



UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE BIOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

Mecanismos de regulación de la expresión de genes shsp durante el desarrollo embrionario: Diferencias transcripcionales y traduccionales con la respuesta al calor.



A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Anabel R.' with a stylized flourish.

Anabel Rojas González

TESIS DOCTORAL

Sevilla, 2001

R.20.447



Mecanismos de regulación de la expresión de genes *shsp* durante la embriogénesis zigótica: Diferencias transcripcionales y traduccionales con la respuesta al calor.

Tesis presentada por la licenciada Anabel Rojas González
para optar al grado de Doctor en Biología

Sevilla, 2001

V°B° Los Directores

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

V°B° El Tutor

Fdo: Isabel López Calderón
Profesor Titular de Genética
Universidad de Sevilla

Fdo: Concepción Almoguera Antolínez
Colaborador Científico del
Consejo superior de
Investigaciones Científicas

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
NEGOCIADO DE TESIS

Queda registrado este Título de Doctor al
folio 165 número 140 del libro
correspondiente. 1 JUN. 2001
Sevilla,

El Jefe del Negociado. _____

P.D.
[Signature]



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE BIOLOGIA
BIBLIOTECA

Doy mi autorización a la Biblioteca de esta Facultad para
que mi Tesis Doctoral Mecanismos de regulación de la
expresión de genes shsp durante el desarrollo embrionario
diferencias transcripcionales y traduccionales con la respuesta
sea consultada, según la modalidad/es indicadas: al calor

- Consulta en depósito.
- Préstamo interbibliotecario.
- Reproducción parcial.
- Reproducción total.
- Tipo de Usuarios.
- Otros términos.

Firmado: _____

[Signature]

Sevilla, a 17 de Diciembre de ~~199~~ 2001

[Signature]

INDICE	i
ABREVIATURAS	ix
I. INTRODUCCIÓN	
Antecedentes	1
Participación de factores reguladores, adicionales a los HSFs, en la activación transcripcional de genes <i>shsp</i> durante la embriogénesis zigótica	5
Elementos en <i>cis</i> implicados en la activación en la activación mediada por HSFs	11
Características estructurales y funcionales de los HSFs	13
Diversidad de HSFs	16
Mecanismos de activación reversible de los HSFs	17
Regulación traduccional durante el choque térmico	21
II. MATERIALES Y MÉTODOS	
1. Material biológico	25
1.1. Material vegetal	25
1.1.1. Especies vegetales	25
1.1.2. Esterilización de las semillas	25
1.1.3. Cultivo <i>in vitro</i>	25
1.1.4. Cultivo de plantas	26
1.1.5. Tratamientos del material vegetal	26
1.1.5.1. Tratamientos con ácido abscísico	26
1.1.5.2. Tratamientos de estrés térmico	26
1.2. Estirpes usadas	27
1.2.1. Bacterias	27
1.2.2. Levaduras	27
2. Transformación y obtención de plantas transgénicas de tabaco	28
2.1. Preparación de células competentes de <i>A. tumefaciens</i>	28
2.1.1. Transformación de <i>A. tumefaciens</i>	28
2.1.2. Transformación de plantas de tabaco vía <i>A. tumefaciens</i>	29
2.1.3. Preparación de las células de <i>A. tumefaciens</i>	29

2.1.4. Transformación de discos de hojas de tabaco	29
2.1.5. Selección de transformantes: enraizamiento y propagación	30
3. Presencia y número de copias del transgén	30
3.1. Presencia del transgén	30
3.2. Número de copias del transgén	30
4. Análisis de la actividad GUS en las plantas transgénicas	30
4.1. Detección histoquímica de la actividad GUS	30
4.2. Cuantificación de la actividad GUS por fluorimetría	31
4.2.1. Extracción de proteínas	31
4.2.2. Cuantificación de las proteínas de los extractos	32
4.2.3. Reacciones fluorimétricas	32
4.2.4. Medición fluorimétrica	32
4.2.5. Cálculo de la actividad b-galactosidasa (GUS)	32
5. Expresión transitoria mediante el bombardeo de micropartículas	32
5.1. Formación de agregados ADN-oro	32
5.1.1. Preparación de las partículas de oro	33
5.1.2. Preparación de los precipitados ADN-oro	33
5.2. Tratamiento del material previo al bombardeo	33
5.2.1. Tratamiento de los embriones	33
5.2.2. Tratamiento de las hojas	34
5.3. Parámetros del bombardeo	34
5.4. Procesamiento del material	34
5.4.1. Medida de actividad luciferasa (LUC)	34
5.4.2. Medida de actividad β -glucuronidasa (GUS)	34
5.4.3. Normalización de las actividades GUS/LUC	35
6. Expresión transitoria en protoplastos de tabaco	35
6.1. Obtención de protoplastos	35
6.1.1. Digestión de las hojas de tabaco	35
6.1.2. Aislamiento de protoplastos	35
6.1.3. Transformación de los protoplastos	36
6.1.4. Extracción de proteínas y medida de la actividad GUS	36
6.1.5. Test de viabilidad de los protoplastos	36

7. Análisis estadístico de los datos	37
8. Transformación de <i>E.coli</i>	37
8.1. Preparación de células competentes de <i>E.coli</i> . Método del RbCl	37
8.1.2. Transformación de <i>E.coli</i> competentes	38
9. Transformación de levaduras	38
9.1. Preparación de células competentes de levaduras	38
9.2. Transformación de levaduras competentes	39
10. Ensayos de actividad β -galactosidasa (β -gal)	39
10.1. Crecimiento y preparación de las células	39
10.2. Medición de la actividad b-galactosidasa	39
11. Purificación y análisis de ADN	40
11.1. Minipreparaciones de ADN plasmídico bacteriano	40
11.2. Purificación de ADN plasmídico para experimentos de expresión transitoria	40
11.3. Cuantificación de ADN	40
11.4. Electroforesis de ADN en geles de agarosa	40
11.5. Extracción de fragmentos de ADN en geles de agarosa	40
12. Manipulación enzimática de ADN	41
12.1. Digestión de ADN con enzimas de restricción	41
12.2. Defosforilación de los extremos 5' del ADN	41
12.3. Generación de extremos romos de ADN	41
12.4. Ligación de moléculas de ADN	41
13. Purificación y análisis de ARN	42
13.1. Preparación de ARN total	42
13.2. Cuantificación de ARN	42
13.3. Electroforesis desnaturizante de ARN.	42
14. Protección frente a la digestión con ARNasa A	43
14.1. Preparación de la ribosonda	43
14.1.1. Transcripción <i>in vitro</i>	43
14.1.1.1. Linearización del plásmido	43
14.1.1.2. Reacción de la transcripción	44
14.1.2. Eliminación de los nucleótidos no incorporados	44

14.1.3. Purificación de la sonda	45
14.2. Hibridaciones	46
14.3. Digestiones con ARNasa A	46
14.4. Electroforesis	46
14.4.1. Marcaje de pBluescriptSK+/HpaII con $\alpha^{32}\text{P}$	47
15. Obtención de proteínas recombinantes en <i>E.coli</i>	47
15.1. Vectores usados de expresión en <i>E.coli</i>	47
15.2. Transformación, crecimiento y condiciones para la expresión	47
15.2.1. Expresión de ABI3 y ABI3 Δ N	47
15.2.2. Expresión de Lp-HSFA1	48
15.2.3. Purificación de proteínas por columna de afinidad	48
15.2.4. Renaturalización de proteínas por diálisis	49
16. Obtención de proteínas en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	49
17. Análisis de proteínas	50
17.1. Electroforesis de proteínas	50
17.2. Tinción de proteínas	50
18. Análisis de Western	50
18.1. Transferencia de proteínas a membranas	51
18.2. Inmunodetección	51
19. Experimentos de retardo en gel	52
19.1. Sondas usadas	52
19.1.1. Marcaje de las sondas	53
19.1.2. Purificación de las sondas mediante cromatografía en minicolumnas de Sephadex	54
19.2. Ensayos de unión <i>in vitro</i>	54
19.2.1. Tratamientos con deoxicolato sódico previos al ensayo de unión <i>in vitro</i> de Lp-HSFA1 a la sonda G4HSE	55
19.3. Resolución en gel de agarosa	55
20. Experimentos de doble híbrido	55
20.1. Vectores y estirpes usados	56
21. Mutagénesis dirigida mediante PCR	56
21.1. Mutagénesis de las regiones con HSEs del promotor <i>Ha hsp17.7G4</i>	56

21.1.1. Obtención del mutante F	57
21.1.2. Obtención del mutante P	58
21.2. Mutagénesis de la región 5'UTR del gen <i>Ha hsp17.7G4</i>	59
21.3. Mutagénesis en el promotor CaMV35s	60
21.4. Mutagénesis de la región con HSE del promotor <i>Ha hsp17.6G1</i>	60
22. Vectores binarios para transformación estable de plantas de tabaco	61
22.1. Genes quiméricos $\Delta 2.2$ y $\Delta Bgl II$	61
22.2. Genes quiméricos G4mutI-G4mutIV	61
23. Plásmidos <i>reporters</i> para expresión transitoria	61
23.1. Genes quiméricos G4WT y derivados con modificaciones en la región con HSEs	61
23.2. Genes quiméricos G4WT(-46) y G4mutE(-46)	62
23.3. Genes quiméricos G1WT y derivados con mutaciones en la región con HSE	62
23.4. <i>Ha ds10G1</i>	63
24. Plásmidos efectores	63
24.1. Heat Shock Factors (HSFs) y derivados	63
24.2. p35s::ABI3	63
25. Vectores para expresión en bacterias	63
25.1. Subclonación de Lp-HSFA1 en vector de expresión para <i>E.coli</i>	63
25.2. Subclonación de ABI3 y ABI3 Δ N HSFA1 en vector de expresión para <i>E.coli</i>	64
26. Vectores de expresión en levaduras	64
26.1. Subclonación de ABI3 Δ N en vector de expresión para levaduras	64
26.2. Subclonación de Lp-HSFA1 en vector de expresión para levaduras	64
27. Construcción de fusiones del promotor G1 con LacZ	64
28. Secuenciación	65
28.1. Reacciones de secuenciación	65
28.2. Electroforesis	65

III. RESULTADOS

Capítulo I. Regulación traduccional de genes quiméricos con el promotor de *Ha hsp17.7G4* durante el desarrollo embrionario

1.1. Participación de la región 5'UTR en el control de la expresión de los genes quiméricos con el promotor <i>Ha hsp17.7G4</i>	67
1.2. Análisis de la expresión durante el desarrollo embrionario de genes quiméricos mutantes en la región 5'UTR del gen <i>Ha hsp17.7G4</i>	72
1.3. Acumulación de ARNm quiméricos mutantes en la región 5'UTR del gen <i>Ha hsp17.7G4</i> en embriones de plantas transgénicas	75
1.4. Respuesta al ácido abscísico de genes quiméricos mutantes en la región 5'UTR del gen <i>Ha hsp17.7G4</i> en germínulas de plantas transgénicas	78
1.5. Respuesta al choque térmico de los genes quiméricos mutantes en la región 5'UTR del gen <i>Ha hsp17.7G4</i> en plantas transgénicas	80

Capítulo II. Regulación transcripcional de genes quiméricos con el promotor de *Ha hsp17.7G4* durante el desarrollo embrionario.

2.1. Transactivación, por Lp-HSFA1, de genes quiméricos con el promotor <i>Ha hsp17.7G4</i> en embriones de girasol	83
2.2. Transactivación por ABI3 del gen quimérico G4WT en embriones de girasol	87
2.3. Sinergismo en la activación transcripcional del gen G4WT por Lp-HSFA1 y ABI3	89
2.4. ABI3 potencia la unión <i>in vitro</i> de Lp-HSFA1 a los HSEs del promotor <i>Ha hsp17.7G4</i> y a un HSE sintético	91
2.5. Efecto de la proteína truncada ABI3 Δ N y requerimiento del dominio de activación de Lp-HSFA1 para la transactivación del gen quimérico G4WT	95

2.6. Transactivación, por ABI3 y Lp-HSFA1, de un promotor mínimo a través de las regiones con HSEs del promotor <i>Ha hsp17.7G4</i> en embriones de girasol	97
2.7. Análisis de la interacción física entre ABI3 y Lp-HSFA1 mediante experimentos de doble híbrido en levaduras	100
2.8. Experimentos de transactivación, por ABI3 y Lp-HSFA1, del gen G4WT en hojas de girasol y protoplastos de tabaco	102

Capítulo III. Regulación transcripcional de genes quiméricos con el promotor *Ha hsp17.6G1*.

3.1. ¿Transactivación por ABI3 del gen quimérico G1WT?	103
3.2. Transactivación por Lp-HSFA1 y Lp-HSFA2 de genes quiméricos con el promotor del gen <i>Ha hsp17.6G1</i>	105
3.3. Transactivación por Lp-HSFA1 de un gen quimérico con el promotor <i>Ha hsp17.6G1</i> y la región con HSEs modificada (mutante P)	106
3.4. Activación transcripcional, por Lp-HSFA1 y Lp-HSFA2, a través de las regiones con HSEs del promotor <i>Ha hsp17.6G1</i> en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	108
3.5. Sinergismo en la activación transcripcional, por Lp-HSFA1 y Lp-HSFA2, del promotor <i>Ha hsp17.6G1</i>	110
3.6. Secuencias mínimas necesarias para la interacción funcional entre Lp-HSFA1 y Lp-HSFA2	114
3.7. Efecto de la mutación de la señal de localización nuclear (K/R2) de Lp-HSFA1 sobre la interacción funcional con Lp-HSFA2	118
3.8. Ensayos de unión <i>in vitro</i> de Lp-HSFA1 y Lp-HSFA2 a la región HSE del promotor <i>Ha hsp17.6G1</i>	120
3.9. Secuencias mínimas necesarias para la interacción funcional entre Lp-HSFA1 y Lp-HSFB1	123

IV. Discusión

Regulación traduccional de la expresión del gen <i>Ha hsp17.7G4</i> en la respuesta al calor y durante la embriogénesis zigótica	129
--	-----

Modelo de activación transcripcional del promotor del gen <i>Ha hsp17.7G4</i> por factores del tipo ABI3	132
Peculiaridades de la activación transcripcional por HSFs del promotor de <i>Ha hsp17.6G1</i>	137
V. Conclusiones	149
VI. Bibliografía	151

Abreviaturas

aa: aminoácido

ABA: ácido abscísico

ABRE: elemento de respuesta a ácido abscísico

ADNc: ADN correspondiente a un ARNm

ARNm: ARN mensajero

ARNt: ARN transferente

ATG: Triplete correspondiente al aminoácido metionina. Sitio de inicio de la traducción.

6BA: N6-benzilamino purina

Bisacrilamida: N, N'-bis-metilén acrilamida

BSA: seroalbúmina bovina

°C: grados centígrados

cm: centímetros

c.p.m: cuentas por minuto

DEPC: dietil pirocarbonato

DMSO: dimetilsulfóxido

D.O: densidad óptica

DOC: deoxicolato sódico

dpa: días post-antesis

dpi: días post-imbibición

DTT: ditioneitol

EDTA: ácido etilen-diamino tetracético

g: gramos

G: aceleración de la gravedad terrestre

GUS: β-glucuronidasa

h: horas

HEPES: N-2 hidroximetil piperazina-N(2)

HSE: elemento en *cis* de respuesta a choque térmico

HSF: factor transcripcional de respuesta a choque térmico.

HSP: proteína de choque térmico.

IAA: alcohol isoamílico

IPTG: Isopropil-B-D-tiogalactopiranosido

kb: miles de pares de bases

KDa: kilodalton.

LB: medio de cultivo de Luria-Bernati

μCi: microcurios

M: molar

mg: miligramos

min: minutos

mm: milímetros

4-MU: 7-hidroxi-4-metilumbeliferona

MUG: 4-metilumberiferil- β -D-glucurónido

NAA: ácido naftaleno acético

ONPG: orto-nitofenil- β -D-galactósido

pb: pares de bases

PEG: polietilenglicol

psi: libras/pulgadas²

rpm: revoluciones por minuto

SDS: docecil sulfato sódico

TEMED: N, N, N', N'-tetrametiletlenodiamina

Tris: tris-(hidroximetil)-aminoetano

U: unidad de actividad enzimática

V: voltios

X-Gluc: 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucurónido

I. INTRODUCCIÓN

Antecedentes

El choque térmico es un aumento transitorio y brusco sobre la temperatura normal de crecimiento que varía entre disitntos organsimos. Ante un choque térmico, todos los organismos responden con un rápido incremento en la síntesis de un grupo de proteínas llamadas proteínas de choque térmico (HSP, *Heat Shock Protein*). Las proteínas sHSP (*small Heat Shock Protein*), forman parte de una de las cinco familias en las que se agrupan las HSP en eucariotas. Las sHSP tienen una tamaño molecular entre 17 y 30 KDa. En plantas, se han clasificado según su homología de secuencia, su localización celular y su reacción inmunológica cruzada en 6 grupos: dos de estos grupos se localizan en el citosol (clases I y II), la clase III se localiza en las mitocondrias, la clase IV en los cloroplastos y la clase V en el sistema de endomembranas y la clase VI también es de localización mitocondrial (revisado en Waters *et al.*, 1996 y Waters y Vierling, 1999). Tras un choque térmico, a unos 5 y 10°C sobre la temperatura normal de crecimiento de las plantas (Nover *et al.*, 1989), las proteínas sHSP constituyen el 1% del total de proteínas en tejidos vegetales (De Rocher *et al.*, 1991). Sin embargo, no sólo el choque térmico induce la expresión de los genes *shsp*. Los tratamientos con análogos de aminoácidos, etanol o metales pesados o bien el estrés hídrico y los tratamientos con la hormona ácido abscísico (ABA, *ABciscic Acid*), también conducen a la expresión de algunos genes *shsp* (revisado por Vierling *et al.*, 1991).

Una de las primeras aportaciones de nuestro grupo al estudio de la expresión de los genes *shsp* vegetales, fue la observación de que algunos de estos genes también se expresan durante el desarrollo embrionario zigótico a temperaturas normales de crecimiento. Inicialmente en nuestro laboratorio se clonaron tres genes *shsp* de clase I de girasol. En la **Fig.1** se muestran las secuencias de nucleótidos de las regiones proximales de los promotores de los tres genes. Los ensayos de transcripción nuclear *in vitro* (*run on*) de estos tres genes, determinaron un patrón de expresión para cada uno de ellos. Así el gen *Ha hsp18.2G2* se induce transcripcionalmente en respuesta al calor en tallos y hojas

de plantas adultas; el gen *Ha hsp17.7G4*, además de inducirse en tejidos vegetativos por calor, respuesta al ABA y estrés hídrico, también se transcribe durante el desarrollo embrionario zigótico a temperaturas normales de crecimiento; y por último, el gen *Ha hsp17.6G1*, es el único gen *shsp* vegetal clonado hasta el momento cuya activación transcripcional está restringida al desarrollo embrionario. (Coca *et al.*, 1996 y Carranco *et al.*, 1997).

Ha hsp17.6 G1

-177 AAAACATTTATAAACGATATATACTAAGAGTTCCACATAATAATCCGTAGAAAAAAGCTTATTCTCTA -108

-107 TCTGTCCAGATAAGTACAGAAATATTCAGAACACTACTACGTTGGCAATATCCAACAGAAGCCACCTCAA -38

-37 CACTTCCCTCCT**TATAAA**TACCACCATTTCATATCCACTCACACAACACATTAACACTCACAACCTCAAAAAC +33

+34 ATTCACCATGTCAATCATTCCAAGCTTTTTCACCAGCAAAAGAAGCAACATATTCGACCCATTCTCCCTA +103

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

Ha hsp17.7 G4

-122 CCTCTGGAACCTTTTCAGAAATATCCATATCCATTCTTCAAGCTTCAAGACAATCCTAGAAATTACTCAC -51

-52 TCTCCCCTTCTTCCCATCT**TATAAA**TGCCACCCCCAATCACATCCATCTCTCAGACAACACACTTCACAA +18

+19 CATTGAAAGCAAGCATTCATCATTATAAACACCCCAACAAAAATATTAAGTTACCAACCATGTTCGATCA +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 AGTATAGAATATTCAGAAATCAACATAACCCAATTCCAAAATAACCATCCAGAACATTCAAGACAGTTT -45

-44 CCAAACCCCTT**TATAAA**CCACAACAACAACCACCCTCCATTTCATCAACAAAACATCAGTTTCCGATTA +26

+27 CTTCAATTCGTTTTTCGCTCAATCAATCACTAAAACAATGTCGATCATTCCAATTTCTTCGGCCGCAGA +96

M S I I P N F F G R R

+97 CGAACAACTGCTTCGACCCCTTCTCTCTAGA +128

R T N C F D P F S L

Fig. 1. Secuencias proximales de los genes de girasol *shsp* de tipo I.

Secuencias de nucleótidos que flanquean los sitios de inicio de la transcripción de los genes *Ha hsp17.6G1*, *Ha hsp17.7G4* y *Ha hsp18.6G2*. Las secuencias están numeradas a partir de los sitios de inicio de la transcripción (sitio 1 para el gen *Ha hsp17.6G1*). Los sitios de iniciación de la transcripción están indicados con una flecha 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). Las repeticiones de pentanucleótidos 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 las secuencias condicantes aparece su traducción a aminoácidos.

Estos diferentes patrones de inducción transcripcional para genes de una misma familia, sugieren la existencia de mecanismos distintos de regulación para estos genes. En todos los promotores de genes *hsp* existen unas secuencias en *cis* denominadas HSE (*Heat Shock Element*), cuyas características se detallan más adelante, que participan en la regulación en la respuesta al calor y durante la embriogénesis zigótica. Los factores transcripcionales de la respuesta al calor se denominan HSFs (*Heat Shock Factors*) y se unen al ADN en las regiones con HSEs. La expresión de un gen quimérico con secuencias del promotor del gen *Ha hsp17.7G4* fusionado al gen *gus* en plantas transgénicas de tabaco, reprodujo los patrones de expresión observado previamente en el sistema homólogo, el girasol, a excepción de la respuesta a estrés hídrico (Coca *et al.*, 1994). Los primeros datos experimentales sobre la participación de los HSEs en la regulación embrionaria de los genes *shsp* proviene de los análisis de delección de los promotores del gen de girasol *Ha hsp17.7G4* y del gen de soja *Gm hsp17.3-B* (respectivamente, Coca *et al.*, 1996 y Prändl y Schöffl, 1996). En estos dos trabajos se demostró que las regiones con HSEs son necesarias para la expresión de genes quiméricos con dichos promotores durante la desecación del embrión.

Un estudio más exhaustivo fue llevado a cabo más tarde con el promotor de girasol *Ha hsp17.7G4* mediante mutagénesis dirigida de las regiones con HSEs. Las mutaciones en cualquiera de las dos regiones con HSEs redujeron drásticamente la activación de dicho promotor durante las fases de desecación del embrión (véase mutantes A y E Almoguera *et al.*, 1998). Estos resultados confirman la necesidad de las regiones con HSEs e implica la participación de HSFs en la regulación de la expresión del gen *Ha hsp17.7G4* durante las fases de desecación del embrión. Sin embargo, este trabajo mostró la existencia de mecanismos dependientes e independientes de HSEs y HSFs para la regulación de la expresión del gen *Ha hsp17.7G4* durante la embriogénesis zigótica. Así, las mutaciones que afectan severamente la activación de este promotor durante las fases de desecación del embrión, no tuvieron ningún efecto en las fases más

tempranas, previas a la desecación (Almoguera *et al.*, 1998, véase mutantes A y E). En cambio, otras mutaciones más extensas en la región con HSEs proximal de este promotor, redujeron la actividad del promotor en las fases tempranas previas a la desecación (Almoguera *et al.*, 1998, véase mutante C). Este último resultado, sugiere que otros elementos en *cis*, situados en posición solapante con su región con HSEs más proximal, participan en la regulación de la expresión de este gen en las fases previas a la desecación del embrión.

Otra observación relevante de este trabajo, fue que las regiones con HSEs participan de forma distinta en la activación del promotor *Ha hsp17.7G4* durante las fases de desecación del embrión y en respuesta al choque térmico en tejidos vegetativos. Así, una misma mutación en la región con HSEs proximal, tuvo unicamente un efecto parcial en la expresión del gen quimerico en las fases tardías del desarrollo mientras que abolió la activación en la respuesta al calor. (Almoguera *et al.*, 1998). Este resultado indicaba la existencia mecanismos de activación transcripcional diferentes para la expresión del gen *Ha hsp17.7G4* en ambas condiciones.

Los estudios realizados con el promotor del gen *Ha hsp17.6G1* fusionado al gen *gus* indicaron la participación de la región con HSEs en la expresión embrionaria en plantas transgénicas de tabaco (Carranco *et al.*, 1999), y por tanto la implicación de HSFs en su regulación transcripcional. De esta forma, en la expresión embrionaria de los genes *Ha hsp17.7G4* y *Ha hsp17.6G1* pudieran existir mecanismos comunes para la regulación transcripcional. Los análisis de deleciones de las regiones más distales de los promotores revelaron que un gen quimérico conteniendo desde la región con HSE distal del promotor *Ha hsp17.7G4* fue suficiente para conducir la expresión tanto en la respuesta al calor como durante el desarrollo embrionario zigótico a temperaturas normales de crecimiento (Coca *et al.*, 1996). Sin embargo, la región con HSE del gen *Ha hsp17.6G1* es necesaria pero no suficiente para la activación transcripcional de dicho gen durante la desecación. Los análisis de deleciones de las secuencias aguas arriba de la región con HSEs del promotor *Ha hsp17.6G1* revelaron la existencia de

elementos reguladores que participan positiva y negativamente en la expresión del gen quimérico (Carranco *et al.*, 1999). Estos resultados confirmaban que la expresión embrionaria de ambos genes estaba regulada por mecanismos distintos. Estos mecanismos distintos pudieran implicar la participación de HSFs comunes y/o diferentes o bien, la participación específica de otros factores embrionarios, junto con los HSFs, para la regulación de cada gen. En el caso del gen *Ha hsp17.6G1*, estos factores embrionarios pudieran unirse a los elementos reguladores positivos y actuar junto con los HSFs. En el caso del gen *Ha hsp17.7G4*, mediante los análisis de deleciones de regiones aguas arriba de las regiones con HSEs no se han identificado otros elementos en *cis* necesarios para la expresión embrionaria de este gen. Sin embargo, estas regiones en *cis* estarían situadas solapando con la región con HSEs más proximal, como ha sido propuesto dado el efecto que presenta el mutante C en la activación del promotor *Ha hsp17.7G4* en las fases previas a la desecación del embrión (Almoguera *et al.*, 1998)

Participación de factores reguladores, adicionales a los HSFs, en la activación transcripcional de genes *shsp* durante la embriogénesis zigótica

La participación de otros factores en *trans* adicionales a los HSFs, pudieran explicar las diferencias en la regulación transcripcional durante la embriogénesis zigótica a temperaturas normales de crecimiento y en la respuesta al calor de los genes *shsp*. Una observación preliminar que apoya la hipótesis de la existencia de mecanismos reguladores específicos de la embriogénesis para los genes *shsp* vegetales deriva de el efecto de los mutantes *abi3* (*ABcistic acid Insensitive*) en *Arabidopsis thaliana*. Los embriones de las plantas de estos mutantes muestran insensibilidad al ABA y por tanto, son capaces de germinar en medio de cultivo en presencia de altas concentraciones de dicha hormona. Los embriones *abi3* son intolerantes a la desecación y están afectados en la expresión de genes que forman parte del programa de desarrollo embrionario, alterando la acumulación de proteínas de reserva, como napinas y cruciferinas y proteínas Lea (*Late Embriogenesis Abundant*), que se acumulan durante la maduración del embrión



(Finkelstein, 1993, Nambara *et al.*, 1992 y Ooms *et al.*, 1993). Uno de los fenotipos que presenta el alelo mutante nulo *abi3-6* es la ausencia de las proteínas HSP17.4 y HSP17.6 en los embriones de las plantas, pero sin afectar a su acumulación en tejidos vegetativos en respuesta al choque térmico (Wehmeyer *et al.*, 1996).

El gen *ABI3* (Giraudat *et al.*, 1992) codifica un factor transcripcional esencial para la regulación mediada por ABA de genes embrionarios. Sin embargo, el análisis de los mutantes *abi3* y *aba1* (este último deficiente en la síntesis de ABA), indicó que la proteína ABI3 modula la expresión de determinados genes embrionarios mediante una ruta dependiente del ABA y otra independiente (Parcy *et al.*, 1994). Así por ejemplo, la acumulación de los ARNm de los genes *At2S3* y *CRC*, que codifican proteínas de reserva napina y cruciferina, respectivamente, se reduce en mutantes *abi3*, mientras que en un mutante *aba1*, su acumulación es comparable a la de un silvestre (Gaubier *et al.*, 1993). Del mismo modo, el mutante *aba1* no tiene efecto en la acumulación de proteínas HSP17.4 y HSP17.6 en embriones en *Arabidopsis thaliana* (Wehmeyer *et al.*, 1996) El efecto del alelo nulo *abi3-6* en la baja expresión de los genes *shsp* durante el desarrollo embrionario, pudiera ser el resultado de efectos pleiotrópicos más que a una participación del factor ABI3 en la activación transcripcional de los genes *shsp*.

La proteína ABI3 muestra una alta homología con VP1 (VIVIPARUS1), un activador transcripcional de maíz que también participa en la regulación de genes embrionarios (McCarty *et al.*, 1991). Otros genes ortólogos a *ABI3/VP1* han sido identificados en otras especies vegetales, como *OsVP1* en arroz (*Oryza sativa*) (Hattori *et al.*, 1994), *PvAlf* de judía (*Phaseolus vulgaris*) (Bobb *et al.*, 1995), *AfVP1* de Avena fatua (Jones *et al.*, 1997), *C-ABI3* de zanahoria (*Daucus carota*) (Shiota *et al.*, 1998), *CpVP1* de la planta de resurrección *Craterostigma plantagineum* (Chandler y Bartels, 1997) y *PtABI3* de álamo (*Populus trichocarpa*) (Rohde *et al.*, 1998). Todas estas proteínas tienen 4 dominios muy conservados, uno de ellos es un dominio ácido localizado en el extremo aminoterminal, que en el caso de VP1 y *PvAlf* se ha demostrado que es un dominio de activación (McCarty *et al.*, 1991 y Bobb *et al.*, 1995, respectivamente), y a continuación

existen tres dominios básicos, B1, B2 y B3. Otras proteínas como, ARF1, una proteína de unión a los elementos de respuesta a auxinas, FUSCA3, un factor transcripcional embrionario de *Arabidopsis* y RAV1, tienen un dominio con alta homología al dominio B3 de ABI3/Vp1 (Ulmasov *et al.*, 1997, Luerksen *et al.*, 1998 y Kagaya *et al.*, 1999, respectivamente).

Los mecanismos de activación transcripcional por factores del tipo ABI3 aún no están muy claros. La regulación de la expresión inducida por ABA de muchos genes embrionarios requieren la presencia de unos elementos en *cis* llamados ABREs (*ABcistic acid Response Elements*). Aunque muchos elementos ABREs contiene la secuencia ACGT, existen ejemplos de ABREs funcionales que no contiene dicha secuencia, como por ejemplo, los elementos ABRE descritos en los promotores de los genes *HaG3* de girasol (Nunberg *et al.*, 1994) y *CdeT27-45* de *Craterostigma* (Nelson *et al.*, 1994). De esta forma, los elementos ABREs se definen por su función más que por su secuencia. Los elementos ABRE que contienen la secuencia ACGT son homólogos a los elementos G-box (Izawa *et al.*, 1993), implicados en en la respuesta a varios estímulos medioambientales como la luz (Giuliano *et al.*, 1988) y la luz ultravioleta (Weisshaar *et al.*, 1991). También se han identificado otros elementos en *cis*, llamados elementos de acoplamiento (CE: *Coupling Elements*), que sólo son activos en combinación con los elementos ABREs (Shen y Ho, 1995 y Shen *et al.*, 1997). Las proteínas capaces de unirse a los elementos ABRE son proteínas del tipo b-ZIP. Varias proteínas que se unen a estos elementos han sido identificadas pero su participación en la transcripción regulada por ABA no ha sido demostrada (Guiltinan *et al.*, 1990, Oeda *et al.*, 1991). *In vitro*, el dominio B2 de VP1 potencia la unión del factor EmBP-1, una proteína del tipo b-ZIP, al elemento ABRE del gen *Em* de trigo (Hill *et al.*, 1996). Este podría ser el mecanismo de activación transcripcional mediado por los factores del tipo ABI3/VP1, sin embargo, la comparación de footprinting *in vivo* del elemento ABRE del promotor *rad28* en embriones silvestre y mutantes en *vp1*, mostraron que la unión de proteínas al elemento ABRE es independiente de VP1 (Busk y Pagés.,1997). Varios autores han propuesto que VP1 se une indirectamente a los elementos ABRE a través de interacciones con proteínas

unidas a dichos elementos o con factores asociados a ellas y VP1 participaría en la activación transcripcional mediante su dominio de activación ácido (Busk y Pagés, 1998, Hattori *et al.*, 1994, y Vasil *et al.*, 1995). De esta forma, los factores del tipo ABI3/VP1 actuarían como coactivadores, sin interaccionar directamente con el ADN. Esta hipótesis ha sido confirmada recientemente tras la caracterización de una proteína del tipo b-ZIP, TRAB-1, que hasta hoy es la única que ha mostrado *in vivo* estar implicada en la transcripción regulada por ABA y dependiente de VP1 (Hobo *et al.*, 1999).

Los factores de tipo ABI3 también potencian la transcripción de otros genes a través de otros elementos en *cis* presentes en los promotores llamados cajas RY, o elementos SphI, que contienen la secuencia CATGCATG. Así el promotor del gen *C1* de maíz, implicado en la biosíntesis de antocianina, es activado transcripcionalmente por VP1. Esta transactivación es independiente de ABA (Hattori *et al.*, 1992). *In vitro*, una proteína VP1 delecionada que contiene únicamente el dominio básico B3, se une específicamente a la secuencia SphI presente en el promotor del gen *C1* (Suzuki *et al.*, 1997). Estos resultados sugieren un mecanismo de activación mediado por factores ABI3/VP1 en el que actuarían como factores transcripcionales canónicos, uniéndose directamente a unas secuencias específicas de los promotores.

Un estudio más exhaustivo de la regulación mediada por ABI3/VP1 han sido realizado recientemente en el promotor de la napina *napA* en *Brassica napus*. En el promotor de este gen, se han identificado dos complejos en *cis* que son requeridos para la activación de un gen quimérico con dicho promotor. Uno de los complejos es llamado RY/G, y está formado por una G-box (similar a un ABRE) y dos repeticiones de elementos RY adyacentes. El otro complejo es llamado B-box y está formado por una parte distal que es un elemento ABRE y otra proximal que es una región rica en CA (citosinas y guaninas) (Ezcurra *et al.*, 1999). Los elementos de cada complejo participan en la activación transcripcional mediada por ABI3 de un gen quimérico con el promotor de gen *napA* (Ezcurra *et al.*, 2000). La participación de los dominios B2 y B3 de ABI3 a través de cada complejo fue

estudiada usando versiones de ABI3 con los dominios B2 o B3 delecionado y distintas construcciones quiméricas con cada complejo aislado y tetramerizado fusionado a un promotor mínimo. La activación transcripcional por ABI3 a través del complejo RY/G requirió el dominio B3 de ABI3. Esta activación transcripcional fue independiente de ABA. Por el contrario, la activación transcripcional por ABI3 a través del complejo B-box, fue dependiente de ABA y del dominio B2 de ABI3, indicando la funcionalidad del elemento ABRE de este complejo. La deleción del dominio B3 también produjo una reducción parcial en la activación transcripcional por ABI3 independiente de ABA a través del complejo B-box. Sin embargo, esta deleción no afectó a la activación transcripcional de un gen quimérico que contiene únicamente el elemento ABRE tetramerizado del complejo B-box. Por lo tanto, el dominio B3 de ABI3 pudiera participar a través del elemento rico en CA del complejo B-box. Todos estos resultados concuerdan con los estudios realizados anteriormente en el promotor del gen *Em* y en el promotor *C1*, de manera que los factores del tipo ABI3/VP1 pueden funcionar como coactivadores de proteínas del tipo b-ZIP a través de elementos ABRE, y como activadores canónicos uniéndose a elementos RY o SphI.

Otros genes, que junto con ABI3, participan en la regulación de la maduración del embrión y en la transición a la germinación han sido identificados, como el gen *LEC1* (Meinke *et al.*, 1992) y *FUSCA 3* (Baümlein *et al.*, 1994 y Keith *et al.*, 1994). Cada uno de estos genes tiene distintos patrones temporales de expresión, y el análisis de dobles mutantes *abi3/fus3* y *abi3/lec1* mostraron que la acumulación de proteína ABI3 era menor que en un mutante simple *abi3* y que en el silvestre, sugiriendo que los genes *LEC1* y *FUSCA 3* regulan la expresión de *ABI3*. Estos factores transcripcionales, no sólo activan ciertos promotores durante la maduración del embrión sino que también reprimen la expresión de genes asociados a procesos post-germinativos. Recientemente se ha demostrado que la expresión de *ABI3* no es específica de los embriones, sino que también se expresa en tejidos vegetativos en procesos de quiescencia. Los procesos de quiescencia forman una parte indispensable en la maduración de las semillas y ayudan a la planta en condiciones adversas arretando el crecimiento

meristemático (Rohde *et al.*, 1999). En las germínulas creciendo en oscuridad la diferenciación de los plástidos se detiene, mientras que las germínulas mutantes *abi3*, llegan a desarrollar los cloroplastos (Rohde *et al.*, 2000).

La expresión ectópica de LEC1 produce la formación de estructuras embrionarias a partir de tejidos vegetativos, sin embargo, la expresión ectópica de FUSCA3 y ABI3 no tiene ningún efecto visible en el desarrollo de la planta, indicando que ninguno de ellos tiene funciones autónomas en la morfología del embrión (Luerksen *et al.*, 1998 y revisado en Holdsworth *et al.*, 1999). La aplicación de ABA en plantas que expresan ectópicamente ABI3 resulta en la acumulación de algunos ARNm de genes embrionarios como algunas proteínas de reserva, pero no de otros que también están regulados por ABI3 en el desarrollo embrionario (Parcy *et al.*, 1994). Este resultado indica que posiblemente otros factores embrionarios participen junto con los factores del tipo ABI3 en los numerosos procesos que ocurren durante el desarrollo embrionario zigótico (véase Apendice I).

Inicialmente, junto con ABI3 se aislaron otros dos mutantes seleccionados también por su capacidad de germinar en medio con concentraciones inhibitorias de ABA (Koornneef *et al.*, 1984), *abi1* y *abi2*. Posteriormente se identificaron otros dos, *abi4* y *abi5* (Finlkenstein, 1994). Las mutaciones, *abi1* y *abi2*, a diferencia de *abi3*, no alteran la acumulación de proteínas de reserva o proteínas Lea, sino que afectan principalmente al crecimiento vegetativo y a la regulación del cierre de los estomas (véase por ejemplo, Finkelstein y Somerville, 1990, Gilmour y Thomashow, 1991). La expresión de ciertos genes específicos de embriones en respuesta a la adición exógena de ABA en tejidos vegetativos que expresan ectópicamente ABI3 está inhibida en las plantas *abi1* mutantes. Estos resultados pudieran indicar que ABI1 y ABI3 interaccionan genéticamente para controlar la respuesta al ABA de algunos genes en tejidos vegetativos (Parcy y Giraudat, 1997). En semillas, tanto la mutación *abi1* como *abi3* inhibirían la ruta de señalización del ácido abscísico, pero el hecho de que la mutación *abi3* tenga un efecto más severo en el desarrollo embrionario que las mutaciones *abi1* y *abi2*,

indica que ABI3 participa también en una ruta controlada por otras señales embrionarias, independiente del ABA. Posteriormente, la caracterización molecular de *ABI1* y *ABI2* reveló que ambos genes codifican proteínas homólogas del tipo 2C fosfatasas (Leung *et al.*, 1997). Los fenotipos que presentan los embriones mutantes *abi4* y *abi5* en cuanto a la insensibilidad al ABA y al grado de dormancia son similares a los que presenta los mutantes *abi3* (Finkelstein, 1994). Otra similitud con los fenotipos que presentan los embriones mutantes *abi3*, es la disminución en la expresión del gen *AtEm6* en los mutantes *abi5*. La clonación del gen *ABI5* ha revelado que se trata de la proteína TRAB1, mencionada anteriormente (Hobo *et al.*, 1999). El gen *ABI4* codifica una proteína de la familia APETALA2 que es un factor transcripcional implicado en la formación floral (Finkelstein *et al.*, 1998).

Elementos en cis implicados en la activación transcripcional mediada por HSFs

Un aspecto común en la activación transcripcional en respuesta a un choque térmico de todos los genes *hsp* presentes en distintos organismos, es la unión de unos factores transcripcionales de choque térmico, (HSFs *Heat Shock Factors*) a unos elementos en *cis* llamados HSEs (*Heat Shock Elements*), que se encuentran en los promotores de estos genes.

Las regiones con HSEs en los promotores de la mayoría de los genes *shsp* están situadas a una distancia de 40 a 270 pb aguas arriba del sitio de inicio de la transcripción. Los HSEs se componen de un número variable de repeticiones contiguas del pentanucleótido nGAAn, que alterna con su orientación inversa, nTTCn, (Xiao y Lis, 1988 y revisado por Fernandes *et al.*, 1994). Los nucleótidos más críticos para la unión de los HSFs a los pentanucleótidos, nGAAn y nTTCn son las guaninas (G) y citosinas (C) subrayadas. Estas secuencias consenso también están conservadas en los promotores de genes *shsp* de plantas (revisado por Gurley y Key, 1991 y Barros *et al.*, 1992). Los nucleótidos que flanquean la parte central más conservada del pentanucleótido han mostrado tener relevancia

para la activación transcripcional por HSFs, siendo más favorecida si el primer nucleótido es un adenina (A) y el último una guanina (G) (Barros *et al.*, 1992). De esta forma, la unidad básica funcional para la unión de un HSF sería aGAAg ó cTTCt.

Los HSFs de *Drosophila melanogaster* y *Sacharomyces cerevisiae* se unen al ADN como homotrímeros lo que explica que sean necesarias tres repeticiones contiguas del pentanucleótido en orientación alterna para la unión eficiente del trímero. De esta manera, cada monómero del HSF contactaría con un pentanucleótido. Sin embargo, los estudios realizados *in vitro* con el HSF de *Drosophila* mostraron que dos repeticiones contiguas del pentanucleótido en orientación alterna, bien empezando por nGAAn o por nTTCn, son suficientes para unir el HSF con similar afinidad en ambos casos. Así, sólo dos monómeros del HSF contactarían con el ADN y uno de ellos quedaría sin contactar. Los dos pentanucleótidos pueden estar contiguos o separados por un espaciamento de 5 pb, pero manteniendo siempre la orientación alterna (Xiao *et al.*, 1991). En plantas se ha mostrado que el HSF1 de expresado en *E.coli* es capaz de trimerizar *in vitro* (Hubel *et al.*, 1995). En general, los requerimientos de secuencia para la unión eficiente *in vitro* de los HSFs vegetales, son similares a los estudiados en sistemas animales (revisado en Gurley y Key, 1991). En los promotores *shsp* de animales y de plantas, la unión de los HSFs a las secuencias HSEs es cooperativa, de manera que la unión de un HSF a los pentanucleótidos consenso en la región con HSEs, favorece la unión de otro HSF a los pentanucleótidos adyacentes (Xiao *et al.*, 1991 y Gurley y Key, 1991). La unión cooperativa de los HSFs observada *in vitro*, se refleja en una mayor activación transcripcional de los genes *shsp* en la respuesta al choque térmico, lo que sugiere la existencia de interacciones cooperativas entre distintos trímeros de HSF unidos a las secuencias HSEs. En los promotores naturales de genes *shsp*, se pueden encontrar varias regiones con HSEs. Las interacciones cooperativas entre HSFs unidos a las distintas regiones con HSEs producen un efecto sinérgico en la activación transcripcional de los genes *hsp* en la respuesta al calor (Amin *et al.*, 1994 y Gurley y Key, 1991). Sin embargo, tanto en animales como en plantas, las regiones HSEs muy distales a la

caja TATA tienen una menor contribución a la actividad transcripcional del promotor que las regiones con HSEs proximales (Gurley y Key, 1991 y revisado en Wu, 1995).

Características estructurales y funcionales de los HSFs

Los HSFs son proteínas multiméricas que tienen la capacidad de oligomerizar. Todos los HSFs identificados hasta hoy en distintos organismos comparten unas características estructurales basadas principalmente en el dominio de unión al ADN y en el dominio de oligomerización.

En la región aminoterminal de los HSFs se encuentra el dominio de unión al ADN que es el más conservado de todos. El dominio de unión presenta un agrupamiento de tres α -hélices empaquetadas junto a una hoja plegada β formada por 4 cadenas que corren antiparalelas. La tercera de las α -hélice, situada en el extremo carboxilo, es la implicada en el reconocimiento del pentanucleótido nGAAn, por lo que la secuencia de aminoácidos de esta región en el dominio de unión es la más conservada entre todos los HSFs, especialmente un residuo de glicina (revisado por Wu, 1995 y Nover y Scharf, 1997). Los aminoácidos que forman esta α -hélice están cargados positivamente y contactan con el ADN mediante interacciones iónicas. El dominio de unión forma una estructura compacta globular, excepto en una región no estructurada formada por 15 aminoácidos que forman un lazo situado entre las cadenas 3 y 4 de la hoja plegada β de los HSFs animales. Los HSFs vegetales carecen de 10 de estos 15 aminoácidos, por lo que este lazo no se forma (Nover y Scharf., 1997).

Una región de secuencia y longitud variables conecta el dominio de unión con el dominio de oligomerización, formado por dos regiones con repeticiones de residuos hidrofóbicos (HR-A/B). En estas regiones existe un patrón característico en el que un aminoácido hidrofóbico está presente tras otros 7 aminoácidos. En la región HR-A, este patrón se repite 5 ó 6 veces, mientras que en la región HR-B, existen 2 repeticiones solapantes de este patrón (revisado por Wu, 1995 y Nover y

Scharf, 1997). Este patrón de aminoácidos hidrofóbicos es característico de los motivos de cremallera de leucina, presentes en otras proteínas de unión (REF:). Las cremalleras de leucina median las interacciones entre proteínas. Las proteínas de la familia de cremalleras de leucinas normalmente se asocian como homo o heterodímero, a diferencia de los HSFs que trimerizan. Una característica exclusiva de HSFs vegetales de clase A, es la inserción de 21 aminoácidos que separan la región hidrofóbica HR-A de la región HR-B. Estos 21 aminoácidos siguen el mismo patrón de aminoácidos hidrofóbicos y solapan con la región HR-A y la región HR-B. Los residuos hidrofóbicos del dominio de oligomerización son variables en cada HSF y se ha propuesto que estas diferencias pudieran contribuir a la especificidad para oligomerizar, explicando así la ausencia de heterotrímeros cuando HSFs distintos son expresados en la misma célula (Clos *et al.*, 1993, Rabindran *et al.*, 1993 y Sistonen *et al.*, 1994).

En la mayoría de los HSFs identificados hasta ahora, a excepción de los HSFs vegetales de clase B, se encuentra otro bloque de repeticiones de aminoácidos hidrofóbicos cargados negativamente en el extremo carboxilo terminal de la proteína (HR-C) y que está implicado en la activación de los HSFs durante el choque térmico (véase más adelante). En esta región, los aminoácidos hidrofóbicos sí están muy conservados entre los HSFs animales, pero no en los HSFs vegetales (Schöffl *et al.*, 1998)).

Otras características presentes en casi todos los HSFs es la presencia de 2 grupos de aminoácidos básicos (K/R1) y (K/R2), adyacentes a los dominios de unión y oligomerización, respectivamente. Los análisis de secuencias de estos dominios muestran una alta homología con señales de localización nuclear, pero sólo en algunos casos han sido definidos funcionalmente. En el HSF2 de humano, ambos motivos son necesarios para una importación eficiente al núcleo en condiciones de choque térmico (Sheldon y Kingston, 1993), mientras que en el HSF1, tan sólo el motivo (K/R1) es necesario (Zuo *et al.*, 1995). En plantas, los HSFs de tomate Lp-HSFA1 y Lp-HSFA2 requieren únicamente el dominio (K/R2) (Lyck *et al.*, 1997). Recientemente se ha caracterizado en Lp-HSFA2 de tomate un

motivo rico en leucina, situado en el extremo carboxilo terminal, que funciona como una señal de exportación nuclear (NES) (Heerklotz *et al.*, 2001).

La región carboxilo terminal es la menos conservada entre los HSFs y en ella se encuentra el dominio de activación. Según la composición de aminoácidos, los dominios de activación se clasifican en ácidos, rico en glutaminas y ricos en prolina (Tjian y Maniatis., 1994). La mayoría de HSFs de vertebrados, *Drosophila* y plantas tienen dominios de activación ácidos con carga negativa y generalmente también enriquecidos en residuos de prolina. La clase B vegetal representa una excepción ya que su dominio de activación tiene carga positiva o neutra (revisado en Nover *et al.*, 1996). Todos los dominios de activación de los HSFs están formados por unos motivos peptídicos cortos con un patrón característico de aminoácidos aromáticos, hidrófobicos y ácidos, AHA (revisado en Nover y Scharf, 1997). Este patrón predice la formación de hélices anfipáticas. Los motivos AHA son los responsables del contacto con los componentes de la maquinaria basal de transcripción (Tjian y Maniatis., 1994). Se ha propuesto que estos contactos contribuyen a la liberación de la ARN polimerasa pausada. Así, en *Drosophila melanogaster*, la proteína de unión a la caja TATA (TBP, *TATA Binding Protein*) interacciona con el HSF y con la ARN polimerasa II. La TBP pueden contribuir al bloqueo de la ARN polimerasa II. El HSF libera a la polimerasa compitiendo con ella por la unión a la TBP (Mason y Lis., 1997).

En plantas, el número de motivos AHA es variable, así por ejemplo en tomate, Lp-HSFA1 y Lp-HSFA2 contienen dos motivos AHA y Lp-HSFA3 presenta 4 motivos AHA (Doring *et al.*, 2000 y Barthi *et al.*, 2000). En todos los motivos AHA de estos tres HSFs de tomate, existe un residuo central de triptófano esencial para la activación (Barthi *et al.*, 2000 y Döring *et al.*, 2000). Los estudios realizados con los HSFs de tomate, Lp-HSFA1 y Lp-HSFA2, mostraron que el contexto ácido del dominio de activación es esencial para la activación por estos HSFs. Las sustituciones de los residuos ácidos del motivo AHA de Lp-HSFA2 por otros residuos con carga negativa, no tuvo efecto en la activación por Lp-HSFA2 de un gen quimérico con el promotor hsp17 de soja en experimentos de transactivación

en protoplastos. Únicamente el cambio de los residuos ácidos a otros cargado positivamente, abolió el potencial activador de Lp-HSFA2. Estos resultados indicaban que la calidad de los residuos aromáticos e hidrofóbicos deben ser decisivas para el reconocimiento y la interacción correcta con los componentes de la maquinaria basal de transcripción (Doring *et al.*, 2000). Las diferencias en los motivos AHA de los HSFs pudieran indicar interacciones específicas entre los HSFs con diferentes factores transcripcionales generales (Barthi *et al.*, 2000).

Diversidad de HSFs

En *Saccharomyces cerevisiae* y en *Drosophila melanogaster* sólo se ha identificado un único HSF, mientras que en sistemas superiores y especialmente en plantas, varios HSFs han sido identificados. Por ejemplo, en *Arabidopsis* se han identificado por el momento más de 20 HSFs distintos. Los HSFs vegetales han sido clasificados basándose en análisis de parsimonia de las secuencias de aminoácidos de los dominios de unión y de los dominios de oligomerización (Nover *et al.*, 1996 y Barthi *et al.*, 2000). De este modo se han clasificado en 7 grupos multigénicos: cuatro de la clase A (A1, A2, A3 y A4) y tres de la clase B (B1, B2 y B3).

La gran diversidad de HSFs en los organismos complejos pudiera indicar la especialización de distintos HSFs en distintas señales de estrés y en su acción conjunta con otros reguladores transcripcionales (revisado en Morimoto, 1998 y Cotto y Morimoto, 1999). La especialización funcional ha sido propuesta para algunos HSFs animales y vegetales. Así el HSF1 de ratón está implicado en la respuesta celular al choque térmico, de manera que los ratones deficientes en la síntesis de HSF1 se desarrollan con normalidad hasta llegar a adultos, pero sus genes de choque térmico no se inducen por calor, afectando la supervivencia del ratón a altas temperaturas (McMillan *et al.*, 1998). El HSF2 se ha relacionado con procesos de desarrollo ya que se activa durante la embriogénesis temprana y la espermatogénesis en el ratón (Mezger *et al.*, 1994 y Sarge *et al.*, 1994, respectivamente). En plantas, se ha propuesto una especialización funcional para

el HSF3 de *Arabidopsis thaliana* basada en la termotolerancia que presentan las plantas que sobre-expresan ectópicamente el HSF3 pero no las que expresan el HSF4 (Prändl *et al.*, 1998).

La diversidad de HSFs en animales, se ve incrementada por procesamientos alternativos (*splicing*) de algunos ARNm que dan lugar a isoformas distintas, como es el caso del HSF1, el HSF2 y el HSF4 de ratón (Fiorenza *et al.*, 1995, Goodson *et al.*, 1995 y Tanabe *et al.*, 1999). Los niveles de expresión de cada isoforma puede variar según el tejido y cada isoforma de un mismo HSF pueden tener diferentes actividades transcripcionales. Así una isoforma del HSF4 actúa como represor de la transcripción constitutiva de genes *hsp* y otra isoforma actúa como activador en la inducción por calor (Tanabe *et al.*, 1999). Del mismo modo, algunos HSFs vegetales de clase B no tienen capacidad de activación transcripcional aunque se unan a las secuencias con HSEs y se ha propuesto que esto HSFs puedan funcionar reprimiendo la expresión de los genes *hsp* en ausencia de estrés térmico (Czarnecka-Verner *et al.*, 2000).

En plantas, la diversificación de la expresión de los genes *shsp* puede resultar aún más compleja debido a la capacidad de oligomerizar entre distintos HSFs de tomate de clase A. Esta característica ha sido observada únicamente entre los HSFs de clase A de tomate, probablemente debida a la presencia de una inserción de 21 aminoácidos en su dominio de oligomerización que, como comentamos anteriormente, sólo está presente en esta clase de HSFs (Scharf *et al.*, 1998 y Barthi *et al.*, 2000).

Mecanismos de activación reversible de los HSFs

La activación de un HSF inducida por calor está muy bien estudiada y conservada en todos los organismos. Los HSFs de *Drosophila* y de vertebrados permanecen en estado monomérico en el núcleo y citoplasma en condiciones normales de crecimiento. En esta forma inactiva del HSF como un monómero, se dan interacciones intramoleculares de las repeticiones hidrofóbicas (HR-A/B) y

(HR-C), por lo que el monómero es incapaz de unirse al ADN y activar la transcripción de genes *hsp* (revisado por Morimoto, 1998). Estas interacciones intramoleculares de los HSFs son estabilizadas por la unión transitoria con chaperonas como HSP70 y HSP90. Durante el choque térmico, las interacciones se rompen y el dominio de oligomerización (HR-A/B) interacciona con el dominio de oligomerización (HR-A/B) de otro monómero de HSF formándose así trímeros activos de HSFs que son capaces de unirse al ADN (Wu, 1995, Shöffl *et al.*, 1998).

La activación de los HSFs induce su unión al ADN y la transcripción de los genes *hsp*. La alta acumulación de proteínas HSP provocan la atenuación de la respuesta al choque térmico mediante la regulación negativa de la actividad del HSF. Algunas chaperonas como HSP70 y HSP90, se unen al trímero de HSF y éste se disocia para dar lugar de nuevo al estado monomérico inactivo (Cotto y Morimoto, 1999, Shöffl *et al.*, 1998) Otras proteínas llamadas proteínas de unión al HSF, HSFBP (*Heat Shock Factor Binding Protein*), han sido identificadas en sistemas animales y también participan en la regulación negativa de la actividad del HSF uniéndose tanto al trímero de HSF como a las proteínas chaperonas asociadas a él (Satyal *et al.*, 1998). Un HSF *in vitro* es capaz de cambiar de conformación y unirse al ADN en un choque térmico, por lo que el propio HSF pudiera actuar como un sensor directo del estrés térmico (Zhong *et al.*, 1998).

Sin embargo, la unión al ADN no parece ser suficiente para la activación transcripcional de promotores *shsp* ya que por ejemplo en *Saccharomyces cerevisiae*, su único HSF está inactivo y unido constitutivamente al ADN (Sorger y Pelham., 1988). La activación de un HSF es un proceso muy complejo que puede estar regulado en múltiples pasos, antes y después de la unión a las secuencias HSEs. Así por ejemplo, la importación nuclear representa un nivel en el que la activación transcripcional de un promotor por un HSF puede estar regulado. Una de las interacciones funcionales observadas entre HSFs vegetales de clase A está relacionada precisamente con el importe nuclear. En plantas, mediante técnicas inmunológicas usadas en protoplastos de tabaco transformados con un plásmido

que expresa el ADNc de Lp-HSFA1, se observó que en condiciones normales de crecimiento, este HSF se distribuye entre el núcleo y el citoplasma. Tras un choque térmico, la distribución de Lp-HSFA1 se convierte en nuclear. La importación al núcleo de Lp-HSFA1 requiere la integridad de su dominio (K/R2). Los mismos experimentos realizados con Lp-HSFA2 revelaron que este HSF permanece en el citosol tanto en condiciones normales como en el choque térmico (Lyck *et al.*, 1997). En presencia de Lp-HSFA1 con el dominio (K/R2) funcional, Lp-HSFA2 es importado eficientemente al núcleo a temperaturas control y más acusadamente durante el choque térmico. El importe nuclear de Lp-HSFA2 asistido por Lp-HSFA1 también requiere la integridad del motivo (K/R2) de Lp-HSFA2, ya que las mutaciones en este motivo impiden su importación nuclear incluso en presencia de Lp-HSFA1. (Scharf *et al.*, 1998). El análisis de las interacciones físicas de ambos HSFs mediante el sistema del doble híbrido en levaduras y experimentos de coimmunoprecipitación, determinaron que tanto los motivos (K/R2) como los dominios de oligomerización (HR-A/B) de ambos HSFs son necesarios para dicha interacción.

La importación al núcleo también puede estar regulada por mecanismos independiente del estrés térmico. En *Drosophila*, la expresión de proteínas HSP70 resulta en una mayor tolerancia al choque térmico, sin embargo, en los estadios tempranos del desarrollo del embrión donde existe una alta tasa de división nuclear, la presencia de estas proteínas causan efectos negativos para el crecimiento celular. Por ello, muchos otros organismos al igual que *Drosophila* han desarrollado un mecanismo para restringir la transcripción de los genes *hsp70* en las fases temprana de la embriogénesis. El bloqueo de la entrada nuclear del HSF de *Drosophila* en estas etapas del desarrollo embrionario, incluso tras un choque térmico, es la causa de dicha restricción transcripcional. En las etapas más tardías de la embriogénesis y en aquellos tipos celulares donde se induce la expresión de los genes *hsp70*, el HSF entra en el núcleo en ausencia de estrés. Por lo tanto, en *Drosophila*, el transporte del HSF está regulado por el estadio del desarrollo y por el tipo celular y es independiente del estrés térmico (Wang *et al.*, 1998).

El estado de fosforilación de los HSFs también puede modular su potencial transcripcional. En células de mamíferos, tanto los tratamientos de choque térmico como la exposición a sustancias, tales como el salicilato sódico, induce en ambos casos la formación de trímeros activos del HSF1 que se unen a las secuencias HSE. Sin embargo, los análisis de transcripción nuclear *in vitro* (*run on*) mostraron que sólo los HSFs inducidos por estrés térmico eran capaces de activar la transcripción del gen *hsp70*, mientras que los HSFs inducidos por salicilato eran transcripcionalmente inertes. La comparación en los patrones de fosforilación de ambas formas inducidas de HSFs revelaron que el HSF1 inducido por calor presentaba un nivel de fosforilación mayor que los HSFs inducidos por salicilatos. Estos estudios indicaron que la fosforilación inducida por calor ocurre posteriormente a la unión del trímero activo a las secuencias de ADN y que dicha fosforilación está correlacionada con el potencial transcripcional del HSF (Cotto *et al.*, 1996). Otros estudios posteriores mostraron que al menos 4 residuos de serina /treonina eran fosforilados en el HSF1 de humanos durante el choque térmico y esta fosforilación además de potenciar la actividad transcripcional del HSF, reduce la tasa de disociación del trímero después del choque térmico, prolongando la actividad del HSF (Xia y Voellmy, 1997).

Se han descrito interacciones de los HSFs con distintos componentes de la maquinaria basal de transcripción tanto en sistemas animales como en vegetales. Así por ejemplo, el HSF1 de humanos interacciona con los factores TFIIA y TFIIB, así como con los factores asociados a la caja TATA, TAF_{II}32 y TAF_{II}55 (Yuan y Gurley, 2000). Como comentamos anteriormente, la interacción entre el HSF de *Drosophila melanogaster* y la proteína de unión a la caja TATA también ha sido descrita (*Tata Binding Protein*, TBP) (Mason y Lis, 1997). En plantas, el HSF1 de *Arabidopsis* interacciona *in vitro* con la TBP (Reindl y Schöffl., 1998). Los contactos entre los HSFs y los componentes de la maquinaria basal de transcripción, pueden ser diferentes dependiendo de la conformación que adopte un HSF unido al ADN, según la disposición espacial de los pentanucleótidos en las regiones con HSEs. Así por ejemplo, en levaduras, su único HSF es capaz de unirse, *in vitro*, con la misma afinidad al promotor *CUP1* que a un promotor *CUP1*

modificado en el que se ha aumentado el número de pentanucleótidos consenso para la unión de los HSFs. Sin embargo, la expresión de un gen *reporter* conducido por el promotor *CUP1* modificado fue mucho mayor que la actividad del *reporter* conducido por el promotor nativo *CUP1* en la respuesta al calor. El HSF de levadura unido al promotor *CUP1* mostró diferente sensibilidad a la digestión por quimi tripsina que el HSF unido al promotor *CUP1* modificado, indicando que el HSF adoptan una conformación distinta según la secuencia de ADN a la que se unen (Santoro *et al.*, 1998). Por lo tanto, la arquitectura y la disposición espacial de los nucleótidos en las regiones con HSEs representan otro nivel de regulación transcripcional de los genes *shsp*.

Regulación traduccional durante el choque térmico

Durante un choque térmico, la transcripción de la mayoría de los genes se detiene y los que han sido ya transcritos no son traducidos, aunque tampoco son degradados. Por el contrario, el choque térmico induce la transcripción de los genes *hsp* y se estimula la síntesis de proteínas HSP (véase Duncan, 1996 y Vaida *et al.*, 1998). Por lo tanto, el aumento en las proteínas de choque térmico se debe tanto a una mayor transcripción de sus ARNm como a una eficiente traducción de los mismos. La mayor traducción del ARNm de los genes *hsp* pudiera deberse bien a una inducción específica de la traducción o a un escape de la represión traduccional a la que se ven sometidos el resto de la población de ARNm. La mayor abundancia de los transcritos de ARNm *hsp*, inducidos por calor, podrían ser la causa del escape de la represión traduccional. Sin embargo, los estudios realizados por Klemenz *et al.*, demostraron que el aumento de los ARNm transcritos a partir del promotor del gen *hsp70* de *Drosophila*, en un choque térmico, no eran suficientes para la traducción de los ARNm y que la región 5'UTR del gen *hsp70* eran necesarios para la traducción preferencial (Klemenz *et al.*, 1985). En este trabajo se fusionó el gen de la alcohol hidrogenasa (*Adh*), que no es inducido por calor, al promotor del gen *hsp70* de *Drosophila*. La activación transcripcional del promotor como consecuencia de un choque térmico, resultó en una alta acumulación de los ARNm correspondientes al gen *Adh*. Sin embargo

estos mensajeros no fueron traducidos. El mismo experimento realizado con una fusión similar a la anterior, pero conteniendo la región 5'UTR del gen *hsp70* resultó en una traducción eficiente de los ARNm quiméricos. Otras observaciones tanto en sistemas animales como en plantas indicaban la participación de las regiones 5'UTR de los genes *hsp* para la traducción selectiva de los ARNm durante el choque térmico, pero se desconocía cómo actuaba la región 5'UTR (Klemenz *et al.*, 1985, McGarry y Lindsquist., 1985, Shöffl *et al.*, 1989 y Pitto *et al.*, 1992). En la región 5'UTR del gen *hsp70* de *Drosophila*, existen dos regiones situadas en la mitad y en el extremo 5' que están muy conservadas. La delección de ambas regiones resulta en una pérdida de la traducción en el choque térmico, sin embargo, el mantenimiento de una de ellas permite la traducción preferencial. Estos resultados pudieran indicar la redundancia en la función de estos dos motivos (Hultmark *et al.*, 1986 y McGarry y Lindquist, 1985). La dependencia de estas regiones para la traducción preferencial sugiere la participación de factores en *trans* que interaccionarían con dichas secuencias delecionadas. Hasta hoy, no hay ninguna evidencia que demuestre la unión específica de factores nucleares a los ARNm transcritos durante el calor (Hess y Duncan., 1994). En general, las secuencias de las regiones UTR de los genes *hsp* son muy ricas en A-U (adenina y uracilo). Esto hace las estructuras secundarias que se forman en el ARNm sean muy inestables. Se ha propuesto que esto pudiera ser una de las razones por la que los ARNm sintetizados en el choque térmico sean traducidos de forma eficiente. (Hess *et al.*, 1996).

La inhibición global de la síntesis de proteínas durante un choque térmico provoca cambios en el estado de fosforilación de los factores generales de la traducción que son los que reconocen la caperuza que está unida en el extremo 5' de los ARNm (cap, m⁷GpppN). Así por ejemplo, se ha observado que la defosforilación del factor eIF-4E media el arresto traducional (Lampher y Panniers, 1991). De esta forma, la inactivación del complejo de unión al cap inhibe la traducción de la mayoría de los ARNm celulares. Sin embargo, los ARNm *hsp* no parecen requerir de la maquinaria de reconocimiento del cap para la traducción. Más aún, la expresión de un ARN antisentido del factor eIF-4E en células HeLa,

reduce la síntesis de proteínas a excepción de proteínas como HSP90, HSP70, HSP60 y HSP27, cuya síntesis no se ve afectada (Joshi-Barve *et al.*, 1992). Los ARN de origen viral tanto de plantas como de animales, no contiene cap y en el inicio de la traducción independiente del cap, los ribosomas se unen a regiones internas del 5'UTR. La destrucción de los factores de iniciación de la traducción es una estrategia que siguen los virus animales para bloquear la síntesis de proteínas del hospedador y continuar la traducción de proteínas virales. Una situación similar es encontrada en los virus de plantas. Las regiones 5'UTR de los virus no contiene cap y los ribosomas se unen a regiones internas para el comienzo de la traducción. Los genes quiméricos conteniendo un motivo identificado en el virus del mosaico del tabaco, el motivo Ω , son traducidos eficientemente durante el choque térmico (Gallie y Walbot, 1990). Otras secuencias de virus vegetales que median la traducción independiente del cap, han sido identificadas (Turner *et al.*, 1994, Carrington y Freed, 1990, Futterer y Hohn, 1991 y Zijlstra y Hohn, 1992).

Una evidencia de que la traducción de los ARNm *hsp* pudiera ser similar a la de los ARNm virales fue la inserción de las regiones 5'UTR de las proteínas de choque térmico BiP (proteína de unión a la cadena pesada de la inmunoglobulina) y GRP (proteína regulada por glucosa) entre dos cistrones, demostrándose que la traducción era iniciada internamente (Macejak y Sarnow, 1991). El sitio de unión interno para los ribosomas en los polivirus es una secuencia complementaria al ARNr 18S. Joshi y Nguyen, recopilaron las secuencias de 139 regiones 5'UTR de genes *hsp* y analizaron tanto la longitud de estas regiones, como el contenido en GC y la presencia de motivos complementarios a una región conservada del ARNr 18S. Ni la longitud ni el contenido en GC fueron claramente una característica exclusiva de genes *hsp*. La comparación con regiones de secuencias presentes en el ARNr 18S, reveló la existencia de numerosos motivos distintos en las regiones 5'UTR de los genes *hsp*. Esta variedad de motivos pudiera indicar que el mecanismo de entrada del ribosoma podría ser específico para cada gen o familia de genes *hsp*. Algunos de estos motivos también fueron encontrados en regiones 5'UTR de algunos genes que no pertenecen a la familia *hsp*. Quizás la utilización

de estos motivos como entrada interna del ribosoma requiera la presencia de ARNm recién transcritos que no tengan el cap, es decir, de los ARNm recién sintetizados en la respuesta al calor (Joshi Y Nguyen, 1995). En definitiva, los aspectos estructurales de los ARNm hsp responsables para la traducción preferencial no están aún muy claros y el modelo propuesto para el inicio de la traducción interna de estos ARNm requiere más evidencias experimentales.

Objetivos y relevancia de esta tesis.

Los objetivos de esta tesis están centrados principalmente en el estudio de la regulación de los genes *Ha hsp17.7G4* y *Ha hsp17.6G1* durante la embriogénesis zigótica. En el caso del gen *Ha hsp17.7G4*, intentamos definir los mecanismos de regulación, tanto transcripcionales como traducionales, durante el desarrollo embrionario que difieren de la regulación de la expresión de este gen en la respuesta al calor. El estudio de la regulación traducional del gen *Ha hsp17.7G4* ha sido realizado mediante la obtención de plantas transgénicas portadoras de distintos genes quiméricos. En este trabajo se ha optimizado un sistema de expresión transitoria por bombardeo de micropartículas de oro cubiertas de ADN. Este tipo de ensayo nos ha permitido complementar el estudio de la regulación transcripcional de la expresión de genes quiméricos con secuencias de promotores de los genes *Ha hsp17.7G4* y *Ha hsp17.6G1*, realizado previamente en plantas transgénicas de tabaco (Coca *et al.*, 1996, Almoguera *et al.*, 1998 y Carranco *et al.*, 1999).

Los factores transcripcionales ensayados en este trabajo (ABI3 y HSFs de tomate) están muy conservados entre las distintas especies vegetales. Dado que en girasol estos factores aún no están identificados, la utilización de factores heterólogos, previamente caracterizados de forma muy detallada, ha sido una alternativa útil para el estudio de la regulación transcripcional de estos genes.

II. MATERIALES Y MÉTODOS.

1. Material biológico.

1.1. Material vegetal.

1.1.1. Especies vegetales.

Se han empleado plantas de girasol (*Helianthus annuus* L. cv. Sunweed) procedentes de semillas proporcionadas por Rhone-Poulenc Agrochimie. Para los experimentos de transformación de plantas se usaron discos de hojas obtenidos a partir de brotes de tabaco (*Nicotiana tabacum* var. Xanthi). Los protoplastos fueron obtenidos a partir de *Nicotiana plumbaginifolia*.

1.1.2. Esterilización de semillas.

Antes de la germinación, la superficie de las semillas tanto de girasol como de tabaco se esterilizaron mediante lavados sucesivos en etanol al 70% (1 min.), en hipoclorito sódico 2% con una gota de Tritón X-100 (30 min.) y finalmente, varios lavados en agua destilada estéril. 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 + kanamicina 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (MSK). Se incubaron en cámaras de cultivo con iluminación y temperatura controladas (16 h de luz, 25°C; 8 h de oscuridad, 20°C).

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_4NO_3 ; 19 g/l KNO_3 ; 4.4 g/l $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 3.7 g/l $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1.7 g/l KH_2PO_4 .

Micronutrientes MS x 100: 0.62 g/l H_3BO_3 ; 2.23 g/l $\text{MnSO}_4\cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 0.86 g/l $\text{ZnSO}_4\cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 0.083 g/l KI; 0.025 g/l $\text{Na}_2\text{MoO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 2.5 mg/l $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$; 2.5 mg/l $\text{CoCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$.

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_2EDTA ; 5.56 g/l $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$. El Na_2EDTA se disuelve en agua, se añade el $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y se calienta a 100°C durante 2 ó 3 min.. Se guarda en oscuridad a 4°C.

1.1.3. Cultivo *in vitro*.

La manipulación del tejido vegetal en condiciones estériles se realizó en una cabina de flujo de aire horizontal, con medios esterilizados por autoclave, y pinzas y bisturíes esterilizados por calor. El material vegetal se cultivó en cámaras con la iluminación y la temperatura controladas (véase 1.1.2). El cultivo *in vitro* ha sido empleado para la propagación vegetativa de plantas de tabaco, transformación, regeneración y propagación de las plantas transgénicas, estudios de la segregación

de la F1 de las plantas transgénicas en medio selectivo y estudios de respuesta en germínulas a tratamientos con ácido abscísico (ABA). El medio base utilizado fue MS. Los medios se esterilizaron mediante autoclave a 120°C y 1 atmósfera de sobrepresión durante 20 min.. Los antibióticos se añadieron una vez enfriado el medio a 50-55°C. Se utilizaron cajas Petri y contenedores Magenta (Sigma).

1.1.4. Cultivo de plantas.

Las plantas de girasol y tabaco se cultivaron en cámaras con luz, temperatura y humedad controladas. Se sometieron a un régimen de 16 h. de luz a 25°C y 8 h. de oscuridad a 20°C, con una humedad relativa constante del 80%. Se cultivaron en macetas en una mezcla 4:1 de turba y perlita. Las plantas transgénicas de tabaco originales, obtenidas tras la transformación de discos de hojas, se cultivaron en medio MSK hasta su completo enraizamiento. Posteriormente se traspararon a macetas donde se cultivaron en las condiciones anteriormente descritas.

1.1.5. Tratamientos del material vegetal.

1.1.5.1. Tratamientos con ácido abscísico.

Las semillas procedentes de las plantas transgénicas de tabaco, tras esterilizarlas como se describe en el apartado 1.1.2, se germinaron en MSK. Después de 15 días, las germínulas resistentes a kanamicina se pasaron a placas conteniendo MSK (germínulas control) o en medio 100 μ M de ABA en MSK (germínulas tratadas con ABA) durante 4 días. Después del tratamiento, el material fue congelado inmediatamente en N₂ líquido. Las muestras se guardaron a -80°C hasta su procesamiento.

1.1.5.2. Tratamientos de estrés térmico.

Las plantas transgénicas de tabaco que se iban a someter a tratamientos de choque térmico se cultivaron 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 obtuvieron dos plantas clónicas: una de ellas se sometió al correspondiente tratamiento y la otra se utilizó como control. Las plantas adultas de tabaco se regaron antes de empezar cada tratamiento. Las plantas se sometieron a tratamientos de choque térmico de 42°C durante 2 h. y media en cámaras iluminadas y con una humedad relativa del 80%. Inmediatamente tras el tratamiento, se recogieron muestras de tallo de la zona proximal al meristemo apical y muestras de hojas y se congelaron en N₂. Las muestras se guardaron a -80°C hasta su procesamiento.

1.2. Estirpes usadas.

Las estirpes empleadas en este trabajo son las siguientes:

1.2.1. Bacterias.

Escherichia coli:

-XL1-Blue cuyo genotipo es *recA1 endA1 gyrA96 thi hsdR17 supE44 relA1 lac* {F'*proAB lacq ZDM15Tn10(tetR)*}. (Bullock *et al.*, 1987). Esta estirpe se usó para la transformación y la multiplicación de plásmidos

-BL21(DE3), cuyo genotipo es *hsdS gal (λclts857 ind1 Sam7 nin5 LacUV5-T7 gene1)* (Studier *et al.*, 1986). La estirpe BL21(DE3) se usó para la obtención de proteínas recombinantes. Esta estirpe proporciona unos altos niveles de expresión de genes clonados en vectores bajo el promotor del bacteriófago T7. El gen de la polimerasa de ARN del bacteriófago T7 está integrado en el cromosoma de esta estirpe y su expresión es inducida por **IPTG** (Isopropiltio-β-D-galactósido).

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.

-*Agrobacterium tumefaciens*

LBA4404. Esta estirpe lleva el plásmido Cr (críptico), pAL4404 en el fondo cromosómico C58-C9 (Hoekema *et al.*, 1983).

La estirpe de *A. tumefaciens* LBA4404 se ha empleado para la transformación de discos de hoja de tabaco. Esta estirpe se cultivó a 28°C en medio **YEP** suplementado con 250 mg/L de estreptomina. Las bacterias transformantes se seleccionaron en medio normal de cultivo suplementado con 100 mg/L de kanamicina.

Medio LB: 10g/L bacto triptona, 5 g/L extracto de levadura y 10 g/L NaCl pH 7,0.

Medio YEP: 10g/L bacto triptona, 10 g/L extracto de levadura y 5 g/L NaCl pH 7,0.

Para preparar medio sólido se añade (en ambos casos) 15 g/L de agar bacteriológico.

IPTG: Se prepara una solución 100mM en H₂O destilada.

1.2.2. Levaduras.

Las estirpes de levaduras usadas en este trabajo son las siguientes:

-RSY4 (haploide), derivada de la estirpe diploide RY10 y cuyo genotipo es MAT *a/α ade2/ade2, ade6, can1/can1, his3, 11, 15/ his3, 11, 15, leu2-3, 112/ leu2-3,*

112, *trp1-1/ trp1-1, ura3-1/ ura3-1*) (Boscheinen *et al.*,1997). Esta estirpe tiene deletado el gen que codifica para el factor de transcripción HSF1, Sc-HSF1. La deleción se hizo introduciendo el plásmido pRS303 (His) que contenía fragmentos 5' y 3' del gen HSF1 de *Sacharomyces* a ambos lados del gen de la histidina. La recombinación homóloga y la introducción de esta cassette en el locus *hsf1* resulta en la escisión del 71.4% de la región codificante.

Antes de la interrupción del gen *Sc-hsf1*, la estirpe es transformada con un plásmido expresando el ADNc de *Sc-hsf1* y permitiendo así la viabilidad de la levadura. El marcador de este plásmido es uracilo, permitiendo la contraselección de las estirpes que lo han perdido creciéndolas en medio con **FOA**, un análogo de pirimidina. Antes de la contraselección, estas estirpes son transformadas con los plásmidos que expresan los HSFs de tomate. El crecimiento en FOA y la viabilidad de esta nueva estirpe dependerá de si el HSF de tomate es capaz de reemplazar al endógeno de *Sacharomyces*. (Boschein *et al.*,1997).

Esta estirpe se usó para el estudio de la transactivación del *promotor Ha hsp17.6 G1* por distintos HSFs de tomate.

-HF7c, cuyo genotipo es *MATa, ura3-52, his3-200, lys2-801, ade2-101, trp1-901, leu2-3,112, gal4-542, gal80-538, LYS2::GAL1-HIS3, URA3::(GAL4 17-mers)₃-CYC1-lacZ* (Feilotter *et al.*, 1994) Esta estirpe fue usada para el estudio de la interacción física de ABI3 y Lp-HSFA1.

FOA: Ácido 5 fluoroacético. Las placas se preparan añadiendo FOA a una concentración de 1mg/mL de medio.

2. Transformación y obtención de plantas transgénicas.

2.1. Preparación de células competentes de *A. tumefaciens*.

Se ha seguido el protocolo de Holsters *et al.* (1978). Con una colonia de la estirpe de *A. tumefaciens* apropiada se inoculan 5 mL de medio YEP y se incuban a 28°C durante la noche. Con 2 mL de este cultivo se inoculan 80 mL de medio, y se cultivan a 28°C hasta $D.O_{600nm} = 0.5-1$. Se recogen las células por centrifugación a 3000 g y 4°C durante 10 min. y se resuspenden en 1.6 mL de 20mM CaCl₂ frío. Las células se dispensan en alícuotas de 100 μ L y se guardan a -80°C o se usan inmediatamente.

2.1.1. Transformación de *A. tumefaciens*.

A 100 μ L de células competentes se les añade al menos 1 μ g de ADN plasmídico, en un volumen menor de 10 μ L, y se congelan en nitrógeno líquido. A continuación, se descongelan a 37°C durante 5 min., y se añade 1 mL de medio YEP. Se incuban a 28°C con agitación suave durante 3 h. y se extienden en cajas Petri con el medio de selección apropiado.

2.1.2. Transformación de plantas de tabaco vía *Agrobacterium tumefaciens*.

En este trabajo se han transformado plantas de tabaco con distintas fusiones traducionales y transcripcionales del promotor del gen *Ha hsp17.7G4* al gen que codifica la β -glucuronidasa (*gus*). El método utilizado para transformar plantas de tabaco fue el descrito por Horsch *et al.* (1985).

2.1.3. Preparación de las células de *A. tumefaciens*.

Se inocula una colonia de *A. tumefaciens* portadora de la construcción a introducir en plantas, en 50 mL de **medio YEP** suplementado con 100 μ g/mL de kanamicina y 100 μ g/mL de estreptomicina. Se cultiva a 28°C durante 48 h. con agitación. Posteriormente, las células se centrifugan a 3.500 rpm durante 20 min. y se resuspenden en 25 mL de medio MS sin antibióticos, y en condiciones de esterilidad. De esta forma, las células están preparadas para la transformación.

Medio YEP: 5g/L de extracto de levadura, 10g/L de NaCl y 10g/L de pectona.

2.1.4. Transformación de discos de hoja de tabaco.

Se requieren plantas silvestres de tabaco crecidas *in vitro* en condiciones de esterilidad. Las hojas de plantas jóvenes (3-4 semanas) se cortan en trozos de 1 cm² aproximadamente, eliminando el nervio central. Los discos de hojas se sumergen en el cultivo de *A. tumefaciens* en medios **MS** preparado para la transformación durante 5 min. Posteriormente, estos discos de hoja se colocan con el haz hacia arriba en placas Petri con de medio **MS** y se incuban 5 días en la cámara de cultivo. El quinto día, los discos de hoja son traspasados a medio **MS** con antibióticos, 250 μ g/mL de carbenicilina o cefotaxina (para eliminar las bacterias) y 50 μ g/mL de kanamicina (para seleccionar brotes transgénicos). A los 15-20 días empiezan a proliferar los callos y posteriormente brotes de plantas (30 días aproximadamente).

Medio MS: 100 mL/L Macronutrientes MS x10; 10 mL/L Micronutrientes MS x100; 10 mL Vitaminas MS x100; 5 mL/L Solución de hierro MS x200; 30 g/L Sacarosa; 0.3 mg/L Tiamina-HCl; 2 mg/L 6-Benzil-aminopurina (6BA); 0.01mg/L ácido naftaleno acético (NAA). Se ajusta el pH a 5.6 con NaOH 1M. Se añade 0.1 g/L de Mio-Inositol y 10g /L agar (Difco).

Reguladores de crecimiento: NAA y 6BA se preparan como soluciones concentradas a 1 mg/mL, disolviendo las hormonas en un pequeño volumen de NaOH 1M y añadiendo después agua hasta el volumen final.

2.1.5. Selección de transformantes: enraizamiento y propagación.

Se cortan los brotes de plantas y se traspasan a contenedores Magenta con medio de enraizamiento MS con kanamicina 100 $\mu\text{g/mL}$ y carbenicilina 250 $\mu\text{g/mL}$. Se consideran falsos transformantes aquellos incapaces de enraizar en medio selectivo.

Las plantas se mantienen en cultivo *in vitro* en cámaras hasta que alcanzan una altura de 5-15 cm, momento en el que se traspasan a macetas con tierra, acondicionándolas al cambio de humedad con bolsas de plástico, y cultivándolas en una cámara de cultivo hasta su desarrollo completo.

3. Presencia y número de copias del transgén.

Las plantas de tabaco fueron analizadas para comprobar si eran transgénicas y determinar cuántas copias del transgén tenían integradas en su genomio.

3.1. Presencia.

Por razones que desconocemos, las plantas transgénicas que contienen el gen quimérico con el promotor del gen *Ha hsp17.G4*, se expresan constitutivamente en los tricomas de dichas plantas. Nos hemos servido de este fenómeno para detectar tanto la presencia como la expresión del transgén. Así, una vez traspasadas las plantas a tierra, le cortamos un trozo de peciolo y analizamos histoquímicamente la acumulación de la proteína GUS en los tricomas.

3.2. Número de copias.

Las flores de las plantas transgénicas fueron autofecundadas. Se sembraron unas 100 semillas de cada planta en medio MS con kanamicina (300 mg/L) después de esterilizarlas. El recuento de los segregantes (F1) resistentes a kanamicina nos permitió determinar si eran o no transformantes y el número de copias del transgén.

4. Análisis de la actividad GUS de las plantas transgénicas.

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

4.1. Detección histoquímica de la actividad GUS.

Este protocolo fue descrito inicialmente por Jefferson *et al.* (1987) y se basa en la capacidad de la β -glucuronidasa para utilizar el sustrato 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucurónido (X-Gluc), que es incoloro, y transformarlo en dicloro-dibromoíndigo (CIBr-índigo), que es de color azul intenso e insoluble. Este compuesto final precipita inmediatamente tras su formación, lo que nos permite localizar dónde se ha dado la reacción. Hemos realizado ensayos histoquímicos de cortes de tallos para ver la tinción de los tricomas. Todas las muestras se pusieron en tampón fosfato sódico 50 mM pH 7. A continuación, se sustituyó este tampón por **tampón de reacción**, se infiltró unos seg. con vacío y se incubó a 25°C en oscuridad durante 16 h. Una vez transcurrido este tiempo se paró la reacción y se fijó la tinción del material. Para ello se incubó el material durante 10 min. a temperatura ambiente en **tampón de fijación**, 2 min. en etanol al 50%, y otros 2 min. 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 guarda a -20°C.

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

4.2. Cuantificación de la actividad β -glucuronidasa (GUS) por fluorimetría.

Este procedimiento descrito inicialmente por Jefferson *et al.* (1987) se basa en la hidrólisis del sustrato 4-metilumbeliferil β -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 indica la cantidad de MU formado y, por lo tanto, la actividad GUS presente en la muestra analizada.

4.2.1. Extracción de proteínas.

El material, recolectado y congelado inmediatamente en nitrógeno líquido, se guardó a -80°C hasta su procesamiento. El material se trituró en N₂ líquido con un mortero hasta convertirlo en un polvo fino y se homogeneizó con un volumen de **tampón de extracción**. Se eliminó el material insoluble centrifugando las muestras a 13.000 g durante 5 min. a temperatura ambiente y recogiendo el sobrenadante. Las muestras se pueden conservar a 4°C ó a -80°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 β -mercaptoetanol; 1% tritón X-100.

4.2.2. Cuantificación de las proteínas de los extractos.

La concentración de proteínas de los extractos se determinó mediante el método descrito por Bradford (1976).

4.2.3. Reacciones fluorimétricas.

Se mezclaron 5 μ L de extracto de proteínas con 175 μ L de tampón de extracción y se preincubó hasta alcanzar los 37°C. La reacción se inició añadiendo 20 μ L de solución 10 mM MUG disuelta en tampón de extracción y agitando. Las reacciones se llevaron a cabo durante 30 min. a 37°C para cada muestra. Transcurrido el tiempo de reacción se añadieron 0.8 ml de 0.2 M Na_2CO_3 para parar la reacción.

4.2.4. Medidas fluorimétricas.

Las medidas fluorimétricas se tomaron con un fluorímetro TKO 100 (Hoefler Scientific Instruments) que excita a una longitud de onda de 365 nm y lee a 455 nm. Para cada medida se utilizó todo el producto de la reacción fluorimétrica, diluyendo las muestras en tampón 0.2 M Na_2CO_3 en caso necesario.

Para saber la concentración de MU correspondiente a la medida obtenida con el fluorímetro se preparó una recta patrón diluyendo 0, 2, 10, 25, 50, 100, 150 y 200 nM de 4-MU en 0,8 ml de Na_2CO_3 0,2 M y añadiendo tampón de extracción hasta 1 ml.

Nota: El producto 4-MU (Sigma) se disuelve en DMSO y se añade Na_2CO_3 0,2 M, hasta alcanzar una concentración 1 μ 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.

4.2.5. Cálculo de la actividad β -glucuronidasa (GUS).

La actividad GUS se mide como pmoles 4-MU/ mg proteína x min..

5. Expresión transitoria mediante el bombardeo de micropartículas.

Estos experimentos se han realizado básicamente según se describe en Bobb *et al.* (1995), optimizando las condiciones para el uso de embriones de girasol.

5.1. Formación de agregados ADN-oro.

Se ha seguido el método descrito por Chern *et al.* (1996), con algunas modificaciones.

5.1.1. Preparación de las partículas de oro.

Unos 60 mg de partículas de oro de $1.6\mu\text{m}$ de diámetro, se lavan 3 veces con 1 mL de etanol 100%, sonicando 30 seg. tras cada lavado y centrifugando después a 5000 g durante 20 seg. Se hace un último lavado con 1 mL de H_2O y se centrifuga igual que antes. Se resuspende en H_2O para obtener una concentración final 60 mg/mL y se mantiene guardado a 4°C .

5.1.2. Preparación de los precipitados ADN-oro.

En este trabajo, en cada experimento de bombardeo se han realizado 5 disparos con cada precipitado ADN-oro. A continuación se describe la preparación de precipitados ADN-oro suficientes para un experimento completo. Se agita la suspensión de oro durante varios min. en un vortex y se toman $40\mu\text{L}$ que se depositan en el fondo de un tubo eppendorf. El ADN se deposita en la pared del tubo; se emplean $5\mu\text{g}$ de plásmido efector (plásmido que expresa el transactivador), $5\mu\text{g}$ de plásmido *reporter* (plásmido que lleva el gen quimérico con la fusión al gen *gus*) y $1\mu\text{g}$ de plásmido de referencia (plásmido que expresa el gen de la luciferasa de luciérnaga, como control interno de la transformación) para embriones y $2\mu\text{g}$ de plásmido referencia en el caso de hojas. Todos los precipitados de un mismo experimento llevan la misma cantidad de ADN plasmídico, igualando la cantidad en algunos casos con plásmidos vacíos.

Sobre el ADN se añaden $50\mu\text{L}$ de CaCl_2 2,5 M y $20\mu\text{L}$ de espermidina 100 mM. A continuación se permite que se junten la mezcla anterior y el oro, y se agita suavemente en el vortex durante 3 min.. Se mantiene en hielo durante 3 min. y se centrifuga a 5.000 g durante 20 seg. El sedimento se resuspende en $65\mu\text{L}$ de etanol 100%, se sonica tres veces durante 3 seg. cada vez, se ponen $10\mu\text{L}$ sobre cada membrana (*macrocarrier*) y se deja secar bien el precipitado antes de bombardear.

5.2. Tratamiento del material previo al bombardeo.

5.2.1. Tratamiento de los embriones.

Se han empleado embriones de girasol de 17-20 días post-antesis (dpa). La superficie de las semillas se esteriliza como se describió en el apartado 1.1.2. Se pelan en condiciones estériles y se cortan longitudinalmente separando los dos cotiledones. Se colocan con la superficie cortada en contacto con el medio MS suplementado con sacarosa 2% y 0.5 M sorbitol en cajas Petri. Se precultivan 2-4 h.



a 28°C y en oscuridad, y tras este tiempo se bombardean. Después del bombardeo los embriones se incuban 24 h. a 28°C y oscuridad, tras lo cual se procede al procesamiento de las muestras.

5.2.2. Tratamiento de las hojas.

Se han usado hojas jóvenes de plantas de girasol. Se han esterilizado como se describe en el apartado 1.1.2. Una vez esterilizadas, bajo la campana de flujo, las hojas se cortan en cuadrados de 1cm², evitando el nervio principal. Se colocan en placas con el haz hacia arriba en medio de cultivo MS+sacarosa 2% y añadiendo las hormonas; 6-benzylaminopurina (6BA) (1mg/L) y 1-naftalenoacético (NAA) (0.1 mg/L). A diferencia de los embriones, en hojas no usamos sorbitol y tanto el tiempo de precultivo como de expresión es de 24 h.

5.3. Parámetros para el bombardeo.

El bombardeo de partículas se llevó a cabo con el sistema *Biolistic PDS-1000 He* (Biorad). Las condiciones de bombardeo fueron: membrana de ruptura de 1550 psi para embriones y de 900 psi para las hojas, las partículas de oro son de 1,6 μm de diámetro, la distancia de la membrana de ruptura al *macrocarrier* de 8 mm, la distancia del *macrocarrier* a la rejilla de 6 mm, y la distancia al tejido a bombardear de 6 cm.

5.4. Procesamiento del material.

Los embriones y hojas bombardeados se trituran con nitrógeno líquido hasta polvo fino. Se añaden 200 μL de tampón de lisis (Luciferase Reporter Gene Assay Kit, Boehringer Mannheim) , se termina de homogeneizar con ayuda de un émbolo y se centrifuga 7 min. a 13000 g. El sobrenadante se mantiene en hielo hasta su uso.

5.4.1. Medida de actividad luciferasa (LUC).

Los ensayos de actividad luciferasa se hicieron con 1μL de extracto diluido en 29 μL de tampón de lisis de luciferasa, y mezclado con 65 μL sustrato de luciferasa (Luciferase Reporter Gene Assay Kit, Boehringer Mannheim). La emisión de luz se midió durante 10 seg. en un luminómetro TD-20/20 (Turner Designs).

5.4.2. Medida de actividad β-glucuronidasa (GUS).

Los ensayos de actividad β-glucuronidasa, se realizaron empleando 3 μL de extracto en las condiciones que se describen en el apartado 4.2.3., durante una hora para embriones y 3 h. para hojas.

5.4.3. Normalización de las actividades GUS/LUC.

La actividad GUS normalizada es la medida de pmoles MU obtenida, multiplicada por 10 en el caso de embriones y por 100 en el caso de hojas, y dividida entre la medida de actividad luciferasa.

6. Expresión transitoria en protoplastos de tabaco.

6.1. Obtención de protoplastos.

Se usaron plantas de tabaco de unos 3 meses crecidas *in vitro*. Todo el proceso se lleva a cabo en condiciones de esterilidad bajo una campana de flujo.

6.1.1. Digestión de las hojas de tabaco

Se cortan varias hojas de la planta y se colocan sobre una caja Petri de vidrio que contiene **solución de enzimática**. Se colocan con el haz hacia arriba. Con un bisturí se hacen pequeños cortes a lo largo de la hoja. Se les da la vuelta y se incuba la placa o/n en oscuridad y a temperatura ambiente. Para obtener un millón de protoplastos se necesita aproximadamente 4 hojas y 10mL de solución enzimática.

Solución enzimática: Se prepara en solución **K3S**; 0.25% Celulasa R10 (DUCHEFA), 0.10% Macerozima R10 (DUCHEFA), se esteriliza por filtración y se guarda a -20°C .

Solución K3S: 136.9g sacarosa, 10mL solución de macronutrientes MS 100x, 10mL de solución de micronutrientes MS 100x, 5mL de solución de hierro 200x, 10mL de 0.5M de MES, pH 5.7, NAA ($5.37\mu\text{M}$), 6BA ($0.89\mu\text{M}$), tiamina ($29.65\mu\text{M}$), piridoxina ($8.12\mu\text{M}$) y ácido nicotínico ($8.12\mu\text{M}$). (véase 1.1.1). Añadir H_2O hasta un litro, autoclavar y guardar a 4°C .

6.1.2. Aislamiento de protoplastos.

Tras la incubación se mueve ligeramente la placa Petri para separar los protoplastos del esqueleto de la hoja. Se pasan a través de un colador a tubos estériles de 10mL. Se centrifugan 7 min. a 23°C y a 500 r.p.m. Los protoplastos se quedan formando un anillo arriba del tubo. Se recogen los protoplastos con una pipeta Pasteur y se colocan en un tubo que contiene 9mL de **solución de lavado W5**. Se vuelven a centrifugar 10 min. a 600 r.p.m. Se retira el sobrenadante y se resuspenden suavemente los protoplastos en 1mL de **solución K3M**.

Para contar el número de protoplastos obtenidos, se hace una dilución 1:5 de protoplastos ($10\mu\text{L}$ protoplastos + $40\mu\text{L}$ K3M). Se cuentan al microscopio el número de protoplastos presentes en una celdilla formada por 16 cuadrados de una cámara Fuchs-Rosenthal, y usando la siguiente fórmula:

Nº protoplastos totales= nº protoplastos contados x factor de dilución (5) x 10000 x 0.5 (profundidad de la cámara).

Solución de lavado W5: 18.4g de CaCl_2 , 9g de NaCl, 0.4g de KC, 1g de glucosa y 1mL de 0.5M de MES pH5.8. Añadir H_2O hasta un litro y guardar a 4°C.

Solución K3M: Esta solución lleva la misma composición que la solución K3S (véase 6.1.1.) añadiéndole 73g/L de Manitol y 30g/L de sacarosa en lugar de 136.9g/L.

6.1.3. Transformación de los protoplastos.

En un tubo eppendorff se mezclan los ADNs plasmídicos a transformar. En este trabajo se usó 4µg de plásmido *reporter*, y 1µg de plásmido efector. A continuación se añaden 50µL de protoplastos (35000-50000 protoplastos). Se añade 100 µL de **25%PEG 6000**. Se mueven bien para mezclar el PEG con los protoplastos y el ADN. Se dejan 20 min. A continuación se para la transformación añadiendo 900µL de K3M. Se deja o/n en cámara de cultivo de plantas con ciclo de luz y humedad controlados (véase 1.1.4.).

25%PEG 6000: 5g PEG6000, 1.64g de manitol y 0.47g de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$. Añadir H_2O hasta 20mL. Esterilizar por filtración y guardar a -20°C.

6.1.4. Extracción de proteínas y medida de la actividad GUS.

Se centrifugan los protoplastos 5 min. a 15000 r.p.m. Se retira el sobrenadante y se resuspenden los protoplastos en 50µL de tampón de reacción (véase 4.1). Se congelan inmediatamente en N_2 líquido. Se descongelan las muestras y se agitan en vortex. Se centrifugan 5 min a 4°C a 15000 r.p.m. En una placa *microtiter* de 96 pocillos, se ponen 25µL del lisado de protoplastos y 25µL de 1mM de MUG. Se incuba a 37°C. Para todos los experimentos de protoplastos en este trabajo, la actividad β-glucuronidasa se midió a los 30 min. Las medidas fluorimétricas se hicieron en un lector de placas *microtiter* FLUOstar (BMG Lab Technologies GmbH, Offenburg, Germany). Las unidades relativas de GUS se corresponden con las dada en el luminómetro, asumiendo que la cantidad de protoplastos viables en un mismo experimento son iguales en todas las muestras.

6.1.5. Test de viabilidad de protoplastos.

La viabilidad de los protoplastos se hace tiñiendo con trypan blue. Los protoplastos viables son impermeables a este colorante y por tanto no se tiñen.

Cuando se obtienen los protoplastos, se ponen en un tubo eppendorff un número conocido de éstos en solución K3M. Tras el proceso de transformación y

expresión transitoria, se añaden 50 μ L trypan blue al 0.5%. Se cuentan en la cámara Fuchs-Rosenthal y se calcula el % de viabilidad según la ecuación:

$$\% \text{viabilidad} = \text{n}^{\circ} \text{ de protoplastos no teñidos} / \text{n}^{\circ} \text{ de protoplastos totales} \times 100.$$

Alrededor del 85-90% de protoplastos siguen viables después del tratamiento.

7. Análisis estadístico de los datos.

Las distribuciones de los valores de actividad GUS determinados tanto para las plantas transgénicas como para los ensayos de expresión transitoria 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 $P = 0.05$.

8. Transformación de *E. coli*.

8.1. Preparación de células competentes de *E. coli*. Método del RbCl.

Este método fue descrito por Hanahan (1983).

Con una colonia de la estirpe apropiada, se inoculan 5 mL de **medio ¥** y se cultiva a 37°C hasta alcanzar una $D.O_{600nm}$ de 0,3. Con este precultivo, se inoculan 100 mL de medio ¥, precalentado a 37°C, y se incuba con agitación vigorosa (300-350 rpm) hasta que la $D.O_{600nm}$ sea 0.5. Se recogen las células centrifugando a 2.500 g durante 5 min. a 4°C. El sedimento se resuspende en 30 mL de **solución TFB1** fría y se centrifuga como antes. Las células son finalmente resuspendidas con suavidad en 4 mL de **solución TFB2** fría y dispensadas en alícuotas de 0,2 mL que se congelan a -80°C hasta su uso.

Solución TFB1: 100 mM RbCl, 50 mM MnCl₂, 30 mM acetato potásico, 10 mM CaCl₂, 15% glicerol. El pH se ajusta con precisión 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 CaCl₂, 15% glicerol. Se esteriliza por filtración y se guarda a -20°C.

Medio Y: 2% bactotripton, 0,5% extracto de levadura, 15 mM MgSO₄, 10 mM KCl. Se ajusta el pH a 7,6 con KOH.

8.1.2. Transformación.

A 200 μ L de células competentes se les añaden, aproximadamente, 10 ng de ADN, en un volumen menor de 20 μ L, y se mantienen 20 min. en hielo, 90 seg. a 42°C y se retornan inmediatamente a hielo. A continuación, se añade 1 mL de medio LB, se incuba a 37°C durante 1 hora y se extiende en cajas Petri con el medio de selección apropiado.

9. Transformación de levaduras.

9.1. Preparación de células competentes de levaduras.

El método usado para la preparación de células competentes de levaduras es el descrito por Gietz *et al.*, 1992.

Se inocula una colonia en medio rico, **YPD**, o medio mínimo suplementado con aa's, **SD + aa's**, según si hay que seleccionar algún plásmido que ya contenga la estirpe. Se crece a 30°C o/n en YPD o 24h en SD. Se requiere unos 10mL de cultivo/transformación. Cuando las células están a D.O_{600nm}=1, se centrifugan a 5000 r.p.m. durante 2 min. Se retira el sobrenadante y se lavan las células dos veces con H₂O estéril. Se lavan una vez con **TE/LiAc**. Se centrifugan a 5000 r.p.m. durante 5 min. Se retira el sobrenadante y se resuspenden en 1mL de 1x TE/LiAc estéril.

YPD: 10g/L extracto de levadura, 20g/L de pectona y 20g/L de glucosa. Autoclavar.

SD: 1,7g/L yeast nitrogen base (Difco), 5g/L (NH₄)₂SO₄ y 20g/L glucosa. Para medios sólidos, añadir 20g/L agar. Autoclavar.

Solución de aminoácidos 10x: Isoleucina (300mg/L), Valina (1500mg/L), Adenosina (200mg/L), Arginina (200mg/L), Lisina (300mg/L), Metionina (200mg/L) Fenilalanina (500mg/L), Treonina (2000mg/L), Tirosina (300mg/L), Histidina (200mg/L), Uracilo (200mg/L), Leucina (300mg/L) y triptófano (400mg/L).

10xTE/LiAc: 0,1M Tri-HCl LiAc pH7.5, 10mM EDTA pH7.5 y 1M.

9.2 Transformación de levaduras competentes.

En tubos ependorff se añaden 500ng del ADN plasmídico a transformar y 50 μ g de **ADN carrier**. Se añaden 100 μ L de células competentes a cada tubo y se mezcla bien. Se añade 600 μ L de **PEG/LiAc** estéril. Se agita en vortex para mezclar bien. Se incuba a 30°C en agitación durante 30 min. A continuación se añade

70 μ L de DMSO y se mezcla bien. Se da un choque térmico de 15 min a 42°C. Se enfría en hielo durante 5 min. Se centrifugan las células 30 seg. a 8000 r.p.m. Se tira el sobrenadante y se añade 500 μ L de YPD. Se incuban las células durante una hora y media a 30°C en agitación. Este período de recuperación aumenta considerablemente la eficiencia de transformación. Por último se centrifugan las células y se resuspenden en TE. Se siembran en las placas SD con los aminoácidos correspondientes. Las placas se incuban a 30°C de 2-4 días.

PEG/LiAc: 50%PEG, 1x LiAc, 1x TE.

ADN carrier: Se prepara una solución conteniendo 5mg/ml (Boehringer Mannheim) en H₂O. Sonicar en frío hasta que la viscosidad de la solución desaparece. Guardar a -20°C.

10x TE: 0.1mM Tris-HCl y 10mM EDTA pH7.5

10. Ensayos de actividad β -galactosidasa (β -gal)

En este trabajo se ha medido actividad β -galactosidasa en los experimentos de transactivación en levaduras del promotor del gen *Ha hsp17.6G1* por HSFs de tomate. En este caso, el gen quimérico está formado por la región con HSE (*Heat Shock Element*) del promotor del gen *Ha hsp17.6G1* fusionado transcripcionalmente al gen *reporter LacZ* de *E.coli*. (véase 27.). La transactivación del promotor del gen *Ha hsp17.6G1* por los HSFs resulta en la transcripción del gen *LacZ* y posterior traducción de la enzima β -galactosidasa, capaz de hidrolizar compuestos cromogénicos que producen color cuando son hidrolizados. El sustrato usado es el orto-nitrofenil- β -D-galactósido (ONPG), y el producto es el orto-nitrofenol, que absorbe a una longitud de onda de 420nm.

10.1. Crecimiento y preparación de las células.

Se inocula la célula en medio SD+aa's correspondientes a 30°C hasta que el cultivo esté en fase estacionaria, aproximadamente a una D.O_{600nm}=3. A partir de este inóculo, se inocula en medio rico, YPD a una D.O₆₀₀= 0.2 y se deja creciendo a 30°C hasta alcanzar una D.O_{600nm}= 0.6. Entre 0.5 y 0.8 la actividad enzimática β -galactosidasa es lineal. En este punto es importante conocer la D.O_{600nm} exactamente. Se recogen las células centrifugando a 8000 r.p.m. durante 10 min. a 4°C. Se tira el sobrenadante y se congelan inmediatamente en N₂ líquido.

10.2. Medición de la actividad β -galactosidasa (β -gal).

Se descongelan las células y se le añade 800 μ L de **tampón Z/SDS**, se agita en vórtex y se le añade 20 μ L de cloroformo, se agita de nuevo y se incuba a 28°C durante 5 min. A continuación se le añade el sustrato, 160 μ L de **ONPG** y se deja incubando a 28°C hasta que se desarrolle el color amarillo. Se anota el tiempo que ha

transcurrido. Se para la reacción añadiendo 800 μ L de Na₂CO₃ 1M y se agita en vórtex. Se mide la D.O. en el espectrofotómetro a 420nm. Las unidades relativas de β -galactosidasa vienen dada por la fórmula:

$$\text{Unidades relativas de } \beta\text{-gal} = \text{D.O.}_{420\text{nm}} \times 1000 / \text{D.O.}_{600\text{nm}} \times \text{tiempo (min.)}.$$

Tampón Z/SDS: 1M Tris-HCl pH8, **0.1M Tampón fosfato sódico pH 7.5**, 1M de MgCl₂, 0.002% SDS 0.5% y 0.5% de β -mercaptoetanol. Esto último se añade justo antes de usar.
0.1M Tampón fosfato sódico pH7.5: 0.1M Na₂HPO₄·x2H₂O y 0.1M Na₂H₂PO₄·x2H₂O.
ONPG: 200mg ONPG (Serva), 0.1M fosfato sódico pH7.5, 1M MgCl₂ y 0.5% de β -mercaptoetanol. Guardar a 4°C y en oscuridad.

11. Purificación y análisis de ADN.

11.1 Minipreparaciones de ADN plasmídico bacteriano.

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

11.2. Purificación de ADN plasmídico para experimentos de expresión transitoria.

Para los experimentos de expresión transitoria, es necesario obtener una alta cantidad y cualidad de ADN plasmídico. Para ello se ha empleado el *Quantum Prep™ Plasmid Midiprep Kit* (Biorad), siguiendo las indicaciones del fabricante.

11.3. Cuantificación del ADN.

La concentración del ADN en solución se estimó por su absorbancia a 260nm, asumiendo que D.O._{260nm}=1 equivale a 50 μ g/ml de ADN. Para verificar la concentración del ADN se realizó una comparación en geles de agarosa con muestras de ADN de concentración conocida.

11.4. Electroforesis de ADN en geles de agarosa.

Se ha realizado según se describe en Sambrook *et al.*, 1989.

11.5. Extracción de fragmentos de ADN de geles de agarosa.

Se han usado varios *kits* comerciales para la recuperación de fragmentos de ADN de geles de agarosa: "GeneClean[®]" (BIO101, EE.UU.), "Agarosa Gel DNA Extraction Kit" (Boehringer Mannheim, GmbH) y "GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit" (Pharmacia Biotech GmbH). Con los distintos *kits* comerciales se han seguido las indicaciones de los fabricantes.

12. Manipulación enzimática de ADN.

En general se siguieron los protocolos descritos por Sambrook *et al.*, (1989).

12.1. 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 min.. Tras centrifugar durante 15 min. a 13000 g en una microcentrífuga, se lavó el sedimento con etanol al 70%, se secó y se resuspendió en TE.

12.2. Defosforilación de los extremos 5' del ADN.

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 religación. Después de precipitar el ADN digerido con la enzima de restricción adecuada y resuspender en 1 mM Tris-HCl pH 8,3 se añadió 1/10 del volumen de tampón 10x para fosfatasa alcalina (Boehringer Mannheim). A continuación, se añadió 1-2 unidades de enzima de fosfatasa alcalina y se incubó a 37°C durante 30 min. La fosfatasa alcalina se inactivó añadiendo EDTA hasta 5 mM e incubando a 75°C durante 10 min. Posteriormente, se realizó una extracción del ADN con un volumen de fenol:cloroformo:IAA (25:24:1) y tras precipitar se resuspendió en TE.

12.3. 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 de ADN se rellenó con la enzima Klenow (Sambrook *et al.*, 1989). Para los extremos 3' protuberantes se usó la ADN polimerasa del bacteriófago T4, que posee una fuerte actividad exonucleasa 3'→5' sobre el ADN monocatenario (Sambrook *et al.*, 1989).

12.4. Ligación de moléculas de ADN.

El ADN se digirió previamente con las enzimas de restricción adecuadas y los extremos 5' del vector se desfosforilaron en los casos necesarios.

La mezcla de reacción contiene tampón de ligación 1x, 1 unidad de ADN ligasa del bacteriófago T4 y los fragmentos de ADN a ligar, en un volumen máximo de 20 μ L. La relación molar del inserto respecto al vector fue de 2:1. Las ligaciones de extremos cohesivos se incuban a 16°C durante 5 h.; para las de extremos romos se incuban a temperatura ambiente durante 1-2 h.. Pasado este tiempo, se transformaron células competentes de *E. coli* con la mezcla de ligación sin modificaciones adicionales.

13. Purificación y análisis de ARN.

13.1. Preparación de ARN total.

Las preparaciones de ARN total a partir de tejidos vegetales y embrionarios se realizaron según se describe en Hall *et al.* (1978), con ligeras modificaciones.

El material se tritura en nitrógeno líquido hasta convertirlo en polvo fino y se le añade **tampón de extracción** (300 μ L/100 mg de material de partida) a 100°C y proteinasa K hasta 0,5 mg/mL. La mezcla se incuba 1 hora a 37°C y agitación suave. Se añade KCl hasta una concentración final 50 mM, se agita suavemente y se incuba 15 min. en hielo para que precipite el SDS. Se centrifuga 15 min. a 13.000 rpm. Al sobrenadante se le añade LiCl hasta una concentración final 2 M y se incuba a 4°C al menos 2 h., precipitando así el ARN de forma selectiva. Tras centrifugar 20 min. a 13.000 rpm el sedimento primero se lava con LiCl 2M y después se resuspende en acetato sódico 0.2M, retirando el material insoluble mediante centrifugación. Se hace una extracción con un volumen de fenol:cloroformo:alcohol IAA (25:24:1) y se precipita añadiendo a la fase acuosa 2,5 volúmenes de etanol. Finalmente el sedimento se disuelve en H₂O-DEPC estéril y se guarda 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: Es importante evitar la contaminación con ARNasas, para ello todas las soluciones contienen 0,1% DEPC, el material de plástico se autoclava dos veces y se utilizan guantes en todas las manipulaciones.

13.2. Cuantificación de ARN.

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

13.3. Electroforesis desnaturizante de ARN.

El análisis de ARN por electroforesis se realizó en geles de agarosa en presencia de formaldehído, según se describe en Sambrook *et al.* (1989).

14. Protección frente a la digestión con ARNasa A.

Esta técnica permite detectar, dentro de una población compleja de ARNs, aquel cuya secuencia es idéntica a la de la ribosonda empleada, pudiendo discernir entre desapareamientos incluso de un solo nucleótido en los híbridos ARN/ARN. Un extracto de ARN total se hibrida con una ribosonda radiactiva. Posteriormente, la mezcla resultante de la hibridación se trata con ARNasa A, enzima que digiere únicamente ARN de cadena sencilla, por lo que sólo el híbrido perfecto queda protegido de la acción enzimática. Es importante poner a punto las condiciones de hibridación, de tal forma que siempre haya exceso de sonda y la temperatura de hibridación sea la adecuada, para estar seguros de que la hibridación ha tenido lugar. Igualmente es necesario asegurarse de que la digestión con la ARNasa A es total, para ello se prueban distintos tiempos de digestión, siempre con exceso de enzima.

Este procedimiento se ha usado en este trabajo para comprobar el patrón de acumulación de los ARNs quiméricos a partir del promotor del gen *Ha hsp1.7.7G4*.

14.1. Preparación de la ribosonda.

14.1.1. Transcripción *in vitro*.

La obtención de ribosondas se consigue con la transcripción *in vitro* de un ADN en presencia de un ribonucleótido marcado radiactivamente, generalmente [$\alpha^{32}\text{P}$]-CTP. Para ello, el ADN se clona en el plásmido pBluescript SK⁺. El sitio de clonación múltiple en pSK⁺, está flanqueado por dos secuencias promotoras, T3 y T7. La ARN polimerasa del bacteriófago T3 transcribe a partir del promotor T3 una de las cadenas del ADN, y la ARN polimerasa del bacteriófago T7 transcribe la cadena complementaria a partir del promotor T7. En este trabajo se ha usado la polimerasa del bacteriófago T3 para transcribir las ribosondas del gen *Ha hsp17.7G4* y del gen de la neomicina fosfotransferasa *NPTII*. Los vectores usados en cada caso son: pSK⁺::G4 HindIII(+93)-SnaBI, que lleva clonado desde la posición +93 del promotor *Ha hsp17.7G4* hasta el único sitio SnaBI del gen *gus*; pSK⁺::NPTII PstI(+177)-SphI(+534).

14.1.1.1. Linearización del plásmido.

El plásmido debe linearizarse con un enzima que corte en el extremo del fragmento que pretendemos marcar, para que la transcripción se interrumpa en ese punto, de lo contrario se transcribiría todo el plásmido.

El plásmido se lineariza digiriendo con el enzima adecuada. En el caso del plásmido que lleva subclonado el fragmento del gen G4, se linearizó con el enzima XhoI y para el plásmido que lleva el fragmento del gen NPTII, la enzima EcoRI. Se hace una extracción con un volumen de fenol:cloroformo:IAA (25:24:1). Se precipita con 0.1 volumen de acetato sódico 3M y 2 volúmenes de etanol absoluto, se seca y se resuspende en H₂O-DEPC hasta una concentración 0,3 µg/µL.

14.1.1.2. Reacción de transcripción.

En un tubo eppendorf se mezclan a temperatura ambiente y en orden:

6,5 µL H₂O-DEPC.

2 µL de tampón de transcripción 10x (Boehringer Mannheim).

2 µL de DTT 0,1M.

1 µL (24 U) de inhibidor de ARNasas (RNase guard[®], Pharmacia).

2 µL de una mezcla 10mM ATP, 10 mM GTP y 10mM UTP.

1 µL de una solución 0,2 mM CTP.

2 µL de plásmido linearizado (0,6 µg de ADN).

2.5 µCi de [α^{32} P]-CTP (25 µCi).

1 µL (10U/µL) de la ARN polimerasa adecuada (T3).

La reacción de transcripción se lleva a cabo a 37°C durante una hora. A continuación se añade 1 µg de ADNasa (libre de ARNasas) y se incuba a 37°C durante 30 min. para eliminar el ADN. La reacción se interrumpe añadiendo 2 µL EDTA 0,5M pH 8 y 77 µL **TEN**.

TEN: 10mM Tris-HCl pH8, 1mM EDTA pH8 y 100mM NaCl

14.1.2. Eliminación de los nucleótidos no incorporados.

Para separar los nucleótidos no incorporados, la mezcla de reacción se pasa por una columna Sephadex G-50 previamente equilibrada en TEN. (véase 19.1.2). La sonda se precipita añadiendo 20 μ g de ARNt de levadura, acetato sódico hasta 0,3M y 2 volúmenes de etanol absoluto. Se incuba durante 30 min. a -20°C. Se centrifuga a 13.000 r.p.m. durante 15 min. y a 4°C. Se seca y se resuspende en 30 μ L de **FBL**.

FBL: 9.7 mL formamida; 0.1 mL SDS 10%; 0.1 mL Tris-HCl 1M pH 7; 1mg/mL xilencianol; 1 mg/mL azul de bromofenol.

14.1.3. Purificación de la sonda.

Los fragmentos marcados se separan por tamaño mediante electroforesis en **geles desnaturalizantes de poliacrilamida**. Se purifica el fragmento marcado del tamaño apropiado de todos aquellos de menor tamaño (debido a la interrupción de la transcripción o a la degradación de la sonda), o de mayor tamaño (debido a la transcripción completa del plásmido por no haber una completa linearización del mismo). Los geles se montan sobre dos placas de vidrio de 20x18 cm con separadores de 1 mm de grosor. Inmediatamente antes de cargarla en el gel, la sonda se calienta a 85°C durante 3 min. Se deposita toda la sonda en el pocillo. La electroforesis se efectúa a 250 V. La electroforesis se interrumpe en función del tamaño de la sonda. Una vez finalizada la electroforesis, se separa una de las placas, se envuelve el gel con plástico y se autorradiografía durante 4 min. Para orientar correctamente la película autorradiográfica, se colocan asimétricamente sobre el plástico tres trozos de cinta adhesiva y se agujerean con un punzón tanto la película como la cinta. Una vez localizada sobre la autorradiografía la banda de tamaño adecuado, se hacen coincidir las marcas de la película con las de la cinta y se agujerea alrededor de la banda. Se recorta la zona agujereada del gel y se trocea con un bisturí.

La sonda se eluye en 380 μ L de una solución 2M acetato amónico / 0,1 % SDS durante toda la noche con agitación a 37°C. Tras eliminar la acrilamida mediante pulsos de centrifugación, la sonda se precipita añadiendo 30 μ g de ARNt y 900 μ L de etanol absoluto e incubando a -20°C durante 30 min. Se centrifuga 15 min. a 13.000 g. Se lava con etanol 70% y se deja secar al vacío. Se resuspende en 25-30 μ L de **solución de hibridación** y se cuantifica 1 μ L de la sonda eluída en un contador de centelleo.

Geles desnaturalizantes de poliacrilamida:	4%	6%
Urea	20g	20g

TBE x5	8 mL	8 mL
A/B (38%acrilamida:2%bisacrilamida)	4 mL	6 mL
H ₂ O	12 mL	12 mL
Calentar a 45°C para disolver		
Persulfato amónico 10%	0.2 mL	0.2 mL
Desgasificar y filtrar		
TEMED	20 μ L	20 μ L

Solución de hibridación: 8 mL de formamida, 1 mL de NaCl 4M, 0.1 mL EDTA 0.1M y 0.4 mL PIPES 1M pH 6.7. Guardar a 4°C.

14.2. Hibridaciones.

Se mezclan 10 μ g de ARN total con 2×10^5 c.p.m. de sonda y 27 μ L de solución de hibridación, se completa con H₂O-DEPC hasta 60 μ L. Para desnaturalizar el ARN se calienta la muestra a 85°C durante 5 min.. Las hibridaciones descritas en este trabajo se han realizado durante 16 h. a 48°C. Como control de hibridaciones inespecíficas, se hibridan las ribosondas con ARNt.

14.3. Digestiones con ARNasa A.

Se añaden 300 μ L de **tampón de digestión** a la hibridación y se incuba a 30°C el tiempo digestión oportuno. En este trabajo se ha usado un tiempo de digestión de 30 min. A continuación, se para la reacción añadiendo 20 μ L de SDS 10% y 5 μ L de proteinasa K (10 mg/mL) e incubando a 37°C durante 15 min. Se añaden 3 μ L de ARNt (10 mg/mL) a cada muestra. Se hace una extracción con fenol:cloroformo:IAA (25:24:1) para eliminar todas las proteínas. El híbrido se precipita con 2 volúmenes de etanol absoluto durante 30 min. a -70°C. Se centrifuga 15 min. en una microcentrífuga. Finalmente se lava con etanol absoluto, se seca y se resuspende en 30 μ L de FBL.

Tampón de digestión: 75 μ 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.

14.4. Electroforesis.

El fragmento protegido se resuelve en geles desnaturalizantes de poliacrilamida iguales al gel preparativo para purificar la sonda. Como marcadores de peso molecular puede cargarse la sonda y las escaleras de fragmentos de ADN pBR322/*Hpa* II o pSK+/*Hpa*II marcadas con ³²P. Después de la electroforesis el gel se coloca sobre papel Whatman 3MM, se seca y se autorradiografía.

La intensidad de las bandas fueron cuantificadas por análisis de densitometría a partir de fotografías digitales. Estas fotografías fueron adquiridas a 600 dpi de resolución a partir de las autoradiografías usando un scanner UMAX y el programa Adobe Photoshop. La densitometría fue hecha con el programa Kodak EDAS 2.0.

14.4.1. Marcaje de y pBluescriptSK⁺/HpaII con [α -³²P]-dCTP.

Se digieren 3 μ g de plásmido pBluescriptSK⁺ con *Hpa* II. Se liberan fragmentos de tamaño conocido. El extremo 3' protuberante de estos fragmentos se rellena por la acción del fragmento Klenow de la ADN polimerasa I de *E.coli*, usando como nucleótidos dGTP y [α -³²P]-dCTP. Así todos los fragmentos quedan marcados radiactivamente.

Reacción: 10 μ L pBluescriptSK⁺/HpaII (1 μ g), 6 μ L H₂O, 1 μ L tampón 10x, 1 μ L dGTP 2mM, 1 μ L [α -³²P]-dCTP (10 μ Ci), 1 μ L Klenow Boehringer (2U). Incubar 15 min. a temperatura ambiente. Inactivar la enzima incubando la mezcla a 65°C durante 20 min. Eliminar los nucleótidos no incorporados pasando la mezcla de reacción a través de una minicolumna de Sephadex G-50.

15. Obtención de proteínas en *E.coli*.

La estirpe usada para la obtención de proteínas recombinantes es BL21(DE3) cuyas características se describen en 1.2.1. Se han expresado los genes que codifican para las proteínas ABI3 y Lp-HSFA1.

15.1. Vectores usados de expresión en *E.coli*.

Los vectores usados son pRSETA (Invitrogen) para ABI3 y pET (Novagen) para Lp-HSFA1. Ambos vectores llevan la secuencia de reconocimiento de los ribosomas (Shine-Dalgano), un ATG seguido de una secuencia que codifica para 6 histidinas y por último un sitio de múltiple clonaje donde se clona en fase el ADNc correspondiente a ambas proteínas.

15.2. Transformación, crecimiento, y condiciones para la expresión.

15.2.1. Expresión de ABI3 y ABI3 Δ N.

La proteína ABI3 es muy insoluble en *E.coli*, por lo que se optimizó las condiciones para su expresión. Fue imposible expresar el ADNc completo y se hizo una deleción en el extremo 5' del ADNc, resultando en una proteína truncada en su extremo aminoterminal, (ABI3 Δ N).

Se transforma la estirpe BL21(DE3) con el plásmido pRSETA::ABI3 Δ N según 8.1.2. A partir de la mezcla de transformación se inocula directamente 50 μ L de esa

mezcla en 500mL de LB+Amp. Se deja crecer o/n a 37°C. A la mañana siguiente, cuando el cultivo está a una $D.O_{600nm}$ de 0.4 se añade IPTG a una concentración de 0.4mM. Se deja el cultivo crecer a 37°C y se recogen las células a dos tiempos distintos, 1 y 2h, centrifugando durante 15 min. a 5000 r.p.m. Se tira el sobrenadante y se congelan las células a -80°C o/n.

Las células se rompen en un mortero añadiendo alúmina (Sigma). La lisis de células se hace evidente por la formación de una masa mucosa. Se recoge el lisado con **tampón de lisis con urea**. Estas condiciones desnaturalizantes, potencian la solubilidad de las proteínas. Se centrifuga para decantar la alúmina y recoger el sobrenadante.

Tampón de lisis con urea: 50mM NaH_2PO_4 pH8, 10mM Tris-HCl pH8, 100mM NaCl y 8M de urea.

15.2.2. Expresión de Lp-HSFA1.

Se transforma la estirpe BL21(DE3) con el plásmido pET8HN. Se plaquea en LB+Amp e incuba a 37°C. Se inocula una colonia fresca en 5mL de LB+Amp, se deja o/n en agitación a 37°C. A la mañana siguiente se inoculan los 5mL en 500mL de LB+Amp. Se deja crecer en agitación hasta una $D.O_{600nm}=0.2$. A continuación, se añade IPTG hasta una concentración de 0.4mM. Dejar crecer a 37°C en agitación durante 3h. Se centrifuga para recoger las células 15 min a 5000 r.p.m. Se retira el sobrenadante y se congelan las células a -80°C. Se rompen las células en un mortero añadiendo alúmina (Sigma) y se recoge el lisado con **tampón de lisis**. Se centrifuga para decantar la alúmina y recoger el sobrenadante.

Tampón de lisis: : 50mM NaH_2PO_4 pH8, 10mM Tris-HCl pH8, 100mM NaCl.

15.2.3. Purificación de proteínas por columna de afinidad.

Básicamente se siguió las especificaciones de Clontech. Los extractos proteicos que contenían las proteínas recombinantes fusionadas a la cola de histidinas (procedentes de 15.2.1 y 15.2.2), fueron pasadas a través de una columna de resina con iones Ni^{2+} , (TALON™ de Clontech). Este método se basa en la interacción entre metales de transición electropositivos, como el Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} y Zn^{2+} , y residuos de histidinas.

En una jeringuilla de 1mL con el extremo inferior sellado con lana de vidrio, se añade la resina. Se centrifuga la columna a 700g durante 2 min. para retirar el EtOH en el que va la resina. Se añade 2-3 volúmenes del tampón de lisis para equilibrar la columna. Se centrifuga de nuevo a 700g. A continuación se van pasando por ella los extractos de proteínas y se deja caer por gravedad. Se lava la columna con 3

volúmenes de **tampón de lavado** dejando que caiga por gravedad. Por último se eluye la proteína añadiendo 1mL de 100mM de EDTA pH8, y se recoge en un tubo eppendorff colocado al final de la jeringuilla.

Tampón de lavado: : 50mM NaH₂PO₄ pH7, 100mM NaCl.

15.2.4. Renaturalización de proteínas por diálisis.

La proteína ABI3 fue extraída con tampón que lleva urea. Estas condiciones desnaturalizan las proteínas, haciendo que pierdan su conformación original y por tanto su función biológica. Dializando contra un tampón que no lleve urea, se consigue que la proteína adopte de nuevo su estructura terciaria. Para la diálisis es necesario preparar la tripa. Se corta un trozo de tripa de unos 5 cm. Se hierve en una solución con bicarbonato sódico al 2% y 1mM de EDTA pH8 durante 10 min. A continuación se lava bien la tripa con H₂O destilada. Se vuelve a hervir en 1mM de EDTA pH 8 durante 10 min. Se lava de nuevo con H₂O destilada. Hay que manipular siempre con guantes y evitar que la tripa se seque. Se anuda un extremo de la tripa y se rellena por el otro con la elución de la proteína. Se anuda el otro extremo y se mete la tripa en un vaso de precipitado con tampón **PBS**. Se deja o/n a 4°C agitándose en un agitador magnético.

PBS: 8 g/L NaCl, 0.2 g/L KCl, 1.44 g/L NaH₂PO₄, 0.24 G/L KH₂PO₄. Ajustar a pH7.2 y autoclavar. Guardar a 4°C.

16. Obtención de proteínas en *Saccharomyces cerevisiae*.

Los extractos de proteínas con Lp-HSFA1 o Lp-HSFA2 se obtuvieron a partir de la estirpe RSY4 conteniendo en cada caso el plásmido que expresa el HSF correspondiente (Boschein *et al.*,1997). Para la obtención de los extractos proteicos con cada HSF se siguió el mismo protocolo. Se inocula una colonia de la estirpe RSY4 en 50mL de YPD y se incuba en agitación a 30°C o/n. Se deja crecer hasta que el cultivo alcance una DO_{600nm} = 1-1.5. Se recogen las células centrifugando a 5000 r.p.m a 4°C 15 min. Se retira el sobrenadante y a continuación se lavan las células con 50 mL de H₂Od estéril. Se vuelve a centrifugar en las condiciones anteriores y se resuspenden las células en 1mL de H₂Od estéril. Las células se pasan a un tubo eppendorf. Se centrifugan y se tira el sobrenadante. El sedimento de células se congela en N₂ líquido. Se añade 600µL de **tampón H**, se agita en vórtex y se añade bolas de vidrio hasta el menisco. Se agita en vortex a 4°C 30 min. A continuación se añade 60µL de NaCl 5M y se deja en hielo 20 min. Se centrifuga a 15000 r.p.m. 15 min a 4°C. Las proteínas se cuantifican por el método de Bradford (1976). Se alicuotan y guardan a -80°C.

Tampón H: 25mM de HEPES (N-2 hidroximetil piperazina-N(2) etano ácido sulfónico), pH 7.5, 10% de glicerol, 1mM de EDTA, 50mM de NaCl, 0.5% de β -mercaptoetanol y cocktail de proteasas Complete, EDTA-free (ROCHE).

17. Análisis de proteínas.

17.1 Electroforesis de proteínas.

Una vez obtenidos los extractos de proteínas, fueron analizados en minigeles de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE), según Laemmli (1970). Para ello se usó una cubeta de electroforesis de proteínas de Bio-Rad. La separación de proteínas se hace en un sistema discontinuo con un gel de empaquetamiento y un gel de separación. Las muestras se diluyen en tampón Laemmli 1x. Se hierven 3 min. inmediatamente antes de cargarlas. Como marcadores de peso molecular se usó una mezcla de proteínas preteñidas de Bio-Rad. La electroforesis se realizó a voltaje constante (200V) hasta que el azul de bromofenol alcanza el borde del gel.

Tampón Laemmli 2x: 125mM Tris-HCl pH6.8, 2% SDS, 5% β -mercaptoetanol, 20% glicerol, 0.1% de azul de bromofenol.

Gel de empaquetamiento: 125mM Tris-HCl pH6.8, 0.1% SDS, 5% A/B (Solución 30% acrilamida, 0.2% bisacrilamida), 0.05% APS (persulfato amónico) y 0.1% TEMED.

Gel de separación: 375mM Tris-HCl Ph8.8, 0.1% SDS, A/B (30/0.2) del porcentaje deseado, 0.05% APS y 0.05% TEMED.

Tampón de electroforesis: 25mM Tris, 194mM glicina y 0.1% SDS.

17.2. Tinción de proteínas.

Las proteínas separadas por electroforesis en geles de poliacrilamida se detectan por tinción con azul de Coomasie. Inmediatamente después de la electroforesis, los geles se sumergen durante 30 min. en una solución de azul de Coomasie (Coomasie brilliant blue R-250), al 0.05% en 50% de metanol y 10% de ácido acético. Posteriormente se destiñen en 5% de metanol, 7% de ácido acético, hasta que el fondo del gel pierde el color azul.

18. Análisis de Western.

Este método fue descrito inicialmente por Towbin (1979) y se basa en la especificidad de unión antígeno-anticuerpo. Permite la detección de proteínas específicas mediante el uso de anticuerpos generados frente a éstas. Los extractos proteicos se resuelven por electroforesis en geles de poliacrilamida como se describe en 17.1. A continuación se transfieren a membranas de nitrocelulosa. En

este trabajo se han hecho análisis de Western de extractos proteicos de levaduras , protoplastos y *E.coli*.

Levaduras: Se recogen las células centrifugando a 5000 rpm durante 5 min. y se retira el sobrenadante. Se le añade 100 μ L de tampón Laemmli 1x con azul de bromofenol por cada 0.1 D.O_{600nm} que tuviese el cultivo original de donde proceden. De esta manera se intenta igualar la concentración de proteínas entre los distintos cultivos. Se hierven las muestras 5 min. a 100°C y se cargan 10 μ L de cada una en un gel de poliacrilamida al 12%.

Protoplastos y *E.coli*. A los extractos de proteicos a partir de protoplastos o de *E.coli* se añade un volumen de tampón Laemmli 2x con azul de bromofenol. Se cargan 5 ó 10 μ L de cada una en un gel de poliacrilamida al 12%.

18.1. Transferencia de proteínas a membranas.

La transferencia de proteínas se realizó en un fuente de transferencia de Bio-Rad. Tras la electroforesis, el gel se sumerge en **tampón de transferencia** durante 15 min. a temperatura ambiente para equilibrarlo. Se colocan en el lado del ánodo 3 papeles de filtro (Whatman 3MM) del tamaño del gel empapados en tampón de transferencia. Sobre los papeles se coloca una membrana de nitrocelulosa del mismo tamaño y humedecida en tampón. Encima se coloca el gel, seguido de otros tres papeles de filtros humedecidos. La transferencia se hace a 100V durante 2 h. Las proteínas transferidas se visualizan en el filtro incubándolo durante 15 min. en una solución de Ponceau S y destiñendo en H₂O destilada. El filtro puede guardarse seco a 4°C hasta procesarse.

Tampón de transferencia: 25mM Tris, 194mM glicina y 20% metanol.

18.2. Inmunodetección.

El filtro se bloquea en una solución de tampón TBST+5%de leche en polvo desnatada (Sveltesse) durante 2h en agitación. A continuación se retira el tampón y se añade el anticuerpo a la dilución apropiada, diluido en el mismo tampón con leche en polvo fresca. En este trabajo se han usado los siguientes anticuerpos policlonales a las diluciones señaladas: anti-HSA1: 1/5000, anti-HSFA2: 1/10000 y anti-HSFB1: 1/1000 (Lyck et al.1997). Todos estos anticuerpos fueron cedidos amablemente por el Dr. Lutz Nover, U. de J.W. Goethe, Frankfurt, Alemania.

Tras la incubación con el anticuerpo durante 2 h. a temperatura ambiente u o/n a 4°C y en agitación, los filtros se lavan 3 veces en tampón TBST dejándolos en

agitación 5 min. en cada lavado. A continuación los filtros se incuban con los anticuerpos secundarios. En este trabajo el anticuerpo secundario usado es anti-conejo IgG (Bio-Rad) y la dilución usada es de 1/10000 en TBST+5% de leche en polvo desnatada. Se incuba durante 1h a temperatura ambiente en agitación. Por último, se vuelven a lavar los filtros en TBST como anteriormente y se procede a la detección usando el sistema ECL (Pierce) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Se hacen varias exposiciones en autorradigrafía a distintos tiempos de exposición.

TBST: 20mM Tris, 137mM NaCl, Ajustar el ph a 7.6 y añadir Tween-20 (Sigma) a una concentración final de 0.1%.

19. Experimentos de retardo en gel.

Estos experimentos se basan en la interacción ADN-proteínas. La unión específica de las proteínas a ADN resulta en un complejo de mayor peso molecular que producen un retardo en la movilidad del ADN en geles de acrilamida o agarosa.

19.1 Sondas usadas.

En este trabajo se han usado las siguientes sondas:

Sonda del promotor *Ha hsp17.7G4*: G4HSE

La región comprendida entre la posición (-136) hasta la (-18) del promotor *Ha hsp17.7G4* fue amplificada por PCR. El producto resulta en un fragmento de 120 p b que contiene la región con HSEs del promotor del gen *Ha hsp17.7G4*. Los oligos usados para dicha amplificación son los siguientes:

Oligo 1: 5'GCCTCTTTTCAAACCTCTG 3'.

Oligo2: 5'TGGGGGTGGGCATTTA 3'.

El programa usado para la PCR fue:

1 ciclo: 95°C 10 min.

25 ciclos: 95°C 1 min, 54°C 30 seg, 72°C 30seg.

1 ciclo: 72°C 10 min.

El producto de PCR se corrió en un gel de agarosa al 1.5% y se purificó según se describe en 11.5.

Sonda a partir de un HSE sintético: (oliHSE).

Se han usado oligonucleótidos de un HSE sintético que contine 5 pentanucleótidos consenso para la unión de los HSFs (oliHSE), contiguos y de orientación alterna, nGAAn ó nTTC, (Hübel y Shöeffl, 1994). Los nucleótidos más críticos para la unión de los HSFs en los pentanucleótidos consenso, son las guaninas y citosinas que están indicadas en negrita en la sonda oliHSE. Las sustituciones en dichos nucleótidos en la sonda oliHSEmut también están indicadas en negrita.

oliHSEWT(+): tcgaggatccta**GAA**gcT**TCC**a**GAA**gcT**TCT**a**GAA**gcagatc

oliHSEWT(-): cctaggatCTTcgAAGgtCTTcgAAGatCTTcgctctagagct

oliHSEmut(+): tcgaggatcctatA**Agc**TTacatA**Agc**TTatata**Agc**agatc

oliHSEmut(-): cctaggataTTcgA**Atg**tTA**Ata**tataTTcgctctagagct

El emparejamiento de ambas cadenas se hizo mezclando en un tubo ependorff, 1 μ g de cada oligonucleótido e hirviendo durante 10 min. a 100°C. Luego se dejó enfriar a temperatura ambiente al menos 2 h.

Sonda G1HSE

A partir del vector binario G1(RI-Sty)::GUS::nos, (véase 23.3), se amplificó la región con HSE del promotor desde la posición -110 hasta la -81. Para la amplificación por PCR se usaron los siguientes olinucleótidos, usados también para crear los sitios para la enzima de restricción Sal I a ambos lados de la región con HSE, (véase 27)

Sal1: TAATAATCCGTcGAcAAAAAAGC

Sal2: GGATATTGtCgACGTAGTAG

La T^a de hibridación usada fue de 50°C y el resto de ciclos fue similar a los descritos anteriormente para las demás sondas. El producto de la PCR es un fragmento de 88 pb y fue separado en un gel de agarosa al 2% y posteriormente purificado.

19.1.1. Marcaje de las sondas.

Las sondas fueron marcadas con γ -ATP³² usando la polinucleótido kinasa de T4 (Boehringer). Las reacciones se hicieron en tubos ependorff añadiendo: 2 μ L de

tampón de la polinucleótido kinasa 10x (Boehringer), 50ng del ADN a marcar en cada caso, $2\mu\text{L}$ de $\gamma\text{-ATP}^{32}$ ($20\mu\text{Ci}$), 0.5 unidades de la enzima polinucleótido kinasa y H_2O hasta un volumen de $20\mu\text{L}$. Las reacciones se incubaron a 37°C durante 30 min. A continuación se añadió $200\mu\text{L}$ de TE.

19.1.2. Purificación de las sondas mediante cromatografía en minicolumnas de Sephadex.

Las minicolumnas se montan en jeringas de insulina de 1 mL de volumen, selladas en su extremo inferior con lana de vidrio. El Sephadex G-25 (Pharmacia Biotech) debe estar previamente hidratado, en una proporción de 10g de Sephadex por 160 mL de agua bidestilada, y a continuación se esteriliza por autoclave. Las jeringas se rellenan con el Sephadex G-25 hidratado y se empaquetan por centrifugación a 1000 G durante 3 min. Seguidamente las minicolumnas se equilibran en la misma solución en la que están resuspendidos los ácidos nucleicos a purificar, normalmente $200\mu\text{L}$ de TE y se vuelven a centrifugar. Finalmente se pasa la solución de ácidos nucleicos a través de la minicolumna centrifugando en las mismas condiciones y recogiendo la sonda en un tubo eppendorf.

19.2 Ensayos de unión *in vitro*.

Las reacciones de unión *in vitro* en este trabajo se hicieron en un volumen final de $12\text{-}14\mu\text{L}$. En tubos eppendorf, se van añadiendo según el orden siguiente:

1. La sonda marcada. Se marcó una cantidad equimolar de cada sonda y finalmente se eluyó tras la purificación en un volumen de $200\mu\text{L}$ de TE.
2. Tampón de reacción: $6\mu\text{L}$ reacción.
3. $1.5\mu\text{L}$ poli(dI-dC) ($1.2\mu\text{g}/\mu\text{L}$) (Pharmacia Biotech Inc.).
4. Las proteínas de interés en el ensayo, bien sean purificadas o extractos proteicos con la proteína expresada.

Para los experimentos de competición positiva, en cada caso se usó un exceso molar de 50 veces de la sonda oliHSE sin marcar radioactivamente. Para la competición negativa se usó el mismo exceso molar del oligo oliHSEmut (véase 19.1).

Las reacciones de unión *in vitro* se incuban a 20°C durante 30 min. A continuación se para la reacción añadiendo tampón de carga para ADN.

Tampón de reacción: 10 mM Hepes pH 7,9; 1,5 mM MgCl_2 ; 0,05 mM EDTA; 120 mM NaCl y 6% de glicerol

19.2.1 Tratamientos con deoxicolato sódico previos al ensayo de unión *in vitro* de Lp-HSFA1 a la sonda G4HSE

Los tratamientos con deoxicolato sódico (DOC) fueron hechos según Shen y Gigot (1997). Previamente a la adición de la sonda, los extractos de proteínas fueron incubados con 0.5% de DOC durante 20 min. a 4°C. A continuación, el DOC fue neutralizado con 1% Nonidet P40 (NP40). Por último se añadió la sonda marcada para iniciar el ensayo de unión como se describió anteriormente. Para controlar el efecto del DOC, una de las reacciones se incubó añadiendo el DOC y el NP40 simultáneamente antes de la adición de la sonda.

19.3. Resolución en gel de agarosa.

Después de parar las reacciones de unión *in vitro*, los complejos proteína-ADN se resuelven en un gel al 2% de agarosa MetaPhor (FMC BioProducts) en el caso de la sonda oliHSE y de 1.2% de agarosa SeaKen Le (FMC BioProducts) para las demás sondas en TBE x 0,5, sin bromuro de etidio. La electroforesis se realizó en tampón TBE x 0,5 a 80 V hasta que el azul de bromofenol había avanzado 4,5 cm. El gen se secó entre papel de filtro durante 1 hora y en un secador de geles durante otra hora. Una vez seco se expuso en una película autorradiográfica.

20. Experimentos de doble híbrido.

Estos experimentos detectan la interacción física de dos proteínas. (Fields y Song, 1989) El factor de transcripción GAL4 contiene 2 dominios modulares que son separables físicamente. Uno es el dominio de unión, capaz de reconocer secuencias específicas en los promotores a los que regula y otro es el dominio de activación, que contacta con la maquinaria de inicio de la transcripción. Ambos dominios son requeridos para la funcionalidad de GAL4, pero pueden ser ensamblados *in vivo* a partir de ambos dominios separados.

En este trabajo se ha usado el *kit* MATCHMAKER Two-Hybrid System de Clontech. En este sistema, las secuencias que codifican los dos dominios del activador GAL4 están clonados en dos vectores distintos. En cada uno de estos vectores se clona cada proteína de interés resultando en dos proteínas de fusión; una de ellas fusionadas al dominio de unión de GAL4 y la otra al dominio de activación. La interacción física de ambas proteínas, resultará en un activador GAL4 funcional y capaz de activar genes *reporters* que vayan conducidos por promotores con sitios de unión para dicho activador. Normalmente se usan dos genes *reporters*, el gen de la histidina y el gen LacZ. Ésto permite un doble análisis en el estudio de la interacción.

La estirpe usada debe tener al menos tres auxotrofías. Dos ellas podrán ser complementadas con los dos vectores donde están clonados los genes para cada proteína de fusión. La tercera auxotrofia es la de histidina, pudiendo ser complementada sólo en el caso en el que el activador GAL4 se funcional y para ello dependerá de la interacción física de las dos proteínas a estudiar.

20.1. Vectores y estirpes usados.

Los vectores usados son:

pGAD424 (Clontech): Lleva el dominio de activación del activador GAL4 y el marcador de selección es Leucina.

PGBT9 (Clontech): Lleva el dominio de unión del activador GAL4 y su marcador de selección es Triptófano.

El ADNc de ABI3 y de Lp-HSFA1 fueron clonados en ambos vectores (véase 26.1 y 26.2.). La estirpe HF7c fue transformada con ambos vectores seleccionando en medio SD-Leu-Trp. Cuando aparecieron las colonias se cogieron dos transformantes independientes de cada transformación y se crecieron en zig-zag en placas frescas del mismo medio. Se dejó crecer a 30°C dos días. A partir de esas placas se hicieron réplicas en terciopelo a placas con medio SD-Leu-Trp-His, en placas SD-Leu-Trp y por último en placas con medio YPD. Se dejó crecer a 30°C Para controlar que el crecimiento sin histidina fuese dependiente de la presencia de ambas proteínas de fusión se transformaron dos estirpes con el vector vacío pGAD424. Cada una de ellas fue transformada en un caso con el vector pGBT9-ABI3 y en otro caso con el vector pGBT9-Lp-HSFA1.

Como control negativo, se transformó la estirpe con ambos vectores vacíos. Como control positivo, se transformó la estirpe con el vector pGAL4 (Stratagene) que llevaba clonado el ADNc completo del activador transcripcional GAL4. Esta estirpe también fue transformada con el vector pGBT9 vacío.

21. Mutagénesis dirigida mediante PCR.

La mutagénesis se ha llevado a cabo usando 2 ó 3 oligonucleótidos, según el caso. En todos ellos, uno de los oligonucleótidos contiene la/s mutacion/es que se quiere introducir. El producto de PCR se corre en un gel de agarosa, se purifica del gel y se clona en el vector correspondiente.

21.1. Mutagénesis de las regiones con HSEs del promotor *Ha hsp17.7G4*.

En este trabajo se han construido dos mutantes en las regiones con HSEs del promotor del gen *Ha hsp17.7G4*. En ambos casos se ha seguido 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 quiere mutar, y un tercer oligonucleótido que es el que contiene las mutaciones que se van a introducir. Se realizan dos reacciones de PCR. En la primera se emplean el oligonucleótido que introduce las mutaciones (M) 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.

Para todas las amplificaciones se utilizó la *Pfu* ADN polimerasa (Stratagene), Esta polimerasa tiene una tasa de error muy baja y no tiene actividad transferasa terminal.

21.1.1. Obtención del Mutante F.

Se han mutado los nucleótidos más críticos para la unión de los HSFs a la región HSE distal del promotor del gen *Ha hsp17.7G4*. El ADN molde para la reacción de PCR fue el vector pSK+::G4(ClaI-HindIII), que contiene el fragmento de 312pb desde la posición (-395) donde está el sitio de restricción para la enzima ClaI hasta la posición (-84) que contiene el sitio para la enzima de restricción **HindIII** clonado en el pSK+.

Los oligonucleótidos usados para la 1ª reacción de PCR en la que se introduce las mutaciones (en minúscula y negrita) son:

MutF: 5´GTTTGGAGACaTTGGAAAGTaTTTATAGG 3´

KS: 5´CGAGGTCGACGGTATCG 3´

El programa usado para la PCR fue:

1 ciclo: 95°C 10 min.

25 ciclos: 95°C 1 min, 54°C 30 seg, 72°C 30seg.

1 ciclo:72°C 10 min.

El producto de esta PCR es un fragmento de 313 pb y fue usado como oligonucleótido (*megaprimer*) en la segunda amplificación.

2ª reacción de PCR; los oligonucleótidos usados fueron, el producto de la 1ª PCR y el oligonucleótido T3 cuya secuencia es :

T3: 5´ ATTAACCCTCACTAAAG 3´.

El programa usado para la PCR fue:

1 ciclo: 95°C 10 min.

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

1 ciclo:72°C 10 min.

El producto de la PCR es un fragmento de 420 pb. Se corre en un gel de agarosa al 2%, se purifica. Este fragmento contiene la mutación deseada y sitios de restricción para las enzimas Clal y HindIII a ambos lados.

21.1.2. Obtención del Mutante P.

Se siguió la misma estrategia que en el apartado anterior. Las sustituciones en el mutante P crean y mejoran los pentanucleótidos consensos para la unión de los HSFs, ajustando la secuencia al consenso aGAA ó cTTC. Se modificó ambas regiones con HSEs del gen *Ha hsp17.7G4* en dos pasos. En ambos casos se usó como ADN molde el vector pSK+::G4 mutA Clal((-395)-HdII(+93) (Almoguera *et al*, 1998).

La síntesis del megaprimer para el HSE proximal se hizo usando los siguientes oligonucleótidos:

MUTP distal: 5'-ATATCCATTTCTagAAc*CTTCAAGACAATC-3'

SK: 5'TCTAGAACTAGTGGATC 3'

Nota: Esta c* se introdujo para mutar el sitio de HindIII y facilitar su posterior clonación.

La temperatura de hibridación usada para esta reacción fue de 45°C. El megaprimer de 236pb se usó para la segunda reacción de PCR junto con el oligonucleótido KS (véase 21.1.1), usando una temperatura de hibridación de 53°C. El producto de PCR de 550pb, se corre en un gel de agarosa al 1.5% y se purifica. Se digiere con Clal y HindIII y se clona en un vector pSK+ digerido también con ambas enzimas. Así, este vector contiene desde la región (-395) hasta la (+93) del promotor G4 con las mutaciones en el HSE proximal y se usará de molde para la mutagénesis del HSE distal.

Para mutar el HSE distal se usó la misma estrategia y los siguientes oligonucleótidos para la síntesis del megaprimer:

MUTP proximal: 5'-TCAAACCTCTaGAACCTTcCAGAAATATC-3'

SK: (anteriormente descrito).

La temperatura de hibridación fue de 45°C. El megaprimer de 266pb se usó para la segunda reacción de PCR junto con el oligonucleótido KS usando una temperatura de hibridación de 53°C. El producto de PCR de 550pb, se corre en un gel de agarosa al 1.5% y se purifica. Este fragmento contiene la región con HSEs del gen *Ha hsp17.7G4* con las modificaciones introducidas y dos sitios para las enzimas de restricción *Clal* y *HindIII* en ambos extremos.

21.2. Mutagénesis de la región 5' UTR del gen *Ha hsp17.7G4*.

Se hicieron 4 mutantes sustituyendo en cada uno de ellos 10 nucleótidos consecutivos en la región 5' UTR del gen *Ha hsp17.G4*, desde la posición +25 hasta la +65. Los cambios introducidos conservaban el % de A-T de la secuencia original. En los tres primeros mutantes, el cambio de secuencia generaba un sitio de restricción para el enzima *EcoRI*.

Los oligonucleótidos que introducían las 10 mutaciones (en minúscula), estaban flanqueados en ambos extremos por 15 nucleótidos que hibridaban completamente con la secuencia original, siendo por tanto la longitud de cada oligo de 40 nucleótidos totales.

MUT I: 5'CTTCACAACATTGAAGaattcacacCATCATTCATAAACA 3'

MUT II:5'TTGAAAGCAAGCATTataagaattcAAACACCCCAACAAA 3'

MUT III: 5'GCATTCATCATTTCATtcaggaattcACAAAATATTAAGT 3'

MUT IV: 5'TTCATAAACACCCCAatattcttatctAAGTTACCAACCAT 3'

En los cuatro mutantes se siguió la misma estrategia para la mutagénesis: Como ADN molde para la reacción de PCR se uso el vector pSK+::G4 *HindIII*(-84)-*HindIII*(+93), que tiene clonado un fragmento de *HindIII* de 175pb de la región 5'UTR del gen *Ha hsp17.7G4*, conteniendo la secuencia que se va a mutar.

Para la 1ª PCR se uso el oligonucleótido que introduce las mutaciones y el T3, descrito anteriormente. La Tª de hibridación usada fue de 45°C. El producto de la PCR de 186pb (megaprimer), fue usado en la 2ª reacción de PCR junto con el oligonucleótido KS, descrito anteriormente. La Tª de hibridación en este caso fue de 54°C y el producto de la PCR de 296pb fue purificado en un gel de agarosa al 2%. Estos fragmentos contienen las sustituciones en cada uno de ellos y los sitios para la enzima de restricción *HindIII* en los extremos.

21.3. Mutagénesis en el promotor CaMV35S .

Mediante mutagénesis por PCR, se introdujo un sitio para la enzima de restricción XbaI en el promotor CaMV35s en la posición (-46). El ADN molde para la reacción de PCR usado es el vector pBS:: GUS(-). Este vector deriva del pSK+ en el que se clonó un fragmento de EcoRI-HindIII del vector pBI121 (Jefferson *et al.*, 1987), conteniendo el promotor completo CaMV, el gen *gus* y el terminador de nopalina sintetasa (*nos*).

La reacción de PCR se hizo con el oligonucleótido que introducía dos cambios (en minúscula) creando el sitio de restricción y el oligo GUSIII, que hibrida en la región codificante del gen *gus*.

CaMV XbaI(-46): 5'ACTATCCTTtCtAGAC 3'

GUSIII: 5'ACGCGCTTTCCCACCAACGCTG 3'

La T^a de hibridación usada fue de 54°C. Se purificó el producto de la PCR y se digirió con XbaI y BsmI (sitio de restricción en el gen *gus*). Se clonó este fragmento en el vector pBS::GUS(-) digerido con XbaI y BsmI. Una vez clonado, se sacó de este vector el fragmento XbaI-HindIII que contenía el promotor CaMV desde la posición (-46), el gen *gus* y el terminador *nos*. Esta *cassette* se clonó en el vector pUC19 (Amersham Pharmacia) digerido con XbaI-HindIII obteniéndose el vector CaMV(-46)::GUS::*nos*

21.4. Mutagénesis de la región con HSE del promotor *Ha hsp17.6 G1*.

Se mutaron secuencialmente los nucleótido más críticos para la unión de los HSFs en la región con HSE del gen *Ha hsp17.6G1*, obteniéndose un total de 4 mutantes (véase Fig.25). Se conservaron los cambios hechos en el mutante completo del HSE del promotor *Ha hsp17.6G1*, descrito previamente en Carranco *et al.*, 1999. Los cambios fueron G por t (guanina por timina) y C por a (citosina por adenina).

En las cuatro mutagénesis se siguió la misma estrategia. Usando como molde el vector SK+(-1486)G1::GUS::*nos* procedente de la misma construcción en el vector binario pBI 101(Carranco *et al.*, 1999), se hicieron las reacciones de PCR usando cada oligonucleótido que introducía los cambios y el oligonucleótido G1oli 1:

Mut1: 5' AAAAAAGCTTATTCTCTATCTGTaCAGATAAG 3'

Mut2: 5' AAAAAAGCTTATTCTCTATCTGTCCAtATAAGTAC 3'

Mut3: 5' AAAAAAGCTTATTCTCTATCTGTCCAGATAAGTACAtAATATT
TC 3'

Mut5: 5' AAAAAAGCTTATTCTCTATCTGTCCAGATAAGTACAGAATAT
TTCAtAACACTAC 3'

G1 oli1: 5' ATGGGTCTGAATATGTTG 3'

La Tª de hibridación para la reacción de PCR fue de 46°C. El producto de la PCR de 222pb se purificó en gel de agarosa al 2%. Cada fragmento contenía una modificación en la región con HSE del gen *Ha hsp17.6G1* y los sitios de restricción para la enzima HindIII en ambos extremos.

22. Vectores binarios para transformación estable de plantas de tabaco.

22.1. Genes quiméricos Δ 2.2 y Δ Bgl II.

La fusión transcripcional Δ Bgl II procede de una delección interna de la región codificante del gen *Ha hsp17.7G4*. La fusión transcripcional Δ 2.2 procede de una delección de la región 5' transcrita no traducida del gen *Ha hsp17.7G4*. Ambas fusiones fueran hechas inicialmente en nuestro laboratorio a partir de la construcción (-1132)G4::GUS::nos en el plásmido binario pBI101.1.

22.2. Genes quiméricos G4mutI-mutIV

Las amplificaciones por PCR que contenían las mutaciones en la región 5'UTR procedentes de 21.2 fueron digeridas con la enzima de restricción HindIII y cada fragmento de 175 pb resultante de la digestión fue sustituido por el fragmento HindIII en la construcción del plásmido binario (-1132)G4::GUS::nos (Almoguera *et al.*, 1998). De esta manera se obtuvieron 4 plásmidos binarios que contenían los genes quiméricos a partir del promotor *Ha hsp17.7G4::GUS* con la región 5'UTR modificada, mut I, mut III y mut IV.

23. Plásmidos *reporters* para expresión transitoria.

23.1. Genes quiméricos G4WT y derivados con modificaciones en la región con HSEs.

Para los experimentos de expresión transitoria, se usan genes quiméricos clonados en vectores de pequeño tamaño. De esta forma, a partir de los vectores binarios (-1132)G4::GUS::nos y los mutantes B y E usados en Almoguera *et al.* (1998), se clonaron los fragmentos Sall-EcoRI de 3.5 Kb que contenían la cassette G4::GUS::nos en el vector pSK+ con las regiones con HSEs nativas y modificadas, dando lugar a los genes quiméricos G4WT, G4mutB y G4mutF.

Los productos de la PCR obtenidos en 21.1.1 y 21.1.2 conteniendo las modificaciones introducidas en el mutante F y P, respectivamente, fueron digeridos con las enzimas ClaI y HindIII. Este fragmento fue sustituido por el fragmento ClaI-HindIII del vector SK+(-1132)G4::GUS::nos, dando lugar a los genes quiméricos G4mutF y G4mutB.

23.2. Genes quiméricos G4WT(-46) y G4mutE(-46).

A partir de los plásmidos con los genes quiméricos G4WT y G4mutE descritos anteriormente en 23.1, se amplificó por PCR la región con HSEs de cada gen quimérico usando los siguientes oligonucleótidos:

G4-1: 5'GCCTCTTTTCAAACCTCTG 3'

G4-2: 5'GGGAAGAAGtctAGAGTAAGTA 3'

El oligonucleótido G4-2, introduce 3 sustituciones de nucleótidos para crear un sitio de restricción para la enzima XbaI que está subrayado. La Tª de hibridación fue de 50°C y el producto de la PCR se digiere con XbaI y se clona en el vector CaMV(-46)::GUS::nos (véase 21.3), dando lugar a los genes quiméricos G4(-46) y G4mutE(-46).

23.3. Genes quiméricos G1WT y derivados con mutaciones en la región con HSE.

A partir del plásmido binario (-1486) G1::GUS::nos descrito en Carranco *et al.*, 1999, se clonó un fragmento Xho-EcoRI de 3.9 Kb en el vector pSK+ conteniendo la secuencia del promotor desde la posición -1486 fusionado al gen *gus*. Se clonó la versión silvestre del HSE, G1WT y la mutada, G1mut0. Los productos de la PCR conteniendo las sustituciones en la región con HSE del gen *Ha hsp17.6G1* obtenidos en 21.4 fueron digeridos con la enzima de restricción HindIII y cada fragmento de 175pb resultante de la digestión fue sustituido por el fragmento HindIII-HindIII en el vector G1WT, dando lugar a los genes quiméricos mut1, mut2, mut3 y mut5.

El gen quimérico G1mutP procede del gen quimérico G1WT, en el que se modificó la región con HSE, de manera que se crea un pentanucleótido consenso para la unión de los HSFs (véase Fig.25). Este gen quimérico fue previamente construido en el laboratorio.

23.4. *Ha ds10G1*.

Este vector se describe en Prieto-Dapena *et al.*, 1999.

24. Plásmidos efectores.

24.1. Heat Shock Factors (HSFs) y derivados.

Los plásmidos de expresión en plantas que llevan clonados los genes de HSFs de tomate Lp-HSFA1 y Lp-HSFA2, Lp-HSFA1 Δ C393 y Lp-HSFA1M3 se describen en Treuter *et al.*, 1993, Scharf *et al.*, 1998 y Lyck *et al.*, 1997. El vector de expresión es el pRT101 (Töpfer *et al.*, 1997). Todos estos plásmidos fueron cedidos amablemente por el Dr. Lutz Nover, U. de J.W. Goethe, Frankfurt, Alemania.

24.2. p35S::ABI3.

Este plásmido se construyó sustituyendo el ADNc de *PvALF1* clonado en pJIT82 (Bobb *et al.*, 1995), por el ADNc de *ABI3*. El ADNc de *PvALF1* fue escindido digiriendo el vector con HindIII, romizado con klenow y digerido posteriormente con EcoRI. Así, el vector pJIT queda abierto teniendo un extremo romo y otro compatible con EcoRI. El ADNc de *ABI3* fue obtenido a partir del plásmido pcabi3-4F (Giraudat *et al.*, 1992), digiriendo con XbaI y romizando con klenow y posteriormente con EcoRI. El ADNc de *ABI3* fue clonado en pJIT.

24.3. p35S::ABI3 Δ N

El plásmido efector que expresa una versión aminoterminal truncada de *ABI3*, fue construido insertando un fragmento EcoRV-SmaI de 1372pb en el sitio de BamHI romizado con klenow del vector pRT103 (Töpfer *et al.*, 1987) en la orientación adecuada. La expresión de este ADNc resulta en una proteína ABI3 que tiene delecionada 366 aa's en su extremo aminoterminal.

25. Vectores para expresión en bacterias.

25.1. Subclonación de Lp-HSFA1 en vector de expresión en *E.coli*

El vector pET8HN se describe en Lyck *et al.*, 1997.

25.2. Subclonación de ABI3 y ABI3 Δ N en vector de expresión en *E.coli*

Para la expresión de ABI3 y ABI3 Δ N se usó el vector pRSET (Invitrogen). En ambos casos, los fragmentos procedentes del gen *ABI3* se clonaron en el sitio PvuII del vector pRSETA en la orientación y fase de lectura adecuada. Para la expresión del ADNc completo de *ABI3* se clonó un fragmento HpaI-EcoRV de 2.6Kb. La proteína de fusión generada es de 88.8 KDa. Para la expresión de la versión aminoterminal truncada de ABI3, ABI3 Δ N, se clonó un fragmento EcoRV-SmaI de 1372pb, cuya expresión da lugar a una proteína de fusión de tan sólo 396 aa's.

26. Vestores de expresión en levaduras.

26.1. Subclonación de ABI3 Δ N en vector de expresión para levaduras

Para los experimentos de doble híbrido se clonó el fragmento Sall-SmaI de 1339pb del ADNc de *ABI3* en los sitios Sall-SmaI de los vectores pGAD424 y pBGT9 (Clontech) en la fase de lectura adecuada.

26.2. Subclonación de Lp-HSFA1 en vector de expresión para levaduras.

Para los experimentos de doble híbrido, se clonó el ADNc de *Lp-HSFA1* en los sitios EcoRI de los vectores pGAD424 y pGBT9. El fragmento EcoRI de 1619pb que contenía el ADNc de *Lp-HSFA1* se obtuvo a partir del plásmido efector de Lp-HSFA1.

27. Construcción de fusiones del promotor de *Ha hsp17.6G1* con el gen *LacZ*.

En los experimentos de transactivación en levaduras se usó el plásmido reporter pZJ (Slater y Craig, 1987). Este plásmido contiene un promotor mínimo Cyc1 que conduce la expresión del gen reporter de la β -glucoronidasa. La activación del gen reporter se basa en la ganancia de función del promotor mínimo CyC1 por las secuencias clonadas aguas arriba, en este caso, secuencias del promotor *Ha hsp17.6G1*.

A partir de los genes quiméricos G1WT, G1P, G1mut0 mut1, mut2, mut3 y mut5 se amplificaron mediante reacciones de PCR usando los oligonucleótidos Sal1 y Sal2, descritos previamente en 19.1, los fragmentos de 88 pb que contenían las distintas versiones de la región con HSE del gen *Ha hsp17.6G1*. Estos fragmentos fueron digeridos con la enzima de restricción Sall, dando lugar a un fragmento de

64pb. Cada fragmento fue clonado en el sitios de XhoI del vector pZJ, dando lugar a las distintas fusiones con el gen LacZ.

28. Secuenciación.

Tanto las mutaciones hechas por PCR como las construcciones en las que se generan proteínas de fusión, se secuenciaron posteriormente para su comprobación.

28.1. Reacciones de secuenciación.

Las reacciones se realizaron por el método originalmente descrito por Sanger *et al.* (1982), que se basa en el uso de dideoxinucleótidos para producir paradas al azar en una reacción de polimerización de ADN.

Se utilizó el *kit* de secuenciación de USB (Sequenase versión 2.0) y se siguieron los protocolos del fabricante. Los oligonucleótidos se marcaron con $\alpha^{33}\text{P}$ -dATP (Amersham). Los cebadores usados flanqueaban cerca de la zona a secuenciar. El apareamiento cebador/ADN molde en las reacciones sobre ADN de doble cadena se realizó según Hsiao (1991). El ADN molde se obtiene por el método de lisis alcalina (Sambrook *et al.*, 1989), se limpia por cromatografía en columnas de Sephadex G-50, se precipita y se resuspende en 10-15 μL de TE. Se usan 5 μL de ADN por reacción de secuenciación, que se desnaturaliza con NaOH 1N en presencia del cebador. Posteriormente, se neutraliza la solución con HCl 1N, produciéndose el apareamiento del cebador al plásmido.

28.2. Electroforesis.

Los productos de la reacción de secuenciación se resolvieron en geles 8M de urea en tampón TBE conteniendo acrilamida al 6%, para lecturas de secuencia cercana al cebador, y al 4% para lejanas. El gel se monta entre dos placas de vidrio de 20x50 cm con un gradiente de grosor de 0,2 a 0,4 mm. Las placas se lavan cuidadosamente, se tratan con alcohol y la placa "con orejas" se trata además con Repel-silane (Pharmacia Biotech). Los pocillos se formaron con peines de "dientes de tiburón" de 0,2 mm de grosor.

La electroforesis se efectúa a 2750 V, usando tampón TBE 1x, como electrolito. El reparto homogéneo del calor se consigue mediante una chapa de aluminio adosada a la placa posterior de vidrio. Para controlar la migración de los fragmentos generados en la reacción de secuenciación, se adicionan los colorantes azul de bromofenol y xilencianol que migran respectivamente con fragmentos de 45 y 170 pb en un gel al 4%, y de 26 y 106 pb en un gel al 6%. Terminada la

electroforesis, la placa con orejas se separa y el gel se adsorbe a una hoja de papel Whatman 3MM. A continuación el gel se fija en una solución 10% ácido acético, 10% de metanol, durante 30 min. a temperatura ambiente. Posteriormente se seca y se expone a película autorradiográfica.

TBE x5: 445 mM Tris, 445 mM ácido bórico, 10 mM EDTA.

III. RESULTADOS

Capítulo 1. Regulación traduccional de genes quiméricos con el promotor de *Ha hsp17.7G4* durante el desarrollo embrionario

1.1. Participación de la región 5'UTR en el control de la expresión de los genes quiméricos con el promotor *Ha hsp17.7G4*

En la respuesta al calor existe, tanto en plantas como en animales, una traducción preferencial y una mayor estabilidad de los ARNm que aseguran la presencia de las proteínas necesarias para la tolerancia a dicho estrés térmico. Las regiones 5' y 3' UTR (*UnTranslated Region*; transcritas y no traducidas) de estos ARNm parecen ser las responsables de esta discriminación, aunque las secuencias concretas en *cis* implicadas se desconocen hasta ahora (Duncan *et al.*, 1994, Pitto *et al.*, 1992, Schöffl *et al.*, 1989).

Estudiamos la participación de la región 5'UTR en la expresión del gen *Ha hsp17.7G4* en tejidos vegetativos durante el estrés térmico. Para ello, en nuestro laboratorio, se hicieron dos deleciones internas a partir de la construcción (-1132)G4::GUS::nos (Coca *et al.*, 1996) dando lugar a las construcciones $\Delta 2.2$ y Δ Bgl II. En la **Fig.2** se detallan las secuencias presentes en dichas construcciones. $\Delta 2.2$ posee una deleción del 5'UTR que elimina 54 pb de dicha región. Δ Bgl II contiene toda la región 5'UTR y dos sustituciones de nucleótidos en el primer codón de la proteína HSP17.7 (G4). Estas sustituciones crean un sitio de restricción para la enzima Bgl II que fue usado para deleccionar la región codificante de HSP17.7 (G4) presente en la construcción de partida. Por tanto, las nuevas construcciones $\Delta 2.2$ y Δ Bgl II son dos fusiones transcripcionales con el gen *reporter gus*.

Obtuvimos plantas de tabaco mediante transformación usando *Agrobacterium tumefaciens*, tanto con la fusión transcripcional $\Delta 2.2$ como con

Δ Bgl II, ambas en el vector binario pBI101 (véase Materiales y Métodos, 2). La presencia y expresión de cada transgén en las plantas obtenidas se analizó inicialmente estudiando la acumulación de la proteína GUS en los tricomas mediante ensayos histoquímicos (Coca *et al.*, 1996 y Almoguera *et al.*, 1998).

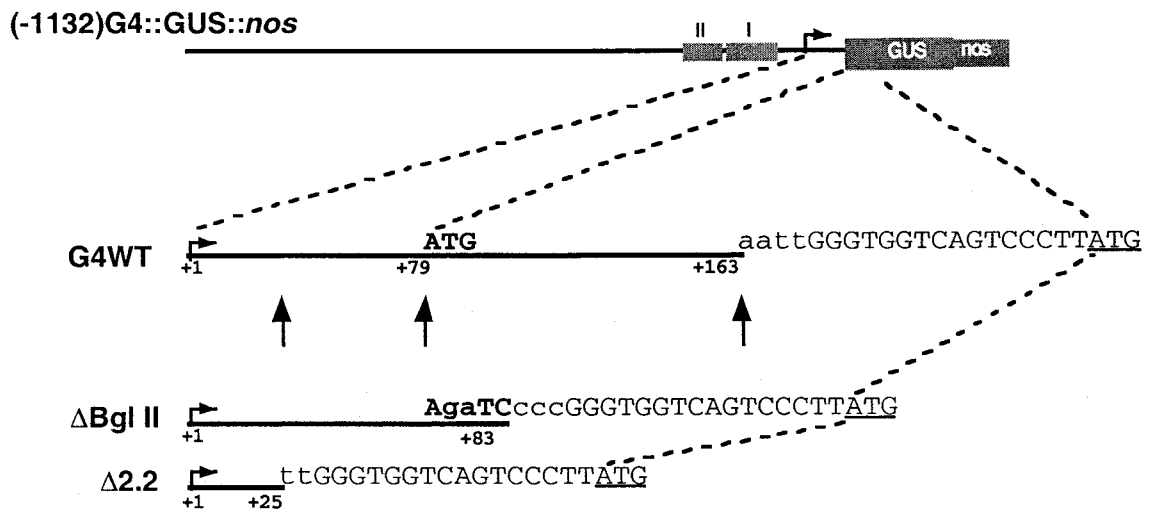


Fig.2. Mapa de la fusión traduccional (-1132)G4::GUS::nos (G4WT) y de las nuevas fusiones transcripcionales analizadas: Δ 2.2 y Δ Bgl II. La fusión (-1132)G4::GUS::nos (G4WT) contiene 1132 pb aguas arriba del sitio de inicio de la transcripción del gen *Ha hsp17.7G4*. Este sitio está indicado con una flecha. Las regiones con los HSEs proximal (I) y distal (II) están indicadas con cajas grises. Abajo se representan las secuencias comprendidas entre dicho inicio de la transcripción y el primer codón de la proteína GUS (ATG). También se indica el primer codón de la proteína HSP17.7 (ATG +79, en negrita). Las flechas verticales indican el extremo 3' de las secuencias de *Ha hsp17.7G4* presentes tanto en la fusión traduccional de partida (WT), como en las fusiones transcripcionales Δ 2.2 y Δ Bgl II. Los mapas de estas nuevas fusiones se detallan más abajo. En cada fusión se muestran las secuencias de nucleótidos del vector pBI 101.1, situadas antes del codón de iniciación de la proteína GUS (ATG). Las diferencias de secuencia entre las distintas fusiones (incluyendo las sustituciones de nucleótidos introducidas en Δ Bgl II) se indican con minúscula.

Seleccionamos semillas de 5 plantas transgénicas de cada construcción. A partir de las germínulas procedentes de estas semillas se hicieron experimentos de choque térmico. El material procesado se usó tanto para el ensayo de actividad GUS como para la extracción de ARN total. De estas mismas germínulas se obtuvieron plantas adultas que crecieron en condiciones

controladas de luz y humedad. Se recolectaron embriones a los 24 y 28 dpa (días después de la antesis). Se mezclaron muestras de embriones de cada edad procedentes de las cinco plantas de cada construcción, tomando la precaución de tomar cantidades equivalentes de embriones de cada planta. De esta forma, obtuvimos una sola muestra de embriones correspondiente a cada construcción y edad. Este material se usó tanto para los ensayos de actividad GUS como para la extracción de ARN total.

Los experimentos de protección frente a la digestión con ARNasa A se hicieron a partir de los ARN obtenidos de las germínulas control y sometidas a choque térmico y de los embriones de las plantas transgénicas de tabaco. Las ribosondas sintetizadas a partir de las cadenas no codificantes de los genes *Ha hsp17.7G4* y *NPTII* se describen en Materiales y Métodos (véase 14.1.1). Los ensayos fluorimétricos de actividad GUS en germínulas y en embriones se hicieron según se describe en Materiales y Métodos (véase 4.2). En la **Fig. 3** se muestra una tabla con los resultados de la cuantificación, para cada construcción, de los ARNm quiméricos y la actividad GUS de las germínulas (panel A) y de los embriones (panel B). Los datos correspondientes a la acumulación de ARNm provienen de los experimentos de protección frente a ARNasa A de las germínulas (panel A) y de los embriones (panel B) que se muestran en la **Fig.4**.

A)	GUS C	GUS HS	ARNm*	GUS HS*	GUS HS* / ARNm*
Δ Bgl II	204	16213	100	100	x 1
Δ 2.2	124	2959	404	18	x 0.04

B)	GUS	ARNm*	GUS*	GUS* / ARNm*
Δ Bgl II	2793	100	100	x1
Δ 2.2	247	28.7	9.1	x0.3

Fig.3. Cuantificación y normalización de la expresión de los genes quiméricos Δ 2.2 y Δ Bgl II en germínulas en respuesta a choque térmico, y en embriones en ausencia de estrés exógeno. (A) Se muestran las actividades GUS de las germínulas en condiciones control (GUS C) y sometidas a choque térmico (GUS HS), y (B) los valores promedio de dicha actividad obtenidos en dos experimentos independientes,

realizados con los embriones de 24 y 28 dpa de las plantas transgénicas con las construcciones Δ Bgl II y Δ 2.2 (GUS). Estos valores se expresan como pmoles MU/mg. prot. x min. La acumulación de los ARNm quiméricos de cada construcción se cuantificó mediante densitometría a partir de los resultados de los experimentos de protección frente a ARNasa A mostrados en la Fig.4. Los valores obtenidos se normalizaron respecto al ARNm del gen NPTII (véase Materiales y Métodos, 14.2). Los valores relativos de actividad GUS y acumulación de ARNm para el gen quimérico Δ 2.2 (respectivamente, GUS* o GUS HS* y ARNm*), se obtuvieron comparándolos con los valores correspondientes a la construcción Δ Bgl II, a los que se les asignó arbitrariamente un valor de 100 en todos los casos. En las germínulas, las actividades GUS comparadas corresponden a las muestras sometidas a choque térmico (GUS HS*). En el panel B, los valores de ARNm* corresponden al promedio normalizado obtenido en los dos experimentos realizados en embriones. La expresión de los distintos genes quiméricos se cuantificó mediante el cociente entre la actividad GUS y la acumulación de ARNm normalizada, usando los valores relativos obtenidos en cada caso: GUS HS*/ARNm* en germínulas y GUS*/ARNm* en embriones. Los resultados más relevantes se indican en negrita.

La inducción, en respuesta al choque térmico, de la actividad GUS de las germínulas portadoras de la construcción Δ BglII, (cociente entre los valores GUS HS y GUS C) fue de 79.5 veces, mientras que dicha inducción fue de tan sólo 23.8 veces en las germínulas con la construcción Δ 2.2, (Fig.3 panel A). Sin embargo, los niveles de acumulación del ARNm quimérico de la construcción Δ Bgl II, (ARNm*), fueron menores que los de la construcción Δ 2.2. La expresión de cada gen quimérico fue normalizada como se detalla en el pie de Fig.3, de manera que la relación GUS HS*/ARNm* reflejaría la síntesis de proteína GUS a partir de cada construcción. Así, en las germínulas sometidas a choque térmico, observamos que dicha síntesis fue para la construcción Δ Bgl II aproximadamente 25 veces mayor que la de Δ 2.2 (Fig.3 panel A). Esta diferencia en la síntesis de la proteína GUS fue confirmada por análisis *western* de los extractos proteicos respectivos, usando anticuerpos comerciales frente a la proteína GUS (datos no mostrados). Estos resultados indican que la delección efectuada en el 5'UTR del gen *Ha hsp17.7G4* tienen un efecto negativo sobre la traducción de los ARNm quiméricos de la construcción Δ 2.2; y que, por lo tanto, dicha región participaría potenciando la traducción del gen *Ha hsp17.7 G4* en situaciones de choque térmico.

III. Resultados

Del mismo modo, cuantificamos la expresión de los genes quiméricos Δ Bgl II y Δ 2.2 en los embriones de las plantas transgénicas (Fig.3 panel B). En este caso, la acumulación de los ARNm quiméricos de la construcción Δ 2.2 (ARN*) fue menor que la de los de Δ Bgl II. La menor acumulación en Δ 2.2, pudiera ser debida tanto a efecto(s) transcripcionales, como post-transcripcionales (que afecte(n) por ejemplo a la estabilidad de los mensajeros). Además de esta menor acumulación, la relación (GUS*/ARNm*) para la construcción Δ 2.2 indicó que sus mensajeros no se traducían tan eficientemente como los de Δ Bgl II, reduciéndose la síntesis de la proteína GUS hasta aproximadamente un 33% (Fig.3 panel B).

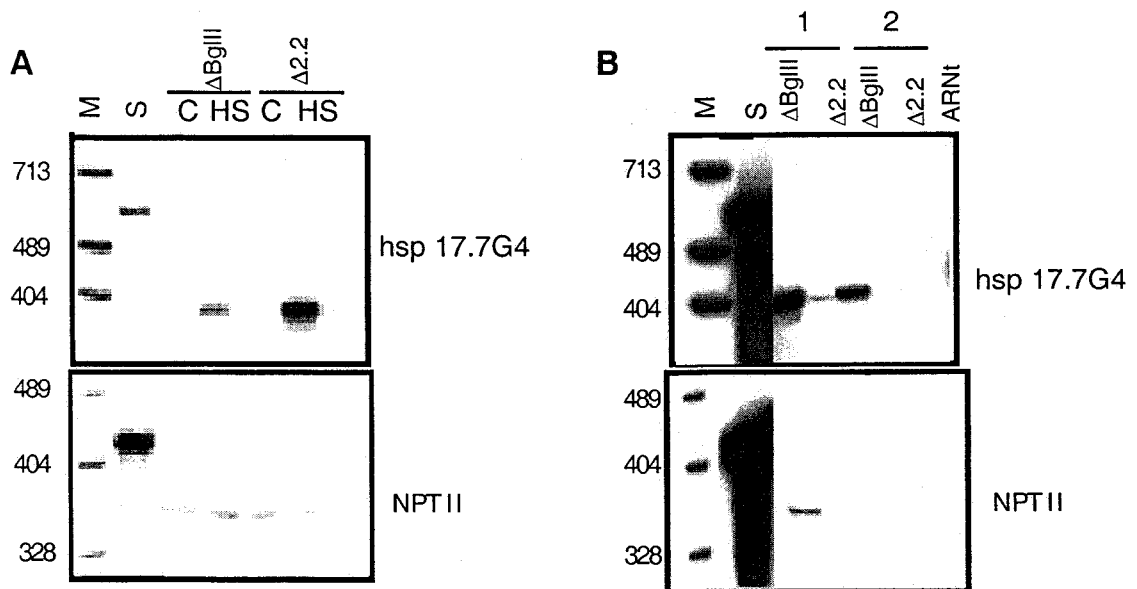


Fig.4. Acumulación de los ARNm quiméricos de las fusiones Δ 2.2 y Δ Bgl II en germínulas sometidas a choque térmico, y en embriones en ausencia de estrés exógeno. (A) Se muestran los resultados de la protección frente a la digestión con ARNasa A usando el ARN total de las germínulas sometidas a choque térmico (HS) o sin tratar (C), y para los distintos genes quiméricos. (B) Resultados de los dos experimentos independientes de protección (respectivamente 1 y 2) realizados con las muestras de ARN de los embriones de 24 y 28 dpa. El tamaño de los fragmentos protegidos tras la digestión de las hibridaciones con la ribsonda procedente del gen *Ha hsp17.7 G4* es de 394 pb. En la parte inferior de los Paneles A y B se muestran los fragmentos protegidos, en este caso de 357 pb, que se observan usando las mismas muestras con la ribsonda del gen NPT II. Otros carriles: (M), marcador de peso molecular (véase Materiales y Métodos 14.2.2); (S), ribsondas sin digerir; (ARnt), hibridaciones de las ribsondas con ARnt.

Por tanto, con el análisis de las deleciones Δ Bgl II y Δ 2.2 hemos acotado una región del 5'UTR que participa en la regulación traduccional del gen quimérico con el promotor *Ha hsp17.7G4* tanto en la respuesta al calor como durante el desarrollo embrionario zigótico, en este caso a temperaturas normales de crecimiento. Las secuencias implicadas en dicha regulación, acotadas por la deleción Δ 2.2, están comprendidas entre las posiciones +25 y +79 a partir del inicio de la transcripción de *Ha hsp17.7G4*.

1.2. Análisis de la expresión durante el desarrollo embrionario de genes quiméricos mutantes en la región 5'UTR de *Ha hsp17.7G4*

Mediante mutagénesis dirigida de la región 5'UTR, realizamos un análisis más exhaustivo de las secuencias implicadas en la regulación traduccional de la expresión del gen quimérico con el promotor gen *Ha hsp17.7 G4* durante la repuesta al calor y en el desarrollo embrionario. Todos los trabajos previos en los que se había analizado la expresión del gen *Ha hsp17.7G4* en plantas transgénicas de tabaco, se habían hecho usando distintos genes quiméricos derivados de la construcción (-1132)G4::GUS::nos (Coca *et al.*, 1996 y Almoguera *et al.*, 1998). Esta construcción es una fusión traduccional (véase Fig.2) que se expresa durante la embriogénesis zigótica a temperatura ambiente, y en tejidos vegetativos en respuesta tanto al choque térmico como a la hormona ácido abscísico (ABA, véase la Introducción). Por tanto, conociendo el patrón de expresión de esta fusión en plantas transgénicas de tabaco, decidimos usarla para estudiar el papel de las secuencias 5'UTR acotadas anteriormente mediante deleciones. De este modo, a partir de la construcción con el 5' UTR "silvestre" (-1132)G4::GUS::nos, a la que denominamos G4WT, mutagenizamos dicha región, desde la posición +25 (donde acaba la construcción Δ 2.2) hasta la posición +65. Obtuvimos 4 mutantes, denominados I-IV. En cada mutante se sustituyeron 10 nucleótidos consecutivos (**Fig. 5A**). Así obtuvimos nuevas fusiones traduccionales que contenían las mismas secuencias que la construcción de partida (G4WT), excepto los cambios introducidos en el 5'UTR. Los distintos

ARNm quiméricos difieren, por lo tanto, únicamente en dichos cambios; mientras que las proteínas GUS codificadas por las construcciones mutantes son exactamente iguales a la de la construcción silvestre.

La secuencia de nucleótidos del 5'UTR de *Ha hsp17.7G4* es muy rica en A y T, lo que hace que las estructuras secundarias que pudieran formarse en el ARNm sean muy poco estables. Por ello, tomamos la precaución de mantener el contenido en A+T en las sustituciones hechas en los cuatro mutantes. También analizamos la secuencia de los ARNm quiméricos, de los distintos mutantes y del silvestre, mediante el programa FOLDRNA del Genetics Computer Group de la Universidad de Wisconsin (Devereux *et al.*, 1984). Las posibles estructuras secundarias y su estabilidad fueron muy similares (datos no mostrados).

Los genes quiméricos correspondientes a los cuatro mutantes fueron clonados en el vector pBI101.1 para la obtención de plantas transgénicas mediante la transformación con *Agrobacterium* (véase Materiales y Métodos, 22.2.). No obtuvimos un número suficiente de plantas transgénicas para el mutante II y por tanto no fue posible su estudio exhaustivo. Proseguimos el análisis de los otros tres mutantes. Para ello, recolectamos embriones de distintas edades a lo largo del desarrollo embrionario procedentes de 10 plantas de cada construcción. A partir de este material se analizó la actividad GUS y el resto se guardó a -80°C para la obtención de ARN. En la **Fig. 5B**, se indican las actividades GUS de cada construcción obtenidas a partir de los embriones recolectados desde 16dpa hasta 28dpa.

A los 12 y 16dpa, todos los mutantes presentaron unos niveles de actividad GUS estadísticamente similares a los del silvestre (comparaciones estadísticas no mostradas). Por tanto, ninguna de las modificaciones realizadas en los mutantes afectaron la expresión del gen *Ha hsp 17.7G4* en fases relativamente tempranas de la embriogénesis zigótica.

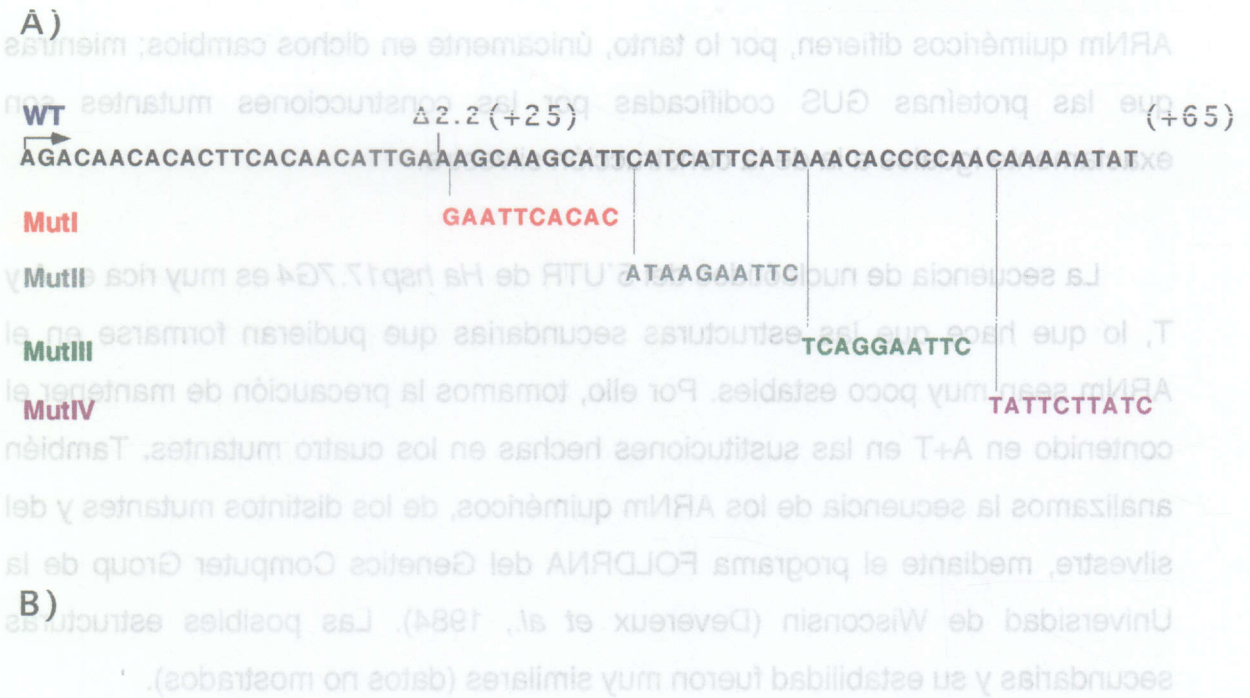


Fig.5(A) Secuencia del 5'UTR del gen *Ha hsp17.7G4* y modificaciones introducidas en los mutantes I-IV. Se muestra la secuencia de nucleótidos del gen *Ha hsp17.7G4*, desde el inicio de la transcripción, indicado con una flecha, hasta la posición +65 (5'UTR G4WT). Bajo esta secuencia se indican las 10 sustituciones introducidas en cada mutante. La posición del primer nucleótido modificado en cada mutante se señala con una barra vertical. También se indica el límite de la delección 2.2 ($\Delta 2.2$) en la posición +25. **(B) Valores de actividad GUS durante el desarrollo embrionario en plantas transgénicas con los distintos genes quiméricos analizados.** Se representan las medias de los valores obtenidos con muestras de 10 plantas distintas para cada construcción. Las barras representan el error estándar. Los asteriscos indican las diferencias significativas observadas mencionadas en el texto.

En otras etapas más tardías, (a los 24 y 28dpa), la actividad GUS observada con el mutante I tampoco fue significativamente distinta a la del WT (24dpa: $F=0.130$, $P=0.7187$; 28dpa: $F=0.03$, $P=0.863$). Este dato indica que la región afectada por las modificaciones del mutante I no participa en la regulación de la expresión del gen quimérico durante el desarrollo embrionario. El mutante III presentó en cambio niveles de actividad GUS aparentemente menores que los del silvestre. Sin embargo, el análisis estadístico de los datos reveló que dichos valores no eran significativamente distintos, ni a 24, ni a 28dpa ($F=1.089$, $P=2.979$ y $F=1.499$, $P=0.2223$, respectivamente). Finalmente, la misma comparación con el mutante IV, resultó en una disminución significativa de la actividad GUS respecto a la del gen silvestre, tanto a 24 como a 28dpa. ($F=12.026$, $P=0.0006$ y $F=4.877$, $P=0.0284$, respectivamente). Este resultado indica que la región del 5'UTR modificada en este mutante participa la regulación de la expresión durante las fases tardías de la embriogénesis, al menos en los genes quiméricos y quizás en el propio gen *Ha hsp17.7G4*. Dado que la proteína GUS codificada por todos los genes quiméricos analizados es idéntica, podemos descartar una regulación post-traducciona diferencial como explicación de los resultados observados.

1.3. Acumulación de ARNm quiméricos mutantes en la región 5'UTR de *Ha hsp17.7G4* en embriones de plantas transgénicas

Para investigar la causa de la disminución de la actividad GUS observada con el mutante IV (Fig.5B), estudiamos los niveles de acumulación de los ARNm quiméricos en aquellos estadios de la embriogénesis en los que difería del silvestre, es decir a 24 y 28dpa. Se extrajo ARN total a partir de los embriones recolectados de las plantas transgénicas respectivas. Para obtener una mayor cantidad de ARN, y puesto que los niveles alcanzados a ambas edades no diferían significativamente para cada construcción (Fig.5B), se mezclaron los embriones de ambas edades y de las 10 plantas de una misma construcción; tomando la precaución de tomar cantidades de embriones equivalentes de cada planta. De esta forma, obtuvimos una sola muestra de embriones para cada

construcción. A cada muestra se le midió la actividad GUS para compararla con el nivel de acumulación del ARNm quimérico correspondiente. Esto último se determinó mediante un experimento de protección frente a la digestión con ARNasa A. Las hibridaciones de los ARN totales obtenidos a partir de las muestras anteriormente descritas se hicieron con las ribosondas sintetizadas a partir de las cadenas no codificantes de los genes *Ha hsp17.7G4* y *NPT II*; añadiendo ambas ribosondas a la vez en este experimento. Los fragmentos protegidos que se detectan con ambas sondas son de distinto tamaño y fácilmente distinguibles.

En la **Fig. 6A** se muestran una tabla con los resultados de la cuantificación de los ARNm quiméricos y de la actividad GUS en las muestras de embriones de las plantas transgénicas de tabaco. Los datos de acumulación de ARNm corresponden al experimento de protección frente a ARNasa A presentado en la **Fig 6B**. La actividad GUS medida en mezcla de embriones de 24 y 28 dpa (también en la Fig 6A) fue similar a los valores obtenidos anteriormente procesando los embriones independientemente por edad y planta (Fig. 5B). Esto confirma la validez del procedimiento de muestreo usado.

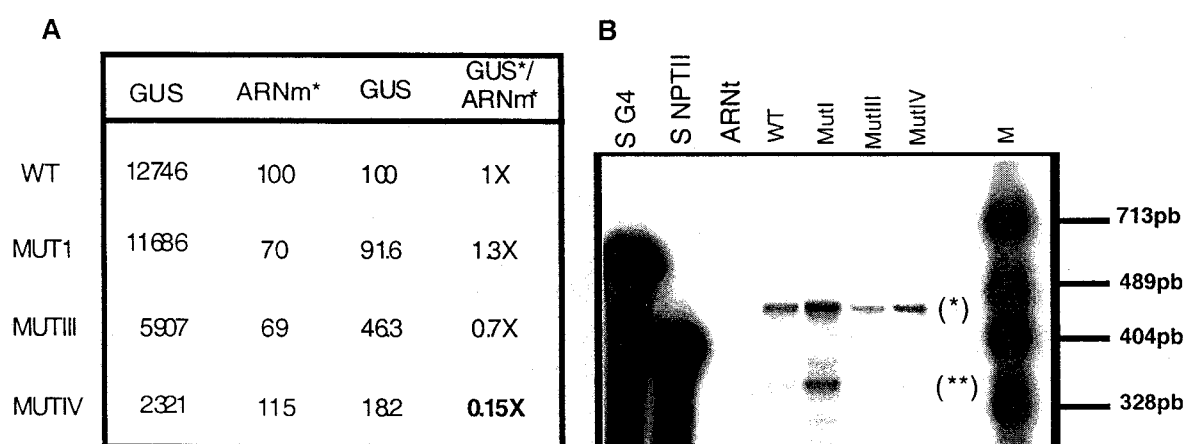


Fig.6 (A) Cuantificación y normalización de la expresión en embriones de las plantas transgénicas con los genes quiméricos mutantes en el 5'UTR. Los niveles de acumulación de los ARNm quiméricos de cada construcción fueron cuantificados y normalizados, respecto al ARNm del gen *NPTII*, por análisis densitométrico (véase Materiales y Métodos, 14.2). Los valores normalizados de actividad GUS (GUS*) y de

acumulación de ARNm (ARNm*) de los genes quiméricos mut I, mut III y mut IV se obtuvieron por comparación con los respectivos de la construcción G4WT, a los que se asignó arbitrariamente un valor de 100. La expresión de los distintos genes quiméricos se cuantificó mediante el cociente entre la actividad GUS y la acumulación de ARNm normalizada. Los resultados más relevantes se indican en negrita **(B) Datos experimentales correspondientes a los valores del panel A.** Se muestra la protección frente a la digestión con ARNasa observada con el ARN total de los embriones de 24 y 28dpa. El tamaño de los fragmentos protegidos fue de 476 pb (*), tras la digestión con la ribosonda procedente del gen *Ha hsp17.7 G4*, y de 357 pb (**) con la ribosonda procedente del gen NPT II. Otros carriles: (M), marcador de peso molecular (véase Materiales y Métodos, 14.2.2); (SG4), ribosonda sintetizada a partir del gen *Ha hsp17.7G4* sin digerir; (SNPTII), ribosonda sintetizada a partir del gen *NPTII* sin digerir; (ARNt), hibridaciones de la ribosonda con ARNt.

Así, el mutante I alcanzó unos niveles de actividad GUS similares a los del silvestre; mientras que en el mutante III y, más drásticamente, en el mutante IV la actividad GUS se redujo. En cambio, los niveles normalizados de ARNm quiméricos no fueron muy diferentes entre los mutantes y el silvestre; tan sólo observamos una pequeña disminución en los niveles de los mutantes I y III. Estos pequeños cambios no se corresponden completamente con los valores de la actividad GUS normalizada, lo que se refleja en el cociente entre ambos valores (Fig 6A). Así, la actividad GUS normalizada en el mutante III fue menor que la del silvestre y por tanto también lo fue dicho cociente.

El efecto más drástico lo observamos con el mutante IV. En este mutante, la acumulación de ARNm quimérico fue similar a la del silvestre. Sin embargo, dada la disminución en su actividad GUS, el cociente entre ambos valores normalizados fue unas 7 veces menor que la del silvestre (Fig. 6A). Por tanto, las sustituciones introducidas en este mutante no parecen disminuir la transcripción ni la estabilidad del ARNm quimérico, sino que reducirían su traducción eficiente durante la embriogénesis tardía a temperaturas normales de crecimiento. Así estos resultados indican la existencia de una regulación traduccional embrionaria del gen quimérico con el promotor *Ha hsp17.7G4*, en las que las secuencias reguladoras implicadas están en la región del 5'UTR que contiene las mutaciones en el mutante IV, es decir desde la posición +56 hasta la posición +65 (Fig. 5A).

1.4 Respuesta al ácido abscísico de los genes quiméricos mutantes en la región 5´ UTR de *Ha hsp17.7G4* en germínulas de plantas transgénicas

Como comentamos anteriormente, la fusión G4WT se expresa no sólo durante la embriogénesis zigótica a temperatura ambiente sino también en tejidos vegetativos en respuesta al choque térmico o al ácido abscísico (ABA) (Coca *et al.*,1996). Dado este patrón de expresión, nos preguntamos si las secuencias implicadas en la regulación traduccional durante las fases tardías del desarrollo embrionario (Fig. 5A) también participan en otras condiciones. Por ello investigamos el efecto de las mutaciones en la región 5´UTR en la respuesta al ácido abscísico de los genes quiméricos en germínulas.

Se germinaron semillas procedentes de todas las plantas transgénicas analizadas durante el desarrollo embrionario (Fig.5B). A los 15 días tras la inhibición (dpi, días post-imbibición) en medio MSK, las germínulas se traspasaron a placas Petri con medio MSK fresco (germínulas control), o a placas con MSK+ 100 μ M de ABA (ABA, germínulas tratadas). A los 4 días tras el tratamiento, las germínulas se recogieron y procesaron para los ensayos fluorimétricos de actividad GUS. En la **Fig. 7** se muestran los resultados obtenidos. Las germínulas tratadas con ABA del mutante I presentaron unos niveles de actividad GUS mayores que las del silvestre (F=9.867, P=0.0024). Sin embargo, la comparación de los niveles de inducción de este mutante y los del silvestre no reveló una diferencia significativa entre dichos valores (F=0.34, P=0.55). Igualmente, tampoco fue diferente del silvestre la inducción alcanzada por el mutante III (F=2.35, P=0.13).

El resultado más relevante de este experimento fue el obtenido con el mutante IV. La actividad GUS de las germínulas con este mutante fue similar a la obtenida por el silvestre, tanto en control como en respuesta a ABA (Control: F=0.99, P=0.322; ABA: F=2.16, P=0.14); siendo por tanto también similares los niveles de inducción de ambos.

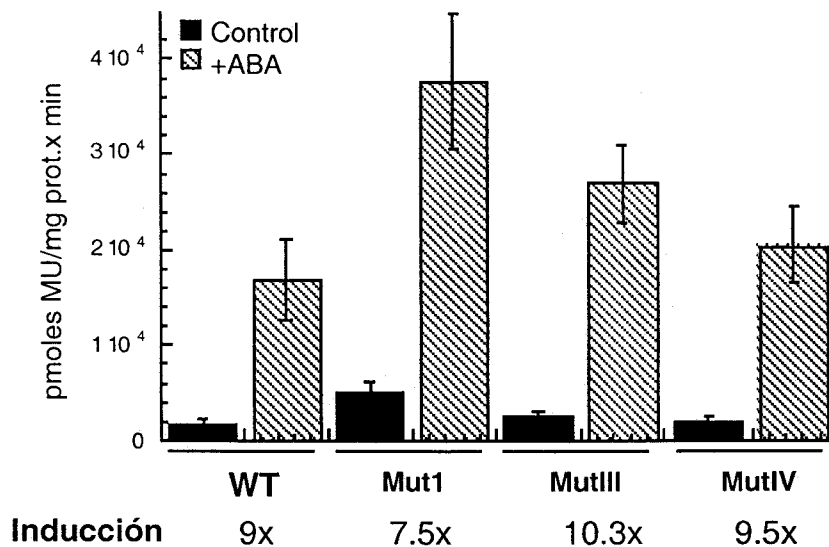


Fig.7. Respuesta al ácido abscísico (ABA) en germínulas con los genes quiméricos mutantes en el 5'UTR de *Ha hsp17.7G4*. Se representa la media de las actividades GUS, correspondiente a germínulas sin tratar (control) o tratadas con ácido abscísico (+ABA). Se utilizaron muestras procedentes de 10 plantas transgénicas distintas con cada construcción. De cada planta se analizaron aproximadamente 25 germínulas. Todas las medidas fluorimétricas se hicieron por duplicado y las barras representan su error estándar. Abajo, se indican los niveles de inducción definidos como la razón entre las actividades medias obtenidas con las germínulas tratadas con ABA y las correspondientes a las germínulas sin tratar para cada gen quimérico (es decir: ABA/Control).

En consecuencia, el efecto negativo sobre la expresión del gen quimérico que habíamos observado con el mutante IV durante las fases tardías de la embriogénesis, no se produjo en las germínulas en respuesta al ABA. Estos resultados indican que las secuencias presentes en la región 5'UTR, desde la posición +56 hasta la +65, participan en la regulación traduccional de la expresión del gen *Ha hsp17.7G4* durante el desarrollo embrionario zigótico, pero no así en la regulación de la expresión de dicho gen en respuesta al ABA en tejidos vegetativos.

1.5. Respuesta al choque térmico de los genes quiméricos mutantes en la región 5' UTR de *Ha hsp17.7G4* en plantas transgénicas

Mediante el análisis de deleciones de la región 5'UTR del gen *Ha hsp17.7G4* realizado previamente (véase Fig.3, paneles A y B), habíamos acotado una región que participa en la regulación traduccional de los genes quiméricos, tanto en la respuesta al calor en tejidos vegetativos como a temperaturas normales de crecimiento en las fases tardías de la embriogénesis (Fig.3, panel A y B). El análisis mediante mutagénesis de parte de la región acotada nos ha permitido identificar secuencias implicadas en la regulación traduccional durante el desarrollo embrionario (Fig. 6A). Investigamos si estas mismas secuencias también participan en la regulación durante la respuesta al choque térmico.

De cada construcción seleccionamos 5 de las 10 plantas transgénicas que previamente habían sido analizadas durante el desarrollo embrionario y en respuesta al ABA en germínulas (véase Figs.5B y 7). De las semillas de cada una de estas 5 plantas se obtuvieron y seleccionaron 2 germínulas descendientes distintas (es decir un total de 10 descendientes por cada construcción). Estas dieron lugar a plantas adultas que se cultivaron en condiciones controladas de luz, temperatura y humedad. Las plantas fueron sometidas a choque térmico según se describe en Materiales y Métodos (véase 1.1.5.2.).

Los ensayos de actividad GUS se hicieron a partir de extractos de proteínas del tallo, donde previamente se había observado, con la fusión G4WT, la inducción por calor de niveles substanciales de actividad GUS (Coca *et al.*, 1996). Ya que el mutante I no tuvo efecto alguno durante el desarrollo, no estudiamos su expresión en la respuesta al calor.

Como se observa en la **Fig.8**, ninguno de los dos genes quiméricos mutantes analizados se vió afectado en su respuesta al calor. Así, el mutante IV presentó unos niveles de actividad GUS similares a los del silvestre, tanto en condiciones

III. Resultados

control ($F=1.74$, $P=0.19$) como tras el choque térmico ($F=2.48$, $P=0.122$). Por lo tanto, la traducción durante la respuesta al calor y en el desarrollo embrionario (véase Fig.3), parecen no estar reguladas por las mismas secuencias del 5'UTR (véase la Discusión).

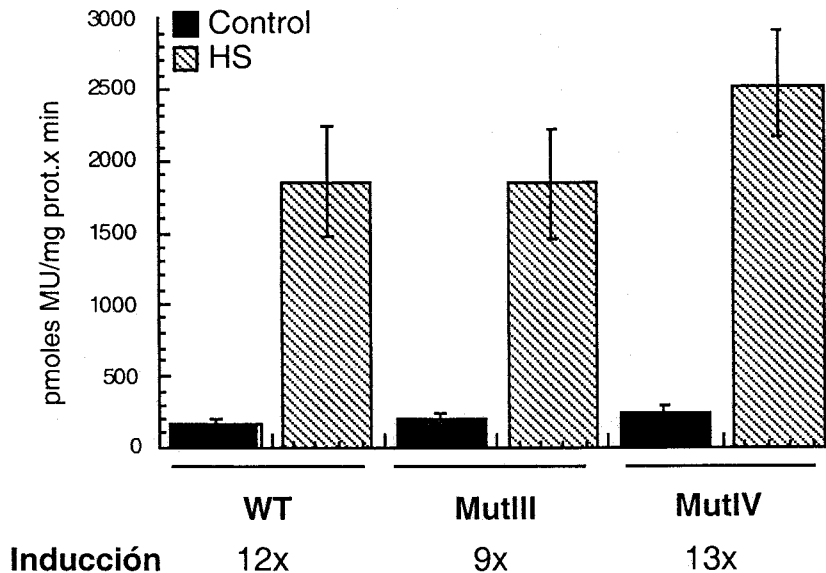


Fig.8. Respuesta al choque térmico de los genes quiméricos mutantes en el 5'UTR de *Ha hsp17.7G4*. La actividad GUS se midió en extractos de proteínas del tallo de plantas transgénicas sometidas a choque térmico (HS) o sin tratar (Control). Se representa la media de los valores obtenidos con la muestras cuyo tamaño y composición se detalla en el apartado de resultados (1.5). Las barras representan el error estándar. Abajo, se indican los niveles de inducción, definidos como la razón entre las actividades medias obtenidas en las plantas sometidas a choque térmico y las correspondientes a las plantas sin tratar para cada gen quimérico (es decir: HS/Control).

Capítulo 2. Regulación transcripcional de genes quiméricos con el promotor *Ha hsp17.7G4*

2.1. Transactivación, por Lp-HSFA1, de genes quiméricos en embriones de girasol

El análisis de los genes quiméricos con mutaciones en las regiones con HSEs del gen *Ha hsp17.7G4* en plantas transgénicas de tabaco había revelado previamente la funcionalidad de estas regiones en la expresión de los genes quiméricos durante las fases tardías del desarrollo embrionario (Almoguera *et al.*, 1998). Hemos estudiado la implicación de HSFs, en dicha expresión, mediante experimentos de expresión transitoria tras el bombardeo de micropartículas de oro cubiertas de ADN. Esta técnica se describe en Materiales y Métodos (5).

Hemos usado la construcción quimérica (-1132) G4::GUS::*nos* (silvestre, G4WT) (véase Fig.1) y distintas versiones mutadas de las regiones HSEs como plámidos *reporters* (véase Materiales y Métodos, 23.1). En la **Fig.9** se representan las fusiones traduccionales usadas, indicando las secuencias de las regiones HSEs del promotor *Ha hsp17.7G4* y los cambios de nucleótidos realizados en cada mutante.

En la **Fig.10A**, se muestran las actividades obtenidas en embriones de girasol bombardeados con las distintas construcciones quiméricas. Tanto las mutaciones en la región HSE proximal (G4mutB) como en la región HSE distal (G4mutF), o en ambas regiones (G4mutE), redujeron significativamente la actividad GUS en embriones comparadas con las actividades obtenidas con el silvestre. (G4mutB, $F=30.53$, $P=0.0001$; G4mutF, $F= 37.3$, $P= 0.0001$; G4mutE, $F= 37.7$, $P= 0.0001$). El mutante G4P, cuyas substituciones de secuencia mejorarían los sitios de unión para los HSFs (Barros *et al.*, 1992), presentó unos niveles de actividad GUS significativamente mayores que los del silvestre.

(diferencia de unas 5 veces: $F= 207$, $P= 0.0001$). Estos resultados confirman la implicación de las regiones HSEs en la regulación de la expresión del gen quimérico G4WT, e indican la existencia de HSFs endógenos en los embriones de girasol utilizados en nuestros ensayos

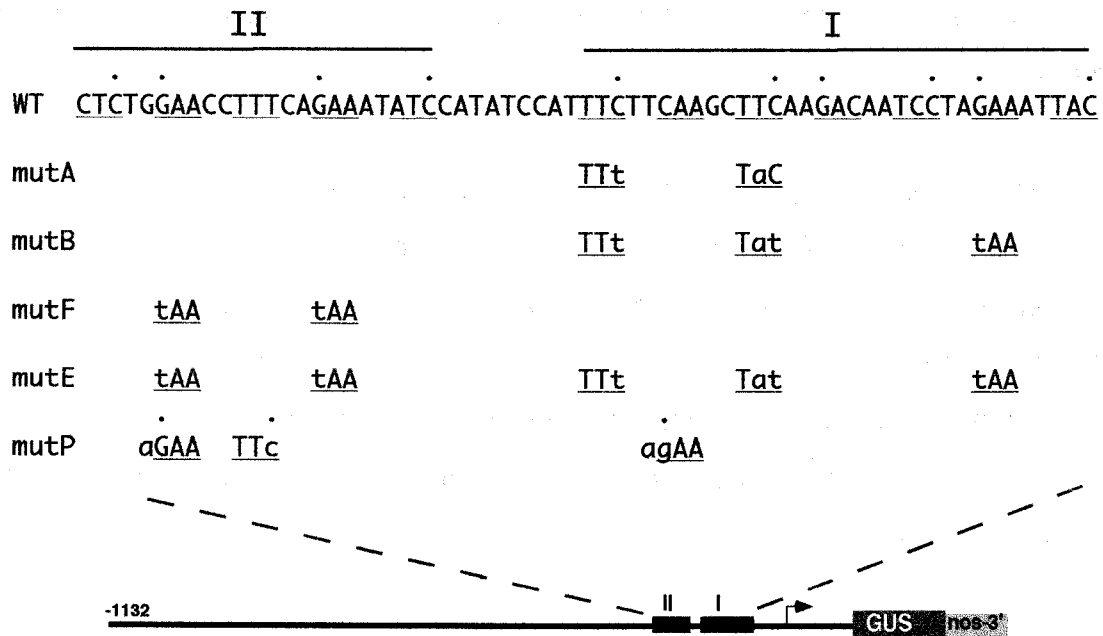


Fig.9. Fusiones traduccionales de los genes quiméricos con secuencias del promotor *Ha hsp17.7G4*. Se indica la secuencia de nucleótidos del promotor *Ha hsp17.7G4*, desde la posición (-121) hasta la posición (-57). Esta zona comprende la región con los HSEs (II y I), señalados con corchetes. Las secuencias consenso -GAA y TTC- del núcleo de las repeticiones para la unión de los HSFs están subrayadas. Los nucleótidos más críticos para dicha unión, (G ó C) se señalan con un punto arriba. Abajo se representa un esquema de la fusión traduccional del gen quimérico (-1132)G4::GUS::nos, (G4WT). El sitio de inicio de la transcripción se representa con una flecha. Los distintos mutantes, (G4mutA, G4mutB, G4mutF, G4mutE y G4mutP), fueron construidos a partir de dicha fusión traduccional, introduciendo en cada caso las sustituciones de nucleótidos, indicadas en minúsculas.

A continuación, analizamos la transactivación de cada construcción (la original y los distintos mutantes) usando un plásmido efector que expresa constitutivamente el ADNc de un HSF de tomate (Lp-HSFA1, véase Materiales y Métodos 24.1). El bombardeo con dicho plásmido produjo la activación transcripcional del gen quimérico original G4WT (Fig.9B). Así, observamos una inducción significativa ($F=539.72$, $P=0.0001$) de 19.7 veces sobre los niveles basales obtenidos con la misma construcción en ausencia del plásmido efector (-).

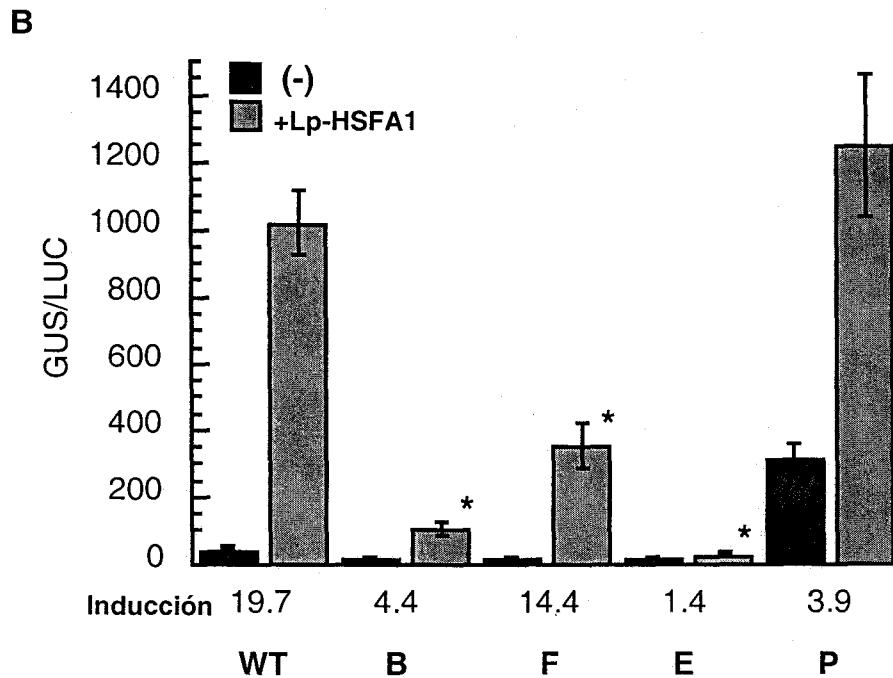
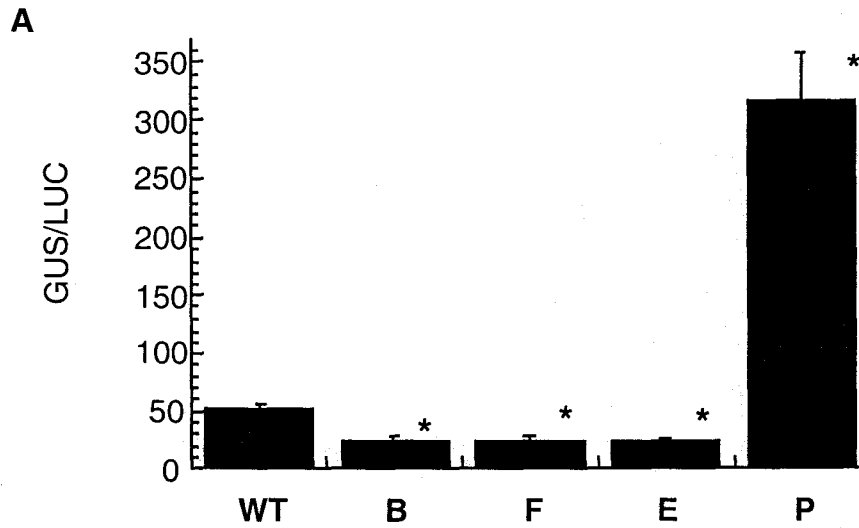


Fig.10 (A) Actividad de los distintos genes quiméricos con secuencias del promotor *Ha hsp17.7G4* tras el bombardeo de embriones de girasol. Se indican las medias de las actividades GUS normalizadas con las actividades luciferasa (LUC). Las barras representan los errores estándar de las medias correspondientes a 5 experimentos independientes con 5 disparos cada uno. Abajo se indican los distintos genes quiméricos ensayados: WT, G4 silvestre; B, G4mutB; F, G4mutF; E, G4mut E y P,

G4mut P. Los asteriscos indican las diferencias significativas, respecto a la actividad de WT, explicadas en el texto. **(B). Transactivación por Lp-HSFA1.** Los genes quiméricos se ensayaron con (+Lp-HSFA1), o sin (-), un plásmido efector que expresa constitutivamente el HSFA1 de tomate. El número de experimentos realizados con cada gen quimérico varió entre 4 (para G4mutB+Lp-HSFA1) y 13 (para G4WT+Lp-HSFA1), efectuándose en todos los casos 5 disparos por cada experimento. El nivel de inducción indicado en la parte inferior de la figura, viene dado como la razón entre las actividades normalizadas obtenidas tras el bombardeo con y sin el plásmido efector. Como se detalla en el texto, todas las diferencias observadas entre los niveles de inducción fueron estadísticamente significativas, a excepción del mutante E. Resto de los símbolos como en A.

Las mutaciones tanto en la región HSE proximal (G4mutB) como en la región HSE distal (G4mutF), redujeron, aunque no abolieron, la transactivación por Lp-HSFA1, indicando la contribución funcional relativa de cada región. Así, en el caso de mutante G4mutF, la inducción fue de 14.4 veces y para el mutante G4mutB de 4.4 veces. Estos resultados indican una mayor contribución de la región HSE proximal a la activación transcripcional del gen *Ha hsp17.7G4* en embriones de girasol, lo que confirma observaciones previas, con los mismos genes mutantes, en plantas transgénicas de tabaco (Coca *et al.*, 1996 y Almoguera *et al.*, 1998). Las actividades basales obtenidas con cada construcción en ausencia del plásmido efector, son mínimas frente a las obtenidas en su presencia. En estas últimas condiciones de ensayo podemos observar que la suma de las actividades obtenidas con los dos mutantes (G4mutB y G4mutF) es significativamente menor que la obtenida con el silvestre ($F=5.02, P=0.028$). Este resultado sugiere la existencia de una cierta cooperatividad, entre las dos regiones con HSEs, para la activación transcripcional del gen quimérico G4WT en embriones.

El mutante G4mutE, es el más afectado en la unión *in vitro* de HSF1 humano y en la expresión del gen quimérico correspondiente durante la desecación de los embriones en plantas transgénicas de tabaco (Almoguera *et al.*, 1998). Este mutante resultó nulo para la transactivación por Lp-HSFA1. Por otro lado, los altos niveles basales (-) obtenidos en el mutante G4mutP, resultaron en una menor inducción transcripcional por Lp-HSFA1 que el silvestre, siendo ésta de tan sólo unas 3.9 veces (**Fig. 10B**).

Estos resultados confirman que el promotor *Ha hsp17.7G4* pudiera estar regulado transcripcionalmente por HSFs. El uso de la técnica de expresión transitoria tras el bombardeo con distintos plásmidos, nos facilita el estudio de la regulación de este gen en un sistema homólogo, complementando y ampliando los análisis que se habían realizado hasta el momento en plantas transgénicas de tabaco con genes quiméricos conteniendo secuencias del promotor de dicho gen.

2.2. Transactivación por ABI3 del gen quimérico G4WT en embriones de girasol

Algunas observaciones del laboratorio de E. Vierling, (U. Arizona, Tucson), indicaban la posible implicación de genes reguladores embrionarios en la activación de promotores sHSP de plantas. Estas observaciones incluían el efecto de mutantes en el gen *ABI3*, un factor transcripcional de *Arabidopsis thaliana* (Giraudat *et al.*, 1992). Existen genes ortólogos a *ABI3* clonados en otras especies vegetales. Los mutantes en dichos genes son insensibles al ácido abscísico en semillas y están afectados en la expresión génica de varios programas del desarrollo embrionario. Así, uno de los efectos que presenta el mutante nulo de *Arabidopsis abi3-6*, es la ausencia de las sHSPs expresadas normalmente en semillas (HSP17.4 y HSP17.6), sin afectar en cambio a la acumulación de dichas proteínas en tejidos vegetativos en respuesta al calor (Wehmeyer *et al.*, 1996).

Por ello, investigamos si *ABI3* era capaz de activar transcripcionalmente al promotor del gen *Ha hsp17.7G4* en embriones de girasol. Para ello usamos un plásmido efector que expresa constitutivamente *ABI3* (pues contiene su ADNc). El bombardeo de embriones de girasol con dicho plásmido, resultó en una inducción transcripcional del gen quimérico G4WT de 5.3 veces (**Fig.11**). La actividad GUS obtenida en presencia de *ABI3* fue significativamente mayor que la obtenida en ausencia del efector (-) ($F=254.26, P=0.0001$). La activación transcripcional mediada por *ABI3* fue dependiente de la integridad de ambas regiones con HSEs, principalmente de la proximal. Esto se deduce de las

actividades inducidas por ABI3 obtenidas en los mutantes B y F. Así, la inducción en el mutante G4mutB fue de tan sólo 2.7 veces y significativamente menor a la inducción obtenida en la construcción silvestre ($F=11.99$, $P=0.0007$); mientras que la inducción del mutante G4mutF fue de 4.4 veces, más similar a la del silvestre, ($F=0.83$, $P=0.36$).

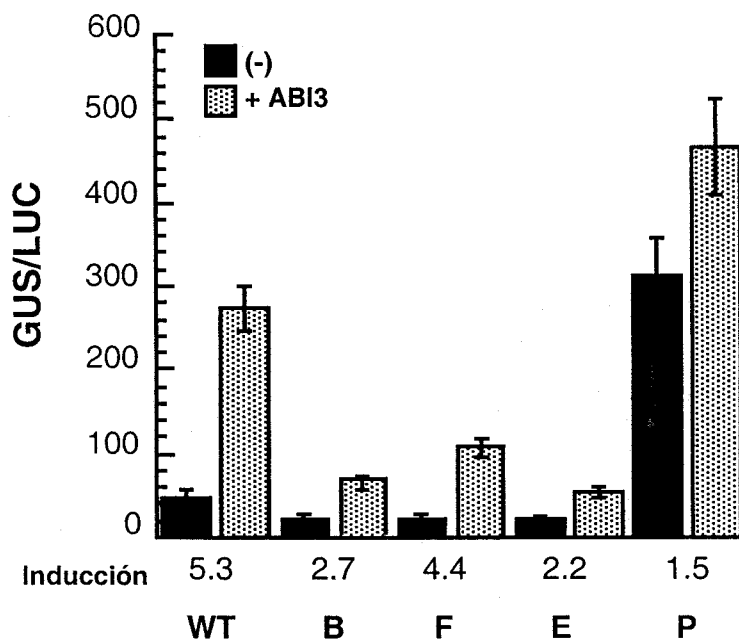


Fig.11. Transactivación por ABI3 de los distintos genes quiméricos con secuencias del promotor *Ha hsp17.7G4* en embriones de girasol. Se muestran los valores medios de actividad GUS normalizada con LUC, correspondientes a 5 experimentos independientes con 5 disparos cada uno. Los embriones fueron bombardeados con los distintos genes quiméricos, con (+ABI3) o sin (-), un plásmido efector que expresa constitutivamente ABI3. El nivel de inducción y el resto de los símbolos se explican en el pie de la Figura 9. La significación estadística de las diferencias observadas se detalla en el texto.

El mutante G4mutE mostró una inducción por ABI3 mucho menor que la del silvestre pero significativamente mayor a la obtenida en ausencia del plásmido efector ($F=34.21$, $P=0.0001$). Esta mínima activación en el mutante G4mutE, cuyas regiones HSEs no son funcionales, podría ser comparable a la obtenida con otros factores de transcripción, como el c-Myc, en promotores carentes de secuencias de unión para dichos factores (Kanei-Ishii *et al.*, 1994).

2.3. Sinergismo en la activación transcripcional del gen G4WT por Lp-HSFA1 y ABI3

Los resultados de la transactivación con Lp-HSFA1 y ABI3, indicaban que cada uno de estos factores requerían las mismas secuencias en *cis* en el gen quimérico G4WT. Es decir, los mutantes en las regiones con HSEs (proximal o distal) se comportaron de forma similar en la transactivación, tanto por Lp-HSFA1 como por ABI3 (Fig.10 B y Fig.11).

Para investigar una posible interacción funcional entre ambos factores, bombardeamos embriones de girasol con las distintas construcciones quiméricas y los plásmidos efectores Lp-HSFA1 y ABI3. El cobombardeo con ambos plásmidos efectores resultó en una actividad GUS, del gen quimérico G4WT, significativamente mayor que la suma de las actividades obtenidas bombardeando con cada factor por separado ($F=12.88$, $P=0.0004$) (Fig.12).

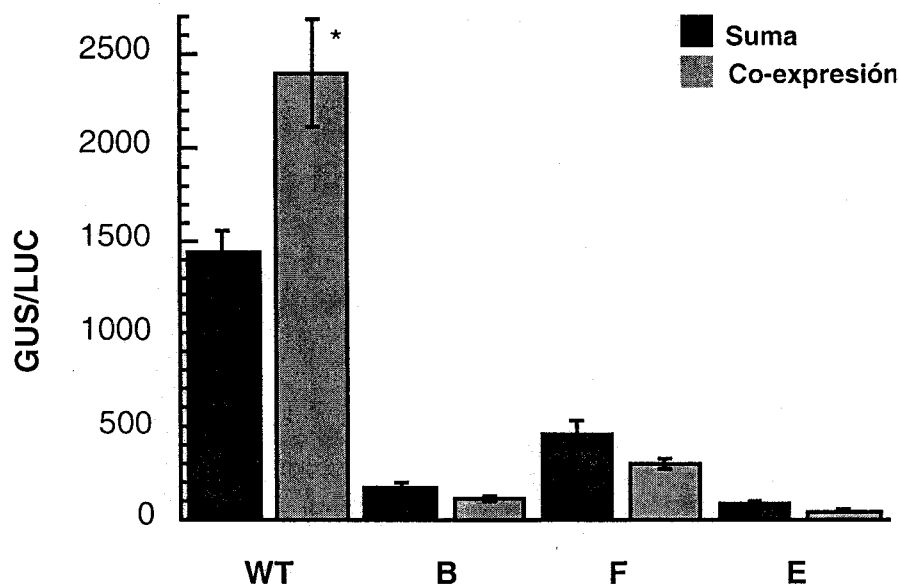


Fig.12. Efecto sinérgico de ABI3 y Lp-HSFA1 en la activación transcripcional de los distintos genes quiméricos, con secuencias de *Ha hsp17.7G4*, en embriones de girasol. Se representan las sumas de las actividades GUS normalizadas con LUC, obtenidas tras el bombardeo de los distintos genes quiméricos con los plásmidos efectores Lp-HSFA1 (valores mostrados anteriormente por separado en la Fig.10A) y ABI3 (valores mostrados anteriormente por separado en la Fig.11). Los valores de estas sumas se comparan con las medidas de las actividades obtenidas tras el bombardeo de ambos plásmidos efectores a la vez (Cobombardeo). Se han realizado 4 experimentos

independientes de cobombardeo para los genes quiméricos G4mutB (B), G4mutF (F) y G4mutE (E) y 8 experimentos para la construcción silvestre (WT); con 5 disparos por experimento en todos los casos. En la parte inferior de la figura, se indican los distintos genes quiméricos ensayados en cada caso. El asterisco indica la significación estadística de la diferencia observada, sólo para el gen silvestre, entre las actividades obtenidas con la suma y el cobombardeo. Resto de los símbolos como se explica en el pie de la Figura 10.

Sin embargo, este efecto sinérgico de ABI3 y Lp-HSFA1 no fue observado con la construcción quimérica del mutante G4mutF ni con la del mutante G4mutB. En estos mutantes, los niveles de actividad GUS tras el bombardeo conjunto con ambos plásmidos efectores fueron similares a los obtenidos tras el bombardeo únicamente con el plásmido efector Lp-HSFA1 (respectivamente para cada mutante, $F=2.26$, $P=0.135$; y $F=2.46$, $P=0.1196$). Por tanto, el efecto sinérgico fue dependiente de la integridad de ambas regiones con HSEs del promotor *Ha hsp17.7G4*. Este resultado sugiere la necesidad de interacciones cooperativas entre los HSFs unidos tanto a la región proximal como a la distal. Así, un posible papel para los factores del tipo ABI3 sería ayudar a, o mantener, las interacciones cooperativas entre los HSFs unidos a dichas secuencias. Esta hipótesis también explicaría por qué el mutante G4mutP no es transactivado eficientemente por ABI3 (Fig. 11). Las mutaciones introducidas en este mutante, facilitarían la unión de los HSFs a los HSEs haciendo, por tanto, superfluo el papel de ABI3.

El mutante E, cuya caracterización previa demostró ser nulo para la transactivación por Lp-HSFA1, no presentó una inducción significativa tras el bombardeo con ambos plásmidos efectores ($F=1.18$, $P=0.97$). Este resultado confirma que en ausencia de HSEs funcionales, ABI3 no es capaz de activar más allá de unas 2 veces sobre el nivel basal obtenido sin efector (Fig.11).

Los resultados mostrados aquí son la primera evidencia de una interacción funcional entre un factor del tipo ABI3 y un HSF. Esto aporta un nuevo ejemplo a los conocidos, hasta ahora muy escasos, para las interacciones de cada uno de estos factores con otros factores transcripcionales.

2.4. ABI3 potencia la unión *in vitro* de Lp-HSFA1 a los HSEs del promotor *Ha hsp17.7G4* y a un HSE sintético

Estudios previos habían demostrado la capacidad de VP1, el ortólogo de ABI3 en maíz, para potenciar la unión *in vitro* del factor de transcripción EmBP-1 al promotor del gen *Em* (Hill *et al.*,1996). Para investigar el mecanismo de activación de ABI3 mediado por HSFs, realizamos ensayos de unión de *in vitro*. Usamos proteínas recombinantes de ABI3 y Lp-HSFA1, junto con fragmentos de ADN procedentes del promotor del gen *Ha hsp17.7G4*.

Para la obtención de proteínas recombinantes Lp-HSFA1 y ABI3, clonamos los ADNc correspondientes en vectores de expresión para *E.coli* fusionados a 6 residuos de histidina para facilitar su posterior purificación (véase Materiales y Métodos 25.1 y 25.2).

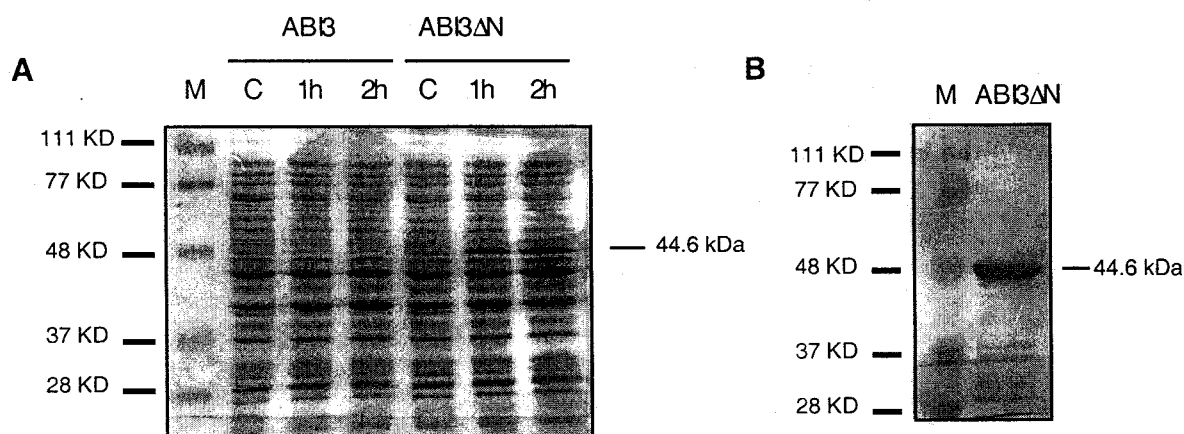


Fig.13 (A) Expresión de las proteínas recombinantes ABI3 y ABI3ΔN en *E.coli*. Se muestran, separados electroforéticamente en un gel de poliacrilamida, los extractos proteicos de *E.coli* con las proteínas recombinantes ABI3 y ABI3ΔN. (M): marcador de proteínas de bajo peso molecular (BioRad), (C): extractos de proteínas de *E.coli* a partir de un cultivo sin inducir por IPTG. (1h): extractos de proteínas de *E.coli* obtenidos tras 1h de inducción del cultivo por IPTG. (2h): extractos de proteínas de *E.coli* obtenidos tras 2h de inducción del cultivo por IPTG. (véase Materiales y Métodos 13.2.1). La escasa producción de la proteína completa ABI3 no permitió detectarla. La banda correspondiente a ABI3ΔN y su peso molecular se señalan en el margen derecho. **(B) Purificación de ABI3ΔN por columna de afinidad.** Los extractos proteicos de *E.coli* con la proteína recombinante ABI3ΔN fusionada a 6 residuos de histidina, fueron pasados a través de una columna de resina con iones Ni²⁺. La proteína, eluida de la columna con

EDTA 100mM, se separó en un gel de poliacrilamida. Dicha proteína tiene un peso molecular de 44.6 KDa. Símbolos como en A.

La proteína completa de ABI3 resultó muy insoluble, y no la conseguimos obtener cantidades suficientes (Fig.13A). Por ello, hicimos una delección del ADNc de ABI3, para obtener la proteína ABI3 Δ N, de 336 aminoácidos, que está truncada en su extremo aminoterminal. Esta nueva proteína contiene el dominio B2, responsable del efecto de VP1 con el factor de transcripción EmBP-1 mencionado anteriormente (Hill *et al.*,1996). Para los ensayos de unión *in vitro*, usamos tanto extractos de *E.coli* con la proteína ABI3 Δ N (Fig.13A), como la propia proteína purificada por columna de afinidad (Fig.13B).

Lp-HSFA1 fue expresado de forma similar a partir de su ADNc y su producto purificado por columna de afinidad (véase Materiales y Métodos 15.2.2) (Fig.14).

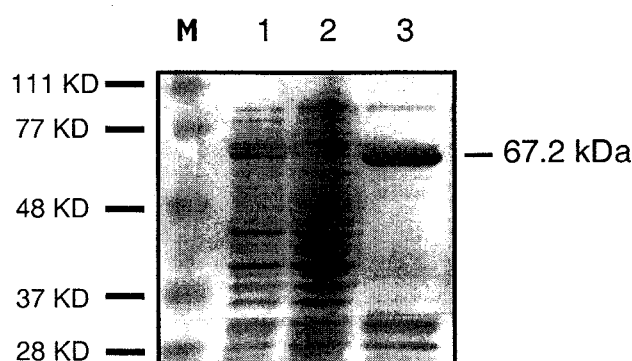


Fig.14. Expresión en *E. coli* de Lp-HSFA1, y purificación por columna de afinidad. Los extractos proteicos, con la proteína recombinante Lp-HSFA1 fusionada a 6 residuos de histidina, fueron pasados a través de una columna de resina con iones Ni^{2+} . La proteína eluida con EDTA 100mM, se separó en un gel de poliacrilamida. Dicha proteína tiene un peso molecular de 67.2 KDa. (1): extractos de proteínas de *E.coli* a partir de un cultivo sin inducir por IPTG. (2): extractos de proteínas de *E.coli* obtenidos tras 1h de inducción del cultivo por IPTG. (3) Elución de la columna conteniendo la proteína de fusión 6His-Lp-HSFA1. (M): marcador de proteínas de bajo peso molecular (BioRad).

En las Fig.15A y 15B se muestran estos experimentos de unión *in vitro*. En estos experimentos, la unión de proteínas al ADN provoca una movilidad menor del ADN durante la electroforesis. El complejo retardado en el gel con respecto al ADN desnudo indica la interacción proteína-ADN. En la Fig. 15A, usamos como sonda el fragmento del promotor del gen *Ha hsp17.7G4* desde la posición -136

hasta la -18. Esta sonda (HSEG4) contiene las regiones proximal y distal con los HSEs de este gen. En la Fig. 15B, usamos como sonda un oligonucleótido sintético con otras secuencias HSE (oliHSE) (véase Materiales y Métodos 14.2).

Titulamos la cantidad de Lp-HSFA1 recombinante, de manera que determinamos la cantidad óptima para detectar una unión eficiente del Lp-HSFA1 a cada sonda (Figs. 15A y B: carril2), así como la cantidad sub-óptima, con la que el complejo retardado apenas se detecta. (Figs. 15A y B: carril3). Usando estas últimas condiciones, ensayamos el efecto de la proteína ABI3ΔN. La adición de extractos de *E.coli* con ABI3ΔN, en ausencia de Lp-HSFA1, tanto a la sonda oliHSE como a la sonda HSEG4, no produjo ningún complejo detectable. (Fig.15B: carril11 y datos no mostrados para HSEG4).

Cuando añadimos extractos de *E.coli* con ABI3ΔN a la mezcla de reacción, usando Lp-HSFA1 en las condiciones sub-óptimas de retardo, volvemos a detectar el complejo correspondiente a Lp-HSFA1 unido a la sonda (Figs. 15A: carril 4, y 15B: carril 5). Dicho complejo es el resultado de uniones proteína::ADN específicas para las secuencias de los HSEs, como se observa en los experimentos de competición con sondas específicas o inespecíficas sin marcar (Fig. 15A: carriles 5 y 6, y Fig 15B: carriles 6 y 7). Este resultado indica que, al menos *in vitro*, ABI3ΔN facilita la unión de los HSFs a los HSEs. Esto podría explicar, al menos en parte, la inducción del gen quimérico G4WT por ABI3 en los ensayos de expresión transitoria en embriones (Fig. 11).

Los complejos detectados en las reacciones con y sin ABI3ΔN, no difieren en su movilidad (comparar Fig 15A: carriles 2 y 4 y Fig 15B: carriles 2 y 5). Este resultado indica que el posible complejo ternario Lp-HSFA1::ABI3ΔN::ADN, no sería lo suficientemente estable para detectarse en las condiciones experimentales usadas; por lo que dicho complejo ternario se disociaría durante la electroforesis en el gel. Esta misma explicación se ha propuesto, para el complejo ternario VP1::EmBP1::Em-ADN, en Hill *et al.* (1996).

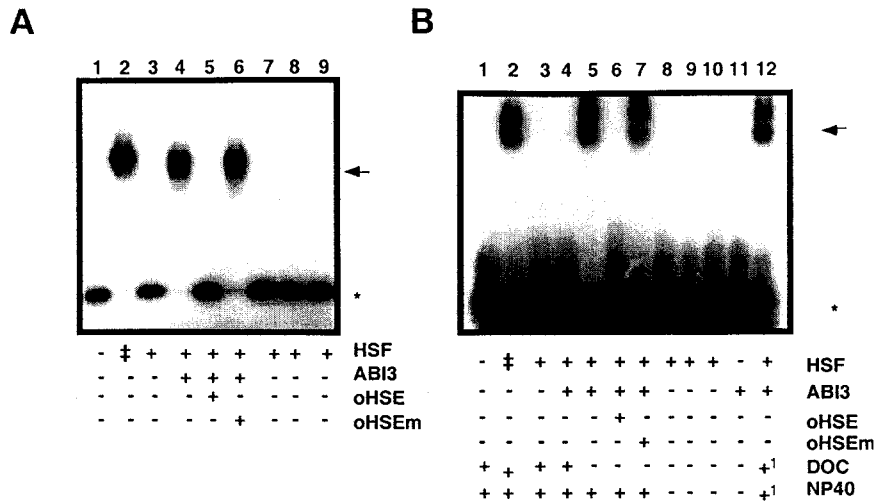


Fig.15. Ensayos de unión *in vitro* de Lp-HSFA1 a los HSEs del promotor *Ha hsp17.7G4* y a secuencias HSE sintéticas en un oligonucleotido (oliHSE). Las condiciones para las reacciones de unión *in vitro* se detallan en Materiales y Métodos (véase 14.2). Todas las reacciones contienen 0.13 ng de las sondas G4HSE (panel A), o oliHSE (panel B), ambas marcadas radioactivamente. La adición (+), o no (-), de otros componentes se indican debajo de cada carril. Para Lp-HSFA1 (HSF), el símbolo (‡) significa la adición de 500 ng de la proteína recombinante purificada (paneles A y B), y el símbolo (+) la de 50 ng (panel A), o 5 ng (panel B) de dicha proteína. Para ABI3ΔN (ABI3): (+), 0.66 ng de proteína purificada ABI3ΔN (panel A), o 1μg (panel B) de extractos proteicos de *E.coli* con ABI3ΔN. Para los experimentos de competición, se indica la adición de un exceso molar, de 50 veces, de oligonucleotidos sintéticos, sin marcar radioactivamente, con secuencias ajustadas al consenso de HSE (oHSE), o con sustituciones alejadas de dicho consenso (oHSEm). En los carriles 7-9 (panel A) y carriles 8-10 (panel B) se añadió, sustituyendo a la proteína ABI3ΔN, la misma cantidad de BSA, de extractos de *E.coli* transformada con el vector de expresión pRSETC o de poli-lisina (respectivamente en cada caso). Los tratamientos con DOC (panel B) se hicieron antes de la adición de la sonda de ADN. El DOC añadido fue neutralizado con NP40 antes de comenzar la reacción de unión. En el carril 12, el DOC y el NP40 se añadieron simultáneamente (+¹).

La secuencia de la sonda oliHSE carece de sitios de unión para otros factores distintos a los HSFs. Por ello, el efecto de ABI3ΔN en los ensayos de unión *in vitro* usando esta sonda, sugiere que ABI3ΔN no se une directamente al ADN, sino que lo haría a través de Lp-HSFA1. Para investigar la posible interacción física entre ambos factores transcripcionales usamos deoxicolato sódico en las reacciones de unión *in vitro* con la sonda oliHSE (DOC, véase Materiales y Métodos 19.2.1). El DOC es un detergente capaz de romper

interacciones iónicas entre proteínas (Shen y Gigot, 1997) Los tratamientos con DOC no afectaron a la unión de Lp-HSFA1 al ADN en las reacciones que contenían cantidades óptimas de este factor (Fig. 15B, carril 2). Sin embargo, la preincubación con DOC de los extractos de proteína con ABI3ΔN y Lp-HSFA1 evitó la potenciación de la unión a la sonda de Lp-HSFA1 mediada por ABI3ΔN. (Fig 15B: comparar carriles 4 y 5). La neutralización del DOC, añadiendo simultáneamente Nodidet P40 (NP40) a la reacción de unión, abolió completamente el efecto del DOC (Fig. 15B: carril 12). Los resultados de estos experimentos sugieren una posible interacción física, al menos *in vitro*, entre ABI3ΔN y Lp-HSFA1. Esta interacción física entre ambos factores sería muy débil, ya que la concentración de DOC usada en nuestros experimentos son condiciones no disociantes para otras interacciones proteicas estudiadas previamente por otros autores (Baeuerle y Baltimore, 1988).

2.5. Efecto de la proteína truncada ABI3ΔN y requerimiento del dominio de activación de Lp-HSFA1 para la transactivación del gen quimérico G4WT

El factor ABI3 de *Arabidopsis* y el factor VP1 de maíz son ortólogos, [por lo que sus secuencias de aminoácidos son muy similares]. Los análisis funcionales realizados con el factor VP1 (McCarthy *et al.*, 1991) revelaron la presencia de un dominio de activación situado en la región aminoterminal. En los ensayos de unión *in vitro* hemos usado la proteína ABI3ΔN, truncada en su extremo aminoterminal. Esta proteína tiene delecionado este posible dominio de activación, así como otra región adyacente que no está conservada entre las proteínas de esta familia. Aún así, ABI3ΔN fue capaz de potenciar la unión de Lp HSFA1 a los HSEs del promotor *Ha hsp17.7G4 in vitro* (Fig 15). Investigamos si esta potenciación puede explicar la activación transcripcional del gen quimérico G4WT observada *in vivo* con ABI3 (Fig. 11). Para ello, hicimos experimentos de expresión transitoria estudiando la capacidad de transactivación de la proteína ABI3ΔN en embriones de girasol. Los resultados de estos experimentos mostraron que la actividad GUS obtenida tras el bombardeo con el plásmido efector de ABI3ΔN fue similar a la obtenida tras el bombardeo en ausencia de

dicho plásmido (Fig.15, $F=1.577$, $P=0.210$). Es decir ABI3 Δ N no fue capaz de transactivar al gen quimérico. Este resultado indica que la potenciación de la unión de HSFs a los HSEs pudiera ser necesaria, pero no es suficiente para explicar la transactivación por ABI3.

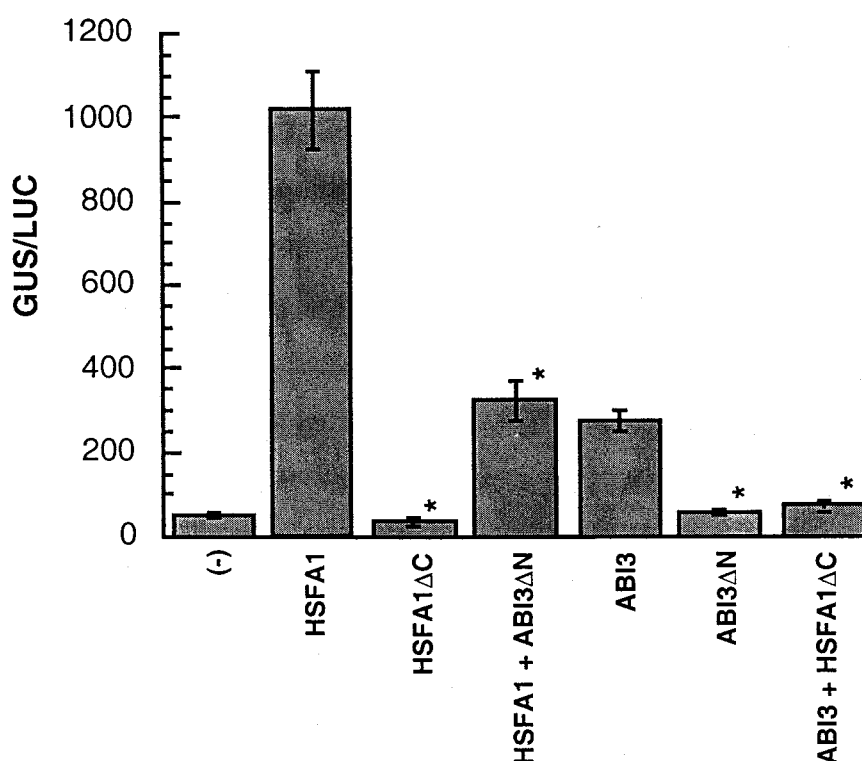


Fig.16. Efecto de la proteína trunca ABI3 Δ N, y requerimiento del dominio de activación de Lp-HSFA1 para la transactivación en embriones de girasol. Se muestran las medias de las actividades β -glucuronidasa normalizadas con luciferasa (GUS/LUC) obtenidas. Los embriones fueron bombardeados con el gen G4WT sin plásmido efector (-) o con el/los plásmido/s efector/es que se indican en la parte inferior. El número de experimentos realizados con cada plásmido efector varía entre 4 (para ABI3 Δ N) y 13 (para Lp-HSFA1), siendo en todos los casos 5 disparos los efectuados en cada experimento. Los asteriscos (*) indican las diferencias estadísticamente significativas entre las actividades alcanzadas en las siguientes comparaciones: Lp-HSFA1 Δ C frente a Lp-HSFA1, ABI3 Δ N frente a ABI3, ABI3+Lp-HSFA1 Δ C frente a ABI3 y Lp-HSFA1+ABI3 Δ N frente a Lp-HSFA1. Resto de los símbolos como en el pie de la Figura 10.

Más aún, el cobombardeo con los plásmidos efectores de ABI3 Δ N y Lp-HSFA1 redujo significativamente la activación del promotor quimérico, comparada con la activación producida tras bombardear únicamente con el efector de Lp-HSFA1 (véase Fig 15, $F=74.18$, $P=0.0001$). Este efecto negativo dominante

apoyaría la hipótesis de una interacción física entre ambos factores, basada en los resultados de los experimentos de unión *in vitro* usando DOC (Fig. 14B). Así, el complejo formado por ABI3 Δ N y Lp-HSFA1 adoptaría una conformación ineficiente para la activación transcripcional del promotor del gen quimérico.

También investigamos la contribución de Lp-HSFA1 al efecto sinérgico en la transactivación del gen quimérico G4WT. Para ello disponíamos de una versión de Lp-HSFA1 troncada en su extremo carboxiterminal (Lp-HSFA1 Δ C, véase Materiales y Métodos 24.1). Esta proteína carece del dominio de activación de Lp-HSFA1, que previamente había sido caracterizado funcionalmente (Treuter *et al.*, 1993). La actividad GUS obtenida en los embriones bombardeados con el plásmido efector de Lp-HSFA1 Δ C no difería significativamente a la obtenida tras el bombardeo sin dicho plásmido (Fig.16, $F=1.267, P=0.2618$). Es decir, Lp-HSFA1 Δ C fue incapaz de transactivar al gen quimérico. El cobombardeo de Lp-HSFA1 Δ C y ABI3 también resultó en una transactivación nula del gen quimérico. Esta transactivación, por tanto, fue significativamente menor que la producida tras bombardear únicamente con el plásmido efector de ABI3 (véase también Fig.16, $F=75.34, P=0.0001$). Estos resultados sugieren que en ausencia de un HSF funcional, ABI3 no es capaz de activar sustancialmente al promotor del gen quimérico.

2.6. Transactivación, por ABI3 y Lp-HSFA1, de un promotor mínimo a través de las regiones con HSEs del promotor *Ha hsp17.7G4* en embriones de girasol

Todos los experimentos de expresión transitoria se han realizado usando un gen quimérico con una fusión traduccional con el gen *gus* que contiene 1132 pb aguas arriba del sitio de inicio de la transcripción del promotor del gen *Ha hsp17.7G4*. El uso de esta construcción no nos permite discernir entre dos posibles modelos para la activación transcripcional de su promotor por ABI3 y Lp-HSFA1. i) Lp-HSFA1 podría unirse a los HSEs de *Ha hsp17.7G4*; y el factor ABI3 hacerlo a cualquier otra región no caracterizada de dicho promotor. En este caso

ABI3 actuaría como un activador transcripcional canónico. ii) Alternativamente ABI3 se uniría a Lp-HSFA1 y éste a su vez a los HSEs. Así ABI3 actuaría como un coactivador, sin unirse directamente al ADN. De hecho VP1, un gen ortólogo de ABI3, regula a algunos genes actuando como un activador transcripcional; mientras que se ha determinado recientemente que en otros casos funciona como un coactivador. Así por ejemplo, VP1 es capaz de unirse *in vitro* a la secuencia RY o SphI del promotor del gen *C1* a través de su dominio básico B3 (Suzuki *et al.*, 1997). Por otro lado, VP1 actuaría como un coactivador a través del factor TRAB1, un factor de tipo b-ZIP que se une directamente al ADN en los elementos de respuesta a ABA (ABREs) (Hobo *et al.*, 1999) (véase la Introducción).

Para poder discernir entre ambas posibilidades usamos un plásmido con un nuevo gen quimérico, G4WT(-46). Esta nueva construcción contiene un promotor mínimo (CaMV35S (-46)), delante del cual hemos clonado los HSEs del promotor del gen *Ha hsp17.7G4*, incluyendo sus secuencias desde la posición -136 hasta la -49 (véase Materiales y Métodos 23.2).

Los resultados de los experimentos de expresión transitoria, usando dicho plásmido, demostraron la capacidad de transactivación por Lp-HSFA1 del promotor mínimo a través de los HSEs de *Ha hsp17.7G4*. Así, la actividad GUS tras el bombardeo con el plásmido efector de Lp-HSFA1 fue significativamente mayor a la obtenida en ausencia de dicho plásmido (Fig. 17, $F=29.6$, $P=0.0001$). En cambio, el bombardeo con el plásmido efector de ABI3 produjo una actividad GUS similar a la obtenida sin dicho efector (véase también la Fig. 17, $F=0.725$, $P=0.3960$). Es decir, ABI3 no fue capaz de transactivar, por sí mismo, al promotor mínimo del nuevo gen quimérico. Dado que las actividades GUS/LUC alcanzadas con este promotor, tras la activación por Lp-HSFA1, fueron mucho menores que las obtenidas con la fusión (-1132)G4::GUS::nos, es probable que la activación transcripcional por ABI3 del promotor mínimo no sea lo suficientemente fuerte para ser detectada en nuestras condiciones experimentales.

Sin embargo, la activación transcripcional del gen quimérico WT(-46), producida conjuntamente por Lp-HSFA1 y ABI3 resultó en una actividad GUS significativamente mayor a la obtenida usando únicamente Lp-HSFA1 (Fig. 17, $F=16.9$, $P=0.0001$). Tanto la transactivación por Lp-HSFA1 como por Lp-HSFA1 y ABI3 fue dependiente de la integridad de los HSEs, ya que el plásmido con su versión mutada, mutE(-46) no fue activado significativamente en ninguno de los dos casos, comparando con los niveles basales en ausencia de efectores (Fig. 17, $F=3.5$, $P=0.07$ y $F=0.123$, $P=0.7261$, respectivamente.).

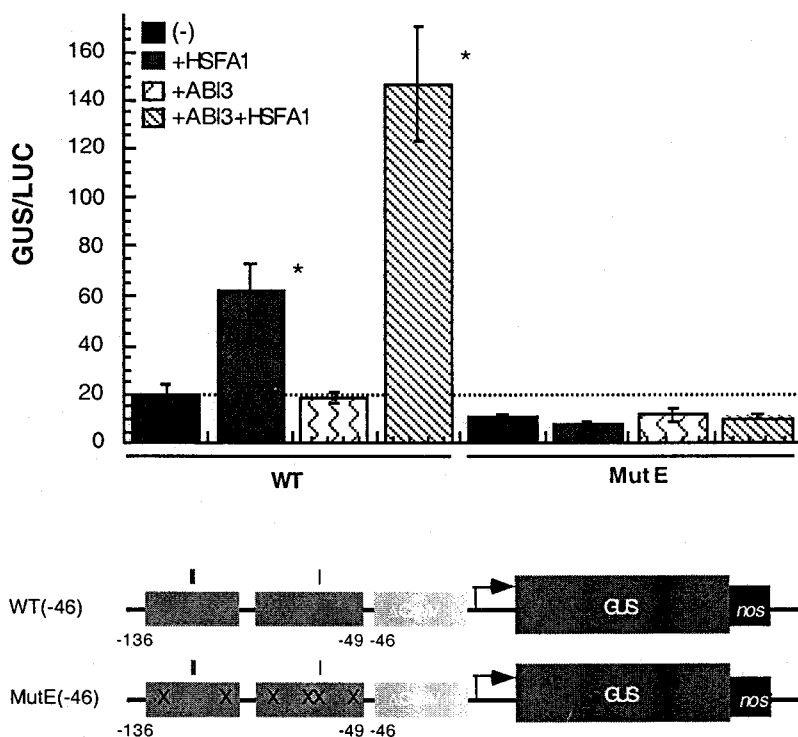


Fig.17. Activación de un promotor mínimo, por ABI3 y Lp-HSFA1, a través de los HSEs del promotor *Ha hsp17.7G4* en embriones de girasol. Se muestran las medias de las actividades β -glucuronidasa normalizadas con las actividades luciferasa (GUS/LUC), correspondientes a 5 experimentos independientes con 5 disparos cada uno. En la parte inferior, se representa un esquema de las dos construcciones quiméricas usadas, G4WT(-46) y G4mutE(-46), (véase Materiales y Métodos 23.2). Los embriones fueron bombardeados con los genes quiméricos sin plásmido efector (-) o con el/los plásmido/s efector/es que se indican en la parte superior izquierda de la gráfica. Los diferencias observadas fueron estadísticamente significativas para las siguientes comparaciones: Lp-HSFA1 frente a (-) y ABI3+Lp-HSFA1 frente a Lp-HSFA1. Para facilitar la visualización de estas comparaciones, el nivel basal de la construcción G4WT se señala también mediante una línea discontinua. Las substituciones de nucleótidos en los HSEs de MutE se indican por X (véase también la Fig. 9 donde se muestra su secuencia). Resto de los símbolos como en el pie de la Figura 10.

Por tanto, el efecto sinérgico observado con ABI3 y Lp-HSFA1 está mediado únicamente por las secuencias de *Ha hsp17.7 G4* presentes en los plásmidos utilizados (es decir los HSEs y posibles elementos en *cis* solapantes). El análisis exhaustivo de estas secuencias no reveló ninguna homología con motivos presentes en elementos en *cis* de posible relevancia funcional para ABI3; como SphI, RY-box, o de distintos elementos de respuesta a ABA (datos no mostrados, véase Introducción). Así, podríamos descartar que el mecanismo de activación de ABI3 sea uniéndose directamente al ADN a un elemento SphI, o bien, indirectamente a través de otros factores transcripcionales de tipo b-ZIP. Sin embargo, los resultados obtenidos (Figura 17) indican que ABI3 funcionaría como un coactivador junto con HSFs unidos al ADN a través de los HSEs del promotor del gen *Ha hsp17.7G4*.

2.7. Análisis de la interacción física entre ABI3 y Lp-HSFA1 mediante experimentos de doble híbrido en levaduras

Algunos resultados descritos anteriormente, como el efecto negativo dominante de ABI3 Δ N sobre la activación por Lp-HSFA1 (véase Fig.16), y los ensayos de unión *in vitro* con la sonda oliHSE (experimentos con deoxicolato sódico, véase Fig.15B), sugerían (indirectamente) que ABI3 puede interaccionar físicamente con Lp-HSFA1.

Los ADNc correspondientes a Lp-HSFA1 y a ABI3 Δ N fueron clonados en vectores de expresión en levaduras (véase Materiales y Métodos 16.1). Usamos esta versión truncada de ABI3 para evitar la activación no específica de los genes *reporters* de la estirpe de levadura, observada por otros autores cuando se usa la proteína completa ABI3 (Kurup *et al.*,2000). El crecimiento en medio sin histidina de la estirpe HF7c, en la que introdujimos los vectores de expresión Lp-HSFA1 y ABI3 Δ N, diagnosticaría la unión física de ambos factores en levadura (véase Materiales y Métodos 19). Como se observa en la Fig. 18, la estirpe que expresa

III. Resultados

únicamente la proteína Lp-HSFA1 fusionada al dominio de unión del factor transcripcional GAL4 (pGBT9-Lp-HSFA1) fue capaz de crecer en medio sin histidina. Este resultado indica que el dominio de activación de Lp-HSFA1 es funcional en levaduras y capaz de reemplazar al dominio de activación de GAL4. El crecimiento de esta estirpe fue, por tanto, independiente de la transformación con el vector pGAD424-ABI3ΔN, que expresa la proteína ABI3ΔN fusionada al dominio de activación de GAL4. Por otro lado, la estirpe que expresa únicamente la proteína ABI3ΔN fusionada al dominio de unión de GAL4 (pGBT9-ABI3), fue incapaz de crecer en medio sin histidina (Fig.18).

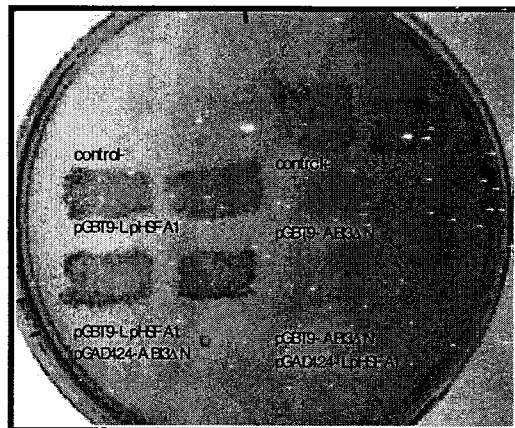


Fig.18. Experimento de doble híbrido en levaduras con las proteínas ABI3ΔN y Lp-HSFA1. Se muestra el crecimiento tras 32 horas de incubación a 30°C de dos transformantes independientes de la estirpe HF7c con las combinaciones los vectores que se indican bajo el lugar de siembra en la placa. (Control-): transformada con los vectores “vacíos”, pGAD424 y pGBT9, es decir sin los los ADNc de ABI3ΔN y Lp-HSFA1. (Control+): transformada con pGBT9 y el plásmido pGAL4 (Stratagene), que expresa el ADNc completo del factor transcripcional GAL4. El resto de las combinaciones se explica en el texto de los apartados 2.7 (Resultados) y 20 (Materiales y Métodos).

Esta proteína de fusión carece de dominio de activación y por tanto, incapaz de activar la transcripción del gen *reporter* de histidina. La estirpe transformada con este vector pGBT9-ABI3ΔN junto con el vector pGAD424-Lp-HSFA1 también fue incapaz de crecer en medio sin histidina. Así pues el resultado es negativo respecto a una posible interacción física entre ABI3ΔN y Lp-HSFA. Esto puede deberse por ejemplo, a que dicha interacción no es lo suficientemente fuerte, o

estable, en levaduras para ser detectada con esta técnica. Otras posibles explicaciones se comentan en la Discusión.

2.8. Experimentos de transactivación, por ABI3 y Lp-HSFA1, del gen quimérico G4WT en hojas de girasol y protoplastos de tabaco.

Investigamos si en la activación transcripcional del gen *Ha hsp17.7G4* por ABI3 y Lp-HSFA1 participan otros factores específicos de la embriogénesis. Para ello hicimos experimentos de expresión transitoria en hojas de girasol y en protoplastos de tabaco (véase Materiales y Métodos 5 y 6).

El gen *Ha ds10G1* que ha sido clonado en nuestro laboratorio, codifica una proteína Lea (*Late embryogenesis abundant*) de tipo I. Su promotor puede ser transactivado por ABI3 en experimentos de expresión transitoria (Prieto-Dapena *et al.*, 1999). Decidimos usarlo como control positivo de la activación por ABI3 en tejidos vegetativos. Las actividades GUS obtenidas con el gen quimérico con el promotor *Ha ds10G1* tras el bombardeo con el plásmido efector de ABI3 en ambos sistemas, fueron significativamente mayores, comparadas con las actividades obtenidas en ausencia de dicho plásmido (véase Figs. 19A y B: para hojas de girasol, $F=14.40$ y $P=0.0003$; para protoplastos de tabaco, $F=62.376$, y $P=0.0001$). Este resultado, indica que ABI3 es activo en hojas de girasol y en protoplastos de tabaco y capaz de activar suficientemente al gen quimérico *ds10::GUS::nos*.

Por otro lado, la expresión de HSFs de tomate en tejidos vegetativos es capaz de activar la transcripción, de otros genes quiméricos con promotores sHSP, a temperatura ambiente en experimentos de expresión transitoria (Treuter *et al.*, 1993). También nosotros observamos una activación transcripcional del promotor del gen quimérico G4WT por Lp-HSFA1, tanto en hojas de girasol como en protoplastos (Figs. 19A y B). Esta transactivación por Lp-HSFA1 se tradujo en un aumento significativo de la actividad GUS comparada con la obtenida en

ausencia del efector (hojas de girasol, $F=174.55$, $P=0.0001$; protoplastos de tabaco, $F=355.22$, $P=0.0001$).

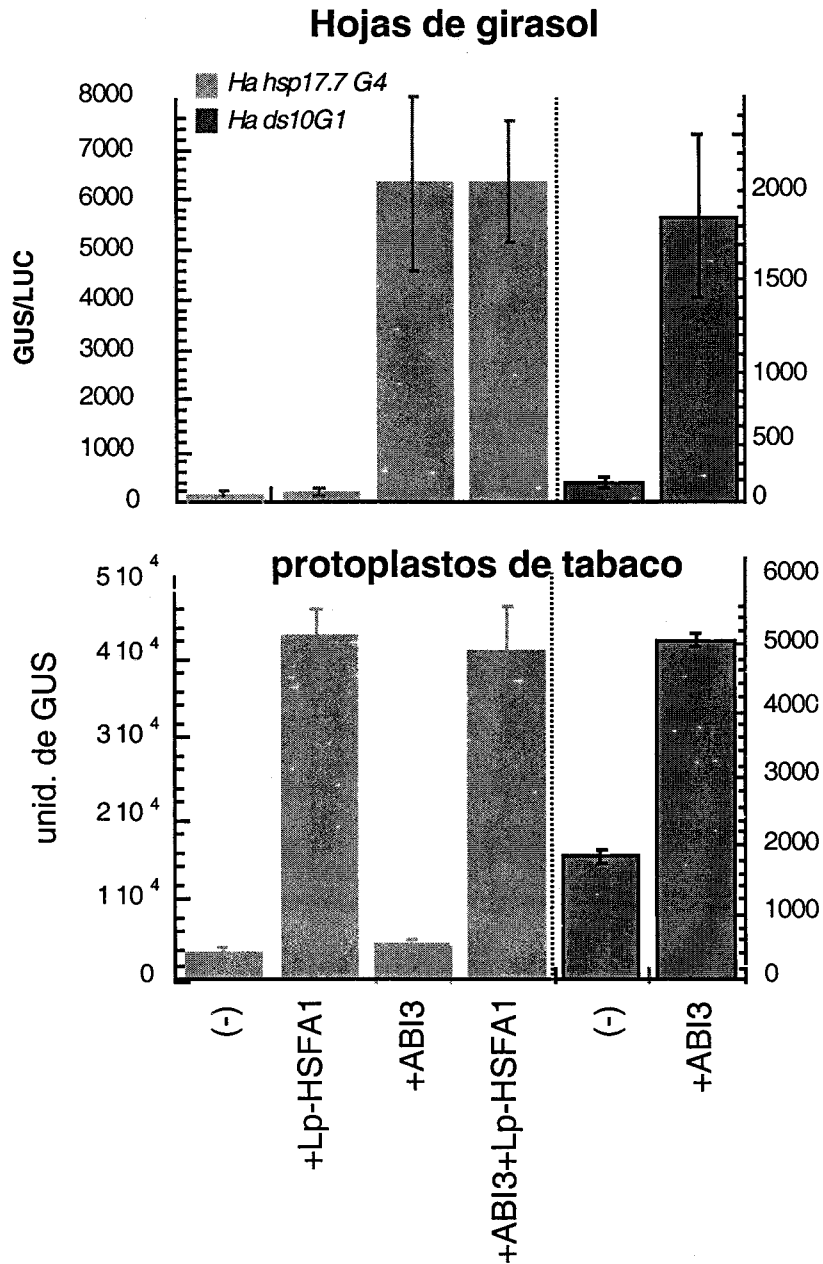


Fig. 19. Ausencia de transactivación conjunta, por ABI3 y Lp-HSFA1, del gen quimérico G4WT en tejidos vegetativos . Se muestran las medias de las actividades β -glucuronidasa normalizadas con las actividades luciferasa (GUS/LUC), correspondientes a los experimentos de expresión transitoria efectuados en hojas de girasol (A) y con protoplastos de tabaco (B). Las barras representan los errores estándar de las medias de 5 experimentos independientes con 5 disparos cada uno (A) y de 3 experimentos independientes medidos por triplicado (B). Los genes quiméricos usados, (-

1132)G4::GUS::nos y Ha ds10::GUS::nos están indicados según el color de las barras. El/los plásmido/s efector/es usado/s se indican abajo en cada caso. Sin plásmido efector (-).

Sin embargo, ABI3 no fue capaz de transactivar al gen quimérico en ninguno de los dos sistemas ensayados; como se observa al comparar las actividades GUS obtenidas en presencia y en ausencia del plásmido efector de ABI3 (véase también la Fig 19: hojas de girasol, $F=1.466$, $P=0.2294$; protoplastos de tabaco $F=2.421$, $P=0.1457$). Tampoco se reprodujo el efecto sinérgico observado con Lp-HSFA1 y ABI3 en embriones de girasol. Así, la coexpresión de dichos factores resultó en una actividad GUS similar a la obtenida usando únicamente Lp-HSFA1 en ambos sistemas (hojas de girasol, $F=0.047$, $P=0.8293$; protoplastos de tabaco $F=0.166$, $P=0.690$).

Estos resultados indican que la interacción funcional (y tal vez física) entre ABI3 y Lp-HSFA1 es específica de embriones y que pudiera requerir algún otro factor no presente en tejidos vegetativos. Este posible "tercer componente" en la interacción de ABI3 y Lp-HSFA1, también estaría ausente en levaduras, lo que explicaría adicionalmente porque no hemos conseguido detectar la interacción física de ambos factores mediante los experimentos de doble híbrido.

Capítulo 3. Regulación transcripcional de genes quiméricos con el promotor *Ha hsp17.6G1*

3.1 ¿Transactivación por ABI3 del gen quimérico G1WT?

Los resultados mostrados previamente en la Fig. 11 indican que factores del tipo ABI3 pudieran activar transcripcionalmente al gen *Ha hsp17.7G4* durante el desarrollo embrionario. El análisis del efecto de las mutaciones en las regiones con HSEs de este promotor revelaron ciertos requisitos para la activación por ABI3. Estos requisitos pudieran no cumplirse en otros genes *shsp* embrionarios. Investigamos si éste es el caso del gen *Ha hsp17.6G1*. Para ello, realizamos experimentos de transactivación transitoria en embriones de girasol, usando las siguientes construcciones con el promotor y secuencias reguladoras de dicho gen: G1(RI-Sty)::GUS::*nos* con la región del HSE sin modificar (G1WT) (Fig. 20A); y G1mut0, derivado a partir de G1WT sustituyendo, en dicha región, los nucleótidos más críticos para la unión de los HSFs (véase la Fig. 25). En estos experimentos usamos el plásmido efector de ABI3, descrito anteriormente en el apartado 2.2 de Resultados.

En ausencia del plásmido efector la actividad GUS de los embriones bombardeados con G1WT fue significativamente mayor que la obtenida con G1mut0 ($F=24.3$, $P=0.02$; ver Fig. 20B). Estos resultados confirman las observaciones obtenidas previamente en plantas transgénicas de tabaco (Carranco *et al.*, 1999); es decir, la región HSE del gen *Ha hsp17.6G1* es también funcional en nuestros ensayos de expresión transitoria, contribuyendo a una activación transcripcional presumiblemente mediada por HSFs endógenos. El bombardeo con el plásmido efector ABI3 resultó en una activación transcripcional del gen quimérico G1WT de unas 2 veces con respecto a los niveles de actividad GUS obtenidos en ausencia de efector. Este nivel de inducción fue independiente de la integridad de

la región HSE, ya que el mismo resultado se obtuvo cuando ensayamos el gen quimérico G1mut0 (Fig. 20B). Igualmente, obtuvimos un nivel de activación por ABI3 semejante con otro plásmido con el promotor del virus del mosaico de la coliflor (CaMV). Las secuencias flanqueantes de dicho promotor carecen de regiones HSEs. Además no hay antecedentes de que el promotor CaMV se regule *in vivo* por ABI3. Por lo tanto, la baja activación del gen quimérico G1WT, producida por ABI3, pudiera explicarse por interacciones inespecíficas de ABI3 con componentes de la maquinaria basal transcripcional. Esto también explicaría los casos de transactivación por ABI3 con una magnitud semejante (es decir una activación de de 1-2 veces, véase por ejemplo mutE en la Fig.11).

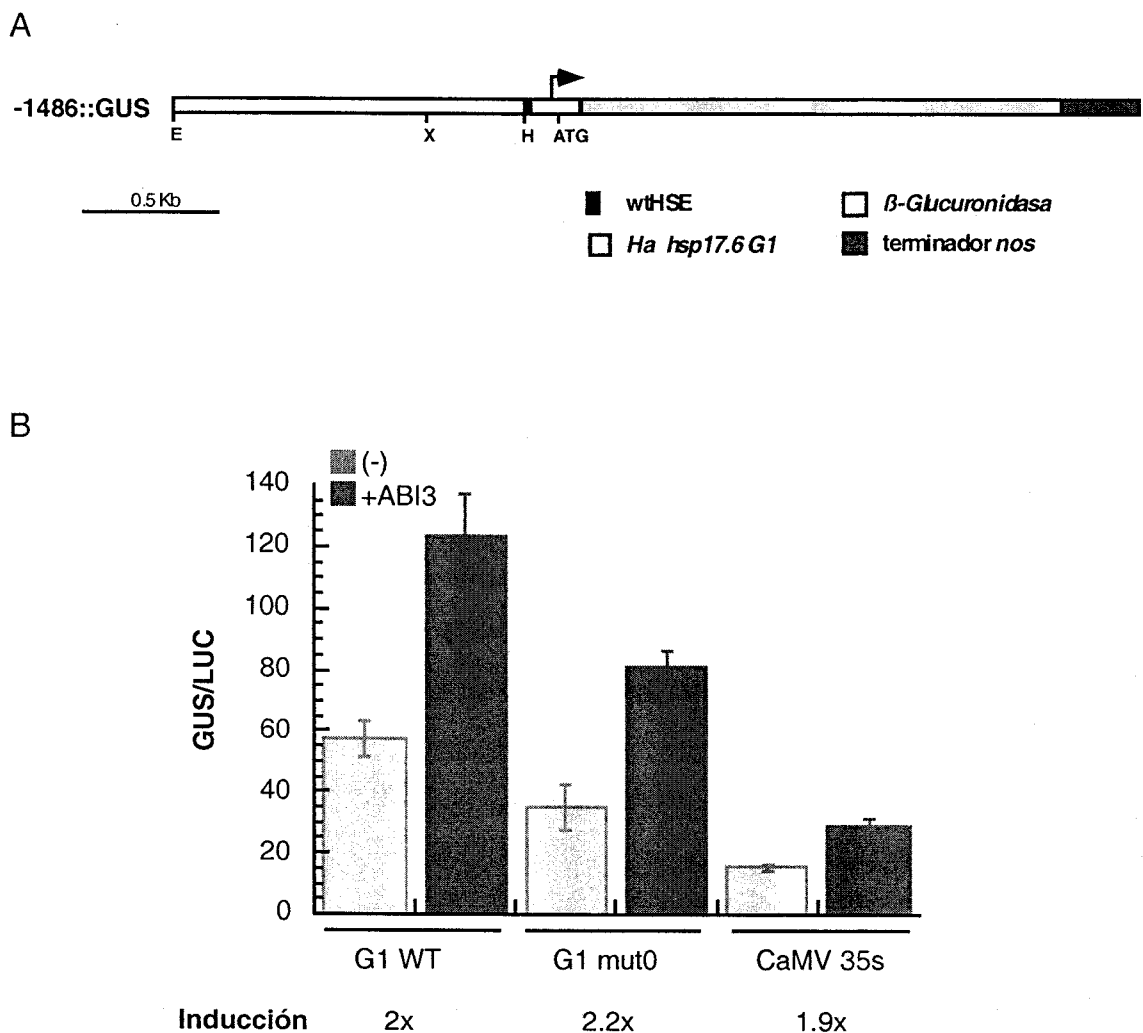


Fig.20 (A) Esquema del gen quimérico G1WT. La flecha indica el inicio de la transcripción en el promotor del gen *Ha hsp17.6G1*. La región con HSE está indicada con un cuadrado negro. El ATG corresponde al codon de iniciación de la proteína quimérica

codificada por la fusión traducional. Los sitios de restricción indicados son H=HdIII, E=EcoRI y X=XhoI. **(B) Transactivación por ABI3 de G1WT en embriones de girasol.** Se representan las medias de las actividades GUS normalizadas con las actividades luciferasa (GUS/LUC). Estas corresponden a los distintos genes quiméricos ensayados en cada caso (indicados bajo la gráfica). Las barras indican los errores estándar. Los embriones fueron bombardeados con cada gen quimérico en presencia (+ABI3) o en ausencia (-) del plásmido efector de ABI3. Se efectuaron 5 experimentos con el gen quimérico G1WT, 3 experimentos con G1 mut0, y 2 experimentos con el gen quimérico 35SCaMV; en todos los casos efectuando 5 disparos por cada experimento y combinación de plásmidos ensayados. El nivel de inducción indicado en la parte inferior es la razón entre las actividades normalizadas obtenidas tras el bombardeo con y sin el plásmido efector.

Por tanto, estos resultados sugieren que los factores del tipo ABI3 no participan en la regulación de la expresión embrionaria del gen *Ha hsp17.6G1*. La activación transcripcional mediada por dichos factores no parecer ser general para todos los promotores de genes *shsp* embrionarios; requiriéndose para ello ciertas condiciones que sólo cumplirían los promotores como el del gen *Ha hsp17.7G4* (véase la Discusión).

3.2 Transactivación por Lp-HSFA1 y Lp-HSFA2 de genes quiméricos con el promotor y secuencias reguladoras de *Ha hsp17.6G1*.

Mediante experimentos de expresión transitoria en embriones de girasol, investigamos la capacidad de transactivación del gen quimérico G1WT por dos HSFs distintos de tomate: Lp-HSFA1y Lp-HSFA2 (Treuter *et al.*,1993). Como control usamos el gen quimérico G1mut0. En la **Fig.21**, se muestran los resultados de este experimento. Para comparar la capacidad de transactivación de ambos HSFs con promotores distintos, usamos también G4WT, otro gen quimérico con el promotor y secuencias reguladoras de *Ha hsp17.7G4* (véase la Fig.9). Las actividades GUS alcanzadas por el gen quimérico G4WT tras el bombardeo con el plásmido efector de Lp-HSFA1 fueron similares a las obtenidas tras el bombardeo con Lp-HSFA2 (F=2.233, P=0.1369). Sin embargo, las actividades GUS alcanzadas por el gen quimérico G1WT tras el bombardeo con Lp-HSFA1 fueron similares a las obtenidas en ausencia de efector (F=4.87, P=0.07); es decir, Lp-HSFA1 no activó transcripcionalmente al gen quimérico G1WT. Por otro lado, las actividades GUS obtenidas con este gen quimérico tras bombardear con Lp-

HSFA2, fueron significativamente mayores que las obtenidas en ausencia de efector ($F=156.39$, $P=0.0001$). La transactivación de G1WT por Lp-HSFA2 fue dependiente de la región HSE, ya que el gen quimérico G1mut0 no fue transactivado por Lp-HSFA2; siendo similares, en este caso, las actividades GUS obtenidas con el dicho plásmido efector o en ausencia del mismo ($F=0.39$, $P=0.53$).

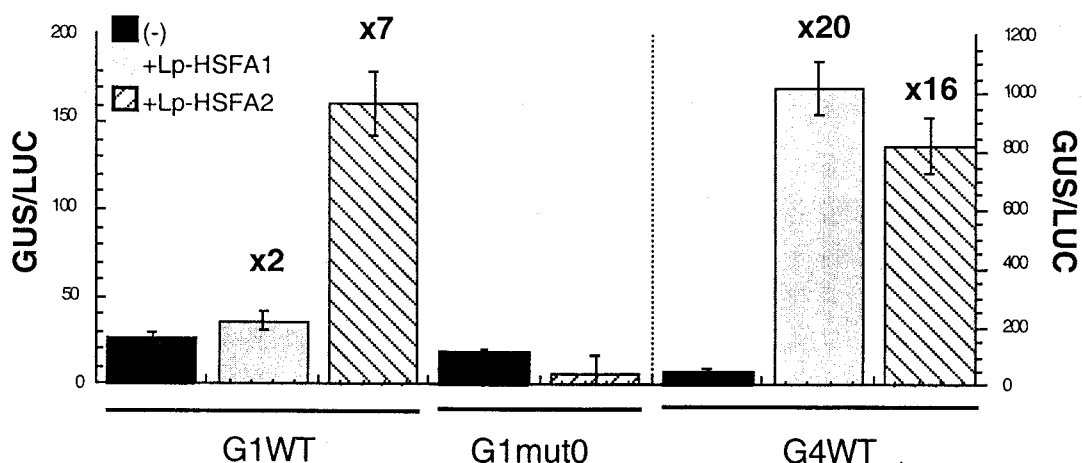


Fig.21. Transactivación del gen quimérico G1WT, por Lp-HSFA1 y Lp-HSFA2, en embriones de girasol. Se representan las medias de las actividades GUS normalizadas con las actividades luciferasa (GUS/LUC), obtenidas con los distintos genes quiméricos ensayados (indicados bajo la gráfica) Las barras indican los errores estándar de las medias correspondientes a 5 experimentos independientes con 5 disparos cada uno. Los embriones fueron bombardeados sin plásmido efector (-) o con los plásmidos efectores de Lp-HSFA1 o Lp-HSFA2, según se indica a la izquierda de la gráfica. El nivel de inducción, explicado en el pie de la Fig.20B, se muestra con números sobre las barras.

Estos resultados indican que pudiera haber especificidad de algunos HSFs por ciertos promotores de genes sHSP embrionarios. Así los HSFs de tipo A2 podrían ser capaces de activar a promotores con regiones HSEs semejantes a las del gen *Ha hsp17.6G1* y a las del gen *Ha hsp17.7G4*, mientras que los HSFs de tipo A1 preferirían regiones HSEs más complejas como las del segundo promotor.

3.3. Transactivación por Lp-HSFA1 de un gen quimérico con el promotor de *Ha hsp17.7G1* y la región HSE modificada (mutante P)

Las características de las regiones HSEs necesarias para la transactivación por cada HSF pudieran ser varias. Así por ejemplo podrían influir la distancia desde

el HSE a la caja TATA (Mason *et al.*,1998, Reindl y Shöffl, 1998), la distribución espacial de los pentanucleótidos consenso para la unión cooperativa y eficiente de los HSFs (Fernandes *et al.*,1995) o incluso la conformación que adopta un HSF unido a una región HSE determinada dependiendo de la secuencia (Santoro *et al.*,1998). Estos factores, por separado o en combinación , pudieran ser claves para la discriminación de un HSF en la activación de un promotor (véase Introducción). La complejidad de la región HSE del promotor *Ha hsp17.6G1* es mucho menor que la de las regiones HSE del promotor *Ha hsp17.7G4*, donde los estudios previos indicaron la existencia de interacciones cooperativas funcionales entre dichas regiones (Almoguera *et al.*,1998 y este trabajo). Ésta pudiera ser una de las razones por las que el promotor del gen *Ha hsp17.6G1* sea activado exclusivamente por Lp-HSFA2.

Mediante mutagénesis dirigida, modificamos la región HSE en el gen quimérico G1WT, de manera que aumentamos el número de pentanucleótidos consenso, y por lo tanto su complejidad (Barros *et al.*,1992) (véase la Fig. 25). Así obtuvimos un nuevo plásmido *reporter* al que denominamos G1mutP (P = “perfecto”).

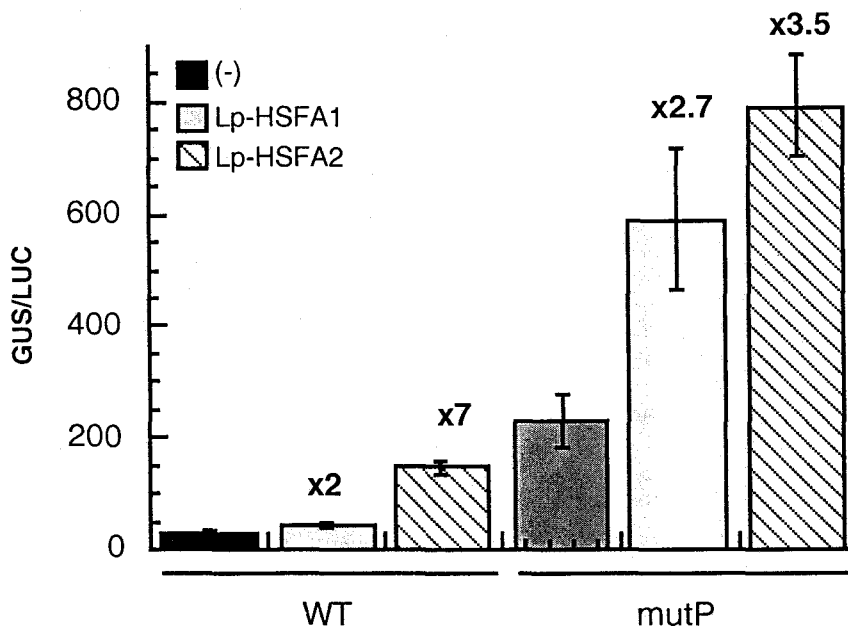


Fig.22. Transactivación del gen quimérico G1mutP, por Lp-HSFA1 y Lp-HSFA2, en embriones de girasol. Los embriones fueron bombardeados sin plásmido efector (-) o con

los plásmidos efectores de Lp-HSFA1 o Lp-HSFA2, según se indica a la izquierda de la gráfica. Se muestran los valores medios de actividad GUS normalizada correspondientes a 5 experimentos. Tamaño de las muestras y resto de los símbolos como se indica en los pies de las Figuras 20 y 21.

En la **Fig.22** se muestran los resultados de los ensayos de expresión transitoria en embriones de girasol usando dicho plásmido y los efectores de Lp-HSFA1 y Lp-HSFA2. En la misma figura se muestran los resultados obtenidos con G1WT para una mejor comparación. Todos los genes quiméricos fueron ensayados simultáneamente en los mismos experimentos.

En ausencia de efector la actividad GUS obtenida con G1mutP fue significativamente mayor que la obtenida con G1WT ($F=50.23$, $P=0.0001$). Este resultado muestra que las modificaciones introducidas en el gen quimérico mutante mejoran su activación transcripcional mediada por HSFs presente(s) en los embriones. El bombardeo con el plásmido efector de Lp-HSFA1 resultó en la activación transcripcional de G1mutP, aumentando significativamente la actividad GUS con respecto a la obtenida en ausencia del efector ($F=9.63$, $P=0.021$). Aún más, la actividad GUS obtenida usando Lp-HSFA1 fue similar a la observada con el efector de Lp-HSFA2 ($F=0.29$, $P=0.083$). Es decir, ambos HSFs transactivaron de igual forma al gen quimérico G1MUTP. Por tanto, las modificaciones introducidas en el mutante P posibilitan la activación del gen quimérico por Lp-HSFA1. En cambio, dichas modificaciones no afectaron substancialmente la activación por Lp-HSFA2. Estos resultados sugieren la existencia de cierta especificidad de secuencia para la activación transcripcional por Lp-HSFA2. Así, mientras que la capacidad de activación de Lp-HSFA1 varía según la secuencia de las regiones con HSEs, Lp-HSFA2 muestra una especificidad para activar a través de las secuencias nativas de las región con HSEs del promotor *Ha hsp17.6G1*.

3.4. Activación transcripcional, por Lp-HSFA1 y Lp-HSFA2, a través de la región HSE del gen *Ha hsp17.7G1* en *Saccharomyces cerevisiae*.

La presencia de HSFs endógenos en los embriones podría explicar las diferencias en las actividades GUS observadas con los plásmidos *reporters* G1WT

y G1MUTP en ausencia de efectores (Fig. 22). Si cuando expresamos un plásmido efector con un HSF, éste no fuera capaz de “desplazar” a los factores endógenos, la activación transcripcional del gen *reporter* que observamos, pudiera deberse a interacciones entre los factores endógenos y el efector ensayado. Estas interacciones pueden dificultar las interpretaciones sobre la capacidad de activación de dicho efector por sí sólo. Para solventar este problema, investigamos la capacidad de transactivación por Lp-HSFA1 y Lp-HSFA2 a través de la región HSE del promotor *Ha hsp17.6G1* en un sistema sin HSFs endógenos. Usamos la estirpe RSY4 de *Saccharomyces cerevisiae*, cuyo único HSF está deletado (Boscheinen *et al.*,1997). La viabilidad de esta estirpe depende de la complementación con Lp-HSFA1 o Lp-HSFA2 expresados a partir de un plásmido (ver materiales y métodos 1.2.2). De esta forma las estirpes RSY4::Lp-HSFA1 y RSY4::Lp-HSFA2, contienen los plásmidos efectores de Lp-HSFA1 y Lp-HSFA2 respectivamente. Como plásmidos *reporter* usamos las fusiones con lacZ G1WT::Z, G1mut0::Z y G1mutP::Z (ver materiales y métodos 27). Estas fusiones contienen un promotor mínimo y la región HSE del gen *Ha hsp17.6G1* sin modificar (WT) o modificadas (G1mut0 y G1mutP), según se describió anteriormente (véase la Fig. 25).

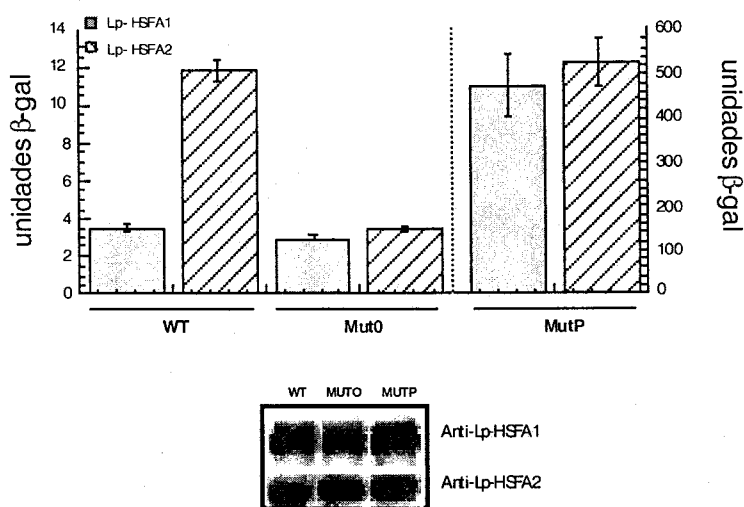


Fig.23. Transactivación, por Lp-HSFA1 y Lp-HSFA2, de los genes quiméricos G1WT::Z y G1mutP::Z en *Saccharomyces cerevisiae*. Se representan las medias de las actividades β-gal (véase materiales y métodos 10.2) obtenidas en las estirpes RSY4::Lp-HSFA1 y RSY4::Lp-HSFA2 (Boscheine *et al.*,1997) transformadas con los plásmidos *reporter* que se indican bajo la gráfica: WT, G1WT::Z, Mut0, G1mut0::Z, y MutP,

G1mutP::Z. Las barras muestran los errores estándar de las medias obtenidas con dos transformantes independientes por cada plásmido ensayado. En el panel inferior se muestra el nivel de expresión de cada HSF, determinado por análisis *Western* de extractos proteicos de las estirpes transformadas con los plásmidos que se indican arriba del panel. Carriles superiores: estirpe RSY4::Lp-HSFA1. Carriles inferiores: estirpe RSY4::Lp-HSFA2. En la parte derecha se indica el suero utilizado para la inmunodetección.

En la **Fig. 23** se muestran los obtenidos. En la estirpe RSY4::Lp-HSFA1 observamos actividades β -gal similares, usando tanto G1WT::Z como G1mut0::Z. Sin embargo, en la estirpe RSY4::Lp-HSFA2, usando G1WT::Z obtuvimos una actividad 4 veces mayor que la observada con G1mut0::Z. Estos datos indican que, en ausencia de HSFs endógenos, únicamente Lp-HSFA2 es capaz de activar el gen *LacZ* a través de la región HSE del promotor de *Ha hsp17.6G1*. Este resultado confirma las observaciones previas en los experimentos de expresión transitoria en embriones de girasol (Fig. 21).

También investigamos la capacidad de activación de ambos HSFs a través del HSE modificado en el mutante P. La mejora en los sitios de unión para los HSFs, permitió la activación transcripcional del gen quimérico G1mutP::Z en la estirpe RSY4::Lp-HSFA1. Por otro lado, la actividad β -gal, observada con dicho gen quimérico, fue similar en las estirpes RSY4::Lp-HSFA1 y RSY4::Lp-HSFA2 (Fig. 23). Estos resultados también reproducen las observaciones previas en embriones de girasol con el gen quimérico G1WT (Fig. 22). Hasta ahora sólo se había demostrado la especificidad de activación por HSFs con secuencias HSE sintéticas, tanto en animales (Kroeger y Morimoto, 1994), como en plantas (Barthi *et al.*, 2000). Nuestros resultados son la primera evidencia de activación preferencial por un HSF obtenida con secuencias HSE de un promotor natural, tanto en plantas (Fig. 22), como en levaduras (Fig. 23).

3.5 Sinergismo en la activación transcripcional, por Lp-HSFA1 y Lp-HSFA2, del promotor de *Ha hsp17.6G1*.

Mediante experimentos de expresión transitoria en protoplastos de tabaco y con técnicas inmunológicas, se ha observado que Lp-HSFA2 permanece en el

citoplasma. Sólo cuando se co-expresan Lp-HSFA1 y Lp-HSFA2, se ha observado una eficiente importación al núcleo de este último HSF. Estos resultados se refieren a tejidos vegetativos, tanto a temperaturas control como en situaciones de choque térmico (Scharf *et al.*,1998). El co-transporte al núcleo de ambos HSFs requiere su interacción física mediante los respectivos dominios de oligomerización (HR-A/B) y las señales de localización nuclear (K/R2) (Scharf *et al.*,1998) (véase Introducción). Además, la co-expresión de Lp-HSFA1 y Lp-HSFA2 en protoplastos de tabaco produjo la activación sinérgica del promotor del gen *hsp17* de soja (Scharf *et al.*,1998). Estos autores propusieron que además de un co-transporte al núcleo de ambos HSFs, éstos pudieran formar hetero-oligómeros que serían transcripcionalmente más activos que los respectivos homo-oligómeros. Otra posible explicación a tener en cuenta y puesto que no se ha demostrado la unión de hetero-oligómeros al ADN, sería que la unión de homo-oligómeros distintos - de Lp-HSFA1 y de Lp-HSFA2, a la región HSE- activase la transcripción del promotor *hsp17* mucho más que cuando se unen homo-oligómeros de un solo tipo. Puede ser muy difícil discernir entre estas dos posibilidades cuando las regiones con HSEs implicadas son muy complejas. Dada la sencillez de la única región HSE del gen *Ha hsp17.6G1*, éste sería un buen modelo para estudiar el mecanismo de la interacción funcional entre ambos HSFs.

Como primera aproximación, determinamos si la interacción funcional de los dos HSFs observada previamente (Scharf *et al.*,1998) es independiente del promotor y del tejido. Para ello realizamos experimentos de expresión transitoria en embriones y hojas de girasol, usando el plásmido *reporter* G1WT y los plásmidos efectores de Lp-HSFA1 y Lp-HSFA2. En estos experimentos se ensayaron ambos efectores separada y conjuntamente. Como habíamos observado anteriormente, sólo Lp-HSFA2 fue capaz de activar transcripcionalmente al promotor quimérico G1WT en embriones (ver las Figs. 21 y 24A). Sin embargo, la actividad GUS obtenida tras el co-bombardío de Lp-HSFA1 y Lp-HSFA2 fue significativamente mayor que la suma de las actividades obtenidas tras el bombardío con cada efector por separado (F=27.349, P=0.0001; Fig.24 A).

Por tanto, la interacción funcional entre ambos HSFs, observada previamente (Scharf *et al.*, 1998), es independiente del tejido y del promotor.

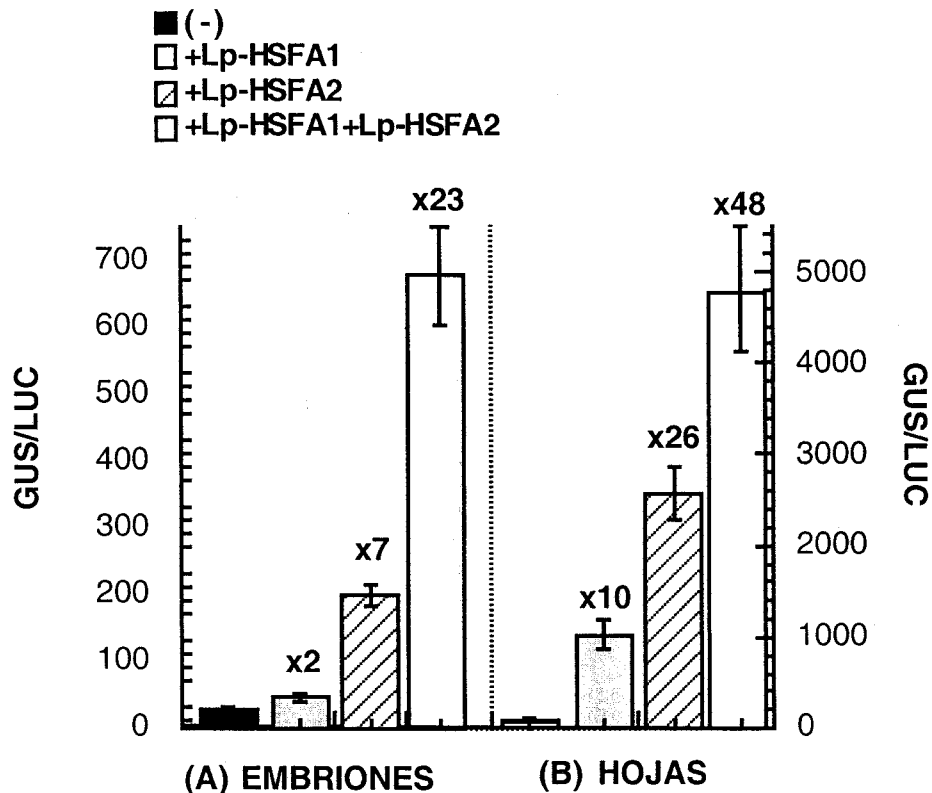


Fig.24. Efecto sinérgico, de Lp-HSFA1 y Lp-HSFA2, en la activación transcripcional del gen quimérico G1WT en embriones y hojas de girasol. Se representan los valores medios de actividad GUS normalizada correspondientes a 5 experimentos de expresión transitoria realizados en cada sistema (indicado en la parte inferior). El uso de plásmido(s) efector(es) se indica arriba a la izquierda de la gráfica. Tamaño de las muestras y resto de los símbolos como se indica en los pies de las Figuras 20 y 21.

De hecho, este efecto sinérgico también lo observamos en hojas de girasol (Fig. 24B). Así, la actividad GUS obtenida en hojas bombardeadas con ambos HSFs fue significativamente mayor a la suma de las actividades obtenidas con cada HSF por separado ($F=0.559$; $P=0.06$). Otra observación interesante de este último experimento es que, a diferencia de los resultados en embriones, en hojas, cada uno de los HSFs fue capaz de activar transcripcionalmente, por separado, al gen quimérico G1WT. Así, sólo en hojas la actividad GUS obtenida con G1WT en presencia de Lp-HSFA1 fue significativamente mayor que en ausencia de efector (-

) ($F=103.174$, $P=0.0001$, Fig.24B; datos estadísticos no mostrados para embriones, Fig. 24A). Estos resultados sugieren la existencia de interacciones funcionales entre los HSFs endógenos y los exógenos, de manera que la actividad GUS alcanzada, tras bombardear con un HSF, puede deberse en realidad a la interacción de éste con factores endógenos. Así por ejemplo, el bombardeo con Lp-HSFA2 mostraría el resultado de la interacción de éste con HSFs endógenos de tipo A1 y viceversa. El hecho de que la actividad transcripcional mediada por Lp-HSFA2 sea mayor que la producida por Lp-HSFA1, tanto en embriones como en hojas de girasol (Fig. 24A y B), indicaría la menor abundancia de HSFs de tipo A2 en ambos tejidos. Del mismo modo podrían explicarse las diferencias observadas en la transactivación por Lp-HSFA1. En embriones de girasol la cantidad de HSFs de tipo A1 sería más abundante que en hojas.

Por tanto, el conjunto de estos resultados indica que la interacción funcional de Lp-HSFA1 y Lp-HSFA2 es independiente del promotor y del tejido. Como apuntan Scharf *et al.*, (1998), el efecto sinérgico observado con ambos HSFs pudiera no ser una mera consecuencia de la importación al núcleo de Lp-HSFA2 asistida por Lp-HSFA1, sino que además ambos HSFs pudieran cooperar en la activación transcripcional de los promotores ensayados. Si fuese así, como se comentó anteriormente, el efecto sinérgico podría deberse a la unión de hetero-oligómeros transcripcionalmente muy activos, o bien, a otros efectos cooperativos tras la unión de homo-oligómeros de distinto tipo. En el caso del gen *Ha hsp17.6G1*, y a pesar de la sencillez de su HSE (véase la Fig. 25), ambas posibilidades podrían darse: ya que un HSF puede unirse muy eficientemente a tres pentanucleótidos consenso alternos (ver Introducción); pero también con moderada afinidad a sólo 2 de ellos (Wu,1995). En este último supuesto, la secuencia HSE de *Ha hsp17.6G1* podría unir simultáneamente dos homo-oligómeros de HSF; tal y como se muestra en la Fig. 25. El análisis mediante mutagénesis dirigida de la región HSE del gen *Ha hsp17.6G1* nos ha permitido averiguar la secuencia mínima necesaria para la interacción funcional de Lp-HSFA1 y Lp-HSFA2 y, como explicamos a continuación, discernir entre la dos posibilidades mencionadas anteriormente.

3.6. Secuencias mínimas necesarias para la interacción funcional de Lp-HSFA1 y Lp-HSFA2.

Para averiguar la secuencia mínima de la región HSE del gen *Ha hsp17.6G1* necesaria para la interacción funcional de Lp-HSFA1 y Lp-HSFA2, construimos una serie de mutantes en los que modificamos, en cada uno de ellos, el nucleótido más crítico para la unión de HSFs en uno de los pentanucleótidos consenso de dicha región (Barros *et al.*, 1992). En la **Fig. 25** se muestra la secuencia del gen *Ha hsp17.6G1* desde la posición (-110) hasta la posición (-81), correspondiente a la región HSE.

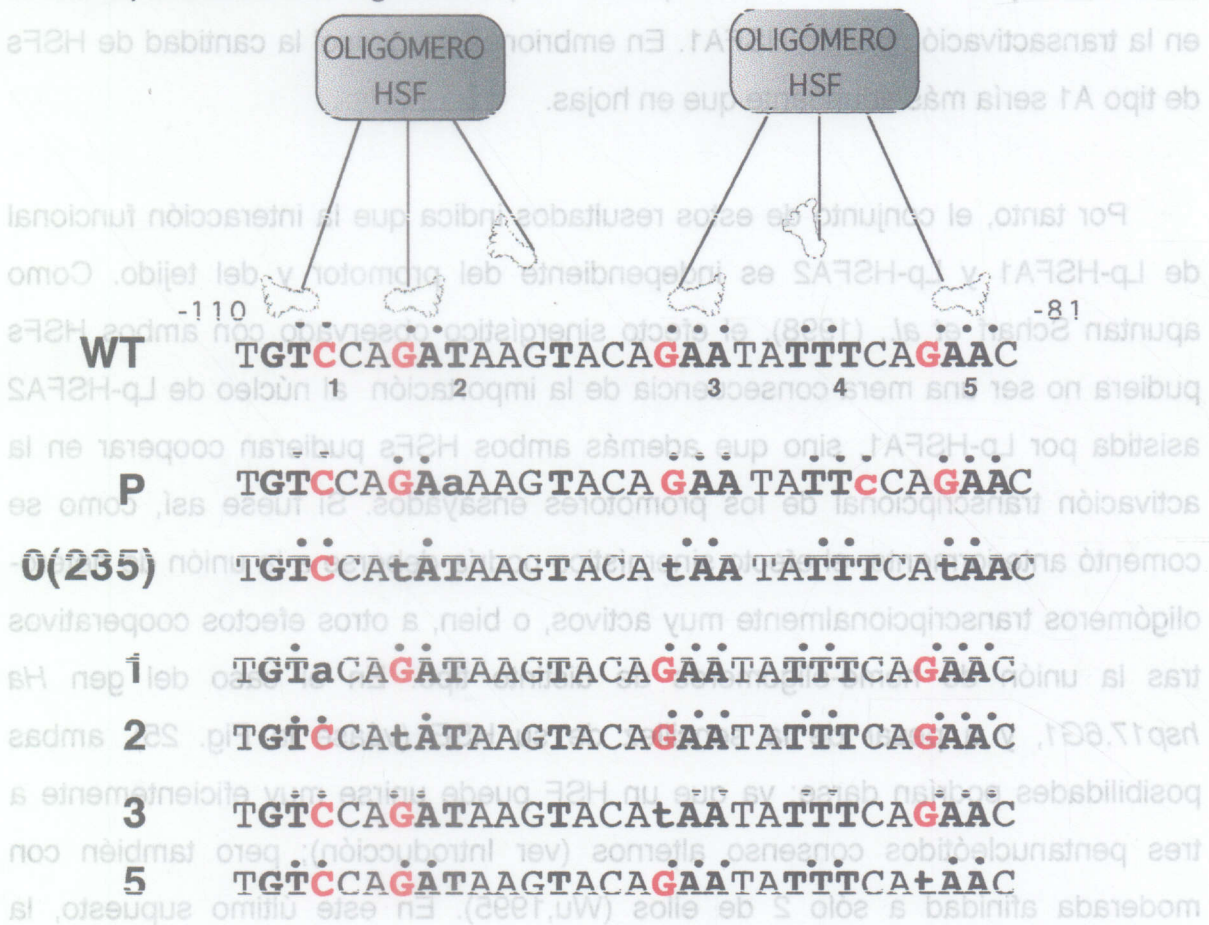


Fig.25. Secuencias de la región HSE del promotor de *Ha hsp17.6G1* con las modificaciones introducidas en cada gen mutante. Se muestra la secuencia de nucleótidos sin modificar (WT) de la región HSE de *Ha hsp17.6 G1*, desde la posición -110 hasta la -81 (respecto al sitio de inicio de la transcripción de dicho gen). Los números bajo esta secuencia identifican, según su posición respecto al promotor, los pentanucleótidos consenso para la unión de HSFs (nGAAn ó nTTCn): desde el más 5'-distal (el número 1) hasta el más proximal (el número 5). Los nucleótidos ajustados a dicho consenso llevan un punto encima y los más críticos para la unión de HSFs están marcados en rojo. Los distintos genes quiméricos mutantes se obtuvieron substituyendo

la secuencia HSE del gen de partida G1WT por la indicada, en cada caso, en la parte inferior de la figura (ver materiales y métodos, 23.3). Las substituciones de nucleótidos se indican en minúscula. Correspondencia con las denominaciones de los genes quiméricos usadas en el texto: WT, G1WT; P, G1mutP; 0 (2,3,5), G1mut0; 1, G1mut1; 2, G1mut2; 3, G1mut3; y 5, G1mut5. En la parte superior de la figura se incluye un esquema mostrando como dos oligómeros de HSF podrían unirse simultáneamente al HSE de *Ha hsp17.6G1* efectuando, cada uno, dos contactos con dos posiciones críticas en dos pentanucleótidos distintos. Esta posibilidad requeriría un contacto con el pentanucleótido número 1.

Obtuvimos un total de 4 mutantes: 1, 2, 3 y 5; denominados según el número del pentanucleótido consenso donde se ha introducido la mutación. El pentanucleótido número 4, ya tiene modificado naturalmente dicho nucleótido crítico y por tanto no hubo que cambiarlo.

Dado que la interacción funcional entre Lp-HSFA1 y Lp-HSFA2 es independiente del tejido (Figs. 24A y B), decidimos usar como sistema experimental de estudio la expresión transitoria en protoplastos de tabaco, dada su mayor facilidad y rapidez para el análisis. De este modo, usamos como plásmidos *reporters*, el gen quimérico original G1WT, con la región HSE sin modificar, y sus derivados que incorporan las distintas versiones mutadas: G1mut0, G1mut1, G1mut2, G1mut3 y G1mut5. Como plásmidos efectores usamos los de Lp-HSFA1 y Lp-HSFA2. En la **Fig. 26** se representan las actividades GUS obtenidas en protoplastos transformados con los distintos plásmidos. La expresión de cada HSF en dichos protoplastos fue verificada usando antisueros específicos (véase la parte inferior de la **Fig. 26**).

En ausencia de efectores, la actividad GUS alcanzada por los 4 genes quiméricos mutantes fue similar a la de G1WT (G1mut1: $F=1.31$, $P=0.253$; G1mut2: $F=0.232$, $P=0.63$; G1mut3: $F=0.151$, $P=0.69$; G1mut5: $F=0.002$, $P=0.96$). El efecto sinérgico previamente observado en embriones y hojas de girasol, también se reprodujo en protoplastos, según muestra la comparación de la actividad GUS obtenida con G1WT, en presencia de los dos efectores Lp-HSFA1 y Lp-HSFA2, con la suma de las actividades obtenidas con cada efector por separado ($F=19.6$, $P=0.0001$). Puesto que la actividad basal (sin efector) de G1WT fue mínima, frente a la obtenida en presencia de los dos HSFs, podemos hacer una simplificación y

comparar directamente las actividades GUS alcanzadas por los mutantes en presencia de los dos HSFs.

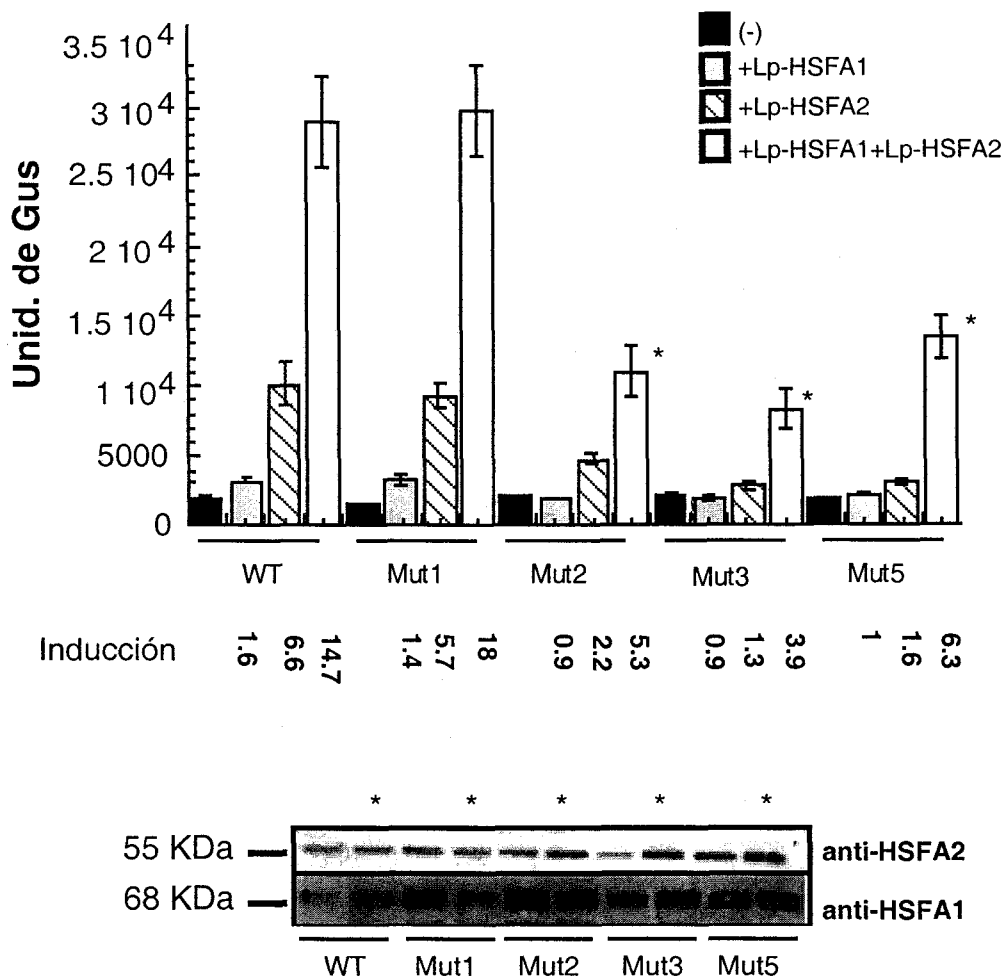


Fig.26. Efecto, sobre la activación sinérgica por Lp-HSFA1 y Lp-HSFA2, de las mutaciones puntuales en la región HSE del gen quimérico G1WT. Se representan las medias de las actividades GUS (véase materiales y métodos 6.14) obtenidas en protoplastos de tabaco transformados con combinaciones de los distintos genes quiméricos y plásmidos efectores. Los datos corresponden a 3 repeticiones experimentales independientes de cada combinación, con las actividades GUS medidas por triplicado. Los distintos genes quiméricos ensayados se indican debajo de la gráfica: WT, G1WT; Mut1, G1mut1; Mut2, G1mut2; Mut3, G1mut3; y Mut5, G1mut5 (ver la Fig. 25). Cada gen quimérico fue ensayado sin (-) o con los plásmidos efectores que se indican a la derecha de la gráfica. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas respecto a los resultados obtenidos con G1WT usando los plásmidos efectores de Lp-HSFA1 y Lp-HSFA2. Resto de los símbolos como se indica en los pies de las Figuras 20 y 21. En el panel inferior, se muestra la verificación del nivel de expresión de cada HSF. Esto se hizo mediante análisis de *western* de muestras proteicas de protoplastos transformados, con los genes quiméricos que se indican abajo, y con los plásmidos efectores correspondientes al suero utilizado para la inmunodetección (indicado a la derecha del

panel). En los protoplastos co-transformados con Lp-HSFA1 y Lp-HSFA2, la presencia de ambos HSFs se determinó a partir de las mismas muestras (asteriscos sobre los carriles correspondientes). A la izquierda se indican los pesos moleculares de las bandas detectadas en cada caso.

De esta forma, como puede observarse en la Fig. 26, los genes quiméricos mutantes 2, 3 y 5 presentaron unos niveles de actividad GUS significativamente menores que los de G1WT (G1mut2: $F=33.66$, $P=0.0001$; G1mut3: $F=58.75$, $P=0.0001$; G1mut5: $F=20.64$, $P=0.0001$); es decir, cada una de las modificaciones introducidas en estos mutantes afectaron a la interacción funcional entre Lp-HSFA1 y Lp-HSFA2. Este resultado se observa también al comparar las transactivaciones por Lp-HSFA2 de los distintos genes quiméricos. Así, la actividad GUS obtenida con G1mut2, G1mut3 y G1mut5 en presencia de Lp-HSFA2 fue significativamente menor a la obtenida con G1WT en las mismas condiciones (respectivamente, $F=13.21$, $P=0.0001$; $F=68.03$, $P=0.0001$; y $F=59.03$, $P=0.0001$). Las comparaciones entre las actividades GUS obtenidas con cada uno de estos mutantes, revelaron que las mutaciones en G1mut2 y G1mut5 afectaban de igual forma a la interacción funcional entre Lp-HSFA1 y Lp-HSFA2, al ser similares las actividades GUS alcanzadas por dichos genes quiméricos en presencia de ambos HSFs ($F=3.1$, $P=0.08$).

En cambio, las mutaciones en G1mut3 tuvieron un efecto mayor sobre interacción funcional entre Lp-HSFA1 y Lp-HSFA2. Los análisis estadísticos revelaron, en este caso, una diferencia significativa entre la actividad GUS alcanzada por dicho gen respecto a la de G1mut5 ($F=15.9$, $P=0.0001$). Esta misma comparación dió sólo un resultado marginalmente significativo respecto a G1mut2 ($F=4.95$, $P=0.02$). Como control negativo de la transactivación por Lp-HSFA1 y Lp-HSFA2 se usó el plásmido G1mut0 (ver la Fig 25). Las actividades GUS observadas con dicho plásmido fueron similares tanto en ausencia de efectores como en su presencia (datos no mostrados).

Sin embargo, el comportamiento del gen mutante G1mut1 fue el resultado más sorprendente. Las actividades GUS obtenidas con dicho mutante, en presencia de los plásmidos efectores de Lp-HSFA1 y Lp-HSFA2, no fueron

significativamente distintas de la del gen G1WT en las mismas condiciones ($F=0.047$, $P=0.8292$). Así, el pentanucleótido número 1 no parece ser funcional; por lo que el HSE del gen G1mut1 contendría las secuencias mínimas necesarias para la interacción funcional entre Lp-HSFA1 y Lp-HSFA2.

Si observamos la región HSE del gen G1mut1 (Fig. 25), vemos que ésta sólo contiene 3 repeticiones del pentanucleótidos consenso con los nucleótidos críticos para la unión de HSFs (los pentanucleótidos número 2,3 y 5), y un pentanucleótido imperfecto sin ellos (el número 4). No existe ningún antecedente, ni en plantas ni en animales (véase la Introducción), en el que una región HSE de estas características pueda unir simultáneamente dos oligómeros de HSFs. Por lo tanto, muy probablemente sea un único oligómero el responsable de la transactivación conjunta, por Lp-HSFA1 y Lp-HSFA2, de los genes quiméricos G1mut1 y probablemente G1WT. Además, Los homo-oligómeros de Lp-HSFA1 y Lp-HSFA2 no parecen competir por el único sitio de unión; ya que de lo contrario, el resultado observado tras el co-bombardío con ambos HSFs hubiera sido una actividad GUS intermedia entre las producidas con cada efector por separado. En consecuencia, el efecto sinérgico observado en su lugar (Fig. 26) podría ser explicado por la acción de un único hetero-oligómero formado por monómeros de Lp-HSFA1 y Lp-HSFA2.

3.7. Efecto de la mutación de la señal de localización nuclear (K/R2) de Lp-HSFA1 sobre la interacción funcional con Lp-HSFA2.

Como comentamos anteriormente, el efecto sinérgico sobre la transcripción del gen quimérico G1WT, mediado por Lp-HSFA1 y Lp-HSFA2, pudiera deberse únicamente a una mayor disponibilidad de Lp-HSFA2 en el núcleo, donde entraría ayudado por Lp-HSFA1. En este caso, la activación transcripcional de G1WT sería producida únicamente por Lp-HSFA2, y las secuencias mínimas para la interacción funcional de ambos HSFs, acotadas por mutagénesis (Fig. 26), indicarían los sitios de unión al ADN para Lp-HSFA2.

En protoplastos de tabaco, la mutación de una señal de localización nuclear (K/R2) en el mutante Lp-HSFA1M3 de Lp-HSFA1 impide su importación al núcleo. Por tanto, dicho mutante es incapaz de mediar el co-transporte al núcleo de Lp-HSFA2, tanto a temperaturas normales como en situación de choque térmico (Lyck *et al.*, 1997 y Scharf *et al.*, 1998). Por ello, usando Lp-HSFA1M3 investigamos posibles efectos de co-transporte sobre la interacción funcional con Lp-HSFA2. En la Fig. 27 comparamos, en embriones y hojas de girasol, la activación del gen quimérico G1WT por Lp-HSFA1 y Lp-HSFA2 con la correspondiente al bombardeo del mismo gen con Lp-HSFA1M3 y Lp-HSFA2.

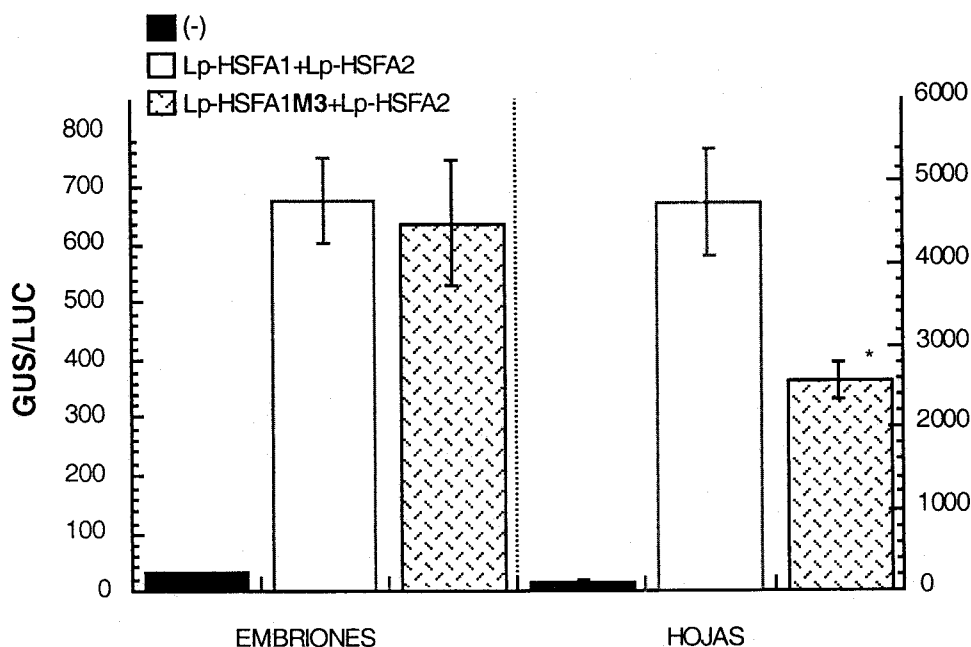


Fig.27. Interacción funcional, entre Lp-HSFA1M3 y Lp-HSFA2, en embriones de girasol. Se representan las medias de las actividades GUS normalizadas con luciferasa (GUS/LUC) obtenidas a con el gen quimérico G1WT tras expresión transitoria, mediante bombardeo, de ADN plasmídico en embriones y hojas de girasol. Los datos corresponden a 5 experimentos con 5 disparos cada uno. Los ensayos se hicieron en ausencia de efector (-), o en presencia de los efectores indicados arriba a la izquierda. El asterisco denota las diferencias estadísticamente significativas explicadas en el texto que indican la ausencia de la interacción funcional en hojas. Resto de los símbolos como se indica en los pies de las Figuras 20 y 21.

En estos experimentos, Lp-HSFA1M3 no interaccionó funcionalmente con Lp-HSFA2 en hojas de girasol; pues cuando los ensayamos conjuntamente observamos una reducción significativa de actividad respecto a la alcanzada tras el

bombardeo de los dos HSFs nativos ($F=6.86$, $P=0.009$). Así, las actividades GUS obtenidas tras el co-bombardeo de Lp-HSFA1M3 y Lp-HSFA2 fueron similares a las obtenidas en presencia únicamente de Lp-HSFA2 (véase también los datos previamente mostrados en la Fig. 24). Por lo tanto la señal de localización nuclear K/R2 de Lp-HSFA1 sería funcional en hojas de girasol. Este resultado indica que los mecanismos de co-transporte de HSFs pudieran estar conservados en distintas especies vegetales.

Sin embargo en embriones de girasol, la mutación en (K/R2), no tuvo ningún efecto en la interacción funcional con Lp-HSFA2 (Fig 27). En este caso, la actividad GUS obtenida tras el co-bombardeo con Lp-HSFA1M3 y Lp-HSFA2 no difirió estadísticamente de la obtenida con Lp-HSFA1 y Lp-HSFA2 ($F=0.25$, $P=0.61$). Por tanto, el transporte nuclear de los HSFs pudiera ser distinto en tejidos vegetativos y en embriones. De esta forma, la interacción funcional entre Lp-HSFA1 y Lp-HSFA2 pudiera ser independiente del co-transporte de ambos factores al núcleo, al menos en embriones de girasol y en nuestras condiciones experimentales.

3.8. Ensayos de unión *in vitro* de Lp-HSFA1 y Lp-HSFA2 a la región HSE del gen *Ha hsp17.7G1*

Los resultados expuestos anteriormente muestran que, por separado sólo Lp-HSFA2 es capaz de activar al promotor de *Ha hsp17.6G1* (véase Resultados 3.2 y 3.4), mientras que junto con Lp-HSFA1 se produce una activación sinérgica que probablemente implica la unión a la región HSE de un hetero-oligómero de ambos factores (véase Resultados 3.6 y 3.7). Sin embargo desconocemos cual es la razón por la que Lp-HSFA1 sea incapaz de activar transcripcionalmente a dicho promotor. Tampoco tenemos una evidencia experimental directa de la formación de los hetero-oligómeros mencionados. Para aclarar estas cuestiones, realizamos ensayos de unión *in vitro* de Lp-HSFA1 y Lp-HSFA2 a la región HSE del gen *Ha hsp17.6G1*. A partir de las estirpes RSY4::Lp-HSFA1 y RSY4::Lp-HSFA2 (Boscheinen *et al.*, 1997) (véase Resultados 3.4), obtuvimos extractos de proteínas totales de cada una de ellas. La presencia de cada HSF en dichos extractos proteicos fue determinada por análisis de *Western*. Sus resultados mostraron una

III. Resultados

abundancia similar de ambos HSFs (Fig. 28, panel inferior). Como sondas usamos un fragmento de ADN de 88 pb (G1HSE), correspondiente a la región HSE del gen *Ha hsp17.6G1*, y un oligonucleótido sintético (oliHSE) con 5 repeticiones de un pentanucleótido consenso para la unión de los HSFs (ver materiales y métodos, 14.2).

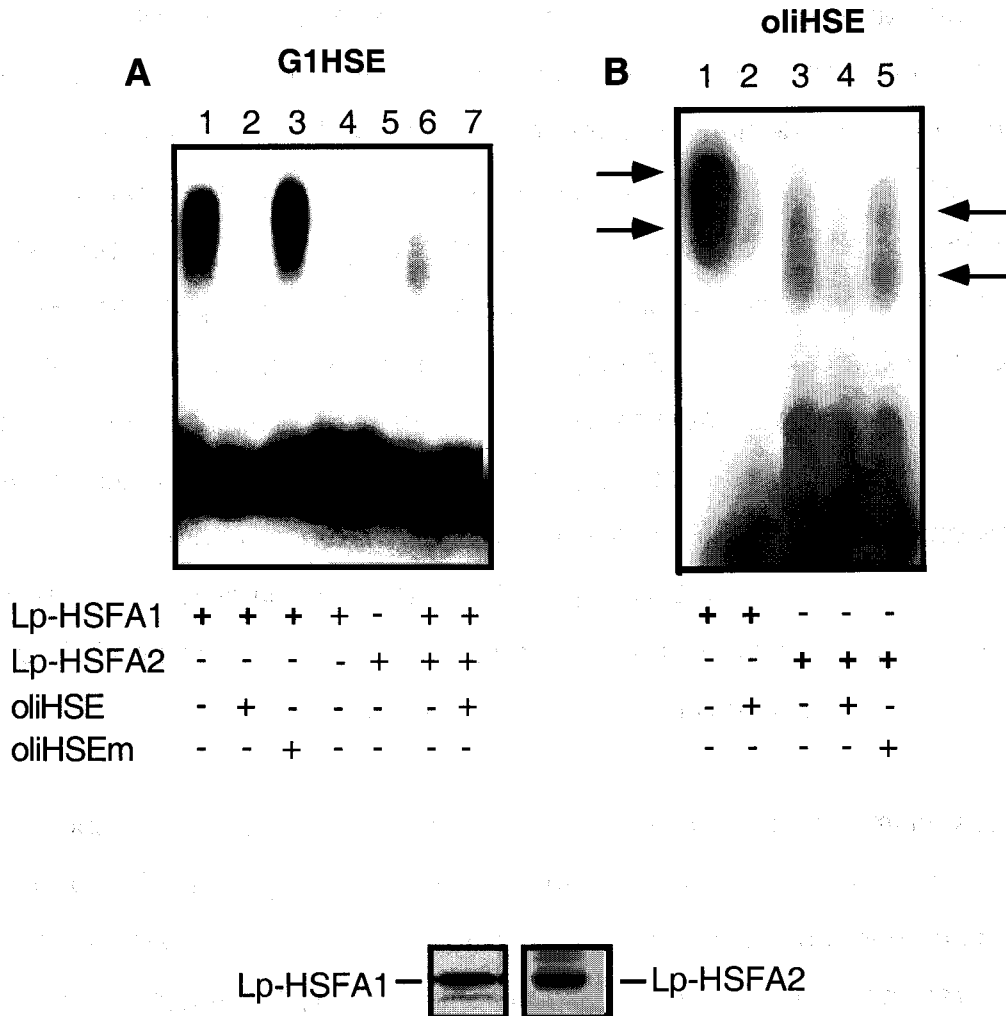


Fig.28. Ensayos de unión *in vitro* de Lp-HSFA1 y Lp-HSFA2: (A) con la región HSE del gen *Ha hsp17.6G1*. (B) con secuencias sintéticas HSE en un oligonucleótido. Las condiciones para las reacciones de unión *in vitro* se detallan en materiales y métodos (14.2). Los extractos de proteínas fueron obtenidos a partir de las estirpes RSY4::Lp-HSFA1 y RSY4::Lp-HSFA2. Las reacciones contienen 0.13 ng de las sondas G1HSE (panel A) o oliHSE (panel B). La adición (+) u omisión (-) de cada uno de los otros componentes se indican debajo de cada carril. (A) Lp-HSFA1, (+): 20 mg de extractos de proteínas con Lp-HSFA1 y (+): 10 mg de extracto de proteínas con Lp-HSFA1. Lp-HSFA2, (+), 40 mg de extracto de proteínas con Lp-HSFA2 y (+), 10 mg de extracto de proteínas con Lp-HSFA2. (B): Lp-HSFA1, (+): 5 mg de extractos de proteínas con Lp-HSFA1. Lp-HSFA2, (+): 40 mg de extractos de proteínas con Lp-HSFA2. En los carriles 6 y 7 (panel A), los extractos de proteínas con Lp-HSFA1 y Lp-HSFA2 fueron añadidos

simultáneamente a la sonda. Competidores -oliHSE y oliHSEm-: Adición de un exceso 50 veces molar de los oligonucleótidos sintéticos, sin marcar radioactivamente, que se detallan en materiales y métodos (17.1.). En el panel B, las flechas laterales señalan la detección de al menos dos complejos específicos distintos. En el panel inferior de la figura se muestra, mediante inmunodetección *western* que los extractos utilizados contienen cantidades equivalentes de los dos HSFs.

En la **Fig.28** se muestran los resultados de estos ensayos. Para la sonda G1HSE (ver panel A), titulamos la cantidad de extracto con Lp-HSFA1 (datos no mostrados); de manera que determinamos la óptima para detectar el complejo formado por la unión de homo-oligómeros de dicho factor a esta sonda (véase carril 1). Este complejo es específico y muestra los requerimientos de secuencia típicos de los HSFs, como se observa en los experimentos de competición con exceso de fragmentos no marcados específicos (el propio oliHSE) o inespecíficos (su versión mutante oliHSEm; carriles 2 y 3, respectivamente). La adición, a la sonda G1HSE, de la misma cantidad de proteínas totales con Lp-HSFA2, e incluso la del doble, no produjo ningún complejo detectable (carril 4). Este resultado indica que *in vitro*, los homo-oligómeros de Lp-HSFA2 tienen menos afinidad por la unión a la región HSE del promotor *Ha hsp17.6G1* que los homo-oligómeros de Lp-HSFA1. Alternativamente, y de forma no excluyente, los complejos con Lp-HSFA2 serían menos estables en las condiciones usadas para su detección.

Estos mismos resultados fueron observados cuando usamos la sonda oliHSE (Fig. 28, panel B). Esta sonda tiene más sitios de unión para HSFs que la sonda G1WT, de manera que la cantidad de extracto con Lp-HSFA1 necesaria para ver el complejo retardado específico correspondiente (carril1) fue mucho menor que la usada para la sonda G1WT). Esto también se refleja, más claramente que con la sonda G1HSE, en la detección al menos dos complejos de distinta movilidad. Sin embargo, para detectar los complejos formados por los homo-oligómeros de Lp-HSFA2, fue necesario añadir hasta 4 veces más de proteína total del extracto con dicho factor (carril 3). La movilidad dichos complejos fue mayor que la de los de Lp-HSFA1 (comparar carriles 1 y 3), lo que se explicaría por la diferencia en los pesos moleculares de ambos factores de transcripción. Por tanto, las diferencias observadas en la transactivación por Lp-HSFA1 y Lp-HSFA2 en embriones y levaduras con el gen quimérico G1WT, (Figs. 22 y 23), no se explicarían por la

unión ineficiente de Lp-HSFA1 a la región HSE de *Ha hsp17.6G1*. (véase la Discusión).

Utilizando la sonda G1HSE (Figura 28, panel A), también titulamos la cantidad de extracto proteico con Lp-HSFA1, de manera que el complejo homo-oligomérico correspondiente no sea detectado (carril 5). La adición de esa cantidad sup-óptima de Lp-HSFA1 junto con la misma cantidad de extracto con Lp-HSFA2, resultó en la detección de un complejo de intensidad muy débil (carril 6 derecha). Este complejo es específico de las secuencias de unión para los HSFs (carril 7) y presenta un movilidad ligeramente mayor a la del complejo formado por homo-oligómeros de Lp-HSFA1. Estos resultados sugieren que este complejo pudiera estar formado por hetero-oligómeros de Lp-HSFA1 y Lp-HSFA2 unidos a la sonda. Además, al menos *in vitro*, la afinidad del hetero-oligómero por la región HSE del gen *Ha hsp17.6G1* sería mayor que la de los homo-oligómeros de Lp-HSFA1 y Lp-HSFA2. Estos resultados confirmarían directamente, al menos *in vitro*, que la región HSE del gen *Ha hsp17.7G1* puede unir un hetero-oligómero de Lp-HSFA1 y Lp-HSFA2. Adicionalmente dichos resultados podrían explicar, al menos en parte, el efecto sinérgico en la activación transcripcional del gen quimérico G1WT por Lp-HSFA1 y Lp-HSFA2 (Los posibles mecanismos se discuten más adelante en esta Memoria).

3.9 Secuencias mínimas necesarias para la interacción funcional entre Lp-HSFA1 y Lp-HSFB1

En base a sus dominios de unión y de oligomerización, los HSFs vegetales pertenecen a dos familias : las clases A y B. En tomate todos los HSFs de Clase A, clonados hasta la fecha, interaccionan funcionalmente unos con otros. Esta interacción es también física, según los análisis mediante la técnica del doble híbrido en levaduras (Barthi *et al.*,2000). Sin embargo un HSF de clase B, Lp-HSFB1 también es capaz de interaccionar funcionalmente con un único HSF de la clase A, Lp-HSFA1; aunque la interacción física entre ambos no ha sido demostrada (Barthi *et al.*, 2000 y comunicación personal de los autores).

Aprovechando la sencillez estructural de la región HSE del gen *Ha hsp17.6G1*, investigamos los requerimientos de secuencia para la interacción funcional entre ambos HSFs. Para ello, usamos el sistema de expresión transitoria en protoplastos de tabaco y los distintos genes quiméricos ensayados anteriormente para el estudio de la interacción funcional entre Lp-HSFA1 y Lp-HSFA2.

En la **Fig. 29** se muestran los resultados obtenidos. La interacción funcional entre Lp-HSFA1 y Lp-HSFB1 fue reproducida usando el gen quimérico G1WT. La co-expresión de los dos HSFs produjo un efecto sinérgico sobre la activación transcripcional de este gen quimérico; de manera que la actividad GUS obtenida con ambos fue mucho mayor que la suma de las actividades obtenidas con cada factor por separado ($F=96.431$, $P=0.001$). Las actividades GUS alcanzadas, en las mismas condiciones, con los genes mutantes G1mut2 y G1mut3 fueron significativamente mucho menores que la obtenida con el gen silvestre G1WT (G1mut2, $F=,157.75$ $P=0.0001$; G1mut3, $F=90.32$, $P=0.0001$). Es decir las modificaciones introducidas en estos mutantes impidieron la interacción funcional entre Lp-HSFA1 y Lp-HSFB1.

En cambio, al igual que lo observado en la interacción entre Lp-HSFA1 y Lp-HSFA2 (ver la Fig.26), el gen quimérico G1mut1 se comportó de forma similar al silvestre en presencia de ambos efectores, alcanzando la misma actividad GUS (Fig. 29). Por tanto, el pentanucleótido número 1 de la región HSE del gen *Ha hsp17.6G1* tampoco participaría en la interacción funcional entre Lp-HSFA1 y Lp-HSFB1 (ver las Figs. 25, 26 y 29). De forma análoga a lo considerado anteriormente para Lp-HSFA1 y Lp-HSFA2, este resultado indicaría que un único hetero-oligómero de Lp-HSFA1 y Lp-HSFB1 pudiera ser el responsable de la transactivación sinérgica observada con dichos factores. Otras alternativas se comentan en la Discusión. Puesto que las modificaciones introducidas en el gen mutante G1mut1 no tienen ningún efecto, ni sobre la interacción entre Lp-HSFA1 y Lp-HSFA2, ni sobre la de Lp-HSFA1 y Lp-HSFB1; podríamos sugerir que el

pentanucleótido afectado (el número 1, ver la Fig 25) no participa en la regulación, a través del HSE de *Ha hsp17.7G1*, mediada por cualquiera de estos HSFs o de sus combinaciones.

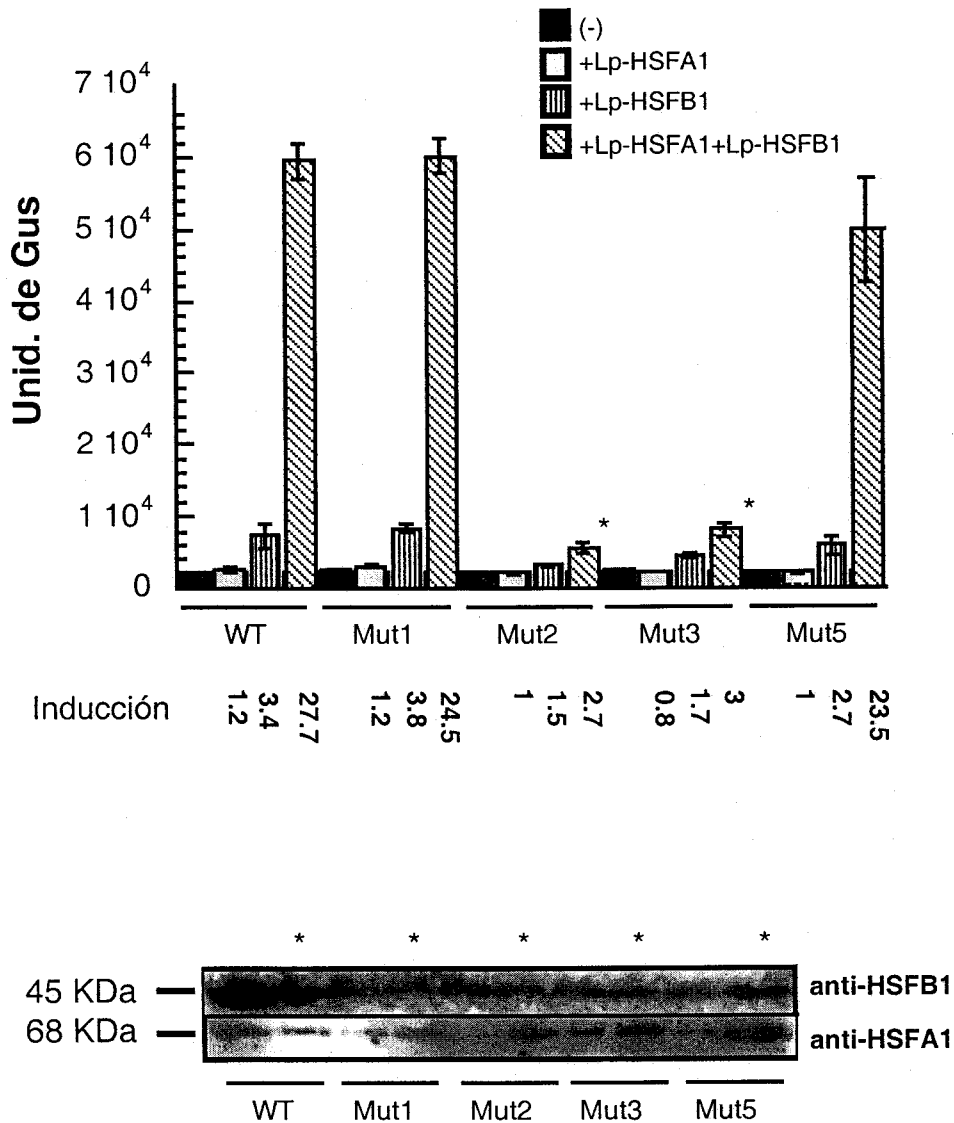


Fig.29. Efecto, sobre el sinérgismo entre Lp-HSFA1 y Lp-HSFB1, de las mutaciones puntuales en la región HSE del gen quimérico G1WT. Se representan las medias de las actividades GUS (véase materiales y métodos 6.14) obtenidas en protoplastos de tabaco transformados con combinaciones de los distintos genes quiméricos y plásmidos efectores. Los datos corresponden a 3 repeticiones experimentales independientes de cada combinación, con las actividades GUS medidas por triplicado. Los distintos genes quiméricos ensayados se indican debajo de la gráfica. Cada gen quimérico fue ensayado sin (-) o con los plásmidos efectores que se indican arriba a la derecha. Véase el pie de la Fig. 25 y 26 para la identificación de los genes quiméricos utilizados, la identificación del

resto de los símbolos, y para la explicación del panel inferior de la figura con la comprobación de la expresión en los protoplastos de Lp-HSFA1 y de Lp-HSFB1.

Los resultados obtenidos con el gen mutante G1mut5 revelaron otra diferencia con los resultados anteriores, que nos permite definir la secuencia mínima necesaria para la interacción entre Lp-HSFA1 y Lp-HSFB1. Usando dicho gen quimérico mutante, la co-expresión de ambos factores resultó en una actividad estadísticamente indistinguible de la del gen G1WT (Figura 29, $F=3.42$, $P=0.07$). Teniendo en cuenta el conjunto de los resultados anteriormente expuestos, y suponiendo que el gen quimérico con el doble mutante G1mut1-mut5 fuese transactivado por Lp-HSFA1 y Lp-HSFB1 de forma similar al gen G1WT, las secuencias para dicha interacción funcional quedarían reducidas a las comprendidas por los pentanucleótidos consenso números 2 y 3 (véase la Fig. 25).

IV. DISCUSIÓN.

Discusión

Los análisis realizados en nuestro laboratorio sobre la regulación embrionaria de promotores vegetales *shsp*, habían indicado que dicha regulación difería, a nivel transcripcional, de la regulación en la respuesta al calor (Carranco *et al.*, 1997; Almoguera *et al.*, 1998; Carranco *et al.*, 1999). Los mecanismos de la activación embrionaria podrían diferir tanto en la implicación adicional de factores en *trans* distintos de los HSFs, como en la participación diferencial de HSFs. Éstos pudieran ser distintos, o incluso los mismos HSFs implicados en la respuesta al calor; pero en ambos casos reconociendo y/o activando de forma diferente al promotor. Al comenzar nuestro trabajo se desconocía la naturaleza de los factores adicionales implicados en la regulación embrionaria de genes *shsp*. Tampoco se habían definido las peculiaridades de los mecanismos de activación embrionaria por HSFs.

Los resultados presentados en este trabajo identifican a ABI3 como una de las familias de factores en *trans* implicada, junto con los HSFs, en dicha activación embrionaria. Nuestros estudios comparativos, usando distintos genes quiméricos con los promotores *Ha hsp17.6G1* y *Ha hsp17.7G4*, nos permiten proponer un mecanismo de coactivación por ABI3 y HSFs que requeriría HSEs con propiedades estructurales como las del segundo promotor. Este mecanismo pudiera afectar tanto a la regulación del gen *Ha hsp17.7G4* en embriones de girasol como a la de otros genes vegetales de propiedades y patrones de expresión similares. Respecto al papel de los HSFs en la activación transcripcional embrionaria, nuestro trabajo, con genes quiméricos con el promotor *Ha hsp17.6G1*, permite definir sus posibles mecanismos de activación y la de otros promotores similares, como *Ha hsp17.7G4*. En concreto, determinamos que sólo uno de los HSFs ensayados, LpHSFA2, es capaz de activar al promotor *Ha hsp17.6G1* en ausencia de otros HSFs; Mientras que otros, como LpHSFA1, son capaces de unirse a dicho promotor sin activarlo transcripcionalmente. La capacidad de activación embrionaria dependería tanto de la naturaleza del HSF como de la secuencia HSE del promotor. Además, la activación embrionaria del promotor *Ha hsp17.6G1* pudiera implicar la unión al

ADN de hetero-oligómeros compuestos de subunidades monoméricas procedentes de distintos HSFs. Discutimos las peculiaridades estructurales comunes de los distintos HSEs estudiados y la posible generalización de nuestras conclusiones sobre los mecanismos embrionarios de activación por HSFs. Finalmente, nuestros estudios sugieren la existencia de otros mecanismos para la regulación embrionaria de genes *shsp* a nivel traduccional.

Regulación traduccional de la expresión del gen *Ha hsp17.7G4* en respuesta al calor y durante la embriogénesis zigótica

Los estudios realizados mediante deleciones de la región 5'UTR del gen *Ha hsp17.7G4* indican que las secuencias comprendidas entre las posiciones +25 y +79 son necesarias para la traducción eficiente del gen quimérico G4WT en la respuesta al calor y durante el desarrollo embrionario (Fig.3). Un estudio más exhaustivo de la región acotada nos ha permitido identificar una secuencia de 10 pb entre las posiciones +55 y +65, cuya modificación, en el mutante IV, disminuyó la actividad GUS obtenida a partir del gen quimérico en las fases tardías de la embriogénesis, sin afectar a la acumulación de su ARNm (Fig. 3). Esta modificación no tuvo ningún efecto (comparado con el gen silvestre) sobre la actividad GUS del gen mutante, tanto en las fases tempranas del desarrollo embrionario, o en respuesta al calor (o al ABA) en tejidos vegetativos (Figs.5A, 8 y 9). Aunque en ninguno de estas otras situaciones hemos analizado la acumulación de los ARNm quiméricos, suponemos que la correspondiente al mutante IV debe de ser similar a la del silvestre. En este caso, el conjunto de nuestros resultados habría identificado una región de tamaño muy reducido implicada específicamente en la traducción embrionaria de los ARNm del gen *Ha hsp17.7 G4*. Alternativamente, cambios en la acumulación de los ARNm quiméricos mutantes pudieran haber compensado los efectos sobre la traducción del mutante IV; lo que significaría que dichos efectos no serían específicos de embriones. Así por ejemplo, una mayor acumulación de ARNm mutante en tejidos no embrionarios pudiera compensar su traducción ineficiente en dichos tejidos. Experimentos en curso permitirán distinguir entre estas posibilidades.

Otras observaciones iniciales de nuestro laboratorio apuntaban a la existencia de mecanismos de control post-transcripcional para la expresión de las proteínas sHSP de clase I en semillas de girasol. En estos estudios se observó los ARNm correspondientes se acumulan apreciablemente desde las fases tempranas del desarrollo embrionario, alcanzando su máximo nivel de acumulación en los embriones maduros y en las semillas secas. Sin embargo, las proteínas de clase I aparecen solo tardíamente durante la desecación del embrión (Coca *et al.*, 1994). Los mecanismos post-transcripcionales que retrasan la expresión de las proteínas sHSP de clase I de girasol durante la embriogénesis pudieran incluir mecanismos traduccionales, como los que hemos demostrado para la regulación del gen quimérico G4WT.

En plantas existen muy pocos ejemplos en el que las secuencias 5'UTR de un ARNm participen en su traducción de forma específica en un tipo de tejido o durante un estadio concreto del desarrollo. Uno de dichos ejemplos es el gen *lat52*, que se expresa específicamente en el polen y que codifica una proteína esencial para el crecimiento del tubo del polínico. La región 5'UTR del gen *lat52* es capaz de potenciar la traducción de genes distintos quiméricos, independientemente de las secuencias del promotor y del gen *reporter* utilizados. Además, la traducción eficiente, mediada por la región 5'UTR del gen *lat52*, no requiere del extremo 3' del ARN de dicho gen. Esta potenciación de la traducción es específica de las células del polen durante la maduración (Bate *et al.*, 1996). Los autores de dicho estudio proponen que factores específicos de polen interaccionan con la región 5'UTR del gen *lat52* y potencian su traducción a nivel de iniciación. Sin embargo, las secuencias *in cis* de la región 5'UTR a las que dichos factores se unirían no han sido aún identificadas. En cambio, nuestros resultados con el 5'-UTR del gen *Ha hsp17.7G4* permitirían usar las secuencias delimitadas como cebo para la clonación por interacción (SenGupta *et al.*, 1996) de los factores implicados en la regulación traduccional. Dichos factores y dichas secuencias pudieran constituir los elementos *in trans* y *in cis* del primer ejemplo

de regulación traduccional específica de las fases tardías de la embriogénesis zigótica en vegetales.

Modelo de activación transcripcional del promotor del gen *Ha hsp17.7G4* por factores del tipo ABI3

Los embriones mutantes *abi3*, están afectados en los programas de expresión que ocurren durante la maduración de las semillas en *Arabidopsis thaliana*. Los fenotipos que presentan estos embriones mutantes, tales como la disminución en la acumulación de proteínas de reserva y proteínas sHSP (véase por ejemplo Wehmeyer *et al.*, 1996), pudieran deberse precisamente a la ausencia de tales programas de maduración de las semillas más que a una participación directa del regulador ABI3 sobre la expresión embrionaria de estos genes.

Nuestro diseño experimental, mediante experimentos de expresión transitoria, nos ha permitido atribuir un papel directo de ABI3 en la activación transcripcional del gen quimérico G4WT, y añadir un nuevo ejemplo, a los pocos conocidos, de interacción funcional entre factores del tipo ABI3, o HSF, con otros factores transcripcionales.

La transactivación por ABI3 y LpHSFA1 de un promotor mínimo, a través de las regiones con HSEs del promotor *Ha hsp17.7G4* (Fig.17), nos permite postular un modelo para el mecanismo de activación transcripcional. En dicho modelo ABI3 actuaría como un coactivador junto a los HSFs unidos a las regiones con HSEs (Fig.30A). La coactivación implicaría interacciones proteína-proteína entre ABI3 y los HSFs. Los estudios de la activación transcripcional de otros promotores vegetales por factores del tipo ABI3 han permitido proponer modelos en los que los factores ABI3 participarían, bien como activadores uniéndose directamente al ADN a través de elementos en *cis* RY (Suzuki *et al.*, 1997); o como coactivadores, actuando junto con proteínas bZIP unidas al elementos en ABRE (Hill *et al.*, 1996). Los distintos dominios estructurales de los factores ABI3 y la hormona

ABA participarían diferencialmente en los diferentes modelos de activación. Así por ejemplo, en el caso del promotor de la napina *napA*, la coactivación por ABI3 implicaría la participación del dominio básico B2 como responsable de las interacciones con otros factores unidos al ADN; mientras que el dominio básico B3 estaría implicado en la unión y activación directa a través de elementos RY (Ezcurra *et al.*, 2000). Resultados preliminares de nuestro laboratorio indican que las proteínas ABI3 usadas por Ezcurra *et al.*, con el dominio B2, o el dominio B3 delecionados, son incapaces de activar a nuestros promotores sinérgicamente con LpHSFA1. Sin embargo, y a diferencia de lo observado con ABI3 Δ N (Fig.16), dichas proteínas no impedirían la activación transcripcional por LpHSFA1. Por lo tanto, en nuestro modelo de coactivación la interacción física entre ABI3 y LpHSFA1 pudiera estar mediada por los dominios básicos B2 y B3 de ABI3. Esto diferiría del resto de los modelos de coactivación propuestos hasta el momento para ABI3; y supondría que el dominio B3 de ABI3 no está implicado exclusivamente en la unión al ADN. Existen algunos antecedentes para la interacción física de dos factores transcripcionales a través del dominio de unión al ADN. Precisamente uno de ellos es la interacción entre un HSF humano (HSF3) con el dominio de unión al ADN del factor c-Myb (Kanei *et al.*, 1997). Otros resultados preliminares de nuestro laboratorio indican que la adición exógena de ABA a los embriones bombardeados con ABI3, no produce un efecto sinérgico adicional en la activación transcripcional, por ABI3 y LpHSFA1, del gen quimérico G4WT. Esto diferiría también de los mecanismos propuestos para la acción de ABI3 en otros promotores vegetales; ya que no se conoce ninguna regulación, mediada por ABI3 como coactivador, que requiera el dominio B2 de ABI3 y que sea independiente del ABA.

La ausencia de interacción funcional entre ABI3 y LpHSFA1 en hojas de girasol y protoplastos de tabaco (Fig.19), y la falta de interacción física entre ambos en levaduras (Fig.18), pudieran ser explicadas por la ausencia de factor/es embrionario/s que formarían parte del complejo ABI3::LpHSFA1 (Fig.30B). Más aún, existen antecedentes para interacciones entre tres factores en los que uno de ellos es un factor del tipo ABI3. Así por ejemplo, las proteínas 14-3-3 formarían

parte del complejo EmBP-1::VP1 asociado al elemento ABRE del gen *Em* de trigo; ya que dichas proteínas interactúan físicamente *in vitro* con ambos factores por separado. Se ha propuesto que las proteínas 14-3-3 actuarían, en este caso, como mediadoras de las interacciones proteína-proteína (Shultz *et al.*, 1998). De este modo, pudiera existir al menos un tercer componente específicamente asociado al complejo LpHSFA1::ABI3 en embriones, de manera que su ausencia tanto en hojas de girasol y protoplastos de tabaco (Fig.19) como en levaduras (Fig.18), explicaría, respectivamente, la falta de interacción funcional y física entre ambos factores (Fig.30B). Alternativamente, la existencia de un represor en tejidos vegetativos podría explicar la falta de interacción entre ambos factores. Sin embargo esta alternativa no nos parece muy probable, ya que este represor tendría que ser muy abundante, de manera que no fuese titulado en ninguno de los sistemas de expresión transitoria usados. El sistema de transformación de protoplastos permite la entrada de un número mayor de moléculas de ADN plasmídico (unas 10^7 moléculas/célula) que la transformación por bombardeo. Además, los daños celulares producidos por la transformación de protoplastos con polietilenglicol, son menores que los que causan los microproyectiles al entrar en la célula en el sistema de bombardeo. Por lo tanto, y al menos en protoplastos, cabría esperar que la presencia de un represor endógeno fuese titulada, dado el alto número de copias de plásmidos expresando ABI3 y Lp-HSFA1 en el interior celular. Más aún, de existir un represor, éste debiera estar conservado en las distintas especies vegetales ensayadas y en las levaduras. Esto último no parece razonable ya que los factores de tipo ABI3 son exclusivamente vegetales. Actualmente en nuestro laboratorio, se está llevando a cabo el escrutinio de una genoteca embrionaria de girasol mediante el sistema de triple híbrido en levaduras (ver por ejemplo, Zhang y Lautar, 1996), usando como cebos ABI3 y LpHSFA1. Esta estrategia permitiría confirmar nuestra hipótesis con la clonación, y eventual identificación y caracterización de la(s) proteína(s) embrionarias que medien la interacción física y funcional entre ABI3 y LpHSFA1; y consecuentemente con los factores de girasol correspondientes.

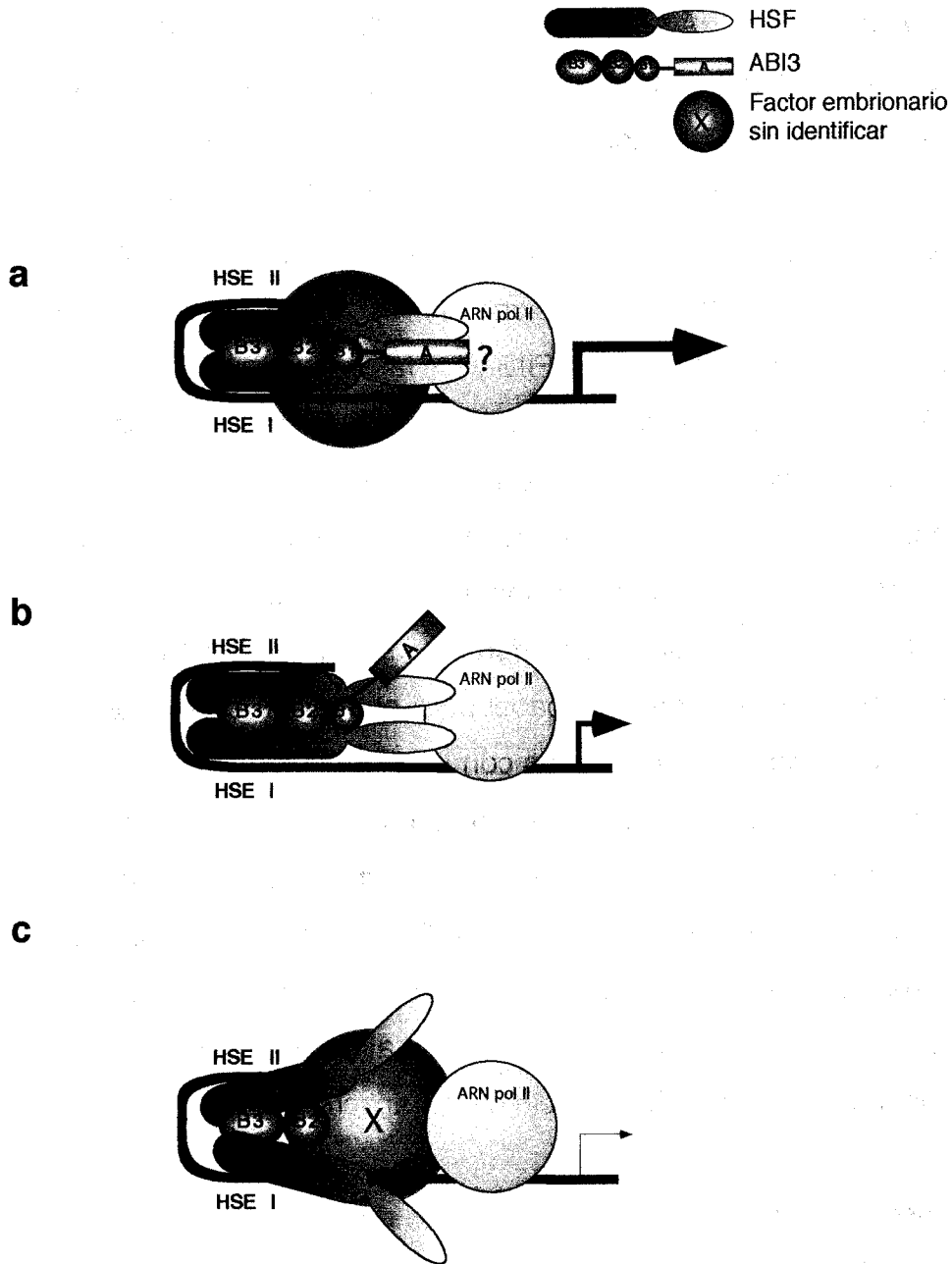


Fig.30. Modelo para la coactivación de ABI3 y Lp-HSFA1 del gen quimérico G4WT. (A). El complejo formado por ABI3 ,Lp-HSFA1 y un factor embrionario no identificado, permite una eficiente activación transcripcional del gen quimérico G4WT en embriones. **(B).** La ausencia de algun/os factor/es embrionarios en tejidos vegetativos, no permite la interacción física y/o funcional de ABI3 y Lp-HSFA1. **(C).** Las interacciones entre ABI3ΔN y Lp-HSFA1 mediadas por un factor no identificado, forman un complejo no activo para la transcripción debido a una conformación anómala a la falta del dominio de activación de ABI3ΔN en embriones

El efecto sinérgico en la activación transcripcional del gen quimérico G4WT por ABI3 y LpHSFA1 puede ser explicado por los contactos de ambos factores con distintos componentes de la maquinaria basal de transcripción. Las interacciones entre HSFs y distintos factores generales de la maquinaria basal de transcripción como la proteína de unión a la caja TATA (TBP, *TATA Binding Protein*) han sido descritas en sistemas animales y vegetales (Mason y Lis, 1997 y Reindl y Schöffl, 1998). Otras interacciones han sido identificadas entre el HSF1 de humano con los factores TFIIA y TFIIB y los factores asociados a la caja TATA, TAF_{II}32 y TAF_{II}55 (Yuan y Gurley, 2000). Los HSFs contactan con los distintos factores de transcripción generales a través de sus dominios de activación. Recientemente también se ha demostrado la interacción de ABI3 con la subunidad RBP5 de la polimerasa II mediante el sistema del doble híbrido en levaduras (Kurup *et al.*, 2000). Desafortunadamente, la versión truncada de ABI3ΔN, no nos permite asignar un papel para el dominio de activación de ABI3 en el modelo propuesto de coactivación con LpHSFA1, ya que esta proteína tiene deletado tanto el dominio de activación como una región no conservada y el dominio básico B1. Así el efecto negativo dominante de ABI3ΔN sobre la activación transcripcional producida por LpHSFA1 (Fig.17), pudiera ser debido tanto a la ausencia del dominio de activación de ABI3, como a que esta proteína adopte una conformación anómala que no permita la interacción de LpHSFA1 con algún componente del complejo de inicio de la transcripción. (Fig.30C).

Las observaciones genéticas sobre la falta de acumulación de las proteínas HSP17.6 y HSP17.4 en los embriones mutantes *abi3* de *Arabidopsis* (Wehmeyer *et al.*, 1996), pudieran ser explicadas con el modelo molecular que hemos propuesto para la activación por ABI3 del gen *Ha hsp17.7G4*. Una característica común a los genes de *Arabidopsis At hsp17.4* y *At hsp17.6* y *Ha hsp17.7G4* es la presencia en sus promotores de dos regiones con HSEs formadas por repeticiones complejas del pentanucleótido consenso para la unión de los HSFs; aunque el espaciamiento entre ambas regiones con HSEs y el número de repeticiones del pentanucleótido es distinto en cada promotor. Así, en el promotor *At hsp17.4* la región HSE distal está formada por 7 repeticiones y la región proximal por 5. En el

caso del gen *At hsp17.6*, el número de repeticiones es de 5 (región distal) y 4 (región proximal). El espaciamento entre dichas regiones, en los genes *At hsp17.4* y *At hsp17.6*, es de respectivamente 45 y 20 pb; a diferencia de los 7 pb que separan a las regiones correspondientes del gen *Ha hsp17.7G4*. Nuestros resultados mostraron que las interacciones cooperativas entre los HSFs unidos a las dos regiones con HSEs pudieran ser necesarias para la activación del gen quimérico G4WT por ABI3 (Fig.12, comparar mutB y mutF). A pesar de la mayor distancia entre las regiones con HSEs en los promotores de *Arabidopsis*, pensamos que las interacciones cooperativas entre los HSFs unidos a dichas regiones serían posibles. En cambio, la menor complejidad de la única región HSE del promotor de girasol *Ha hsp17.6G1* (véase Figs.1 y 25), no permite las interacciones cooperativas entre HSFs; por lo que, consecuentemente, no observamos la transactivación por ABI3 del gen quimérico G1WT (Fig. 20B). Otra observación que confirmaría la aplicación de nuestro modelo de co-activación por ABI3 a los genes de *Arabidopsis At hsp17.4* y *At hsp17.6* es que la expresión de las proteínas codificadas por los mismos no disminuye en los embriones mutantes *aba1*, que son deficientes en la síntesis de ABA (Wehmeyer *et al.*, 1996). Esto concuerda con la falta de efecto del ABA exógeno sobre la activación sinérgica del promotor de girasol *Ha hsp17.7G4*, que hemos mencionado y discutido anteriormente.

Mecanismos de activación transcripcional embrionaria por HSFs

Para estudiar las peculiaridades de la activación transcripcional por HSFs durante la embriogénesis zigótica, hemos usado genes quiméricos con el promotor de *Ha hsp17.6G1* en su contexto natural. La activación transcripcional por HSFs de este gen ocurre exclusivamente durante la embriogénesis zigótica. Este peculiar patrón de expresión junto con la sencillez de la región con HSEs de su promotor, permiten usarlo como sistema modelo para investigar la activación transcripcional embrionaria por HSFs. En nuestros estudios hemos utilizado sistemas vegetales (incluyendo el homólogo de embriones de girasol) y la

levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Los primeros sistemas permiten reproducir las interacciones complejas entre diversos HSFs y otros factores transcripcionales típicamente vegetales (Treuter *et al.*, 1993, Wehmeyer *et al.*, 1996). El sistema de levaduras en cambio, ofrece la posibilidad de estudiar por separado la activación transcripcional de algunos HSFs en ausencia tanto de otros HSFs como de otros factores transcripcionales, no homólogos (Boscheinen *et al.*, 1997).

Peculiaridades de la activación transcripcional por HSFs del promotor de *Ha hsp17.6G1*

Dada la gran diversidad de HSFs existente en la mayor parte de los organismos eucarióticos, sobre todo en los vegetales, se ha propuesto su especialización funcional y en algunos casos esta hipótesis se ha visto apoyada funcionalmente con algunos ejemplos. Así el HSF1 de ratón ha sido relacionado con la respuesta celular al choque térmico, (McMillan *et al.*, 1998), mientras que el HSF2 estaría implicado en procesos de desarrollo (Mezger *et al.*, 1994 y Sarge *et al.*, 1994, respectivamente). En vegetales, la sobreexpresión del HSF3 de *Arabidopsis thaliana*, pero no la del HSF4, aumentó la termotolerancia adquirida de plantas transgénicas (Prandl *et al.*, 1998). La especialización funcional pudiera implicar la preferencia de un determinado HSF por unirse a HSEs con una determinada secuencia o estructura. Esto ha sido propuesto en base a las diferencias de secuencia observadas en los dominios de unión de los distintos HSFs (Nover *et al.*, 1996) Dichas diferencias permiten agruparlos en clases distintas que en animales coinciden con una cierta preferencia por determinados sitios de unión (Kroeger y Morimoto, 1994). Así por ejemplo, in vitro el HSF1 de ratón (mHSF1) se une preferentemente a HSEs formados por 4 ó 5 repeticiones del pentanucleótido consenso, mientras que el mHSF2 prefiere HSEs menos complejos, formados por solo 2 ó 3 repeticiones del pentanucleótido consenso (Kroeger y Morimoto, 1994). Alternativamente y de forma no excluyente, determinados HSFs serían capaces de activar transcripcionalmente a un subconjunto de promotores, independientemente de que puedan unirse a otros distintos sin activarlo. Esta sería precisamente la forma en la que ScHSF, el único

HSF de *Saccharomyces cerevisiae* y que permanece constitutivamente unido a las regiones HSEs, es capaz de activar transcripcionalmente por diferentes mecanismos a promotores con secuencias HSEs distintas.

En plantas aún no ha sido posible hasta el momento determinar los mecanismos implicados en la posible especialización funcional de sus múltiples HSFs. Tan sólo en dos estudios precedentes, se observó una posible discriminación de HSFs para activar a través de secuencias HSEs sintéticas (Treuter *et al.*, 1993 y Barthi *et al.*, 2000) o naturales (Treuter *et al.*, 1993) fusionadas transcripcionalmente a genes quiméricos con el promotor mínimo -46CaMV 35S (Treuter *et al.*, 1993) y CyC1 (Barthi *et al.*, 2000). La discriminación de los HSFs para la activación se dedujo de la distinta actividad de los genes *reporter* observada en cada caso mediante trans-activación transitoria, en protoplastos de tabaco (Treuter *et al.*, 1993) o en *Saccharomyces cerevisiae* (Barthi *et al.*, 2000). Estos experimentos presentan múltiples complicaciones que imposibilitan su análisis más allá de la simple descripción del fenómeno observado y ambos sistemas de estudio empleados presentan ventajas e inconvenientes. Por un lado, en protoplastos, la presencia de HSFs endógenos que interaccionan funcionalmente con el expresado transitoriamente pudiera complicar la interpretación de los resultados, si éstos no se contrastan usando un sistema en el que no existan dichos factores endógenos. Estos problemas pueden evitarse con el sistema de levaduras, reemplazando su único HSF (cuando es posible) por el HSF heterólogo ensayado. Sin embargo, este sistema puede no reproducir las interacciones entre el HSF ensayado y otros factores transcripcionales vegetales que pudieran ocurrir en la activación transcripcional de un gen *hsp in vivo*. Más aún, en los trabajos realizados en levaduras (Barthi *et al.*, 2000), los genes quiméricos ensayados han sido fusiones transcripcionales sintéticas, con HSEs de secuencias y espaciamiento no naturales y al igual que en los trabajos realizados en protoplastos (Treuter *et al.*, 1993), las regiones con HSEs estaban fuera de su contexto natural y a distinta distancia del promotor del gen quimérico. Además en ningún caso se hicieron estudios para distinguir entre mecanismos de unión diferencial a los distintos HSE o de activación transcripcional diferencial.

Nuestro trabajo ha combinado tanto los sistemas de estudio vegetales como las levaduras para poder definir algunos aspectos sobre los mecanismos de activación por HSFs. Los resultados obtenidos con los experimentos de transactivación del gen quimérico G1WT por los HSFs heterólogos de tomate A1 y A2, en ausencia de otros HSFs endógenos, muestran la primera evidencia de la activación preferencial de un HSF a través de secuencias HSEs de un promotor natural (Fig.23). De los dos HSFs ensayados, sólo uno de ellos, Lp-HSFA2, fue capaz de activar a través de la región con HSEs del gen *Ha hsp17.6G1*. Sin embargo, nosotros mostramos que la activación preferencial no implica una unión preferencial de este HSF por las secuencias HSE del promotor *Ha hsp17.6G1*. Más aún, en nuestros ensayos, Lp-HSFA1 es capaz de unirse *in vitro* a la región HSE y sin embargo, no activa al gen quimérico con dicho promotor. Este resultado sugiere la existencia de otros mecanismos que regulen la actividad del HSF, posteriormente a su unión al ADN.

En levaduras, su único HSF está constitutivamente unido a las regiones con HSEs de los promotores *hsp*, sin embargo, no todos los promotores a los que está unido son activados (Sorger y Pelham, 1987). Uno de los mecanismos propuestos para la activación del HSF de levadura está basado en la conformación adoptada dependiendo de las secuencias HSEs a las que esté unido (Santoro et al., 1998). Estos estudios fueron realizados con un gen quimérico que contenía el promotor *CUP1* del gen de la metalotionina, con las regiones HSEs nativas y modificadas. Los resultados de los ensayos de transactivación de unión *in vitro* de Sc-HSF, indicaron que la conformación que adopta el Sc-HSF unido al ADN es distinta dependiendo de las secuencias con HSEs a las que se una y además el potencial transcripcional del HSF varía según la conformación adoptada (Santoro et al., 1998, véase la Introducción). Algo similar puede ocurrir en nuestros ensayos de transactivación en levaduras y de unión *in vitro* con los HSFs heterólogos (Figs.23 e 28, respectivamente). A pesar de las diferencias en las afinidades de Lp-HSFA1 y Lp-HSFA2, la capacidad de activación de cada uno de ellos pudiera estar

regulada por la conformación adoptada al unirse a las secuencias con HSEs del gen *Ha hsp17.6G1*.

Por lo tanto, la discriminación de un HSF para la activación transcripcional de este gen durante la embriogénesis zigótica pudiera depender tanto de la propia naturaleza del HSF como de las secuencias con HSEs presentes en el promotor. En cuanto a las secuencias HSEs, dada la falta de análisis funcionales en otros promotores *shsp* embrionarios, no podemos hacer consideraciones generales. Por el contrario, al menos para los genes de girasol *Ha hsp17.7G4* y *Ha hsp17.6G1*, los estudios realizados en nuestro laboratorio nos permiten proponer ciertas hipótesis sobre la relevancia de la estructura de las regiones con HSEs para la activación embrionaria por HSFs. El análisis comparativo de las regiones con HSEs de estos promotores indican la presencia de repeticiones alternas imperfectas del pentanucleótido consenso para la unión de los HSFs. Esta característica está ausente en otro promotor de girasol clonado en nuestro laboratorio, *Ha hsp18.2G2*, inducible únicamente por calor y cuyas regiones con HSEs se ajustan más al consenso. Nosotros proponemos que la presencia de repeticiones imperfectas alternas son relevantes para los mecanismos de activación por HSFs que ocurren durante la embriogénesis zigótica. Esta hipótesis se ve apoyada por la reciente clonación en nuestro laboratorio de un HSF de girasol. Este HSF fue clonado mediante la técnica del *one-hybrid* a partir de una genoteca de ADNc embrionaria y usando como cebo la región proximal con HSEs del promotor *Ha hsp17.7G4*. La expresión de este HSF es exclusivamente embrionaria. Los resultados preliminares indican la capacidad de este nuevo HSF de activar tanto al promotor *Ha hsp17.7G4* como al *Ha hsp17.6G1*, en experimentos de expresión transitoria en embriones de girasol. Estos resultados indican que ambos genes comparten HSFs comunes para su activación transcripcional embrionaria. Sin embargo, los mecanismos de activación por éste u otros HSFs pudieran ser distintos para cada promotor. Así por ejemplo, las interacciones con otros factores transcripcionales junto con los HSFs, como discutimos anteriormente con el factor ABI3 para la activación transcripcional del

gen quimérico G4WT o bien interacciones con otros HSFs, pudieran ser específicas para cada gen.

Este tipo de interacciones, que obviamente están ausentes en levaduras, pudieran explicar la activación transcripcional del gen quimérico G1WT por Lp-HSFA1 que observamos en nuestros ensayos en hojas de girasol (Fig.24). Más aún, las interacciones funcionales entre Lp-HSFA1 y Lp-HSFA2 han sido previamente descritas en Scharf *et al.*, 1998, usando el sistema modelo de protoplastos y un gen quimérico con el promotor *hsp17* de soja. En estos experimentos, la co-expresión de ambos HSFs resulta en una activación sinérgica del gen quimérico. Nosotros hemos reproducido esta interacción funcional, en experimentos de expresión transitoria usando los plásmidos efectores con ambos HSFs y el gen quimérico G1WT, únicamente en sistemas vegetales (Figs.24 y 26), pero no en levaduras (datos no mostrados). El uso de un sistema modelo vegetal, como los protoplastos de tabaco, nos ha permitido estudiar las interacciones entre los HSFs ensayados y el posible efecto de otros factores endógenos, que no podemos reproducir en el sistema de levadura.

Aprovechando las ventajas del sistema de protoplastos y la sencillez de la región con HSE del promotor *Ha hsp17.6G1*, los resultados de nuestros experimentos nos permiten proponer un mecanismo para la interacción funcional de Lp-HSFA1 y Lp-HSFA2. Hasta hoy, la interacción funcional de estos dos HSFs ha sido explicada por un cotransporte nuclear de ambos factores, de manera que la importación nuclear de Lp-HSFA2 es mediada por Lp-HSFA1. El cotransporte requeriría la formación de hetero-oligómeros, y su interacción física ha sido demostrada por ensayos del doble híbrido en levaduras y ensayos de coimmunoprecipitación. Ambos HSFs interactúan mediante sus respectivos dominios de oligomerización. (Scharf *et al.*, 1998). En cuanto a ensayos funcionales, la co-expresión de Lp-HSFA1 y Lp-HSFA2 en protoplastos de tabaco produjo la activación sinérgica del promotor del gen *hsp17* de soja. Sin embargo, los autores no demuestran la participación de hetero-oligómeros de Lp-HSFA1 y Lp-HSFA2 en la activación transcripcional (Scharf *et al.*, 1998).

Nosotros aportamos evidencias experimentales que indican la participación directa de hetero-oligómeros en la activación transcripcional del gen quimérico G1WT. En primer lugar, hemos determinado la participación de único oligómero en la activación transcripcional del gen quimérico G1WT. Esta conclusión está basada en el comportamiento similar de los genes quiméricos G1mut1 y G1WT en cuanto a la activación transcripcional obtenida en presencia de Lp-HSFA1 y Lp-HSFA2 (Fig.26). Este resultado indica que, presumiblemente las secuencias con HSEs implicadas en dicha interacción sean comunes para ambos genes quiméricos, es decir, las presentes en el mutante G1mut1. Según los antecedentes descritos hasta hoy, tanto en plantas como en animales, una región con HSEs como las del mutante G1mut1 no puede unir simultáneamente dos oligómeros de HSFs, siendo por lo tanto, un único oligómero el responsable del efecto sinérgico observado en la activación transcripcional de los genes quiméricos G1mut1 y G1WT en presencia de ambos HSFs. Sin embargo este análisis no nos permite discernir entre la participación de un homo-oligómero o un hetero-oligómero.

Una posibilidad acorde con la propuesta de los autores y basada únicamente en mecanismos de co-transporte nuclear, sería que en presencia de Lp-HSFA1, la mayor abundancia de Lp-HSFA2 en el núcleo produjese una mayor activación transcripcional del gen quimérico mediada únicamente por este último HSF, sin una participación directa de Lp-HSFA1 en dicha activación (Scharf *et al.*, 1998). Por el contrario, dos de nuestros resultados apuntan a la participación de hetero-oligómeros; por un lado, nosotros mostramos en un sistema independiente de transporte nuclear, la unión *in vitro* de hetero-oligómeros de Lp-HSFA1 y Lp-HSFA2 a la región con HSEs del promotor *Ha hsp17.6G1* (Fig.28). *In vitro*, los hetero-oligómeros muestran una mayor afinidad de unión a las secuencias con HSEs del promotor *Ha hsp17.6G1* que los homo-oligómeros correspondientes. Esta mayor afinidad podría explicar, al menos en parte, el efecto sinérgico en la activación transcripcional del gen quimérico G1WT en presencia de ambos HSFs.

Por otro lado, al menos en nuestras condiciones de ensayo y en embriones de girasol, la interacción funcional entre ambos HSFs pudiera ser independiente del mecanismo de cotransporte propuesto para ambos factores (Scharf *et al.*, 1998, véase la Introducción). El mutante Lp-HSFA1M3 tiene mutado el dominio de señalización nuclear (K/R2) y por lo tanto, es defectivo en el importe nuclear en protoplastos de tabaco (Lyck *et al.*, 1997). En nuestros ensayos en hojas de girasol con el gen quimérico G1WT, Lp-HSFA1M3 no interaccionó funcionalmente con Lp-HSFA2, confirmando la funcionalidad del dominio (K/R2) (Fig.27). Sin embargo, esta mutación en Lp-HSFA1 no tuvo ningún efecto en la interacción funcional con Lp-HSFA2 en embriones de girasol, (Fig.27). Estos resultados sugieren que los mecanismos de transporte nuclear de estos HSFs pudieran ser distintos en tejidos vegetales y en embriones. (Fig. 27). Hasta hoy, no ha sido propuesto ningún mecanismo de importación nuclear de los HSFs durante el desarrollo embrionario, pero los estudios realizados en *Drosophila* indican que la importación nuclear de su único HSF es constitutiva y está regulada según el estadio del desarrollo y el tipo celular (Wang y Lindquist, 1998, véase la Introducción).

Los mecanismos de importación nuclear de los HSFs pudieran representar un nivel de regulación para determinar el tipo de interacciones funcionales entre HSFs que ocurren durante la embriogénesis zigótica. Otro tipo de interacción funcional ha sido observado entre HSFs de tomate de clase A y clase B, concretamente entre Lp-HSFA1 y Lp-HSFB1. En protoplastos de tomate, a diferencia de Lp-HSFA2, Lp-HSFB1 permanece constitutivamente en el núcleo (Scharf *et al.*, 1998). Las interacciones funcionales entre los HSFs de clase A y los HSFs de clase A y B pudieran estar regulada de forma distinta según los mecanismos de importación nuclear de cada HSF durante el desarrollo embrionario.

Nuestros resultados con el promotor *Ha hsp17.6G1* en protoplastos de tabaco, confirman la interacción funcional entre Lp-HSFA1 y Lp-HSFB1 para la activación transcripcional (fig. 29). Basándonos en los antecedentes descritos

para la interacción funcional de Lp-HSFA1 y LpHSFA2 y en nuestros propios resultados, hemos propuesto un mecanismo para dicha interacción funcional que viene dado por la formación de hetero-oligómeros formados por ambos tipos de HSFs. A diferencia de esto, no tenemos evidencias para confirmar la formación de hetero-oligómeros de Lp-HSFA1 y Lp-HSFB1. Más aún, dos observaciones previas apuntan a pensar a que no se forman hetero-oligómeros entre los HSFs de clase A y clase B. La primera de ellas está basada en la ausencia de interacción física entre los HSFs de ambas clases, mediante ensayos de doble híbrido en levaduras (Barthi *et al.*, 2000 y comunicación personal de los autores). La segunda observación se basa en el análisis de los dominios de oligomerización de estos HSFs. La capacidad de oligomerización entre HSFs de clase A se atribuye a la presencia de una inserción de 21 aminoácidos en el dominio de oligomerización de esta clase de HSFs, que está ausente, tanto en la clase B de vegetales como en el resto de HSFs de origen no vegetal (Scharf *et al.*, 1998 y Barthi *et al.*, 2000). De esta forma, las diferencias en las estructuras en hélice superenrollada de los dominios de oligomerización de los HSFs de clase A y clase B de tomate, pudieran impedir la oligomerización entre monómeros de distinta clase. En animales también se se ha propuesto que las diferencias tanto en los tipos de aminoácidos hidrofóbicos como en la posición que ocupan en el dominio de oligomerización, pudieran ser los responsables de la falta de hetero-oligomerización entre distintos HSFs co-expresados en una misma célula (Clos *et al.*, 1993, Rabindran *et al.*, 1993 y Sistonen *et al.*, 1994).

Lp-HSFA1 y Lp-HSFB1 también interaccionan funcionalmente a través de las secuencias HSEs del gen quimérico G1mut1 y de las secuencias HSEs del gen quimérico G1mut5 (Fig. 29). Como comentamos anteriormente, según los antecedentes descritos hasta hoy, las secuencias HSEs presentes en el mutante G1mut1, no permite la unión simultánea de dos oligómeros. Esto también es cierto para las secuencias HSEs presentes en el mutante G1mut5. De esta forma, la activación sinérgica de los genes quiméricos G1mut1 y G1mut5 en presencia de ambos HSFs, suponiendo que no participasen hetero-oligómeros, implicaría la unión de ambos HSFs al ADN, pero de una forma distinta a las que han sido

descritas. Las secuencias HSEs de estos mutantes, permitirían por ejemplo la unión, de forma canónica, de un único oligómero de HSF que contactaría con dos pentanucleótidos consenso, ya sean contiguos o separados por un espaciamento de 5 pb, pero manteniendo la orientación alterna (véase la Introducción). De esta forma, en ambos mutantes quedaría un único pentanucleótido que pudiera ser ocupado por el segundo HSF. La unión de este último HSF a un único punto de contacto con el ADN, podría sugerir la participación de este HSF como un monómero. En el caso del mutante G1mut1, los pentanucleótidos ocupados de forma canónica por un HSF podrían ser el 2 y el 3, o bien el 3 y el 5. La segunda molécula de HSF se uniría al único pentanucleótido restante, es decir, el 5 en el primer caso o el 2 en el segundo. De la misma forma para el mutante G1mut5, los HSFs unidos de forma canónica ocuparían los pentanucleótidos 1 y 2 ó bien 2 y 3, siendo ocupados los pentanucleótidos 3 ó 1, respectivamente, por el segundo HSF.

Obviamente estas hipótesis requerirán futuras demostraciones experimentales para determinar cómo se unen Lp-HSFA1 y Lp-HSFB1 a las secuencias HSEs del promotor *Ha hsp17.6G1*. La transición del estado inactivo monomérico a la forma activa trimérica de los HSFs, inducida por calor, forma parte del ciclo de activación y desactivación de los HSFs (véase la Introducción). Sin embargo, la oligomerización no es un requisito previo para la importación nuclear, la unión al ADN y la función de activador transcripcional, como lo demuestran los ejemplos en los que mutaciones puntuales o deleciones en el dominio de oligomerización del HSF1 de humanos y del HSF de *Saccharomyces cerevisiae* no anulan completamente su potencial de activación (Zuo *et al.*, 1994 y Chen *et al.*, 1993). Otro ejemplo también han sido previamente observado en sistemas vegetales (Boscheinen *et al.*, 1997). Este trabajo fue realizado en levaduras reemplazando su único HSF por Lp-HSFA2 con una deleción en el dominio de oligomerización. La expresión de Lp-HSFA2 con el dominio de oligomerización no funcional permitió la supervivencia de la levadura y activó a un gen reporter con secuencias HSEs, aunque de forma más moderada que el Lp-HSFA2 nativo. La menor activación transcripcional por Lp-HSFA2 con la deleción

en el dominio de oligomerización, con respecto a la producida por Lp-HSFA2 nativo, se correlacionó con una menor afinidad de unión *in vitro* a las secuencias con HSEs (Boscheinen *et al.*, 1997). Estos resultados sugieren que la oligomerización pudiera tener un efecto mayoritario en la mejora de afinidad de unión a las secuencias con HSEs, pero como hemos visto, no es esencial para la función de activación de los HSFs, pudiendo ser funcionales en su estado monomérico.

Las interacciones funcionales entre HSFs, ya sean mediante la formación de hetero-oligómeros o por la unión de distintos HSFs a las secuencias HSEs pueden contribuir a la eficiente activación transcripcional de los genes *shsp* durante la embriogénesis zigótica. Como ha sido propuesto para otros promotores de compleja regulación, la unión de distintos factores a secuencias reguladoras contribuyen al ensamblaje de diferentes componentes de la maquinaria de inicio de la transcripción, dando lugar a un complejo altamente activo transcripcionalmente (Chen *et al.*, 1994; Thanos and Maniatis.,1995; Blau *et al.*,1996). Los dominios de activación de los factores son los responsables de dicho ensamblaje. Los dominios de activación de los HSFs están formados por unos motivos peptídicos cortos con un patrón característico de aminoácidos aromáticos, hidrófobos y ácidos, AHA, que sugieren la formación de hélices anfipáticas. (revisado en Nover y Scharf, 1997). Los HSFs de clase A tiene un dominio de activación ácido y los de clase B son neutros o cargados positivamente. Las diferencias en los dominios de activación entre los HSFs, indican que pudiera existir interacciones específicas entre éstos con distintos componentes de la maquinaria basal de transcripción. De esta forma, la unión de distintos HSFs a secuencias HSEs permitirían una activación transcripcional sinérgica como consecuencia de las interacciones entre distintos motivos AHA con diferentes factores transcripcionales generales (Barthi *et al.*, 2000).

Las peculiaridades de los mecanismos de activación por HSFs que proponemos para el promotor de *Ha hsp17.6G1*, y quizás para otros promotores *shsp* embrionarios, como el de *Ha hsp17.7G4*, serán consideradas en los

experimentos futuros que se realizarán con el HSF homólogo clonado. Una primera aproximación será determinar qué tipo de interacciones funcionales entre HSFs participan en la activación transcripcional del gen *Ha hsp17.6G1 in vivo*. Los distintos requerimientos de secuencias HSEs para las interacciones funcionales entre HSFs de clase A y entre HSFs de clase A y B de tomate mostrados en este trabajo, nos puede proporcionar algunas claves. Para ello el uso de los mutantes en las secuencias HSEs del promotor *Ha hsp17.6G1* supone una herramienta útil y la aproximación experimental podrá llevarse a cabo mediante dos sistemas de estudio: en embriones de las plantas transgénicas de tabaco y los experimentos de expresión transitoria en embriones de girasol.

El análisis de los embriones de plantas transgénicas de tabaco, nos permitirá seguir la expresión de los distintos genes quiméricos en diferentes estadios del desarrollo embrionario. En este sistema la expresión de los genes quiméricos con el promotor *Ha hsp17.6G1*, dependerá de los factores endógenos, entre ellos los HSFs. Los experimentos de expresión transitoria mediante la técnica de bombardeo serán realizados en un sistema homólogo, los embriones de girasol. En estos ensayos, estudiaremos la activación, por el HSF de girasol clonado, de los distintos genes quiméricos con el promotor *Ha hsp17.6G1*. En ambos sistemas de estudio, el análisis de la expresión del gen quimérico G1mut5. Así por ejemplo si la actividad GUS obtenida a partir del gen quimérico G1mut5, tanto en embriones de las plantas transgénicas como en embriones de girasol bombardeados con el plásmido que expresa el nuevo HSF, es menor que la obtenida con el gen quimérico G1WT, podría indicar que el tipo de interacciones entre HSFs que regulan al promotor *Ha hsp17.6G1* son entre HSFs de clase A (Fig.26); por el contrario, si la expresión del gen quimérico G1mut5 es similar a la del gen quimérico G1WT, el tipo de interacción podría ser entre HSFs de clase A y de clase B (Fig.29).

V. CONCLUSIONES.

CONCLUSIONES

1. La expresión del gen *Ha hsp17.7G4* en las fases tardías de la embriogénesis zigótica está regulada traduccionalmente. Las secuencias comprendidas entre las posiciones +55 y +65 de la región 5' transcrita no traducida de este gen participan en dicha regulación traduccional.

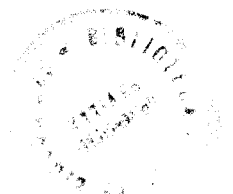
2. Los factores del tipo ABI3 participan, junto con los HSFs, en la regulación transcripcional de la expresión del gen *Ha hsp17.7G4* durante el desarrollo embrionario.

3. Los factores del tipo ABI3 actúan como coactivadores de los HSFs unidos a las regiones con HSEs para la activación transcripcional del gen *Ha hsp17.7G4* durante el desarrollo embrionario. La interacción funcional y/o física entre los factores del tipo ABI3 y los HSFs está mediada por un tercer componente embrionario.

4. La activación transcripcional mediada por los factores del tipo ABI3, requiere regiones HSEs con propiedades estructurales como las del promotor *Ha hsp17.7G4*.

5. La capacidad de activación transcripcional del promotor *Ha hsp17.6G1* por los HSFs no está determinada por la unión preferencial de éstos a las secuencias HSE de dicho promotor.

6. Los HSFs interaccionan funcionalmente a través de las secuencias HSE del promotor de *Ha hsp17.6G1*. Los mecanismos de interacción funcional entre distintos HSFs vendría dado por la participación de hetero-oligómeros formados por monómeros de distintos HSFs. Estos HSFs tendrían propiedades diferentes de activación y de unión al promotor de *Ha hsp17.6G1*. Alternativamente, los HSFs de distinta naturaleza se unirían de forma no canónica a las secuencias HSE del promotor de *Ha hsp17.6G1* para interaccionar funcionalmente.



VI. BIBLIOGRAFIA.

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

Almoguera, C., Prieto, D. P., and Jordano, J. (1998). Dual regulation of a heat shock promoter during embryogenesis: stage-dependent role of heat shock elements. *Plant J* 13, 437-46.

Amin, J., Fernandez, M., Ananthan, J., Lis, J. T., and Voellmy, R. (1994). Cooperative binding of heat shock transcription factor to the Hsp70 promoter in vivo and in vitro. *J Biol Chem* 269, 4804-11.

Baeuerle, P. A., and Baltimore, D. (1988). I kappa B: a specific inhibitor of the NF-kappa B transcription factor. *Science* 242, 540-6.

Barros, M. D., Czarnecka, E., and Gurley, W. B. (1992). Mutational analysis of a plant heat shock element. *Plant Mol Biol* 19, 665-75.

Bate, N., Spurr, C., Foster, G. D., and Twell, D. (1996). Maturation-specific translational enhancement mediated by the 5'-UTR of a late pollen transcript. *Plant J* 10, 613-23.

Baumlein, H., Misera, S., Luerssen, H., Kollé, K., Horstmann, C., Wobus, U., Müller, A.J. (1994). The FUS3 gene of *Arabidopsis thaliana* is a regulator of gene expression during late embryogenesis. *Plant Journal* 6: 379-387.

Bharti, K., Schmidt, E., Lyck, R., Heerklotz, D., Bublak, D., and Scharf, K. D. (2000). Isolation and characterization of HsfA3, a new heat stress transcription factor of *Lycopersicon peruvianum*. *Plant Journal* 22, 355-365.

Blau, J., Xiao, H., McCracken, S., O'Hare, P., Greenblatt, J. and Bentley, D. (1996). Three functional classes of transcriptional activation domains. *Mol. Cell Biol.* 16, 2044-2055.

Bobb, A. J., Eiben, H. G., and Bustos, M. M. (1995). PvAlf, an embryo-specific acidic transcriptional activator enhances gene expression from phaseolin and phytohemagglutinin promoters. *Plant Journal* 8, 331-343.

Boscheinen, O., Lyck, R., Queitsch, C., Treuter, E., Zimarino, V., and Scharf, K. D. (1997). Heat stress transcription factors from tomato can functionally replace HSF1 in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* 255, 322-31.

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., Fernández, J. M., and Short, J. M. (1987). XL1-Blue: a high efficiency plasmid transforming *recA* *Escherichia coli* strain with *b-galactosidase* selection. *Biotech* 5, 376-379.

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

Busk, P. K., and Pages, M. (1998). Regulation of abscisic acid-induced transcription. *Plant Mol Biol* 37, 425-35.

Carranco, R., Almoguera, C., and Jordano, J. (1997). A plant small heat shock protein gene expressed during zygotic embryogenesis but noninducible by heat stress. *J Biol Chem* 272, 27470-5.

Carranco, R., Almoguera, C., and Jordano, J. (1999). An imperfect heat shock element and different upstream sequences are required for the seed-specific expression of a small heat shock protein gene. *Plant Physiol* 121, 723-30.

Carrington, J. C., and Freed, D. D. (1990). Cap-independent enhancement of translation by a plant potyvirus 5' nontranslated region. *J Virol* 64, 1590-7.

Chandler, J. W., and Bartels, D. (1997). Structure and function of the vp1 gene homologue from the resurrection plant *Craterostigma plantagineum* Hochst. *Mol Gen Genet* 256, 539-46.

Chen Y, Barlev NA, Westergaard O, Jakobsen BK. (1993). Identification of the C-terminal activator domain in yeast heat-shock factor: independent control of transient and sustained transcriptional activity. *EMBO J.* 12: 5007-5018.

Chen, B. W., and Przybyla, A. E. (1994). An efficient site-directed mutagenesis method based on PCR. *Biotech* 17, 657-659.

Chen, J. L., Attardi, L. D., Verrijker, C. P., Yokomori, R. and Tjian, R. (1994). Assembly of recombinant TFIID reveals differential coactivator requirements for distinct transcriptional activators. *Cell.* 79, 93-105.

Chern, M. S., Bobb, A. J., and Bustos, M. M. (1996). The regulator of MAT2 (ROM2) protein binds to early maturation promoters and represses P_vALF-activated transcription. *Plant Cell* 8, 305-21.

Clos, J., Rabindran, S., Wisniewski, J. and Wu, C. (1993). Induction temperature of human heat shock factor is reprogrammed in a *Drosophila* cell environment. *Nature.* 364, 252-5.

Coca, M. A., Almoguera, C., and Jordano, J. (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, 479-92.

Coca, M. A., Almoguera, C., Thomas, T. L., and Jordano, J. (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, 863-76.

Cotto, J. J., and Morimoto, R. I. (1999). Stress-induced activation of the heat-shock response: cell and molecular biology of heat-shock factors. *Biochem Soc Symp* 64, 105-18.

Czarnecka-Verner, E., Yuan, C. X., Scharf, K. D., English, G., and Gurley, W. B. (2000). Plants contain a novel multi-member class of heat shock factors without transcriptional activator potential. *Plant Mol Biol* 43, 459-71.

DeRocher AE, Helm KW, Lauzon, LM and Vierling, E. (1991). Expression of a conserved family of cytoplasmic low molecular weight heat shock proteins during heat stress and recovery. *Plant Physiol.* 96: 1038-1047.

Devereux, J., Haeberli, P., and Smithies, O. (1984). A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nucleic Acids Res* 12, 387-95.

Dodeman, V. L., Ducreux, G., and Kreis, M. (1997). Zygotic embryogenesis versus somatic embryogenesis. *Journal of Experimental Botany* 48, 1493-1509.

Doring, P., Treuter, E., Kistner, C., Lyck, R., Chen, A., and Nover, L. (2000). The role of AHA motifs in the activator function of tomato heat stress transcription factors HsfA1 and HsfA2. *Plant Cell* 12, 265-78.

Duncan, R. F. (1996). Translational control during heat shock. In *Translational control*, J. W. B. Hershey, M. B. Mathews and N. Sonenberg, eds. (Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press), pp. 271-2093.

Ezcurra, I., Ellerstrom, M., Wycliffe, P., Stalberg, K., and Rask, L. (1999). Interaction between composite elements in the napA promoter: both the B-box ABA-responsive complex and the RY/G complex are necessary for seed-specific expression. *Plant Mol Biol* 40, 699-709.

Ezcurra, I., Wycliffe, P., Nehlin, L., Ellerstrom, M., and Rask, L. (2000). Transactivation of the Brassica napus napin promoter by ABI3 requires interaction of the conserved B2 and B3 domains of ABI3 with different cis-elements: B2 mediates activation through an ABRE, whereas B3 interacts with an RY/G-box. *Plant J* 24, 57-66.

Feilotter, H. E., Hannon, G. J., Ruddell, C. J., and Beach, D. (1994). Construction of an improved host strain for two hybrid screening. *Nucleic Acids Res* 22, 1502-3.

Fernandes, M., Xiao, H., and Lis, J. T. (1994). Fine structure analyses of the Drosophila and Saccharomyces heat shock factor--heat shock element interactions. *Nucleic Acids Res* 22, 167-73.

Fernandes, M., Xiao, H., and Lis, J. T. (1995). Binding of heat shock factor to and transcriptional activation of heat shock genes in Drosophila. *Nucleic Acids Res* 23, 4799-804.

Fields, S., and Song, O. (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 340, 245-6.

Finkelstein, R. R. and Somerville, C. R. (1990). Three classes of abscisic acid (ABA)-insensitive mutations of Arabidopsis define genes that control overlapping subsets of ABA responses. *Plant Physiol.* 94: 1172-1179.

Finkelstein, R. R. (1993). Abscisic Acid-Insensitive Mutations Provide Evidence for Stage-Specific Signal Pathways Regulating Expression of an Arabidopsis Late Embryogenesis-Abundant (*lea*) Gene. *Molecular & General Genetics* 238: 401-408.

Finkelstein, R. R. (1994). Mutations at two new Arabidopsis ABA response loci are similar to the *abi3* mutations. *Plant Journal* 5: 765-771.

Finkelstein, R. R., Wang, M. L., Lynch, T. J., Rao, S., and Goodman, H. M. (1998). The Arabidopsis abscisic acid response locus *ABI4* encodes an *APETALA 2* domain protein. *Plant Cell* 10, 1043-54.

Fiorenza, M. T., Farkas, T., Dissing, M., Kolding, D., and Zimarino, V. (1995). Complex expression of murine heat shock transcription factors. *Nucleic Acids Res* 23, 467-74.

Futterer, J., and Hohn, T. (1991). Translation of a polycistronic mRNA in the presence of the cauliflower mosaic virus transactivator protein. *Embo J* 10, 3887-96.

Galau, G. A., Jakobsen, K. S., and Hughes, D. W. (1991). The controls of late dicot embryogenesis and early germination. *Physiol Plant* 81, 280-288.

Gallie, D. R., and Walbot, V. (1990). RNA pseudoknot domain of tobacco mosaic virus can functionally substitute for a poly(A) tail in plant and animal cells. *Genes Dev* 4, 1149-57.

Gaubier, P., Raynal, M., Hull, G., Huestis, G. M., Grellet, F., Arenas, C., Pages, M., and Delseny, M. (1993). Two different *Em*-like genes are expressed in *Arabidopsis thaliana* seeds during maturation. *Mol Gen Genet* 238, 409-18.

Gietz, D., St Jean, A., Woods, R. A., and Schiestl, R. H. (1992). Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic Acids Res* 20, 1425.

Gilmour, S.J., Thomashow, M.F. (1991). Cold Acclimation and Cold-Regulated Gene Expression in ABA Mutants of Arabidopsis-Thaliana *Plant Molecular Biology* 17: 1233-1240.

Giraudat, J., Hauge, B. M., Valon, C., Smalle, J., Parcy, F., and Goodman, H. M. (1992). Isolation of the Arabidopsis ABI3 gene by positional cloning. *Plant Cell* 4, 1251-61.

Giuliano, G., Hoffman, N. E., Ko, K., Scolnik, P. A., and Cashmore, A. R. (1988). A light-entrained circadian clock controls transcription of several plant genes. *Embo J* 7, 3635-42.

Goldberg, R. B., de Paiva, G., and Yadegari, R. (1994). Plant embryogenesis: Zygote to seed. *Science* 266, 605-614.

Goodson, M. L., Park-Sarge, O. K., and Sarge, K. D. (1995). Tissue-dependent expression of heat shock factor 2 isoforms with distinct transcriptional activities. *Mol Cell Biol* 15, 5288-93.

Guiltinan, M. J., Marcotte, W. J., and Quatrano, R. S. (1990). A plant leucine zipper protein that recognizes an abscisic acid response element. *Science* 250, 267-71.

Gurley, W. B., and Key, J. L. (1991). Transcriptional regulation of the heat-shock response: a plant perspective. *Biochemistry* 30, 1-12.

- Hall, T. C., Ma, Y., Buchbinder, B. U., Pyne, J. W., Sun, S. M., and Bliss, F. A.** (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.
- Hattori, T., Vasil, V., Rosenkrans, L., Hannah, L. C., McCarty, D. R., and Vasil, I. K.** (1992). The Viviparous-1 gene and abscisic acid activate the C1 regulatory gene for anthocyanin biosynthesis during seed maturation in maize. *Genes Dev* 6, 609-18.
- Hattori, T., Terada, T., and Hamasuna, S. T.** (1994). Sequence and functional analyses of the rice gene homologous to the maize Vp1. *Plant Mol Biol* 24, 805-10.
- Heerklotz, D., Doring, P., Bonzelius, F., Winkelhaus, S., and Nover, L.** (2001). The balance of nuclear import and export determines the intracellular distribution and function of tomato heat stress transcription factor HsfA2. *Mol Cell Biol* 21, 1759-68.
- Hess, M. A., and Duncan, R. F.** (1994). RNA/protein interactions in the 5'-untranslated leader of HSP70 mRNA in *Drosophila* lysates. Lack of evidence for specific protein binding. *J Biol Chem* 269, 10913-22.
- Hess, M. A., and Duncan, R. F.** (1996). Sequence and structure determinants of *Drosophila* Hsp70 mRNA translation: 5'UTR secondary structure specifically inhibits heat shock protein mRNA translation. *Nucleic Acids Res* 24, 2441-9.
- Hill, A., Nantel, A., Rock, C. D., and Quatrano, R. S.** (1996). A conserved domain of the viviparous-1 gene product enhances the DNA binding activity of the bZIP protein EmBP-1 and other transcription factors. *J Biol Chem* 271, 3366-74.

Hobo, T., Kowiyama, Y., and Hattori, T. (1999). A bZIP factor, TRAB1, interacts with VP1 and mediates abscisic acid-induced transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 15348-53.

Hoekema, A., Hirsch, P. R., Hooykaas, P. J. J., and Schilperoot, R. A. (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., Kurup, S., and McKibbin, R. (1999). Molecular and genetic mechanisms regulating the transition from embryo development to germination. *Trends Plant Sci* 4, 275-280.

Holsters, M., Waele, D. d., Depicker, A., Messens, E., Montagu, M. v., and Schell, J. (1978). Transfection and transformation of *Agrobacterium tumefaciens*. *Mol Gen Genet* 163, 181-187.

Horsch, R. B., Fry, J. E., Hoffmann, N. L., Eichholtz, D., Rogers, S. G., and Fraley, R. T. (1985). A simple and general method for transferring genes into plants. *Science* 227, 1229-1231.

Hsiao, K. (1991). A fast and simple procedure for sequencing double stranded DNA with sequenase. *Nucleic Acids Res* 19, 2787.

Hubel, A., and Schoffl, F. (1994). Arabidopsis heat shock factor: isolation and characterization of the gene and the recombinant protein. *Plant Mol Biol* 26, 353-62.

Hubel, A., Lee, J. H. and Schoffl, F. (1995). Arabidopsis heat shock factor is constitutively active in *Drosophila* and human cells. *Molecular & General Genetics* 248: 136-141.

- Hultmark, D., Klemenz, R., and Gehring, W. J.** (1986). Translational and transcriptional control elements in the untranslated leader of the heat-shock gene hsp22. *Cell* 44, 429-38.
- Izawa, T., Foster, R., and Chua, N. H.** (1993). Plant bZIP protein DNA binding specificity. *J Mol Biol* 230, 1131-44.
- Jefferson, R. A., Kavanagh, T. A., and Bevan, M. W.** (1987). GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J* 6, 3901-3907.
- Jones, H. D., Peters, N. C., and Holdsworth, M. J.** (1997). Genotype and environment interact to control dormancy and differential expression of the VIVIPAROUS 1 homologue in embryos of *Avena fatua*. *Plant J* 12, 911-20.
- Joshi, C. P., and Nguyen, H. T.** (1995). 5' Untranslated leader sequences of eukaryotic mRNAs encoding heat shock induced proteins. *Nucleic Acids Res* 23, 541-549.
- Joshi-Barve, S., De Benedetti, A., and Rhoads, R. E.** (1992). Preferential translation of heat shock mRNAs in HeLa cells deficient in protein synthesis initiation factors eIF-4E and eIF-4 gamma. *J Biol Chem* 267, 21038-43.
- Kagaya, Y., Ohmiya, K., and Hattori, T.** (1999). RAV1, a novel DNA-binding protein, binds to bipartite recognition sequence through two distinct DNA-binding domains uniquely found in higher plants. *Nucleic Acids Res* 27, 470-8.
- Kanei, I. C., Yasukawa, T., Morimoto, R. I., and Ishii, S.** (1994). c-Myb-induced trans-activation mediated by heat shock elements without sequence-specific DNA binding of c-Myb. *J Biol Chem* 269, 15768-75.

Keith K, Kraml M, Dengler NG, McCourt P. (1994). *usca3*: a heterochromic mutation affecting late embryo development in Arabidopsis. *The Plant Cell* 6: 589-600.

Klemenz, R., Hultmark, D., and Gehring, W. J. (1985). Selective translation of heat shock mRNA in *Drosophila melanogaster* depends on sequence information in the leader. *Embo J* 4, 2053-60.

Koornneef, M., Reuling, G., and Karssen, C. (1984). The isolation and characterization of abscisic acid-insensitive mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Physiol. Plant.* 61, 377-383.

Kroeger, P. E., and Morimoto, R. I. (1994). Selection of new HSF1 and HSF2 DNA-binding sites reveals difference in trimer cooperativity. *Mol Cell Biol* 14, 7592-603.

Kurup, S., Jones, H. D., and Holdsworth, M. J. (2000). Interactions of the developmental regulator ABI3 with proteins identified from developing Arabidopsis seeds. *Plant J* 21, 143-55.

Laemmli, U. K., Molbert, E., Showe, M., and Kellenberger, E. (1970). Form-determining function of the genes required for the assembly of the head of bacteriophage T4. *J Mol Biol* 49, 99-113.

Lamphear, B. J., and Panniers, R. (1991). Heat shock impairs the interaction of cap-binding protein complex with 5' mRNA cap. *J Biol Chem* 266, 2789-94.

Leung, J., Merlot, S., and Giraudat, J. (1997). The Arabidopsis ABSCISIC ACID-INSENSITIVE2 (ABI2) and ABI1 genes encode homologous protein phosphatases 2C involved in abscisic acid signal transduction. *Plant Cell* 9, 759-71.

Luerssen, H., Kirik, V., Herrmann, P., and Misera, S. (1998). FUSCA3 encodes a protein with a conserved VP1/AB13-like B3 domain which is of functional importance for the regulation of seed maturation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 15, 755-64.

Lyck, R., Harmening, U., Hohfeld, I., Treuter, E., Scharf, K. D., and Nover, L. (1997). Intracellular distribution and identification of the nuclear localization signals of two plant heat-stress transcription factors. *Planta* 202, 117-25.

Macejak, D. G., and Sarnow, P. (1991). Internal initiation of translation mediated by the 5' leader of a cellular mRNA. *Nature* 353, 90-4.

17.7, results in increased or decreased thermotolerance. *Plant Journal* 20, 89-99.

Mason, P. B. J., and Lis, J. T. (1997). Cooperative and competitive protein interactions at the hsp70 promoter. *J Biol Chem* 272, 33227-33.

McCarty, D. R., Hattori, T., Carson, C. B., Vasil, V., Lazar, M., and Vasil, I. K. (1991). The *Viviparous-1* developmental gene of maize encodes a novel transcriptional activator. *Cell* 66, 895-905.

McGarry, T. J., and Lindquist, S. (1985). The preferential translation of *Drosophila* hsp70 mRNA requires sequences in the untranslated leader. *Cell* 42, 903-11.

McMillan, D. R., Xiao, X., Shao, L., Graves, K., and Benjamin, I. J. (1998). Targeted disruption of heat shock transcription factor 1 abolishes thermotolerance and protection against heat-inducible apoptosis. *J Biol Chem* 273, 7523-7528.

Meinke DW, Franzmann LH, Nickle TC, Yeung EC. (1994). Leafy cotyledon mutants of *Arabidopsis*. *Plant Cell* 6: 1049-1064

Mezger, V., Rallu, M., Morimoto, R. I., Morange, M., and Renard, J. P. (1994). Heat shock factor 2-like activity in mouse blastocysts. *Dev Biol* 166, 819-22.

Morimoto, R. I., Kroeger, P. E., and Cotto, J. J. (1996). The transcriptional regulation of heat shock genes: a plethora of heat shock factors and regulatory conditions. *Exs* 77, 139-63.

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

Nambara, E., Keith, K., McCourt, P., and Naito, S. (1994). Isolation of an internal deletion mutant of the *Arabidopsis thaliana* ABI3 gene. *Plant Cell Physiol* 35, 509-13.

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

Nelson, D., Salamini, F., and Bartels, D. (1994). Abscisic acid promotes novel DNA-binding activity to a desiccation- related promoter of *Craterostigma plantagineum*. *Plant J* 5, 451-8.

Nover, L., Scharf, K. D., and Neumann, D. (1989). Cytoplasmic heat shock granules are formed from precursor particles and are associated with a specific set of mRNAs. *Mol Cell Biol* 9, 1298-308.

Nover, L., Scharf, K. D., Gagliardi, D., Vergne, P., Czarnecka-Verner, E., and Gurley, W. B. (1996). The Hsf world: classification and properties of plant heat stress transcription factors. *Cell Stress Chaperones* 1, 215-23.

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

Nunberg, A. N., Li, Z., Bogue, M. A., Vivekananda, J., Reddy, A. S., and Thomas, T. L. (1994). Developmental and hormonal regulation of sunflower helianthinin genes: proximal promoter sequences confer regionalized seed expression. *Plant Cell* 6, 473-86.

Oeda, K., Salinas, J., and Chua, N. H. (1991). A tobacco bZip transcription activator (TAF-1) binds to a G-box-like motif conserved in plant genes. *Embo J* 10, 1793-802.

Ooms, JJJ., Leonkloosterziel, KM., Bartels, D., Koornneef, M. and Karsen, CM. (1993). Acquisition of Desiccation Tolerance and Longevity in Seeds of *Arabidopsis thaliana* - A Comparative Study Using Abscisic Acid-Insensitive *Abi3* Mutants. *Plant Physiology* 102: 1185-1191.

Parcy, F., Valon, C., Raynal, M., Gaubier-Comella, P., Delseny, M., and Giraudat, J. (1994). Regulation of gene expression programs during *Arabidopsis* seed development: roles of the *ABI3* locus and of endogenous abscisic acid. *Plant Cell* 6, 1567-82.

Parcy, F., and Giraudat, J. (1997). Interactions between the *ABI1* and the ectopically expressed *ABI3* genes in controlling abscisic acid responses in *Arabidopsis* vegetative tissues. *Plant J* 11, 693-702.

Parsell, D. A., and Lindquist, S. (1993). The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. *Annu Rev Genet* 27, 437-96.

Pitto, L., Gallie, D. R., and Walbot, V. (1992). Role of the leader sequence during thermal repression of translation in maize, tobacco, and carrot protoplasts. *Plant Phys* 100, 1827-1833.

Prandl, R., Hinderhofer, K., Eggers-Schumacher, G., and Schoffl, F. (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, 269-78.

Prieto Dapena, P., Almoguera, C., Rojas, A., and Jordano, J. (1999). Seed-specific expression patterns and regulation by ABI3 of an unusual late embryogenesis-abundant gene in sunflower. *Plant Molecular Biology* 39, 615-627.

Rabindran, S. K., Haroun, R. I., Clos, J., Wisniewski, J. and Wu, C. (1993). Regulation of heat shock factor trimer formation: role of a conserved leucine zipper. *Science*. 259, 230-4.

Reindl, A., and Schoffl, F. (1998). Interaction between the *Arabidopsis thaliana* heat shock transcription factor HSF1 and the TATA binding protein TBP. *Febs Lett* 436, 318-22.

Rohde, A., Ardiles, D. W., Montagu, M. v., Boerjan, W., and Van, M. M. (1998). Isolation and expression analysis of an ABSCISIC ACID-INSENSITIVE 3 (ABI3) homologue from *Populus trichocarpa*. *Journal of Experimental Botany* 49, 1059-1060.

Rohde, A., Montagu, M. v., Boerjan, W., and van Montagu, M. (1999). The ABSCISIC ACID-INSENSITIVE 3 (ABI3) gene is expressed during vegetative quiescence processes in *Arabidopsis*. *Plant, Cell and Environment* 22, 261-270.

Rohde, A., De Rycke, R., Beeckman, T., Engler, G., Van Montagu, M., and Boerjan, W. (2000). ABI3 affects plastid differentiation in dark-grown *Arabidopsis* seedlings. *Plant Cell* 12, 35-52.

- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989).** Molecular cloning, a laboratory manual. Cold. Spring. Harbor. Laboratory. Press, New York.
- Sanger, F., Coulson, A. R., Hong, F., Hill, D. F., and Peterson, G. B. (1982).** DNA sequencing with chain-termination inhibitors. Proc Natl Acad Sci U.S.A. 162, 729-773.
- Santoro, N., Johansson, N., and Thiele, D. J. (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, 6340-52.
- Sarge, K. D., Park-Sarge, O. K., Kirby, J. D., Mayo, K. E., and Morimoto, R. I. (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, 1334-43.
- Satyal, S. H., Chen, D., Fox, S. G., Kramer, J. M., and Morimoto, R. I. (1998).** Negative regulation of the heat shock transcriptional response by HSBP1. Genes Dev 12, 1962-74.
- Scharf, K. D., Heider, H., Hohfeld, I., Lyck, R., Schmidt, E., and Nover, L. (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, 2240-51.
- Schoffl, F., Prandl, R., and Reindl, A. (1998).** Regulation of the heat-shock response. Plant Physiol 117, 1135-41.
- Schöffl, F., Rieping, M., Baumann, G., Bevan, M., and Angermüller, S. (1989).** The function of the plant heat shock promoter elements in the regulated

expression of chimaeric genes in transgenic tobacco. *Mol Gen Genet* 217, 246-253.

Schultz, T. F., Medina, J., Hill, A., and Quatrano, R. S. (1998). 14-3-3 proteins are part of an abscisic acid-VIVIPAROUS1 (VP1) response complex in the Em promoter and interact with VP1 and EmBP1. *Plant Cell* 10, 837-47.

SenGupta, D. J., Zhang, B., Kraemer, B., Pochart, P., Fields, S., and Wickens, M. (1996). A three-hybrid system to detect RNA-protein interactions in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 8496-501.

Sheldon, L. A., and Kingston, R. E. (1993). Hydrophobic coiled-coil domains regulate the subcellular localization of human heat shock factor 2. *Genes Dev* 7, 1549-58.

Shen, Q., and Ho, T. H. (1995). Functional dissection of an abscisic acid (ABA)-inducible gene reveals two independent ABA-responsive complexes each containing a G-box and a novel cis-acting element. *Plant Cell* 7, 295-307.

Shen, Q., Ho, T., Shen, Q. X., and Ho, T. H. D. (1997). Promoter switches specific for abscisic acid (ABA)-induced gene expression in cereals. *Physiologia Plantarum* 101, 653-664.

Shen, W. H., and Gigot, C. (1997). Protein complexes binding to cis elements of the plant histone gene promoters: multiplicity, phosphorylation and cell cycle alteration. *Plant Mol Biol* 33, 367-79.

Shiota, H., Satoh, R., Watabe, K., Harada, H., and Kamada, H. (1998). C-ABI3, the carrot homologue of the Arabidopsis ABI3, is expressed during both zygotic and somatic embryogenesis and functions in the regulation of embryo-specific ABA-inducible genes. *Plant Cell Physiol* 39, 1184-93.

- Sistonen, L., Sarge, K. D. and Morimoto, R. I. (1994).** Human heat shock factors 1 and 2 are differentially activated and can synergistically induce hsp70 gene transcription. *Mol Cell Biol.* 14, 2087-99.
- Slater, M. R., and Craig, E. A. (1987).** Transcriptional regulation of an hsp70 heat shock gene in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 7, 1906-16.
- Sorger, P. K., Pelham, H. R. (1988).** Yeast heat shock factor is an essential DNA-binding protein that exhibits temperature-dependent phosphorylation. *Cell.* 54, 855-64.
- Studier, F. W., and Moffatt, B. A. (1986).** Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* 189, 113-30.
- Suzuki, M., Kao, C. Y., and McCarty, D. R. (1997).** The conserved B3 domain of VIVIPAROUS1 has a cooperative DNA binding activity. *Plant Cell* 9, 799-807.
- Tanabe, M., Sasai, N., Nagata, K., Liu, X. D., Liu, P. C., Thiele, D. J., and Nakai, A. (1999).** The mammalian HSF4 gene generates both an activator and a repressor of heat shock genes by alternative splicing. *J Biol Chem* 274, 27845-56.
- Thanos, D. and Maniatis, T. (1995).** Virus induction of human *IFN γ* gene expression requires the assembly of an enhanceosome. *Cell.* 83, 1091-1100.
- Topfer, R., Schell, J., and Steinbiss, H. H. (1988).** Versatile cloning vectors for transient gene expression and direct gene transfer in plant cells. *Nucleic Acids Res* 16, 8725.
- Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979).** Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 4350-4.

Treuter, E., Nover, L., Ohme, K., and Scharf, K. D. (1993). Promoter specificity and deletion analysis of three heat stress transcription factors of tomato. *Mol Gen Genet* 240, 113-25.

Turner, R., Bate, N., Twell, D., and Foster, G. D. (1994). Analysis of a translational enhancer upstream from the coat protein open reading frame of potato virus S. *Arch Virol* 134, 321-33.

Ulmasov, T., Hagen, G., and Guilfoyle, T. J. (1997). ARF1, a transcription factor that binds to auxin response elements. *Science* 276, 1865-8.

Vaida, M.E. and Webster, C. (1998). Translational regulation during periods of environmental stress. In *A look beyond transcription*. Bailey-Serres, J. and Gallie, D. R. ed: American Society of Plant Physiologist. pp: 102-114.

Vasil, V., Marcotte, W. J., Rosenkrans, L., Cocciolone, S. M., Vasil, I. K., Quatrano, R. S., and McCarty, D. R. (1995). Overlap of Viviparous1 (VP1) and abscisic acid response elements in the Em promoter: G-box elements are sufficient but not necessary for VP1 transactivation. *Plant Cell* 7, 1511-8.

Vierling, E. (1991). The Roles of Heat Shock Proteins in Plants. *Annu. Rev. Plant Physiology Plant Mol. Biol.* 42, 579-620.

Wang, Z., and Lindquist, S. (1998). Developmentally regulated nuclear transport of transcription factors in *Drosophila* embryos enable the heat shock response. *Development* 125, 4841-50.

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

- Waters, E. R., and Vierling, E.** (1999). The diversification of plant cytosolic small heat shock proteins preceded the divergence of mosses. *Mol Biol Evol* 16, 127-39.
- Wehmeyer, N., Hernandez, L. D., Finkelstein, R. R., and Vierling, E.** (1996). Synthesis of small heat-shock proteins is part of the developmental program of late seed maturation. *Plant Physiol* 112, 747-57.
- Weisshaar, B., Block, A., Armstrong, G. A., Herrmann, A., Schulze-Lefert, P., and Hahlbrock, K.** (1991). Regulatory elements required for light-mediated expression of the *Petroselinum crispum* chalcone synthase gene. *Symp Soc Exp Biol* 45, 191-210.
- Wu, C.** (1995). Heat shock transcription factors: structure and regulation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 11, 441-69.
- Xia, W., and Voellmy, R.** (1997). Hyperphosphorylation of heat shock transcription factor 1 is correlated with transcriptional competence and slow dissociation of active factor trimers. *J Biol Chem* 272, 4094-102.
- Xiao, H., and Lis, J. T.** (1988). Germline transformation used to define key features of heat-shock response elements. *Science* 239, 1139-42.
- Xiao, H., Perisic, O., and Lis, J. T.** (1991). Cooperative binding of *Drosophila* heat shock factor to arrays of a conserved 5 bp unit. *Cell* 64, 585-93.
- Yuan, C. X., and Gurley, W. B.** (2000). Potential targets for HSF1 within the preinitiation complex. *Cell Stress Chaperones* 5, 229-42.
- Zhang, J. and Lautar, S.** (1996). A yeast three-hybrid method to clone ternary protein complex components. *Anal Biochem.* 242, 68-72.
- Zhong, M., Orosz, A., and Wu, C.** (1998). Direct sensing of heat and oxidation by *Drosophila* heat shock transcription factor. *Mol Cell* 2, 101-8.

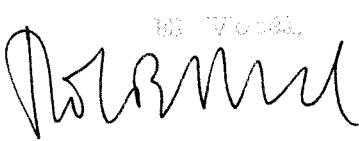
Zuo, J., Baler, R., Dahl, G., Voellmy, R. (1994). Activation of the DNA-binding ability of human heat shock transcription factor 1 may involve the transition from an intramolecular to an intermolecular triple-stranded coiled-coil structure. *Mol Cell Biol.* 14, 7557-68.

Zuo, J., Rungger, D., and Voellmy, R. (1995). Multiple layers of regulation of human heat shock transcription factor 1. *Mol Cell Biol* 15, 4319-30.

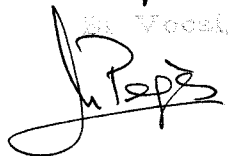
UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Sevilla, el Tribunal integrado por los abajo firmantes
de el día de la fecha, para juzgar la Tesis Doctoral de
D. Anabel Rojas González
sobre Mecanismos de regulación de la expresión de genes
step durante el desarrollo embrionario: diferencias transcripcionales
y traduccionales con la respuesta al calor
con un expediente de calificación de SOBRESALIENTE CUM LAUDE
POR UNIVERSIDAD

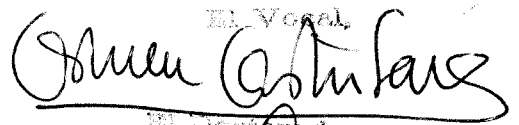
Sevilla, 17 de septiembre 2001

El Vocal,


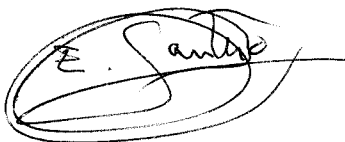
El Presidente

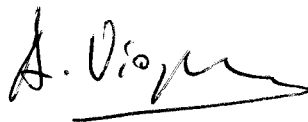
El Vocal,


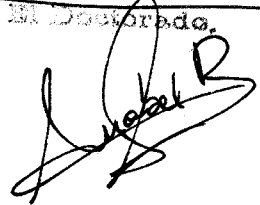
El Secretario

El Vocal,


El Doctorado









UNIVERSIDAD DE SEVILLA



600052091

118611540