

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIEROS DE MONTES
UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID
DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA

**PROTEÍNAS sHSP DEL CASTAÑO COMÚN (*Castanea sativa* Mill.):
ASPECTOS MOLECULARES DE LA RESPUESTA
AL ESTRÉS ABIÓTICO**

Tesis Doctoral

ALVARO SOTO DE VIANA

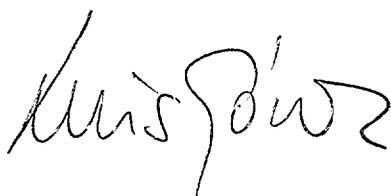
2000

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIEROS DE MONTES
UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID
DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA

**PROTEÍNAS sHSP DEL CASTAÑO COMÚN (*Castanea sativa* Mill.):
ASPECTOS MOLECULARES DE LA RESPUESTA
AL ESTRÉS ABIÓTICO**

Memoria presentada por D. Alvaro Soto de Viana para optar al grado de Doctor.

Madrid, 15 de Diciembre de 2000



VºBº

El Director de la Tesis

Fdo.: Luis Gómez Fernández

Profesor Titular de Química y Bioquímica

Universidad Politécnica de Madrid

RECONOCIMIENTOS

El presente trabajo ha sido realizado en la Unidad de Química y Bioquímica de la E.T.S. Ingenieros de Montes, Departamento de Biotecnología de la Universidad Politécnica de Madrid, en el marco de los proyectos BIO96-0441 y BIO99-0931 del MEC. Alvaro Soto de Viana ha sido becario del programa FPI (MEC) durante los años 1997-2000.

Quiero expresar mi reconocimiento a las siguientes personas, sin cuya colaboración no habría sido posible la consecución de muchos de los resultados recogidos en esta memoria:

Carmen Collada (Dpto. de Biotecnología, E.T.S.I.M., U.P.M.), en la construcción de las genotecas ADNc de semilla y tallo y en la secuenciación de clones de tallo.

Rosa Casado (Dpto. de Biotecnología, E.T.S.I.M., U.P.M.), en la identificación y caracterización de proteínas de tallo.

M^a Ángeles Guevara (CIB, Madrid), en los estudios de actividad chaperona *in vitro*.

Paulina Núñez (Dpto. de Biotecnología, E.T.S.I.M., U.P.M.), en los estudios de expresión estacional en castaños adultos.

Isabel Allona (Dpto. de Biotecnología, E.T.S.I.M., U.P.M.) y Emilio Rodríguez Cerezo (C.N.B., Madrid), en la inmunomicroscopía óptica y electrónica.

M^a Ángeles Lopez (Dpto. de Biotecnología, E.T.S.I.M., U.P.M.), en la purificación de la proteína de semilla.

Juan Jordano y Concepción Almoguera (C.S.I.C., Sevilla), por el envío del clon Ha *hsp17.6*.

Asimismo quiero expresar mi reconocimiento a las siguientes personas, por compartir información y/o enviar material (cepas bacterianas, plásmidos, etc.):

Cipriano Aragoncillo (Dpto. de Biotecnología, E.T.S.I.M., U.P.M.), José M^a Malpica (I.N.I.A., Madrid), José Luis Díez (C.I.B., Madrid), Antonio Leyva (C.N.B., Madrid), Javier Paz Ares (C.N.B., Madrid), Fraukje Bitter (Phabagen, Holanda), Manuel Peitsch y Nicolas Guex (GlaxoWellcome, Suiza), Mike Bennet (Royal Botanic Gardens, Kew, Reino Unido), Linda Danhof y Pamela Green (Michigan State University, USA), Mary Berlyn (*E. coli* Genetic Stock Center, Yale University, USA).

AGRADECIMIENTOS

Llegado este momento quiero expresar mi agradecimiento a las siguientes personas:

A quienes han sido mis jefes durante mi estancia en el laboratorio, Cipriano como director del trabajo de fin de carrera y Luis como director de esta tesis. Gracias por todo, especialmente por lo que de vosotros he aprendido.

A Carmen, Gloria y Rosa, que han vigilado mis primeros pasos en el día a día del laboratorio y, mucho más importante, me han brindado su apoyo y amistad.

A las posteriores incorporaciones al laboratorio (las dos M^a Ángeles, Isabel, Paulina y Alberto); también hemos compartido muchas horas, buenas y malas y, sin excepción, me han ofrecido su ayuda y apoyo.

Al resto de "habitantes" de la cátedra. A lo largo de estos años también nos ha dado tiempo a reír y a charlar.

A la gente de Agrónomos: en especial a Ali, que ha actuado como mi verdadera compañera de tesis, me ha solucionado más de un problema y hemos compartido risas y disgustos; a Emilia, a César, y a todos los demás (son muchos y no podría nombrarlos a todos), que me han tratado muy bien en los inevitables peregrinajes a su Escuela. A Mónica, por las charlas, cafés, etc.; ella también vigiló mis primeros experimentos allí y aportó una importante dosis de serenidad.

Por supuesto, a todas aquellas personas que seguramente he olvidado mencionar y debería haber hecho.

A mis amigos, por serlo y por apoyarme en todo momento.

A mi familia (no hace falta mayor explicación). Lo que de bueno haya en esta tesis va dedicado a ellos.

A Chus, por más cosas de las que podría especificar aquí. Extiendo a ella la dedicatoria de la tesis.

ÍNDICE

ÍNDICE

SUMMARY	2
INTRODUCCIÓN	
I. PLANTEAMIENTO GENERAL DE LA TESIS	5
II. EFECTOS DEL ESTRÉS TÉRMICO SOBRE LOS ORGANISMOS	7
III. CLASIFICACIÓN DE LAS HSP	8
III.1 HSP100	9
III.2 HSP90	9
III.3 HSP70	10
III.4 HSP60	11
IV. HSP DE BAJO PESO MOLECULAR	12
IV.1 Aspectos bioquímicos de las sHSP	12
IV.2 Actividad de las sHSP	15
IV.3 Relaciones estructura-función	18
IV.4 Expresión de las sHSP	20
IV.4.1 Expresión de las sHSP durante el estrés térmico	20
IV.4.2 Expresión en ausencia de estrés térmico	21
IV.5 Relaciones evolutivas	24
MATERIAL Y MÉTODOS	
I. MATERIAL BIOLÓGICO	27
I.1 Cepas bacterianas	27
I.2 Material vegetal	27
I.2.1 Muestras de campo	27
Estadíos de maduración y germinación de las semillas	28

I.2.2 Plántulas crecidas en laboratorio	28
II. MÉTODOS DE PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PROTEÍNAS	29
II.1 Extracción y purificación de proteínas	29
II.1.1 Purificación de Cs HSP17.5 de semilla	29
II.1.2 Purificación de la endoquitinasa de castaña Cs Ch 1	29
II.1.3 Extracción de proteínas de rama de especies forestales	30
II.1.4 Extracción de proteínas de <i>Escherichia coli</i>	30
II.2 Carboximetilación de proteínas de tallo	31
II.3 Métodos cromatográficos	31
II.3.1 Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de filtración molecular	31
II.3.2 Cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC)	32
II.4 Métodos electroforéticos	32
II.4.1 Electroforesis unidimensionales	32
II.4.1.1 Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE)	32
II.4.1.2 Electroforesis en gradiente de poliacrilamida (VPAGE)	33
II.4.2 Electroforesis bidimensional: isoelectroenfoque (IEF) x SDS-PAGE	33
II.5 Detección de proteínas sobre membrana (<i>Western Blot</i> y <i>Dot Blot</i>)	34
Transferencia a membrana por vacío	34
Electrotransferencia a membrana	34
Tinción de proteínas	35
Inmunodetección por anticuerpos	35
II.6 Digestión de proteínas unidas a membrana	36
II.7 Inmunolocalización en tejidos vegetales	36
II.7.1 Localización subcelular mediante microscopía electrónica	36
II.7.2 Localización tisular en tallo mediante microscopía óptica	37
II.8 Ensayos de actividad chaperona <i>in vitro</i>	37
Inactivación térmica	37
Desnaturalización química	38

Renaturalización de Cs Ch 1	38
Ensayo de actividad quitinasa	38
II.9 Análisis MALDI y secuenciación de proteínas	39
III. MÉTODOS DE ÁCIDOS NUCLEICOS	39
III.1 Métodos extractivos	39
III.1.1 Extracción de ARN	39
III.1.2 Extracción de ADN	40
III.2 Digestión enzimática de ADN	40
III.3 Electroforesis en gel de agarosa (EGA) de ADN	41
III.4 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	41
III.4.1 RT-PCR	41
Transcripción inversa	41
PCR	42
III.5 Generación de sondas radiactivas	42
III.6 Construcción y rastreo de genotecas de expresión	42
III.7 Detección de ácidos nucleicos sobre membrana	44
III.7.1 Detección de ARN (<i>Northern Blot</i>)	44
III.7.2 Detección de ADN (<i>Southern Blot</i>)	45
III.8 Secuenciación de ADN	46
III.9 Clonaje en vectores de expresión	46
III.9.1 Clonaje en pET 11d	46
III.9.2 Clonaje en pRSET b	46
III.9.3 Clonaje de formas truncadas en pRSET b	47
IV. TRATAMIENTOS SOBRE PLÁNTULAS	48
IV.1 Estrés de calor	48
IV.2 Estrés de frío	48
IV.3 Estrés salino	48
IV.4 Tratamiento con ácido jasmónico	49
IV.5 Tratamiento con ácido salicílico	49
IV.6 Herida mecánica	49
V. EXPRESIÓN HETERÓLOGA Y TRATAMIENTOS SOBRE BACTERIAS	50
V.1 Expresión heteróloga en BL21(DE3)	50

V.2 Tratamientos sobre bacterias recombinantes	50
V.2.1 Estrés de calor	51
V.2.2 Estrés de frío	51
V.2.3 Estudio de la asociación a membrana	52
RESULTADOS	
I. PROTEÍNAS sHSP DE SEMILLA DE <i>CASTANEA SATIVA</i> MILL.	54
I.1 Construcción y rastreo de una genoteca de ADNc de semilla de <i>C. sativa</i> Mill.	54
I.2 Aislamiento y caracterización del ADNc	55
I.3 Identificación de la proteína Cs HSP17.5	59
I.4 Caracterización de la actividad chaperona molecular <i>in vitro</i>	59
I.4.1 Cinética de la renaturalización de Cs Ch 1	62
I.4.2 Estequiometría de la interacción Cs HSP17.5/Cs Ch 1	62
I.4.3 Efecto del ATP sobre la actividad chaperona	64
II. PROTEÍNAS sHSP DE TALLO DE <i>CASTANEA SATIVA</i> MILL.	64
II.1 Detección de proteínas inmunorreactivas en extractos de tallo	65
II.2 Purificación y caracterización parcial de componentes mayoritarios	67
Purificación y secuenciación de péptidos internos	67
II.3 Aislamiento y caracterización del ADNc de la principal sHSP de tallo	69
II.3.1 Construcción y rastreo de una genoteca de ADNc de tallo	69
II.3.2 Caracterización del ADNc	69
II.3.3 Secuenciación de los fragmentos amplificados a partir de ARN poli(A)+ de tallo (RT-PCR)	70
II.4 Organización genómica de Cs <i>hsp17.5</i>	70
III. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN Y POSIBLE FUNCIÓN <i>IN VIVO</i>	73
III.1 Expresión <i>in planta</i>	73
III.1.1 Localización subcelular	73
III.1.2 Localización tisular en tallo	73
III.1.3 Regulación de la expresión de Cs HSP17.5	76
III.1.3.1 Expresión en semilla	76

III.1.3.2 Expresión en plántula en respuesta a estrés controlado	78
Estrés de calor	78
Tratamiento de 4°C	80
Tratamiento salino	80
Ácido salicílico. Ácido jasmónico. Herida	80
III.1.3.3 Patrón de expresión estacional en castaños adultos	83
III.2 Estudios de funcionalidad <i>in vivo</i>	85
III.2.1 Expresión heteróloga en <i>E. coli</i>	85
III.2.1.1 Expresión mediante el sistema pET 11d	85
III.2.1.2 Expresión mediante el sistema pRSET b	89
III.2.2 Tratamientos de estrés <i>in vivo</i>	93
III.2.2.1 Análisis de la viabilidad celular a 50°C.	
Termoestabilidad de proteínas solubles	93
III.2.2.2 Análisis de la viabilidad celular a 4°C	96
III.2.3 Estudio de la asociación a membrana	98
III.3 Estudio preliminar estructura-función	100
DISCUSIÓN	
Proteínas sHSP de <i>C. sativa</i> Mill.	106
Actividad chaperona molecular de Cs HSP17.5	107
Posible funcionalidad <i>in vivo</i>	108
Expresión de sHSP en castaño	110
Relaciones estructura-función	113
RESUMEN Y CONCLUSIONES	115
BIBLIOGRAFÍA	118

SUMMARY

SUMMARY

Heat stress leads to virtual interruption of protein synthesis in organisms; however, expression of a subset of proteins is then induced, the so-called HSPs (heat shock proteins). HSPs are classified in five families, and the low molecular weight one (sHSPs) dominates heat shock response in plants. These proteins have been less studied than the members of the high molecular weight families, and most papers on sHSPs have focused on herbaceous species. The present study deals with sHSPs from chestnut, a mesophytic tree species, whose desiccation-sensitive mature seeds have one of the highest moisture levels described and accumulate significant amounts of sHSP.

In this thesis the mayor sHSP in chestnut seeds has been identified and its cDNA isolated and sequenced. This protein belongs to the cytosolic class I family of sHSPs, and has been named Cs HSP17.5. The cytosolic location of Cs HSP17.5 has been shown by electron immunomicroscopy of cotyledonary cells. The constitutive presence of Cs HSP17.5 in chestnut stem is also reported; such observation has never been described in herbaceous plants. In stems, Cs HSP17.5 appears to accumulate mainly at the secondary phloem and cambium regions.

The expression of Cs HSP17.5 during seed maturation and germination, as well as in stressed plantlets has been analyzed. The most remarkable induction was caused by extreme temperatures, both high (32°C and 40°C) and low (4°C). The seasonal expression patterns of Cs HSP17.5 in stems of adult trees has also been investigated.

The *in vitro* molecular chaperone activity of purified Cs HSP17.5 has been studied, using endochitinase Cs Ch1 as substrate (Cs Ch1 is one of the most abundant proteins in mature chestnut seeds). Reactivation of chemically denatured Cs Ch 1 by Cs HSP17.5 has been shown to be ATP-independent.

Finally, stable Cs HSP17.5 was heterologously expressed in *E. coli*. These bacteria were then used to investigate the *in vivo* activity of the protein. Cs HSP17.5 protects cells from heat stress; moreover, an increase in the thermostability of soluble bacteria proteins has been observed. In addition, Cs HSP17.5 protects cells from the effect of low temperatures, increasing their viability at 4°C. This protective effect has not been previously described for plants sHSPs.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

I. PLANTEAMIENTO GENERAL DE LA TESIS

Entre los factores que más inciden sobre la productividad vegetal y que limitan de forma significativa la distribución corológica de las especies se encuentran las temperaturas y la disponibilidad de agua en el suelo. Ambos factores registran sus mayores variabilidades estacionales en las regiones templadas del globo. Las especies adaptadas a tales climas han desarrollado una serie de adaptaciones y mecanismos defensivos, no siempre bien caracterizados, con los que hacer frente a las situaciones de estrés ambiental producidas. Cuando la temperatura sube demasiado por encima del óptimo de crecimiento, los vegetales, como todos los seres vivos, responden disminuyendo drásticamente la síntesis de la mayor parte de proteínas y ARNm. Simultáneamente se inicia o incrementa la síntesis de un determinado grupo de proteínas denominadas *proteínas de choque térmico* (*HSP, heat shock proteins*), implicadas en la defensa frente a las altas temperaturas.

El objetivo central de este trabajo es el estudio de la familia de HSP más relevante para las células vegetales: las HSP de bajo peso molecular (*sHSP, small HSP*). Como especie modelo se ha empleado el castaño (*Castanea sativa* Mill.), una de las angiospermas arbóreas consideradas de interés prioritario en los planes forestales de la Unión Europea. El motivo de la elección fue doble: 1) Por una parte, su distribución geográfica se sitúa exclusivamente en la zona templada septentrional europea, desde el Mediterráneo a Centroeuropa, presentando avanzadas en el Norte de África y el Cáucaso. A lo largo del año, por lo tanto, debe hacer frente a temperaturas extremas, a menudo inferiores a 0°C en invierno y superiores a 30°C en verano, así como en ocasiones a una sequía estival. Tal es el caso de la localidad seleccionada para la recogida de muestras (Zarzalejo, Madrid). 2) Por otra parte, las semillas maduras de esta especie poseen uno de los mayores contenidos en agua del reino vegetal, lo que las hace *a priori* más

susceptibles a varios tipos de estrés, incluido el térmico. Todos estos factores hacen del castaño una especie forestal interesante para el estudio de los mecanismos de defensa frente al estrés abiótico en general y de las HSP en particular.

A ello hay que añadir, finalmente, la ausencia casi total de estudios sobre las respuestas moleculares al estrés abiótico en plantas leñosas. Es destacable en este contexto que algunos de los objetivos planteados en la tesis, como los estudios de expresión en tejidos vegetativos, hayan llevado a resultados diferentes de los obtenidos con especies herbáceas.

II. EFECTOS DEL ESTRÉS TÉRMICO SOBRE LOS ORGANISMOS

Los seres vivos están adaptados a desarrollarse dentro de un determinado intervalo de temperatura. Unas temperaturas que superen dicho rango pueden provocar daños incluso letales sobre el individuo. Entre estos daños se encuentra la desnaturalización de las proteínas, que a temperaturas elevadas se ve muy favorecida por el fuerte aumento de entropía que conlleva. Estas proteínas desnaturalizadas o parcialmente desplegadas tienden además a agregarse formando complejos insolubles.

Los organismos vivos adoptan dos tipos de estrategia frente al estrés térmico: por un lado, intentar evitar que su temperatura interna alcance niveles excesivos y, por otra parte, contrarrestar los efectos nocivos, tolerando, al menos parcialmente, el calor.

Estudios realizados a comienzos de los años 80 con plantas en situaciones no desecantes revelaron que cuando las temperaturas suben 5 o más grados sobre el óptimo de crecimiento, la síntesis de la mayor parte de las proteínas y ARNm disminuye drásticamente, mientras que se inicia la transcripción y traducción de un determinado grupo de genes. Las proteínas resultantes de esta inducción se llamaron proteínas de choque térmico (*heat shock proteins, HSP*) y se pensó que posiblemente estuvieran relacionadas con la defensa frente a los efectos de las altas temperaturas (Nover *et al.*, 1984; Lindquist, 1986). Este fenómeno se encuentra muy conservado, tanto en eucariotas como en procariontes, lo que sugiere que las HSP forman parte importante de los mecanismos defensivos desarrollados por los seres vivos frente al estrés térmico.

Numerosos resultados indican que la mayor parte de las HSP actúan como *chaperonas moleculares*. Las chaperonas o proteínas tutoras colaboran en el plegado de otras proteínas, uniéndose de forma reversible a las zonas desplegadas de los polipéptidos. Evitan de este modo interacciones que conllevarían la adquisición de estructuras tridimensionales incorrectas o incluso la formación de agregados insolubles (Fink, 1999; Feder y Hofmann, 1999; Feldman y Frydman, 2000).

La formación de proteínas nativas a partir de un estado desplegado es un proceso espontáneo, en el cual una secuencia de aminoácidos alcanza un mínimo de energía libre (Anfinsen, 1973). Sin embargo, las condiciones experimentales requeridas para lograr un correcto plegado de proteínas, sobre todo de tamaño medio y grande son muy restrictivas: habitualmente es necesario emplear una concentración muy baja de péptidos y el proceso debe llevarse a cabo a temperaturas inusualmente bajas, requiriendo además tiempos de incubación muy elevados. Todas estas condiciones difieren notablemente del ambiente en que las proteínas alcanzan su estructura tridimensional en los seres vivos: las proteínas se sintetizan y pliegan rápidamente en un ambiente celular muy concentrado y a temperatura a menudo superior a la ambiental, con lo que las interacciones hidrofóbicas son mayores; en estas condiciones la desnaturalización y la agregación de las proteínas se verían muy favorecidas. Es evidente, por tanto, la necesidad de chaperonas moleculares para evitar la agregación de péptidos durante el plegado de nuevas proteínas, para prevenir su interacción con otros componentes celulares y para dirigir el correcto plegado de las proteínas y la formación de multímeros, así como durante estreses que pueden causar la desnaturalización de proteínas nativas. En los casos que se han estudiado hasta la fecha, las rutas de plegado de proteínas *in vivo* e *in vitro* son similares (Fink, 1999; van der Berg, 1999).

Sin embargo, las HSP no sólo se sintetizan en respuesta al choque térmico, sino que también lo hacen frente a determinados tratamientos químicos o, en ciertos casos, en determinadas etapas del desarrollo ontogénico (Vierling, 1991; Feder y Hofmann, 1999).

III. CLASIFICACIÓN DE LAS HSP

Las HSP se han agrupado en distintas familias según su estructura primaria, dando lugar a cinco grupos fundamentales, designados en función de su peso molecular aproximado en kDa como HSP100, HSP90, HSP70, HSP60 y las HSP de bajo peso molecular, sHSP (*small HSP*). Las proteínas objeto del presente estudio pertenecen a este último grupo, que es el más importante en la respuesta al estrés térmico por parte de las células vegetales.

III.1 HSP 100

Las proteínas de choque térmico de mayor tamaño se agrupan en la familia HSP100, también denominada familia Clp (*Caseinolytic protease*). Se trata de proteínas con actividad ATPasa, muy conservadas evolutivamente y presentes tanto en procariotas como en eucariotas. Constituyen un caso particular dentro de las chaperonas descritas, puesto que facilitan la solubilización y eliminación de agregados de proteínas desnaturalizadas (por lo que también se las denomina “*unfoldases*”). Este proceso implica la participación de otras chaperonas (HSP70, fundamentalmente) y proteasas (Glover y Lindquist, 1998; Horwich *et al.*, 1999; Goloubinoff *et al.*, 1999). Las proteínas de esta familia fueron inicialmente relacionadas con la adquisición de termotolerancia en levaduras (Chernoff *et al.*, 1995). En cuanto a los vegetales, se han descrito recientemente mutantes de *Arabidopsis thaliana* defectivos en la adquisición de termotolerancia debido a modificaciones en la proteína HSP101 que provocaban la pérdida de actividad ATPasa (Hong y Vierling, 2000).

III.2 HSP 90

Los estudios funcionales realizados hasta la fecha con las HSP90 sugieren que no son esenciales para la adquisición de termotolerancia. En condiciones de estrés, las HSP90 no impedirían la inactivación térmica de las proteínas, pero sí las mantendrían en un estado que permitiría la posterior reactivación por otras chaperonas, como las HSP70. Tal y como se ha visto a través de experimentos *in vitro*, la actividad de las HSP90 implica la hidrólisis de ATP (Nathan *et al.*, 1997; Pearl y Prodromou, 2000). Los trabajos sobre su actividad chaperona *in vivo* se han centrado en la maduración de receptores hormonales, manteniendo a éstos en una conformación adecuada hasta la llegada del activador (Pratt, 1997; Pearl y Prodromou, 2000). Esta función es compatible con la implicación descrita de las HSP90 en la gametogénesis de hongos y animales (Loubradou *et al.*, 1997; Yue *et al.* 1999), así como en el crecimiento de vegetales (Krishna *et al.*, 1995).

Además de la inducción de la expresión de HSP90 en respuesta a las altas temperaturas, se ha descrito un incremento en la transcripción de HSP90 provocado por el frío en *Brassica napus*, lo que sugeriría la participación de estas proteínas en la adaptación a las bajas temperaturas (Krishna *et al.*, 1995).

III.3 HSP70

Se trata de una de las familias más estudiadas, ampliamente extendida tanto en procariotas como en eucariotas. Presentan una gran diversidad, existiendo, además de las inducibles en respuesta al choque térmico, otras proteínas homólogas que se expresan constitutivamente, como las HSC70. En eucariotas las HSP70 se agrupan en subfamilias según su localización subcelular: HSP70 citoplásmicas, HSP70 del retículo endoplásmico, HSP70 mitocondriales y, en el caso de los vegetales, HSP70 cloroplásticas, si bien son codificadas por el ADN nuclear y la traducción tiene lugar en el citosol. Las HSP70 se sitúan entre las proteínas más conservadas evolutivamente, dándose la mayor similitud entre los miembros de una subfamilia, aun pertenecientes a especies distintas. Los dominios más conservados entre las HSP70 se encuentran en la mitad N-terminal de la secuencia proteica. En dicho extremo se encuentran las señales que determinan la localización subcelular, específicas de cada familia y altamente conservadas entre sus miembros (Bukau y Horwich, 1998).

La actividad chaperona de las HSP70 no parece ejercerse mayoritariamente sobre polipéptidos sintetizados *de novo*, sino sobre proteínas ya maduras, protegiéndolas del choque térmico y facilitando su recuperación del mismo. Durante este proceso las HSP70 exhiben también actividad ATPasa, situándose en el extremo N-terminal de las mismas la región de unión al ATP. Por su parte, la especificidad respecto al sustrato vendría determinada por el extremo carboxilo (Bukau y Horwich, 1998; Hesterkamp y Bukau, 1998).

Aunque menos estudiadas, las HSP70 vegetales también han sido relacionadas con la adquisición de termotolerancia (Woolf y Lay-Yee, 1997; Park *et al.*, 1997).

III.4 HSP60

Las proteínas de esta clase son las HSP en los procariotas, encontrándose también en el citosol, mitocondria y cloroplasto de eucariotas; hay miembros de esta familia abundantes en la célula aun en ausencia de altas temperaturas, denominados chaperoninas o cpn60 (Martin y Hartl, 1997; Braig, 1998).

GroEL, de *Escherichia coli*, es probablemente la chaperona molecular mejor estudiada y, por tanto, el miembro mejor conocido de esta familia. Tiene una estructura en forma de cilindro hueco, formado a su vez por dos elementos toroidales (Braig *et al.*, 1994; Xu *et al.*, 1997). Su mecanismo de actuación es bien conocido, y se encuentra descrito profusamente en Fenton y Horwich, (1997), Richardson *et al.* (1998) o Horwich *et al.* (1999). GroEL lleva a cabo su actividad chaperona en colaboración con una pequeña proteína denominada GroES, que se une al extremo del cilindro a modo de tapa cónica, encerrando en la cavidad resultante al péptido sustrato. El plegado del sustrato se lleva a cabo, presumiblemente, a través de repetidos ciclos de unión y liberación del mismo, en un proceso que conlleva un gasto de energía en forma de ATP. Éste se une al otro extremo del cilindro y su hidrólisis provoca un cambio conformacional en el complejo GroEL/ES que supone la liberación del sustrato. El mecanismo de actuación de las demás HSP60 y cpn60 es probablemente muy similar, pues también requieren para su actuación la cooperación de un cofactor, denominado HSP10 o cpn10, respectivamente.

Las proteínas de esta familia han sido vinculadas a la respuesta a diversos estreses, no solamente por altas temperaturas. Así, por ejemplo, se acumulan HSP60 en respuesta a estrés tóxico en el nemátodo *Plectus acuminatus* (Kammenga *et al.*, 1998) o a metales pesados en el anfípodo *Hyaella azteca* (Werner y Nagel, 1997). Por su parte, las cpn60 cloroplásticas, así como el sistema GroEL/ES de los procariotas, tienen un papel determinante en el plegado de las subunidades de rubisco y pueden estar asimismo implicadas en el ensamblaje de las mismas (Vierling, 1991)

IV. HSP DE BAJO PESO MOLECULAR

Las HSP de bajo peso molecular (sHSP, *small HSP*) presentan unos pesos moleculares comprendidos entre los 15 y los 30 kDa. Este grupo ha sido muy poco estudiado en comparación con otras HSP. No obstante, tiene una especial relevancia en los vegetales, pues está muy diversificado y es el que domina en dicho reino la síntesis proteica durante el choque térmico, frente a otras familias de mayor tamaño que son las HSP mayoritarias en otros eucariotas (Vierling, 1991; Boston *et al.*, 1996). En animales, por ejemplo, las sHSP son un grupo poco diverso, siendo el miembro mejor caracterizado la α -cristalina (Graw, 1997; Derham y Harding, 1999).

La familia de las sHSP presenta en los vegetales una estructura muy diversa. Cada especie suele expresar varias proteínas de esta familia, habiéndose llegado a detectar la expresión de hasta 20 variantes diferentes en una misma especie. Sin embargo, se ha estudiado aún poco acerca de su estructura y función (Vierling, 1991; Boston *et al.*, 1996; Waters *et al.*, 1996).

IV.1 Aspectos bioquímicos de las sHSP

Las sHSP se han agrupado en clases, en función de la similitud de sus secuencias y de la localización subcelular, si bien las sHSP localizadas en orgánulos sólo han sido descritas en vegetales (Waters *et al.*, 1996; Waters y Vierling, 1999). Las familias definidas son: citosólicas de clase I y de clase II, cloroplásticas, mitocondriales y sHSP del retículo endoplásmico.

Las sHSP presentan ciertas diferencias a nivel bioquímico con las HSP 70, las proteínas de choque térmico más abundantes en células de mamíferos. Así, frente al alto grado de conservación de éstas (alrededor de un 50% de identidad secuencial entre las HSP 70 de eucariotas y las de procariotas) (Bukau y Horwich, 1998), las sHSP presentan mucha menor similitud en su secuencia de aminoácidos, no sólo entre distintas especies,

sino entre las distintas clases de sHSP. El mayor grado de similitud se da en el extremo carboxilo-terminal (mientras que en las HSP 70 las zonas más conservadas pertenecen a la mitad amino-terminal), en un dominio a veces denominado “dominio α -cristalina”. Este dominio contiene alrededor de cien aminoácidos. Dentro de esta zona cabe diferenciar incluso dos subdominios, denominados *consensos I* y *II*, que están separados por una región hidrófila de longitud variable (Vierling, 1991; Jinn *et al.*, 1995; Waters *et al.*, 1996). El consenso I se sitúa en una posición C-terminal respecto al consenso II. Dentro del consenso I existe una secuencia común a la mayoría de las sHSP conocidas. Esta señal consta de un residuo Pro en posición amino respecto a una típica secuencia Gly-Val-Leu. Los catorce residuos que separan la prolina de este trío son variables en las distintas proteínas estudiadas. El consenso II contiene en la mayor parte de las sHSP conocidas la siguiente estructura: desde la posición amino, una prolina separada esta vez por 15 aminoácidos de la señal {Val, Leu, Ile} - {Val, Leu, Ile} (Vierling, 1991; Waters *et al.*, 1996).

El extremo amino-terminal presenta mucha mayor divergencia entre las distintas clases. Las sHSP del retículo, del cloroplasto y de la mitocondria presentan en esta zona las señales típicas de las proteínas localizadas en dichos orgánulos (Waters *et al.*, 1996). Merced a estas señales pueden atravesar las membranas de los mismos, dado que, como ocurre con los otros tipos de HSP, no se han encontrado sHSP codificadas por el genoma de los orgánulos ni que se traduzcan en ellos (Vierling, 1991). Existen también en esta mitad dominios de consenso típicos de cada subfamilia (Chen y Vierling, 1991; Waters, 1995). Así, por ejemplo, las sHSP del cloroplasto tienen una región de consenso (consenso III) de unos veintiocho aminoácidos, rica en metionina (Vierling, 1991; Chen y Vierling, 1991), que es la más conservada entre estas proteínas, mientras que las citosólicas de la clase II tienen una zona de unos once residuos, nueve de los cuales se conservan idénticos en la mayoría de las proteínas de esta familia estudiadas. La presencia de estos dominios altamente conservados, únicos para cada clase, sugiere que tienen un relevante significado funcional (Waters *et al.*, 1996).

In vivo, las sHSP de muchos organismos se encuentran formando complejos globulares de alto peso molecular, de 200 a 800 kDa (Waters *et al.*, 1996); estas

estructuras también se forman al expresar sHSP recombinantes, en *E. coli* (Lee et al. 1995a). El oligómero mejor estudiado hasta la fecha es el formado por la proteína de *Methanococcus jannaschii* Mj HSP16.5, la única sHSP de la que se ha obtenido una estructura cristalográfica (Kim et al., 1998a,b). El complejo presenta una estructura de esferoide hueco, con ocho “ventanas” triangulares y seis cuadradas en su superficie; el diámetro exterior del esferoide es de unos 120 Å, mientras que el interior ronda los 65. El oligómero tiene una simetría triaxial, distinguiéndose subunidades de 8 elementos cada una; el resultado final es un oligómero de 24 subunidades con simetría octaédrica. Cada monómero cuenta con 9 láminas β dispuestas en 2 capas, 2 cortas hélices α y una nueva lámina β más corta que las anteriores. Los monómeros se unen dos a dos mediante interacciones hidrofóbicas entre sus láminas β , presentando también múltiples contactos hidrofóbicos con otras subunidades del complejo. La parte interior de la esfera tiene un carácter más hidrofóbico que la superficie y al parecer alberga las colas N-terminales, mucho más desordenadas que el resto del monómero.

En el caso de Mj HSP16.5 no se ha citado la existencia de oligómeros distintos del descrito; del mismo modo, para otras sHSP sólo existe evidencia experimental para la existencia de un único tipo de oligómero, como el nonámero de Mt HSP16.3 de *Mycobacterium tuberculosis* (Chang et al., 1996) o el dodecámero de la proteína objeto del presente estudio, la Cs HSP17.5 de *Castanea sativa* (Collada et al., 1997). Sin embargo, para otras sHSP se ha descrito la existencia de múltiples formas de oligomerización. Es el caso de Ce HSP16.2, de *Caenorhabditis elegans*, que presenta una mezcla heterogénea de oligómeros de 14 a 24 unidades al ser expresada heterológamente en *E. coli* (Leroux et al., 1997) o el de la α B-cristalina humana también recombinante, que forma complejos esféricos con diámetros que van de 8 a 18 nm (Haley et al., 1998). Un reciente estudio llevado a cabo con α -cristalina bovina (Vanhoudt et al., 2000) muestra cómo la oligomerización de esta proteína a 37°C depende de su concentración. Así, *in vivo* la proteína forma oligómeros de unos 700 kDa, mientras que, diluida, aparece una forma de 550 kDa. Los autores proponen que, durante la interacción con el sustrato, el oligómero sufre importantes modificaciones en su estructura. En este sentido hay un detallado estudio sobre la HSP25 de ratón en el que se propone la existencia de un

equilibrio dinámico entre los distintos oligómeros de la proteína, que se uniría al sustrato en varias de esas formas (Ehrnsperger *et al.*, 1999).

Aunque la mayor parte de los trabajos realizados tanto *in vivo* como *in vitro* sugieren que las sHSP no forman hetero-oligómeros funcionales entre subunidades de distintas proteínas (Lee *et al.*, 1995a; Waters *et al.*, 1996), se ha descrito, en cambio, la formación de complejos heterogéneos formados por subunidades de HSP25 y α -cristalina de mamíferos, al parecer originados por intercambio de subunidades entre homo-oligómeros. No obstante, estos complejos se disocian durante el choque térmico, recuperándose los homo-oligómeros funcionales (Kato *et al.*, 1992; Merck *et al.*, 1993; Sun *et al.*, 1998).

Los oligómeros de sHSP tienen la propiedad de agregarse en estructuras mayores, de hasta 1 MDa. Estas estructuras insolubles se denominan habitualmente HSG (*heat shock granules*). Su formación tiene carácter reversible y ocurre fundamentalmente a temperaturas mayores que las que inducen simplemente la síntesis de sHSP. Sin embargo, parece que la actividad funcional *in vivo* es llevada a cabo principalmente por los complejos de 200-300 kDa (Waters *et al.*, 1996; Fink, 1999).

IV.2 Actividad de las sHSP

Existen numerosos trabajos recientes que aportan pruebas de la actividad chaperona de las sHSP *in vitro*. Por ejemplo, en vegetales, Lee *et al.* (1995a), en un estudio con formas recombinantes de las proteínas de guisante Ps HSP17.7 y Ps HSP18.1, demostraron la capacidad de estas proteínas de renaturalizar *in vitro* enzimas (citrato sintasa y lactato deshidrogenasa) desnaturalizados químicamente; en el mismo trabajo se indica que estas sHSP impiden la formación de agregados insolubles y la inactivación térmica de la citrato sintasa. Nuestro grupo ha demostrado la actividad chaperona de una sHSP purificada de semilla de *Castanea sativa*, favoreciendo la reactivación de la citrato sintasa de mamífero previamente desnaturalizada con cloruro de guanidinio (Collada *et al.*, 1997). Esta actividad *in vitro* también se ha descrito para sHSP no vegetales. Así,

Leroux *et al.* (1997), refieren que la proteína de *Caenorhabditis elegans* Ce HSP16.2 impide *in vitro* la formación de agregados insolubles de citrato sintasa desnaturalizada química o térmicamente. Más recientemente Yang *et al.* (1999), han señalado esa misma actividad para la proteína Mt HSP16.3 de *Mycobacterium tuberculosis* respecto a la agregación térmica de la insulina B humana.

Por el contrario, hay una gran carencia de estudios que muestren la actividad chaperona *in vivo* de este tipo de proteínas. Uno de estos estudios, publicado durante la realización del presente trabajo, es el de Yeh *et al.* (1997), que señalan que la sobreexpresión en *E. coli* de una fusión de la proteína de arroz Os HSP16.9 con la glutatión-S-transferasa (GST) supone un incremento en la resistencia a las altas temperaturas. Muy recientemente se ha referido la actividad chaperona *in vivo* de dos sHSP citosólicas de tomate, de las clases I y II, expresadas en cultivos de células de *Arabidopsis thaliana*, previniendo la inactivación térmica de la luciferasa (Löw *et al.*, 2000).

Todos estos trabajos señalan la poca especificidad respecto al sustrato mostrada por las sHSP, al igual que la mayoría de las chaperonas de mayor peso molecular (Fink, 1999). En este sentido Kim *et al.* (1998b), con la Mj HSP16.5 de *Methanococcus jannaschii*, o Young *et al.* (1999), con la citada Os HSP16.9, indican la protección genérica ejercida por las sHSP sobre las proteínas solubles de *E. coli* frente a temperaturas elevadas.

En uno de los estudios más completos sobre la actividad chaperona *in vitro* de estas proteínas, llevado a cabo sobre la antes mencionada Ps HSP18.1 (Lee *et al.*, 1997) los autores proponen que la sHSP se une al sustrato desnaturalizado, permitiendo su posterior renaturalización, en un proceso dependiente de ATP, por parte de otras chaperonas. Posteriormente, este mismo grupo ha referido la renaturalización, por encima del 80%, de la luciferasa inactivada térmicamente, unida a Ps HSP18.1, por parte del complejo de HSP70 humano, en una reacción que implica consumo de ATP (Lee y Vierling, 2000). A este esquema también se ajustarían, por ejemplo, los resultados obtenidos por Ehrnsperger *et al.* (1997), con sHSP de ratón: la renaturalización por parte

de HSP70 bovina, con gasto de ATP, de la citrato sintasa desnaturalizada se ve favorecida por la unión previa del sustrato a la HSP25 del roedor. Esta cooperación entre distintas chaperonas se ve apoyada por resultados como los de Jinn *et al.* (1995), según los cuales la protección de proteínas solubles frente a temperaturas elevadas exige la presencia de sHSP, no bastando las HSP de mayor tamaño.

En todos los casos referidos, la actividad de las propias sHSP ha resultado independiente del consumo de energía en forma de NTP. Sin embargo, Muchowski y Clark, (1998), han señalado la dependencia del consumo de ATP por parte de la α B-cristalina humana, lo que aparta a esta peculiar sHSP del modelo propuesto para la generalidad de las proteínas de este tipo.

En resumen, según el modelo de actuación *in vivo* más favorecido por los datos existentes, las sHSP forman parte de un complejo sistema defensivo desarrollado por los seres vivos frente a la desnaturalización y agregación de sus proteínas, provocadas por diversos estreses. Dentro del mismo, las sHSP se unen a las proteínas en sus primeras etapas de desnaturalización, impidiendo la formación irreversible de agregados insolubles, y permitiendo posteriormente la recuperación de las estructuras nativas o la degradación de las proteínas inactivadas por parte de otras chaperonas moleculares o de proteasas, respectivamente, en procesos que conllevan gasto de ATP. Existen abundantes referencias que apuntan hacia una cooperación, dentro de este marco, de las sHSP con las HSP70, aunque sin que se den interacciones específicas entre ambos tipos de chaperona (Forreiter *et al.*, 1997; Lee y Vierling, 2000). En este sistema, revisado recientemente por Wickner *et al.* (1999) y Horwich *et al.* (1999), el destino de cada proteína dañada, reestructuración o eliminación, está gobernado por un delicado balance, aún no bien conocido, en el que intervienen la concentración de péptidos desplegados y el grado de desnaturalización de los mismos.

IV.3 Relaciones estructura-función

La forma en que las sHSP interactúan con los sustratos no es bien conocida. En el medio acuoso celular, las proteínas en su conformación nativa exponen regiones hidrofílicas, mientras que, en las proteínas parcialmente desplegadas, ciertas regiones hidrofóbicas quedan al descubierto. En tales condiciones estas regiones tienden a unirse entre sí, adoptando conformaciones a menudo incorrectas e incluso formando agregados insolubles. De acuerdo con la teoría generalmente admitida, las sHSP reconocerían las regiones de la proteína sustrato que no se encuentran en la conformación nativa, uniéndose a las mismas mediante interacciones hidrofóbicas (Waters *et al.*, 1996). Yang *et al.* (1999) y Vanhoudt *et al.* (2000), abundan en este modelo, afirmando que la chaperona sufre durante el estrés drásticos cambios conformacionales, exponiendo a su vez regiones hidrofóbicas que se unirían al sustrato. Sin embargo, hasta la fecha no se ha dilucidado cuáles son estas regiones responsables de la actividad chaperona.

Según el modelo de estructura tridimensional de los oligómeros de sHSP propuesto por Leroux *et al.* (1997), coincidente con el posteriormente determinado experimentalmente por Kim *et al.* (1998a) para la proteína de *Metanococcus jannaschii* Mj HSP16.5, los extremos N-terminales de los monómeros se proyectarían hacia el interior hueco del complejo. A partir de esta estructura, Leroux *et al.* (1997), proponen que la interacción entre el sustrato y la chaperona se produce en la región “ α -cristalina” de la zona C-terminal, que quedaría expuesta en la superficie del oligómero. La unión entre las unidades del complejo se lograría mediante interacciones entre las regiones N-terminales de éstos; la región C-terminal también contribuiría al mantenimiento de la solubilidad y estabilidad del oligómero.

Sin embargo, en un estudio realizado con la proteína de arroz Os HSP16.9, Yeh *et al.* (1997), obtuvieron unos resultados que contradicen este modelo: expresando en *E. coli* la proteína completa, así como distintos fragmentos de la misma, observaron que la resistencia frente a un tratamiento de calor (47.5°C) mostrada por las bacterias que expresaban un fragmento de proteína que comprendía la zona N-terminal y el consenso II, pero no el I, era comparable a la de las que expresaban la proteína completa, y mayor que

la exhibida por las bacterias que expresaban la región C-terminal, incluidos los consensos I y II, pero que carecían del extremo amino, cuya resistencia era similar a la del control negativo. De este experimento se deduce que la presencia del consenso II es necesaria para la actividad chaperona de la proteína, si bien no es suficiente por sí misma, mientras que el consenso I no es necesario para tal actividad. La implicación del extremo N-terminal en la actividad chaperona es apoyada asimismo por los resultados obtenidos por Kim *et al.* (1998a,b) para MjHSP16.5. El modelo tridimensional del oligómero de esta proteína (único obtenido experimentalmente hasta la fecha), mencionado anteriormente, consiste en una esfera hueca fenestrada, con las regiones amino-terminales en el interior; el tamaño de las “ventanas” en la superficie del complejo sería suficiente para permitir el paso de pequeños péptidos desplegados, que podrían así adquirir su correcta estructura tridimensional en el interior del complejo en contacto con los extremos N-terminales de las subunidades.

Por el contrario, los estudios de Lee *et al.* (1997), con la Ps HSP18.1 de guisante apuntan de nuevo hacia el consenso II como la zona de unión hidrofóbica al sustrato, que recubriría el oligómero; el consenso I participaría en la formación de dichos oligómeros. Por su parte, un reciente estudio realizado sobre la α B-cristalina humana muestra un descenso en la actividad chaperona de la proteína provocado por mutaciones en el dominio α -cristalina, que incluye los consensos I y II, y no por mutaciones similares en la región N-terminal (Muchowski *et al.*, 1999b).

Esta disparidad de resultados puede explicarse a la luz de un reciente trabajo sobre estructura proteica y evolución molecular (Mirny *et al.*, 1998). En el mismo los autores proponen que los residuos que tienden a estar más conservados evolutivamente son aquéllos con una mayor importancia estructural, esto es, los residuos que determinan la rápida adquisición de una estructura tridimensional estable, pudiendo encontrarse las posiciones “funcionales” en distintas zonas de la secuencia. De este modo los consensos I y II tendrían un papel en primera instancia estructural, que determinaría la formación de los oligómeros; el sustrato podría unirse en algunos casos al consenso II y en otros a regiones más amino-terminales. Este punto de vista sería compatible con las numerosas

referencias que señalan que las sHSP exhiben actividad chaperona principalmente en su forma oligomérica (Jinn *et al.*; 1995; Leroux *et al.*, 1997).

IV.4 Expresión de las sHSP

Como se ha demostrado para muchas otras HSP, la regulación de la expresión de las proteínas de choque térmico de bajo peso molecular tiene lugar fundamentalmente en el nivel transcripcional, y presenta ciertos elementos comunes con las demás HSP. Si bien la expresión de las HSP ha sido objeto de numerosos estudios, la mayor parte de ellos referidos a HSP animales de alto peso molecular, dicho proceso no está aún totalmente esclarecido. Los datos obtenidos hasta la fecha se encuentran revisados en trabajos recientes como los de Morimoto, (1998) o Santoro, (1999). En el promotor del gen que codifica la HSP se encuentra el denominado elemento de choque térmico (HSE, *heat shock element*), muy conservado en todos los eucariotas. Los HSE consisten en múltiples repeticiones palindrómicas del motivo 5'-nGAAn-3'. Estas secuencias son reconocidas por los factores de transcripción de choque térmico (HSF, *heat shock factor*), que se unen a los mismos, funcionando como activadores transcripcionales. Los HSF se encuentran normalmente inactivos en el citosol; tras penetrar en el núcleo, se unen formando trímeros activos. Posteriormente, la unión de las propias HSP o de otras proteínas como la HSBP1 (*heat shock factor binding protein 1*) inactivará el trímero, que, tras abandonar el núcleo se separará de nuevo en monómeros. En todo caso, la ruta de activación de los HSF no es aún bien conocida (Morimoto, 1998).

IV.4.1 Expresión de las sHSP durante el estrés térmico

En plantas existen varios genes codificando HSF, y su activación está diferencialmente regulada por el calor. En el medio natural las altas temperaturas se alcanzan de forma progresiva, y diversos estudios demuestran que también es progresiva la síntesis de sHSP. La temperatura a la que comienza a desplegarse la respuesta al choque térmico varía con la ecología de cada especie. Así, para las especies mesofíticas la

síntesis de sHSP comienza a temperaturas más bajas que para especies de climas más cálidos (Howarth, 1991; Vierling, 1991; Waters *et al.*, 1996).

Para las plantas adaptadas a climas templados, la síntesis de sHSP comienza cuando la temperatura de los tejidos supera los 32-33°C (en especies mesofíticas, incluso los 30°C), en los primeros 5 minutos de hipertermia. La síntesis se incrementa proporcionalmente a la temperatura, fabricándose la mayor cantidad de sHSP en los primeros 60-90 minutos. Si la temperatura se estabiliza, la producción de HSP va descendiendo hasta detenerse, y más rápidamente si la temperatura baja a niveles normales. La máxima producción se produce a temperaturas inmediatamente subletales, dependiendo de la temperatura óptima de crecimiento de cada especie (Waters *et al.*, 1996). Las temperaturas que inducen la síntesis de proteínas de choque térmico se alcanzan más fácilmente en las estructuras vegetales que muestran menos termorregulación. Así, a temperaturas óptimas de crecimiento, las estructuras reproductivas, con menos estomas o con una baja relación superficie-volumen, pueden desencadenar respuestas al choque térmico. (Vierling, 1991; Waters *et al.*, 1996).

La vida media de las sHSP se prolonga hasta 40-50 horas tras el fin del choque térmico, según las especies y las familias de sHSP, lo que se corresponde con el papel atribuido en la recuperación de la hipertermia (Vierling, 1991).

IV.4.2 Expresión en ausencia de estrés térmico

Las HSP no sólo se inducen en respuesta a las altas temperaturas, sino que también responden a otros estímulos ambientales y a determinadas fases del desarrollo o del ciclo celular. Es en estas situaciones distintas a la respuesta frente al choque térmico donde más notables son las diferencias entre las sHSP de distintos taxones. Así, por ejemplo, las sHSP han sido relacionadas en animales con procesos como la apoptosis o la formación de tumores (revisados en Arrigo, 2000 o Clark y Muchowski, 2000). En el caso de los vegetales, por el contrario, los procesos sobre los que existen más evidencias de la expresión de sHSP en ausencia de choque térmico son la formación del polen (Atkinson *et al.*, 1993; Zarsky *et al.*, 1995), el desarrollo embrionario (zur Nieden y col., 1995; Carranco *et al.*, 1997; Almoguera *et al.*, 1998), la maduración del fruto (Fray *et al.*, 1990;

Lawrence, 1993) y la maduración de la semilla (DeRocher y Vierling, 1994; Wehmeyer *et al.*, 1996).

En general, la inducción durante el desarrollo de la semilla afecta sólo a parte de las sHSP de un individuo, a determinadas clases o a determinadas proteínas de alguna clase. Así, en *Arabidopsis thaliana* sólo se ha detectado la acumulación de proteínas de la clase I citosólica en el embrión (Wehmeyer *et al.*, 1996), mientras que en *Helianthus annuus* y en *Pisum sativum* se ha referido la presencia de proteínas de las clases citosólicas I y II (Coca *et al.*, 1994; DeRocher y Vierling, 1994; Coca *et al.*, 1996). La expresión en estos casos viene regulada por varios elementos distintos, y no sólo por el HSE. Estudios recientes sugieren la existencia de distintas rutas de regulación de la expresión de las sHSP en la semilla, en respuesta a señales endógenas (desarrollo) y en respuesta a estrés (Almoguera *et al.*, 1998; Wehmeyer y Vierling, 2000).

Los tejidos en que se expresan las sHSP en las semillas en maduración dependen de cada especie, así como su cantidad y localización intracelular. Respecto a este último aspecto se ha referido en ciertos casos la acumulación de las sHSP citosólicas en la zona nuclear. Sin embargo, estas proteínas, durante la termoinducción, tienden a formar complejos en el citosol. Como además carecen de señal de localización nuclear, se piensa que quizá se unan a otras proteínas que se trasladen al núcleo (zur Nieden *et al.*, 1995)

El momento de inicio de la síntesis es característico de cada especie, así como la velocidad de degradación de las sHSP una vez cumplida su función. Generalmente la síntesis empieza después de la fecundación, aunque siempre antes de que se produzca una desecación apreciable (zur Nieden *et al.*, 1995). Este hecho ha incentivado la investigación acerca de una posible implicación de las sHSP en la tolerancia a la desecación que deben desarrollar gran parte de las semillas durante su desarrollo. Existen trabajos recientes que apoyan esta hipótesis, como pueden ser los de Coca *et al.* (1996), con girasol o Wehmeyer y Vierling (2000), con *Arabidopsis thaliana*. Corroborando esta hipótesis de la protección frente a la desecación, se ha comprobado que proteínas homólogas a sHSPs citosólicas de clase I y II (HSP17.6 y HSP17.9, respectivamente) se expresan específicamente en tallos y raíces de plantas de girasol bajo estrés hídrico

(Almoguera *et al.*, 1993). También en este sentido apunta la detección de proteínas constitutivas inmunológicamente relacionadas con HSP 17.6 y HSP 17.9 en tejidos vegetativos de la planta de resurrección, *Craterostigma plantagineum*, capaz de recuperarse de un marchitamiento casi total (Alamillo *et al.*, 1995). No obstante, el estudio de Collada *et al.* (1997), llevado a cabo con semillas de trece especies leñosas tanto ortodoxas como recalcitrantes y con diversos contenidos hídricos, llega a la conclusión de que no se puede establecer una relación directa entre el nivel de sHSP en la semilla y su tolerancia a la desecación.

La expresión de sHSP durante el desarrollo de la semilla no parece estar sujeta a una regulación del mismo tipo que la inducida por choque térmico. Esto explica la multiplicidad y diversificación de HSE en los promotores de los genes de sHSP en vegetales, así como el hecho de que estos procesos sólo impliquen a una parte de las sHSP del individuo. En este sentido, resulta especialmente interesante el trabajo de Carranco *et al.* (1997) con girasol, en el que se refiere, por vez primera, la existencia de un gen de sHSP (*Ha hsp17.6 G1*) expresado durante el desarrollo embriogénico y no inducible, sin embargo, por calor. En cualquier caso, en este tipo de expresión de sHSP deben de intervenir factores de transcripción adicionales o incluso distintos de los descritos anteriormente como implicados en la expresión durante el estrés de calor (Carranco *et al.*, 1997; Wehmeyer y Vierling, 2000).

Además de su implicación en el desarrollo de la semilla, las sHSP vegetales parecen tener otras funciones distintas de la respuesta inmediata frente al estrés por altas temperaturas. Así, han sido relacionadas, por ejemplo, con la adquisición de termotolerancia. Muchos organismos pueden llegar a soportar temperaturas normalmente letales si previamente han sido sometidos a temperaturas altas pero no letales. Las circunstancias de estos pretratamientos coinciden con aquéllas en las que se expresan las HSP, lo que ha llevado a pensar que la acumulación de éstas podría suponer parte imprescindible en el desarrollo de tal resistencia (Lin *et al.*, 1984; Kimpel y Key, 1985). Si bien generalmente se ha relacionado a HSP de mayor tamaño (sobre todo HSP70 y HSP100) con esta termotolerancia adquirida, también hay datos que implican a las sHSP vegetales, como es el caso del trabajo de Lee *et al.* (1995b), con ejemplares transgénicos

de *Arabidopsis thaliana* que expresaban constitutivamente niveles altos de HSP70 y sHSP o el más reciente de Woolf y Lay-Yee (1997), según el cual un pretratamiento a 38°C, que induce la síntesis de HSP70 y sHSP, incrementa la posterior resistencia a tratamientos de 50°C en aguacate. Del mismo modo, se ha comprobado que la presencia de dos sHSP de unos 25 kDa se hereda ligada a la termotolerancia en la gramínea *Agrostis palustris* (Park *et al.*, 1996). En el mismo sentido apuntan los resultados de Park *et al.* (1997), también con *Agrostis palustris*, según los cuales las variedades termotolerantes de esta especie se recuperan más rápidamente de las altas temperaturas merced a una mayor presencia de HSP70, HSP25 y HSP18.

También es sabido que la sobreexpresión de una o más HSP es en ocasiones suficiente para la protección frente a estreses que de otra forma podrían resultar incluso letales, tales como la exposición a agentes oxidantes o a la toxicidad inducida por etanol (Parsell y Lindquist, 1994). En este sentido, un reciente trabajo relaciona a dos sHSP con la resistencia tanto al calor como al estrés oxidativo en *E. coli* (Kitagawa *et al.*, 1999).

De especial interés es la posible implicación de las sHSP en la resistencia al frío. Una práctica habitual en la industria agroalimentaria es, desde hace años, el sometimiento a frutas y verduras a un choque térmico, con objeto de mejorar su posterior conservación en cámaras frigoríficas. Algunos estudios, como los de Sabehat *et al.* (1996, 1998) o Kadyrzhanova *et al.* (1998) con tomates sometidos a tratamientos de calor han relacionado la acumulación de HSP, incluidas sHSP, con la adquisición de una tolerancia al frío.

IV.5 Relaciones evolutivas

La mayor parte del progreso en el conocimiento de la evolución de las proteínas está teniendo lugar con proteínas animales; además, los estudios sobre evolución proteica en plantas suelen centrarse en proteínas codificadas por el cloroplasto. Por lo tanto, se sabe aún poco acerca de la evolución de las sHSP, codificadas por el genoma nuclear.

Un estudio publicado recientemente (Waters y Vierling, 1999a) refiere la presencia de sHSP citosólicas de las clases I y II en células del musgo *Funaria hygrometrica* sometidas a altas temperaturas. Este dato indica que estas clases se desarrollaron hace al menos 450 millones de años, antes de la divergencia de las plantas con semilla.

Se han propuesto dos modelos para el origen de las proteínas codificadas por el núcleo pero localizadas en orgánulos. Uno de ellos propone la transferencia del gen desde el genoma del endosimbionte al del hospedador. Al ser la proteína codificada imprescindible para el funcionamiento del orgánulo, la conservación de dicho gen sería favorecida por la selección natural, así como la adquisición de las secuencias necesarias para el acceso al orgánulo. Según el otro modelo, el origen de estas proteínas se sitúa en una duplicación de genes del genoma nuclear y, siendo equivalentes funcionalmente la proteína codificada por este gen y la del orgánulo, en algunos casos esta última terminaría por desaparecer. En un reciente trabajo sobre sHSP cloroplásticas de *Funaria hygrometrica*, Waters y Vierling (1999b) aportan datos a favor del origen de las sHSP localizadas en orgánulos por duplicación de proteínas citosólicas.

Los análisis realizados a partir de secuencias de sHSP señalan la existencia de distintas tasas de evolución según las subfamilias. De este modo, las sHSP citosólicas de la clase I y las cloroplásticas parecen estar evolucionando de manera más lenta que las citosólicas de clase II o las localizadas en el retículo endoplásmico, sugiriendo diferencias funcionales entre las subfamilias (Waters, 1995).

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL Y MÉTODOS

I. MATERIAL BIOLÓGICO

I.1 Cepas bacterianas

Se emplearon las siguientes cepas de *Escherichia coli*:

XL1-Blue MRF' (Jerpseth *et al* 1992): $\Delta(mcrA)183 \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac[F' proAB lacI^qZ\Delta M15 Tn10 (Tet^r)]$ Se empleó para el rastreo de genotecas de ADNc.

SOLR (Hay *et al.* 1992): $e14^-(McrA^+)\Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)171 sbcC recB recJ uvrC umuC::Tn5 (Kan^r) lac gyrA96 relA1 thi-1 endA1 \lambda^R [F' proAB lacI^qZ\Delta M15] Su^-$. Utilizada para la escisión de fagémidos, tras el rastreo de las genotecas.

DH5 α (Hanahan, 1983): $hsdR17(r_K^-, m_K^+) supE44 thi-1 recA1 gyrA (Nal^r) relA1 \Delta(lacZYA-argF)_{U169} (m80lacZ\Delta M15)$. Empleada para el clonaje y manipulación de fragmentos de ADN.

BL21(DE3) (Studier *et al.* 1986): *E. coli* B F $dcm ompT hsdS(r_B^-, m_B^-) gal \lambda(DE3)$. Empleada para la expresión heteróloga de proteínas.

I.2 Material vegetal

I.2.1 Muestras de campo

Como material vegetal se emplearon semillas y ramas de ejemplares adultos de *Castanea sativa* Mill., recogidas en la localidad de Zarzalejo (Madrid).

Estadíos de maduración y germinación de las semillas

Las semillas en distintos estadios de maduración fueron recogidas directamente del árbol. Se consideró como *tiempo cero* el momento de la aparición del pistilo, recogándose las semillas 90, 110 y 130 días después (M1, M2 y M3, respectivamente).

Los estadios de germinación establecidos fueron: G1 (0 días), G2 (4 días), G3 (8 días) y G4 (12 días), contados a partir del momento en que aparece la radícula.

I.2.2 Plántulas crecidas en laboratorio

Para los experimentos realizados sobre plántulas completas se procedió a la germinación en cámara de cultivo (Fitotron SGC 970/C/R0-HFL, Sanyo) de semillas recogidas en campo. Las castañas se mantuvieron a 4°C durante 15 días, tras lo que fueron sumergidas durante 48 horas en agua destilada y a continuación plantadas en vermiculita, en envases de plástico (6 cm x 6 cm x 6 cm). Se mantuvieron en el Fitotron las siguientes condiciones de luz y temperatura: 8 h de oscuridad a 18°C y 16 h de luz a 22°C, con una humedad relativa del 70% en ambos casos; la iluminación proporcionada fue de unos 20000 lux. Las plántulas se mantuvieron en las mismas condiciones durante 4 semanas, momento en que se trasplantaron a macetas de plástico (12 cm de alto x 12.5 cm de diámetro). En las macetas se empleó como sustrato una mezcla de turba y vermiculita, en una relación aproximada de 3 a 1. Con 14-20 semanas de edad, cuando habían alcanzado un tamaño apropiado, las plantas fueron sometidas a los tratamientos pertinentes. Durante todo el proceso las plántulas se regaron cada 2 días, de modo que el sustrato se mantuvo siempre húmedo.

II. MÉTODOS DE PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PROTEÍNAS

II.1 Extracción y purificación de proteínas

II.1.1 Purificación de Cs HSP17.5 de semilla

Se siguió el protocolo publicado por Collada *et al.*, 1997, para la purificación de Cs HSP17.5 a partir de harina de semilla de *C. sativa* Mill., parcialmente deslipidada con éter de petróleo. La extracción se llevó a cabo con un tampón Tris/HCl 62.5 mM, pH 6.8, PMSF (fenil-metil-sulfonil-fluoruro) 1 mM, a razón de 10 ml/mg de harina, a 4°C y durante 1 hora. Tras centrifugar a 30000 g durante 30 minutos, se sometió al sobrenadante a una precipitación fraccionada con sulfato amónico. Para eliminar el sulfato de las fracciones éstas fueron dializadas, liofilizándose a continuación. En la fracción correspondiente al 90-100% de saturación de sulfato Cs HSP17.5 es el único polipéptido presente.

Se comprobó de manera rutinaria la actividad chaperona *in vitro* de la proteína purificada, siguiendo el protocolo descrito por Collada *et al.*, 1997.

II.1.2 Purificación de la endoquitinasa de castaña Cs Ch1

El protocolo de purificación seguido fue el descrito por Collada *et al.* 1992, a partir de harina de castaña, parcialmente deslipidada con éter de petróleo. Se empleó en este caso un tampón Tris/HCl 50 mM, pH 8.2, NaCl 0.5 M, a razón de 10 ml/mg de harina. La extracción se realizó a 4°C durante 1 hora. Tras centrifugar a 30000g durante 30 minutos, el sobrenadante fue sometido a una precipitación con un 70% de saturación de sulfato amónico. Tras una nueva centrifugación en idénticas condiciones a la anterior, se recogió el precipitado, que fue disuelto en tampón de extracción. Mediante la adición de HCl se rebajó el pH hasta 3.5. Se realizó entonces otra centrifugación, y el sobrenadante fue dializado frente a Tris/HCl 20 mM, pH 8.0. A continuación se insertó en una columna

de quitina (45 cm x ϕ 2.5 cm) equilibrada con el mismo tampón. La elución se realizó con 250 ml del mismo tampón, seguido de 250 ml de acetato sódico 20 mM, pH 5.5 y 250 ml de ácido acético 20 mM, pH 3.2. Las fracciones se concentraron en acetato sódico 10 mM, NaCl 0.08 M (pH 5.3) mediante filtros (Centrifugal Ultrafree, Millipore). Finalmente, la muestra se sometió a una cromatografía de intercambio iónico en una columna de SP-Sephadex C-50 (40 x ϕ 2.5 cm), equilibrada con el tampón de la muestra. La elución se realizó incrementando la concentración de NaCl en el tampón; se empleó para ello un gradiente lineal de 400 ml, llegando hasta 0.2 M de NaCl. La fracción escogida se dializó y liofilizó.

II.1.3 Extracción de proteínas de rama de especies forestales

Las muestras de rama fueron congeladas en nitrógeno líquido y molidas en mortero hasta convertirlas en polvo fino. Para la extracción de proteínas se empleó tampón de muestra de Laemmli [Tris/HCl 62.5 mM, pH 6.8, SDS 2% (p/v), urea 8 M, 2-mercaptoetanol 5% (v/v)], a razón de 5 μ l/mg de material vegetal, y se realizó durante una hora, a temperatura ambiente, con agitación fuerte y pulsos de ultrasonido. A continuación se centrifugaron las muestras durante 15 minutos a 16000 g en una centrífuga de sobremesa, tomándose el sobrenadante. Esta operación se repitió, con el fin de eliminar las partículas flotantes. Acto seguido las proteínas fueron precipitadas, mediante la adición al sobrenadante de ácido tricloroacético (TCA), a una concentración final del 10% (p/v). La precipitación se llevó a cabo a 4°C, durante un tiempo mínimo de 1 hora. Se centrifugaron las muestras en las mismas condiciones antes explicitadas, si bien a 4°C, descartándose el sobrenadante. Para eliminar el TCA del precipitado proteico se dieron dos lavados con acetona al 80% (v/v), centrifugándose tras cada uno de ellos en las mismas condiciones. Tras dejar secar al aire los precipitados, las proteínas se resuspendieron en tampón de muestras de Laemmli.

II.1.4 Extracción de proteínas de *Escherichia coli*

La extracción de proteínas de *Escherichia coli* se realizó utilizando como tampón de extracción Tris/HCl 100 mM, pH 8.0, EDTA 1 mM. Los cultivos fueron centrifugados

a baja velocidad, con objeto de recuperar las bacterias y separarlas del medio de cultivo, desechándose el sobrenadante. Las bacterias así precipitadas fueron lisadas en el tampón antes descrito, a razón de 100 μ l/ml de cultivo saturado, mediante pipeteo exhaustivo, agitación, pulsos de ultrasonido y ciclos de congelación y descongelación. Finalmente se centrifugaron a temperatura ambiente durante 10 minutos a 16000 g y se tomó el sobrenadante.

II.2 Carboximetilación de proteínas de tallo

Se precipitaron con TCA las proteínas de extractos obtenidos como se describe en el apartado II.1.3. A continuación fueron resuspendidas en un tampón Tris/HCl 1 M, pH 8.6, EDTA 2 mM, cloruro de guanidinio 6 M, DTT 20 mM, a razón de 3 mg/ml, donde se mantuvieron durante 3 horas a 37°C, para lograr su desnaturalización. Se añadió entonces iodoacetato sódico a una concentración final del 2.4% (p/v) (115 mM), provocando la alquilación de las proteínas. Esta reacción se prolongó durante 15 minutos a 37°C y en oscuridad.

Finalmente, las proteínas fueron dializadas frente a agua y liofilizadas para los sucesivos pasos de purificación.

II.3 Métodos cromatográficos

II.3.1 Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de filtración molecular

Se empleó en esta técnica una columna de Spherogel TSK-G (\varnothing 21.5 mm x 30 cm, Beckman). Como tampón se empleó acetato amónico 50 mM, SDS 0.1% (p/v), con un flujo de 0.5 ml/minuto. En cada cromatografía se insertaron 20 mg de proteína, disueltos en 3 ml del mismo tampón de elución, detectándose la salida de los picos a 280 nm.

II.3.2 Cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC)

La RP-HPLC se llevó a cabo empleando una columna de Nucleosil C4 (\varnothing 10 mm x 25 cm, Sugelabor) y como tampones agua y acetonitrilo, ambos con TFA al 0.1% (v/v). El gradiente empleado iba de un 0% a un 70% de acetonitrilo en 70 minutos, utilizándose un flujo de 0.5 ml/minuto. La cromatografía se llevó a cabo a 38°C y la detección de los picos se realizó a 214 nm.

II.4 Métodos electroforéticos

II.4.1 Electroforesis unidimensionales

II.4.1.1 Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE)

Se realizaron siguiendo el método de Laemmli (1970), utilizando el sistema de minigeles Bio-Rad Miniprotean II. El gel separador constaba de un 15% (p/v) de poliacrilamida [gr de N,N'-metilenbisacrilamida / (gr de acrilamida + gr de N,N'-metilenbisacrilamida) = 2.5%] en un tampón Tris/HCl 0.375 M, pH 8.8, SDS 0.1% (p/v). Para el gel espaciador se utilizó un 4% de poliacrilamida en Tris/HCl 0.125 M, pH 6.8, SDS 0.1% (p/v). Para los dos tipos de gel se emplearon como catalizadores de la polimerización un 0.1% (p/v) de persulfato amónico y Temed, en un 0.04% y en un 0.1% respectivamente. En las cubetas se utilizó tampón Tris 0.025 M, pH 8.3, glicina 0.192 M, SDS 0.1% (p/v). Para la determinación de pesos moleculares se utilizaron como marcadores citocromo C (12.4 kDa), mioglobina (17.8 kDa), quimiotripsinógeno (25 kDa), ovoalbúmina (45 kDa) y albúmina de suero bovino, BSA (67 kDa).

Las muestras se disolvieron en tampón de muestras de Laemmli, que contiene Tris/HCl 0.0625 M, pH 6.8, SDS 0.2% (p/v), urea 8 M, y un 5% de 2-mercaptoetanol (v/v) y se mantuvieron 5 minutos a 100°C inmediatamente antes de la electroforesis. Como colorante tanto las muestras como los patrones llevaban un 0.001% (p/v) de azul de bromofenol.

Las electroforesis se llevaron a cabo a 4°C, con una diferencia de potencial constante de 200 V. A continuación los geles se tiñeron con azul de Coomassie R-250 al 0.1% (p/v) en una solución acuosa de metanol 50% (v/v), ácido acético 10% (v/v). Tras el desteñido del fondo, con una solución acuosa de ácido acético al 10% (v/v) e isopropanol al 12.5% (v/v), se fijaron con ácido acético al 15% (v/v).

II.4.1.2 Electroforesis en gradiente de poliacrilamida (VPAGE)

Para este tipo de electroforesis las muestras se disolvieron en tampón Tris/HCl 0.0625 M, pH 6.8, sacarosa 10% (p/v). Los demás tampones fueron iguales a los empleados en las SDS-PAGE, pero sin SDS.

Se empleó un gradiente de poliacrilamida del 4 al 20%, en tampón Tris/HCl 0.375 M, pH 8.8. (Bio-Rad). Para determinar los pesos moleculares de las muestras se utilizaron como patrones BSA (67 kDa), aldolasa (160 kDa), catalasa (240 kDa) y ferritina (480 kDa). Las electroforesis se llevaron a cabo a 4°C y a una diferencia de potencial constante de 100 V, durante 2 horas. El colorante de muestras y patrones y los métodos de tinción, destinción y fijación de los geles fueron los mismos que los empleados en las SDS-PAGE.

II.4.2 Electroforesis bidimensional: isoelectroenfoque (IEF) x SDS-PAGE

La primera dimensión de esta electroforesis consistió en un electroenfoque, separándose las proteínas según su punto isoeléctrico en un gradiente de pH. Para ello se utilizó el aparato Mini-PROTEAN II 2-D Cell de Bio-Rad. Los geles lineales de esta primera dimensión constaban de poliacrilamida al 5% (p/v), 2.4% (v/v) de anfolinas con un rango de pH de 3.5 a 9.5 y urea 6 M. Las muestras proteicas, disueltas en urea 9M, se incluyeron en la mezcla de polimerización. Como tampón cubetas se empleó ácido sulfúrico al 0.02% (v/v) en el ánodo y etanolamina al 0.4% (v/v) en el cátodo. Tras 10 minutos de preenfoco a 500 V se procedió al enfoque a 1500 V, que se prolongó por una hora y media.

La segunda dimensión consistió en una SDS-PAGE como las descritas, utilizando los enfoques resultantes de la primera dimensión como muestras y aplicándoles un campo eléctrico perpendicular al empleado en la primera dimensión.

II.5 Detección de proteínas sobre membrana (*Western Blot* y *Dot Blot*)

Para detectar la presencia de una proteína en un extracto se procedió a la transferencia a membranas de PVDF (difluoruro de polivinilideno) del citado extracto previamente sometido a electroforesis (*Western Blot*) o bien en forma de gotas, sin separación previa (*Dot Blot*). En este último caso la transferencia se realizó mediante succión por vacío, mientras que en los *Western Blot* se llevó a cabo por la acción de un campo eléctrico (electrotransferencia). A continuación se procedió a la detección de proteínas por tinción o mediante anticuerpos.

Transferencia a membrana por vacío

La transferencia se realizó en un aparato Bio-Dot Microfiltration (Bio-Rad), siguiendo las instrucciones del fabricante, con ayuda de una bomba de vacío. Como tampón de transferencia se empleó Tris/HCl 100 mM, pH 8.0.

Electrotransferencia a membrana

Tras someter las muestras a una separación electroforética, bien por SDS-PAGE, por V-PAGE o por electroforesis bidimensional, las proteínas se transfirieron a membrana de PVDF (Immobilon P, con tamaño de poro 0.45 μm , Millipore). Se empleó para ello un tampón de transferencia igual al empleado en las cubetas para SDS-PAGE, pero con un 20% (v/v) de metanol. Las membranas de Immobilon se activaron previamente por inmersión en metanol. A continuación, gel y membrana se incubaron en el tampón de transferencia durante 5 minutos. La transferencia se llevó a cabo en un aparato Mini Trans-Blot Cell de Bio-Rad, a 50 V durante 50 minutos. Una vez terminada la transferencia, las membranas se lavaron con agua destilada, pudiéndose entonces proceder a la detección de las proteínas.

Tinción de proteínas

La solución de tinción empleada con las membranas de Immobilon fue la misma que la que se utilizó para los geles de poliacrilamida. La tinción duró 10 minutos, eliminándose el fondo con una solución acuosa de metanol al 50% (v/v) y ácido acético al 10% (v/v).

Inmunodetección con anticuerpos

Una vez transferidas las proteínas a membrana de Immobilon, ésta se incubó durante toda la noche a 4°C con tampón TBS [Tris/HCl 20 mM, pH 8.2, 0.9% (p/v) NaCl] y 1% (p/v) de leche desnatada, para cubrir los posibles sitios inespecíficos de unión de proteínas.

A continuación la membrana se mantuvo durante 2 horas en agitación a temperatura ambiente en 10 ml de tampón TBS, 0.2% (p/v) de leche descremada, 1% (v/v) de suero de cabra y 50 µl de anticuerpo contra Cs HSP17.5 (Collada *et al.*, 1997). Tras esta incubación la membrana se lavó 3 veces con 25 ml de TBS, 0.1% (p/v) de leche desnatada; cada lavado tuvo una duración de 10 minutos.

Durante 2 horas la membrana se incubó a temperatura ambiente y en agitación en 10 ml de TBS, 0.1% (p/v) de leche desnatada, 0.4% (p/v) de gelatina y 10 µl de conjugado de anti IgG de conejo (anticuerpo secundario) con fosfatasa alcalina. Posteriormente se realizaron 3 nuevos lavados, similares a los anteriores, si bien de 5 minutos cada uno.

El revelado se llevó a cabo con 10 ml de una solución del sustrato de la fosfatasa alcalina (5-bromo 4-cloro 3-indolilfosfato, BCIP) al 15% (p/v) y el colorante azul de nitrotetrazolio (NTB) al 30% (p/v), en tampón Tris 100 mM, pH 9.5, MgCl₂ 5 mM (Sigma Fast BCIP/NTB).

II.6 Digestión de proteínas unidas a membrana

Estas digestiones se realizaron sobre proteínas separadas por electroforesis bidimensional. Una vez transferidas a membranas de PVDF como se describe en el apartado II.5, se recortó la zona de la membrana con la proteína buscada. Tales fragmentos se incubaron durante 15 minutos en PVP K-30 diluido al 0.2% (p/v) en metanol (100 μ l/fragmento). Tras eliminar el tampón, se lavaron con agua varias veces. Se equilibró entonces con tampón Tris/HCl 0.1 M, pH 8.0. y se procedió a la digestión de las proteínas en el mismo tampón (60 μ l/fragmento). Ésta se realizó empleando como enzima proteolítico endo-Asp a una concentración final de 5 μ g/ml. La digestión se prolongó durante 4 horas a 37°C, recogándose el sobrenadante al final de la misma. Para optimizar la recuperación de los productos de la digestión se lavó la membrana con ácido fórmico al 80% (v/v) (20 μ l/fragmento) durante 10 minutos, aplicando ultrasonidos cada 2-3 minutos. Tras recoger el sobrenadante se aplicaron 4 lavados con el mismo volumen de agua. La mezcla de todos los sobrenadantes (el de la digestión y los de los lavados con ácido fórmico y agua) se empleó para la posterior purificación de los péptidos.

II.7 Inmunolocalización en tejidos vegetales

II.7.1 Localización subcelular mediante microscopía electrónica

Para la localización subcelular de Cs HSP17.5 se emplearon cotiledones de castaña en el ultimo estadio de maduración (unas 4 semanas antes de la caída), fijados con paraformaldehído al 4% (v/v) en tampón PBS (NaCl 13.7mM, KCl 0.27 mM, Na₂HPO₄ 0.43 mM, KH₂PO₄ 0.14 mM, pH 7.3) inmediatamente tras su recolección. Se siguió el protocolo descrito por Rodríguez-Cerezo *et al.* (1997) para la obtención y tratamiento de las secciones de cotiledón, que fueron bloqueadas durante 1 hora en Tris/HCl 30 mM, pH 7.5, albúmina de suero bovino (BSA) al 0.1% (p/v) y gelatina al 1% (p/v). A continuación se incubaron durante 2 horas con una dilución 1/50 del anticuerpo monoespecífico contra Cs HSP17.5. Los ulteriores lavados, marcaje con oro coloidal (partículas de 10 nm) y tinción se realizaron asimismo según Rodríguez-Cerezo *et al.* (1997).

II.7.2 Localización tisular en tallo mediante microscopía óptica

Para la localización tisular se siguió en principio el protocolo propuesto por Nagar *et al.* (1995) para tabaco, con las modificaciones pertinentes al tipo de tejido. La diferencia de dureza entre la madera y el resto de tejidos del tallo de castaño dificulta en gran medida la obtención de buenas secciones para la microscopía. La forma de conseguir éstas fue mediante la utilización de tejido fresco fijado en PBS 10 mM, pH 7.2 con paraformaldehído al 4% (v/v), sin incluir en ningún material de soporte. Los cortes se realizaron con un vibratomo, obteniéndose secciones de unas 50 μm de espesor. El bloqueo se llevó a cabo en PBS 10 mM, pH 7.4, BSA 0.1% (p/v), con inmunoglobulina G (IgG) de cabra al 0.5% (p/v), durante 2 horas a temperatura ambiente. Las secciones se lavaron a continuación durante 10 minutos, empleando el mismo tampón sin IgG, y se incubaron durante 1 hora con anticuerpo desarrollado en conejo contra Cs HSP17.5 (Collada *et al.*, 1997). Tras tres nuevos lavados como el descrito, las secciones se incubaron durante 1 hora con anticuerpo secundario, a una dilución 1/250 (v/v) en el mismo tampón utilizado para los lavados. Se empleó para ello un cromóforo Alexa-488 (Molecular Probes), del tipo de la fluoresceína, unido al anticuerpo secundario de cabra anti Ig de conejo. La detección de las proteínas inmunorreactivas se llevó a cabo en un microscopio óptico Leica DNRB equipado con un sistema confocal Leica TCSNT.

II.8 Ensayos de actividad chaperona *in vitro*

Se comprobó la actividad chaperona de Cs HSP17.5 en la renaturalización de quitinasa de castaño (Cs Ch1) previamente desnaturalizadas con cloruro de guanidinio, así como su papel protector frente a la inactivación térmica del mismo enzima.

Inactivación térmica

Para la desnaturalización térmica se disolvió Cs Ch1 en tampón HEPES/KOH 50 mM, pH 8.0 [HEPES: N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-(ácido 2-etanosulfónico)]. Con

objeto de comprobar su actividad chaperona se incluyó en la solución Cs HSP17.5 en una concentración de 150 nM, frente a controles con idénticas cantidades de lisozima y BSA. A continuación las mezclas fueron sometidas a una temperatura de 38°C. Transcurrida 1 hora, las muestras se colocaron a 22°C, manteniéndose en esta temperatura otros 60 minutos. Durante todo el proceso se tomaron alícuotas cada 10 minutos, con las que se midió la actividad enzimática remanente.

Desnaturalización química

Se empleó para la desnaturalización un tampón Tris/HCl 0.1 M, pH 7.0 (pH 8.0 para CS), DTT (ditiotreitól) 2 mM, cloruro de guanidinio 6 M. Se disolvió Cs Ch1 al 0.05% (p/v) en este tampón, prolongándose la desnaturalización durante 90 minutos a temperatura ambiente.

Renaturalización de Cs Ch1

Para la renaturalización de la proteína se diluyó la mezcla de desnaturalización 100 veces con tampón Tris/HCl 200 mM, pH 7.0, incluyendo distintas cantidades de Cs HSP17.5. Como control negativo se utilizó BSA en lugar de la sHSP. La renaturalización transcurrió a temperatura ambiente durante una hora, excepto en el ensayo de cinética, en que se midió la actividad quitinasa a distintos tiempos de renaturalización.

Ensayo de actividad quitinasa

El ensayo se llevó a cabo sobre el sustrato CM-quitina-RBV (carboximetil-quitina-*Ramazol Brilliant Violet*, Loewe Biochemica), suspendido en acetato sódico 50 mM, pH 5.5, siguiendo el protocolo descrito por García-Casado *et al.* (1998). La reacción de hidrólisis de la quitina se prolongó durante 10 minutos a 37°C, deteniéndose a continuación mediante la adición de ¼ de volumen de HCl 2 N. Para eliminar las fibras no digeridas se mantuvieron las muestras durante 20 minutos en hielo y a continuación se centrifugaron a 16000 g durante 15 minutos. La medición de la absorbancia a 550 nm del sobrenadante sirvió para evaluar la actividad lítica de la quitinasa.

II.9 Análisis MALDI y secuenciación de proteínas

Los análisis MALDI de proteínas separadas por electroforesis bidimensional y digeridas con tripsina fueron realizados por el Servicio de Química de Proteínas del Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa" (Universidad Autónoma de Madrid), de acuerdo con el protocolo descrito en García *et al.* (2000).

La secuenciación del extremo amino-terminal de proteínas así como la de péptidos internos se llevaron a cabo por el Servicio de Secuenciación de la Universidad Autónoma de Barcelona

III. MÉTODOS DE ÁCIDOS NUCLEICOS

III.1 Métodos extractivos

III.1.1 Extracción de ARN

El material vegetal para las extracciones de ARN se congeló en N₂ líquido y se conservó a -80°C. Se mantuvo congelado con N₂ líquido durante su pulverización, reduciéndolo a un fino polvo. Las extracciones se basaron en el protocolo propuesto por Chang *et al.* (1993) para pino. Se partió de 4 gr del material molido y se empleó como tampón de extracción Tris/HCl 100 mM, pH 8.0, EDTA 25 mM, NaCl 2 M, CTAB (bromuro de hexatrimetilamonio) 2% (p/v), PVP (polivinilpirrolidona) K-30 2% (p/v), 2-mercaptoetanol 2% (v/v), espermidina 0.05% (p/v). La extracción se llevó a cabo a 65°C, durante 1 minuto, tras añadir el tampón de extracción previamente calentado, a razón de 5 ml/gr de material. A continuación, y con objeto de limpiar la preparación de proteínas, lípidos, etc., se añadió un volumen de una mezcla de cloroformo:alcohol isoamílico en proporción 24:1 (v:v) se mezcló y se centrifugó durante 10 minutos a 16000 g y temperatura ambiente, tomándose, con la fase acuosa, los ácidos nucleicos. Este paso de limpieza se repitió. Se añadió entonces ¼ de volumen de LiCl 10 M y se incubó a 4°C

durante la noche, a fin de que el ARN precipitara. Al día siguiente las muestras se centrifugaron a 16000 g durante 20 minutos a 4°C y se descartó el sobrenadante. Una vez seco al aire el precipitado, se resuspendió en 500 µl de SSTE (Tris/HCl 10 mM, pH 8.0, EDTA 1 mM, SDS 0.5% (p/v), NaCl 1 M). Se repitió entonces el proceso de limpieza con cloroformo:alcohol isoamílico. A la fase acuosa se le añadieron 2 volúmenes de etanol absoluto y se dejó precipitar el ARN durante al menos 3 horas a -20°C. Se centrifugaron de nuevo las muestras 20 minutos a 16000 g y se lavó el precipitado con etanol frío al 70% (p/v). Una vez seco el precipitado, se resuspendió en agua (50 µl).

III.1.2 Extracción de ADN

Las extracciones de ADN se basaron en el protocolo propuesto por Doyle y Doyle (1990). Se partió de material congelado y pulverizado como en el caso de las extracciones de ARN (1 gr). Como tampón de extracción se utilizó Tris/HCl 100 mM, pH 8.0, EDTA 20 mM, PVP K-30 1% (p/v), NaCl 1.4 M, ATMBAB (bromuro de alquiltrimetilamonio) 2% (p/v), 2-mercaptoetanol 0.1% (v/v). La extracción se llevó a cabo durante 1 hora a 55°C, con agitación puntual, añadiéndose a la muestra el tampón precalentado, a razón de 10 ml/gr de material. Tras dejar enfriar la muestra durante 10 minutos a temperatura ambiente se añadieron 4 ml de diclorometano, mezclándose suavemente hasta obtener una emulsión. Las muestras fueron centrifugadas entonces 10 minutos a 16000 g, tomándose la fase acuosa. En caso de estar turbia ésta se repitió el paso de limpieza con diclorometano. A continuación se añadieron 2/3 de volumen de isopropanol frío, dejando precipitar a -20°C durante al menos 1 hora. Se centrifugó entonces durante 10 minutos a 4°C y 16000 g. Tras lavar con etanol frío al 70% (v/v) y secar el precipitado se resuspendió el ADN en 50 µl de agua, con RNasa a 50 µg/ml.

III.2 Digestión enzimática de ADN

Las digestiones de ADN se realizaron con endonucleasas de restricción, siguiendo en cada caso las instrucciones y empleando los tampones recomendados por el fabricante (Roche). En general se llevaron a cabo a 37°C y se prolongaron durante al menos 3 horas.

III.3 Electroforesis en gel de agarosa (EGA) de ADN

Las separaciones electroforéticas de fragmentos de ADN se llevaron a cabo en geles de agarosa a distintas concentraciones según la necesidad [entre el 0.8% y el 1.2% (p/v)] en tampón TAE (Tris/HCl 40 mM, pH 8.0, acetato sódico 20 mM, EDTA 1 mM). Para la detección de los ácidos nucleicos mediante luz ultravioleta se incluyó en el gel bromuro de etidio a una concentración final de 0.5 µg/ml. El tampón de carga se utilizó a una concentración 6x, añadiendo a cada muestra 1/5 de su volumen, y consistió en una solución acuosa de ficol al 15% (p/v), y xilencianol y azul de bromofenol como colorantes, ambos al 0.25% (p/v). Los voltajes empleados variaron, según la necesidad, entre los 60 y los 90 V.

Cuando se necesitó purificar algún fragmento de ADN a partir de un gel de agarosa se siguió el protocolo de Ausubel *et al.* (1994) o bien se empleó el sistema GENECLEAN de BIO 101.

III.4 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Las amplificaciones de ADN mediante PCR se llevaron a cabo con cebadores específicos para cada reacción, empleando las polimerasas Pfu (Stratagene) o BioTools DNA Polymerase (BioTools), siguiendo en cada caso las instrucciones del fabricante. Como termociclador se empleó un GeneAmp PCR SYSTEM 2400 (Perkin-Elmer). El programa de reacción seguido se ajustó en cada caso según las necesidades.

III.4.1 RT-PCR

Transcripción inversa

Para la obtención de ADNc mediante transcripción inversa a partir de ARN poli(A)+ se emplearon los reactivos de síntesis ZAP-cDNA incluidos en el *kit* para la creación de genotecas de expresión (Stratagene). El enzima empleado fue la MMLV-RT

(*Moloney murine leukemia virus-reverse transcriptase*). Las reacciones se llevaron a cabo del modo indicado para la genoteca, si bien los nucleótidos metilados empleados en ésta fueron sustituidos por nucleótidos normales.

PCR

Se empleó el programa [94°C, 5'; (94°C, 1'; 46°C, 1.5'; 72°C, 1') x 30; 72°C, 4'] para la reacción de PCR sobre el ADN obtenido por transcripción inversa. Los cebadores, diseñados a partir de la secuencia de Cs *hsp17.5*, fueron:

5'GAGGGCTTCAGTGCTGTAGC

5'GAGATCTCGATGGACTTGAC.

III.5 Generación de sondas radiactivas

Se empleó el sistema Random Primed Labeling Kit (Boehringer) para la síntesis de sondas radiactivas, siguiendo las instrucciones del fabricante. Como molde se emplearon fragmentos de ADN purificados a partir de electroforesis en geles de agarosa. Las sondas fueron purificadas por filtración molecular a través de columnas de Sephadex G-50 (Nick Columns, Pharmacia), utilizando como tampón TE (Tris/HCl 10 mM, pH 8.0, EDTA 1 mM).

III.6 Construcción y rastreo de genotecas de expresión

Se construyeron dos genotecas de expresión de *Castanea sativa* Mill., siendo la semilla madura y la rama de invierno los materiales vegetales de partida, respectivamente. Para ello se utilizó el ZAP-cDNA Gigapack III Gold Cloning Kit (Stratagene), siguiendo el protocolo propuesto por el fabricante. Se extrajo el ARN del material de partida y se purificó, por afinidad con una columna de oligo-(dT) celulosa, el ARNm, que sirvió de molde para la síntesis del ADNc. Una vez generadas las dobles hebras de ADN, se procedió a una selección por tamaños mediante una filtración molecular en una columna

de Sepharose CL-2B. Los fragmentos seleccionados (400-2000 pb) fueron clonados en el fago Uni-ZAP XR. Este virus, derivado del bacteriófago λ , incluye en su cadena de ADN la secuencia completa del plásmido pBluescript SK (-), donde son clonados los fragmentos de ADNc.

Asimismo, se siguieron las instrucciones del fabricante para el rastreo de dichas genotecas. En todos los casos éste se realizó en tres fases: los candidatos escogidos tras la primera hibridación fueron sometidos a una nueva selección y los resultantes de ésta se comprobaron con una tercera y última hibridación. En cada hibridación se infectaron bacterias de la cepa MRF' Blue con los fagos y se plaquearon sobre medio NZY, manteniéndose a 37°C hasta el día siguiente. Se transfirieron a membranas de nylon de 0.45 μm de tamaño de poro, (MAGNA, MSI) por contacto. La desnaturalización de las partículas virales se realizó con NaOH 0.5 M, NaCl 1.5 M, empleándose Tris/HCl 0.5 M, pH 7.5, NaCl 1.5 M para la neutralización y 6x SSC (NaCl 0.9M, citrato sódico 90 mM) para el lavado final. Una vez secos al aire los filtros se fijó el ADN con rayos ultravioleta. y se hibridaron con la sonda marcada con α -[^{32}P] ATP. Como solución de hibridación se empleó SSC 6x, solución de Denhardt 5x, SDS 0.5% (p/v), añadiéndose ADN de esperma de salmón, previamente desnaturalizado a 100°C durante 5 minutos para bloquear los posibles sitios de unión inespecíficos; esta prehibridación se llevó a cabo durante dos horas, en agitación a 60°C. Tras hervir la sonda durante 5 minutos para su desnaturalización fue añadida a la solución de prehibridación. La hibridación se prolongó durante la noche, a la misma temperatura. Tras retirar la solución de hibridación los filtros se lavaron dos veces con SSC 2x, SDS 0.1% a temperatura ambiente durante 15 minutos y una vez con SSC 1x, SDS 0.1% a 37°C. La autorradiografía se llevó a cabo durante dos días a -80°C sobre películas X-OMAT UV (Kodak).

Para el rastreo de la genoteca de semillas se empleó como sonda en todas las hibridaciones el ADNc correspondiente a la sHSP de girasol Ha *hsp17.6* (Almoguera y Jordano, 1992), mientras que para la genoteca de rama se empleó el ADNc Cs *hsp17.5*, resultante del rastreo anterior.

La escisión de los fagos candidatos se realizó individualmente, dando como resultado vectores pBluescript SK (-) con un inserto de ADNc homólogo a la sonda empleada en el rastreo.

III.7 Detección de ácidos nucleicos sobre membrana

III.7.1 Detección de ARN (*Northern blot*)

En los experimentos de transferencia *Northern* se siguió básicamente el protocolo de Sambrook *et al.* (1989). La electroforesis se llevó a cabo en geles de agarosa 1.2% (p/v) con formaldehído 2.2 M en tampón MOPS [ácido 3 (N-morfolino) propanosulfónico (MOPS) 40 mM, pH 7.0, acetato sódico 10 mM, EDTA 1 mM], empleándose para la cubeta tampón MOPS con formaldehído 0.984 M. Como tampón de carga se empleó MOPS 10x, formaldehído 3 M, formamida 50% (v/v), EDTA 1 mM, bromuro de etidio 37 µg/ml y azul de bromofenol (BPB) 0.1% (p/v) como colorante. Se insertaron unos 15 µg por muestra, añadiéndose 3 volúmenes de tampón de carga. Las muestras fueron desnaturalizadas, calentándolas durante 15 minutos a 65°C, y colocadas en hielo inmediatamente antes de la inserción. La diferencia de potencial empleada fue de 40 V, prolongándose hasta que el frente hubiera alcanzado 2/3 de la longitud total del gel.

A continuación se llevó a cabo la transferencia por capilaridad con SSC 10x (NaCl 1.5 M, citrato sódico 0.15 M, pH 7.0), durante toda la noche, del ARN a membrana de nylon, siguiendo las instrucciones del fabricante de la misma (Magna Nylon, MSI).

Tras fijar el ARN mediante rayos ultravioleta se procedió a la hibridación con sonda marcada con α -[³²P] ATP. Se prehibridó la membrana en SSC 5x, tampón de Denhardt 5x [ficol, 0.1% (p/v), albúmina de suero bovino (BSA) 0.1% (p/v), PVP K-40 0.1% (p/v)], formamida 50% (v/v), SDS 0.5% y ADN de esperma de salmón (50 µg/ml), previamente desnaturalizado a 100°C, para bloquear los posibles sitios de unión inespecífica de la sonda, a 42°C y en agitación durante 2 horas. Se añadió entonces la sonda, tras desnaturalizarla a 100°C durante 10 minutos, prolongándose la hibridación en

las mismas condiciones durante la noche. Como sonda se empleó el ADNc Cs *hsp17.5*. Tras retirar la solución de hibridación los filtros se lavaron dos veces con SSC 2x, SDS 0.1% a temperatura ambiente y, cuando fue necesario, hasta dos veces más con SSC 0.2x, SDS 0.1% a temperatura ambiente. La autorradiografía se llevó a cabo durante 5 días a 80°C sobre películas X-OMAT UV (Kodak).

III.7.2 Detección de ADN (*Southern blot*)

Las digestiones de ADN genómico en los experimentos de *Southern* se llevaron a cabo en las condiciones indicadas por los fabricantes de los enzimas de restricción (Roche), añadiendo espermidina a una concentración final 1 mM y calentando el ADN durante 15 minutos a 65°C para favorecer su desplegado, tal y como recomiendan Sambrook *et al.* (1989) y Ausubel *et al.* (1994). Las digestiones se realizaron a 37°C durante toda la noche, y al día siguiente se añadieron 10 µl de tampón y enzima de restricción, prolongándose durante otras 3 horas la reacción.

La electroforesis se llevó a cabo en agarosa al 1% (p/v) en tampón TAE (Tris/HCl 40 mM, pH 8.0, acetato sódico 20 mM, EDTA 1 mM). La diferencia de potencial empleada fue de 15 V durante toda la noche. Al día siguiente el gel se desnaturalizó durante 10 minutos en HCl 0.2 M. Tras varios lavados con agua se mantuvo durante 1 hora en NaOH 0.5 M, NaCl 1.5 M, siempre en agitación suave. La neutralización se realizó entonces durante 30 minutos en Tris/HCl 0.5 M, pH 7.5, NaCl 1.5 M, para terminar equilibrando el gel en SSC 10x. La transferencia se llevó a cabo de forma análoga a las realizadas en los experimentos tipo *Northern*.

La hibridación con la sonda radiactiva, los lavados y la autorradiografía se realizaron siguiendo el protocolo empleado en los experimentos tipo *Northern*, si bien la solución de prehibridación e hibridación incluía además sulfato de dextrano al 10% (p/v).

III.8 Secuenciación de ADN

Para las secuenciaciones de ADN se empleó el ABI PRISM Dye Terminator Kit con un secuenciador automático (ABI 377, Applied Biosystem). Las reacciones de secuenciación fueron realizadas en un termociclador GeneAmp PCR SYSTEM 2400 (PERKIN-ELMER), mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El programa empleado para las mismas constaba de un paso inicial de desnaturalización del ADN molde a 96°C durante 2 minutos, seguido de 25 ciclos consistentes en tres fases: desnaturalización a 96°C por 10 segundos, 5 segundos a 50°C para el emparejamiento de secuencias complementarias y 4 minutos de elongación a 60°C.

III.9 Clonaje en vectores de expresión

III.9.1 Clonaje en pET 11d

Los sitios de restricción escogidos para el clonaje en pET 11d fueron *NcoI* y *BamHI*. Las correspondientes dianas de restricción en los extremos 5' y 3', respectivamente, del fragmento a insertar se generaron mediante una reacción de PCR. Los cebadores empleados fueron 5'GAAGCAGATCCCATGGCGCTCAG (en cursiva el cambio introducido para generar el sitio de restricción *NcoI*, subrayado) y 5'CATGCCATACGGATCCCACTCC (en cursiva el cambio introducido para generar el sitio de restricción *BamHI*, subrayado). El molde de esta reacción fue el pBluescript SK/Cs *hsp17.5* obtenido del rastreo de la genoteca de ADNc de semilla.

III.9.2 Clonaje en pRSET b

El clonaje en pRSET se llevó a cabo entre los sitios de restricción *NdeI* y *BamHI*. La elección de estos sitios exigió la eliminación de una diana *NdeI* en la posición 123 y la generación de dianas *NdeI* y *BamHI* en los extremos 5' y 3', respectivamente, del ADNc. Utilizando como molde pBluescript SK/Cs *hsp17.5*, resultado del rastreo de la genoteca de expresión de semilla, en una primera reacción de PCR se emplearon como cebadores 5'CTCACTGGATATATGGGACCC (en cursiva el cambio introducido en el sitio de

restricción de *NdeI*, subrayado) y 5'CATGCCATACGGATCCCACACTCC (en cursiva la mutación introducida para generar el sitio de restricción de *BamHI*, subrayado). El producto de esta reacción se empleó como cebador, junto con 5'GCAGATCATATGGCGCTCAGTC (en cursiva las mutaciones introducidas para generar el sitio de restricción de *NdeI*, subrayado), en una segunda reacción de PCR, sobre el mismo molde. El producto de esta segunda reacción fue digerido con *NdeI* y *BamHI*, y clonado en el plásmido pRSET (pRSET/Cs *hsp17.5*).

III.9.3. Clonaje de formas truncadas en pRSET b

Se clonaron en el vector pRSET b dos formas truncadas del ADNc Cs *hsp17.5*. Dichos fragmentos fueron generados mediante reacciones de PCR, empleando como molde pRSET-Cs *hsp17.5*, generado para expresar la proteína completa en *E. coli*. Los cebadores empleados en dichas reacciones fueron, respectivamente:

5'GTTTCGACCATATGTCTACTGGATATATGGGAC (en cursiva las mutaciones introducidas para generar el sitio de restricción *NdeI*, subrayado) y 5'GAAGCTCGGATCCCACACTCCTCACTC (subrayado el sitio de restricción *BamHI*)

y

5'AACCACACCATATGGGCTACAGCACGCATTGATTG (en cursiva las mutaciones introducidas para generar el sitio de restricción de *NdeI*, subrayado) y 5'GAAGCTCGGATCCCACACTCCTCACTC (subrayado el sitio de restricción *BamHI*).

Los fragmentos así obtenidos se clonaron en los sitios de restricción *NdeI* y *BamHI* del plásmido, previa digestión con los enzimas de restricción correspondientes.

IV. TRATAMIENTOS SOBRE PLÁNTULAS

Todos los tratamientos descritos se llevaron a cabo en la cámara de cultivo utilizada durante el desarrollo de las plántulas, excepto en el caso del estrés de frío. En todos se mantuvo el fotoperiodo empleado durante la fase de crecimiento de las plántulas, así como las condiciones de humedad ambiental y riego. Se incluyeron siempre plantas testigo en los experimentos, a las que no se aplicó ningún tratamiento y que fueron mantenidas todo el tiempo en las condiciones de la fase de crecimiento.

IV.1 Estrés de calor

Se realizó un tratamiento de calor a 32°C, recogiéndose las muestras a las 3 y a las 8 horas de estar las plantas sometidas al estrés.

También se llevó a cabo un tratamiento a 40°C, recolectando las plantas en este caso a las 1, 3, 5 y 7 horas.

IV.2 Estrés de frío

Para el tratamiento de frío las plántulas se trasladaron a una cámara donde se conservó el mismo fotoperiodo de la fase de crecimiento y la temperatura se mantuvo constante a 4°C. Las muestras se tomaron transcurridas 3 y 8 semanas de tratamiento.

IV.3 Estrés salino

Para administrar a las plántulas un choque salino fueron regadas abundantemente con una solución de NaCl 200 mM. Las muestras se recogieron transcurridas 4, 10 y 24 horas desde el riego.

IV.4 Tratamiento con ácido jasmónico

La aplicación exógena de ácido jasmónico (JA) se realizó mediante pulverización y riego con una solución acuosa de JA 50 μM , preparada a partir de un concentrado de JA 100 mM en dimetilformamida. La aplicación se llevó a cabo con un pulverizador manual, en el envés y en el haz de las hojas, regándose a continuación con unos 25 ml de la misma solución. Las plántulas se recolectaron 8 y 24 horas después de la aplicación.

IV.5 Tratamiento con ácido salicílico

La aplicación de ácido salicílico fue análoga a la de JA, empleando una solución acuosa 1 mM del producto preparada a partir de un concentrado 100 mM en etanol. Las muestras fueron tomadas a las 24, 48 y 72 horas tras la aplicación.

IV.6 Herida mecánica

Se practicaron heridas en todas las hojas con pinzas de diálisis, que se mantuvieron durante 24 horas. Transcurrido ese tiempo se cambiaron de sitio las pinzas, realizando nuevas heridas. Al cabo de 6 y 10 horas de esta segunda tanda de heridas se tomaron las muestras.

V. EXPRESIÓN HETERÓLOGA Y TRATAMIENTOS SOBRE BACTERIAS

V.1 Expresión heteróloga en BL21(DE3)

La expresión heteróloga de Cs HSP17.5 en la cepa BL21(DE3) se llevó a cabo empleando los plásmidos pET 11d y pRSET b. En ambos casos, una vez realizado el clonaje de la secuencia codificante Cs *hsp17.5* en el vector y transformadas con él las bacterias, éstas se crecieron a 37°C y 250 r.p.m. en medio LB, con ampicilina (100 µg/ml) como antibiótico selector (LB-Amp¹⁰⁰). Al llegar la densidad óptica medida a 600 nm (DO₆₀₀) a 0.5 (equivalente a una densidad aproximada de 5 x 10⁸ células/ml), se procedió a la inducción del sistema de expresión (pRSET), añadiendo IPTG hasta una concentración final de 1 mM.

Con el fin de comprobar la expresión de Cs HSP17.5, a distintos tiempos tras el inicio de la inducción, se tomaron alícuotas del cultivo para realizar extractos proteicos y someterlos a SDS-PAGE e inmunodetección. Como control se incluyó en el experimento el cultivo de las bacterias transformadas con el plásmido sin inserto.

La expresión de las formas truncadas de Cs HSP17.5 se realizó siguiendo el mismo método descrito para la secuencia completa, utilizando el vector pRSET b.

V.2 Tratamientos sobre bacterias recombinantes

Se llevaron a cabo diversos tratamientos sobre bacterias de la cepa BL21(DE3), en las que se forzó la expresión heteróloga de la proteína Cs HSP17.5 mediante el sistema de expresión pRSET.

Las bacterias BL21(DE3)/pRSET-Cs *hsp17.5* fueron crecidas en LB-Amp¹⁰⁰ a 37°C y 250 r.p.m. Al alcanzar una DO₆₀₀ en torno a 1.0 (aproximadamente 1 x 10⁹ células/ml), se procedió a la inducción del sistema pRSET, añadiéndose un volumen de

medio de cultivo e IPTG (isopropil- β -D-tiogalacto-piranosido) hasta una concentración final de 1 mM. Se mantuvieron las condiciones de cultivo durante 2 horas, para dar ocasión a la síntesis de una cantidad suficiente de Cs HSP17.5, momento en que se sometieron los cultivos a los distintos tratamientos. En todos los casos se incluyó como control un cultivo de bacterias transformadas con el plásmido sin inserto [BL21(DE3)/pRSET]. Todos los experimentos se repitieron un mínimo de tres veces.

V.2.1 Estrés de calor

Una vez inducida la expresión de la proteína, se ajustó la DO_{600} a 0.006 (dilución aproximada 1/300); se tomaron entonces alícuotas de 0.5 ml del cultivo y se pasaron a 50°C. A cada tiempo deseado se tomó una de las alícuotas y se plaquearon, por duplicado, 100 μ l de una dilución 1/100 de la misma (equivalente a una dilución aproximada 1/30000 del cultivo). Las placas se mantuvieron a 37°C durante la noche. Al día siguiente se evaluó la viabilidad celular en función del número de unidades formadoras de colonias (cfu). También se obtuvieron extractos proteicos de las bacterias sometidas al tratamiento.

V.2.2 Estrés de frío

Transcurridas 2 horas de la adición del IPTG se sacaron alícuotas de 1 ml, de las que se hicieron diluciones 1/30000. Se plaquearon, por duplicado, 100 μ l de tales diluciones. Las placas se mantuvieron a 4°C, exceptuando el control, que fue mantenido a 37°C durante la noche. Al día siguiente se contó número de unidades formadoras de colonias (cfu). A los tiempos deseados las placas sometidas al tratamiento de 4°C fueron trasladadas a estufas a 37°C, donde se mantuvieron durante la noche. Al día siguiente al traslado se evaluó la viabilidad celular en función del número de cfu, en comparación con el control. Para comprobar la presencia de Cs HSP17.5 en las bacterias durante el tratamiento, se sembraron también placas a alta densidad con alícuotas del cultivo, sin diluir, y se pusieron a 4°C. A los tiempos deseados y sin pasar las placas a 37°C, se realizó una extracción de las proteínas de las bacterias plaqueadas, mediante pipeteo exhaustivo de la superficie de las placas con 2 ml de Tris/HCl 100 mM, pH 8.0, EDTA (ácido etilendiaminotetracético) 1 mM.

V.2.3 Estudio de la asociación a membrana

Para este experimento se siguió el protocolo descrito por Jobin *et al.* (1997), con ciertas modificaciones. Tras la inducción de cultivos de BL21(DE3)/pRSET y BL21(DE3)/pRSET-Cs *hsp17.5* como ya se ha descrito, éstos se mantuvieron en agitación a 4°C. Al cabo de 1 y 3 horas de tratamiento se centrifugaron los cultivos (50 ml) a baja velocidad (5000 g, 4°C, 5 minutos), con objeto de recuperar intactas las células, y se descartó el sobrenadante. Tras lavar el precipitado con Tris/HCl 10 mM, pH 8.0, frío, se resuspendieron en 3 ml del mismo tampón, con RNasa a 250 µg/ml, y las células fueron lisadas en frío por cizalladura en una prensa de French, a $1.2 \cdot 10^5$ kPa. El resultante de esta lisis fue centrifugado 5 minutos a 16000 g y se tomó el sobrenadante, eliminando así las células que hubiesen salido intactas del proceso. A continuación se procedió a la separación por ultracentrifugación de las membranas celulares. Ésta se llevó a cabo a 4°C durante 60 minutos a 68600 g, separándose el sobrenadante. El precipitado, correspondiente a la fase membranosa, fue resuspendido en 5 ml del mismo tampón y sometido a una nueva ultracentrifugación. Se recogió el segundo sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 100 µl del tampón. Las fracciones obtenidas fueron sometidas a SDS-PAGE y *Western Blot*. La eficacia de la separación se comprueba mediante un ensayo de actividad lactato deshidrogenasa. Como control se realizó el mismo proceso con cultivos no sometidos al tratamiento de 4°C.

RESULTADOS

RESULTADOS

I. PROTEÍNAS sHSP DE SEMILLA DE *CASTANEA SATIVA* MILL.

En trabajos de nuestro grupo previos al inicio de esta tesis doctoral se había completado la purificación de una proteína de unos 20 kDa en SDS-PAGE, abundante en los cotiledones de la semilla de castaño. La secuenciación de dos péptidos internos sugería su pertenencia a la clase I de la familia de proteínas de choque térmico de bajo peso molecular (sHSP), por lo que se denominó a la proteína Cs smHSP 1 (Collada *et al.*, 1997).

I.1 Construcción y rastreo de una genoteca de ADNc de semilla de *Castanea sativa* Mill.

Con el fin de completar la caracterización de Cs smHSP 1 y ampliar el estudio de su funcionalidad se aisló su ADNc. Para ello se generó una genoteca de expresión a partir de cotiledones maduros de castaña. El ADNc sintetizado a partir del ARNm fue sometido a una filtración molecular, tomándose la fracción enriquecida en fragmentos pequeños (400-2000 pb), donde se esperaba encontrar la secuencia correspondiente a la Cs smHSP 1. Se estimó el título final de la genoteca en 1.1×10^6 pfu (unidades formadoras de placas)/ μ l.

Habida cuenta de la elevada similitud entre las secuencias correspondientes a sHSP de una misma familia, aunque pertenezcan a especies muy alejadas filogenéticamente se empleó como sonda para el rastreo de la genoteca el ADNc Ha *hsp17.6* de girasol (Almoguera y Jordano, 1992). Se procesaron 2.5×10^5 clones, en condiciones de baja restrictividad. Fueron seleccionados finalmente 5 candidatos independientes, procedentes todos ellos de diferentes clones escogidos en la primera selección.

I.2 Aislamiento y caracterización del ADNc

Tras la escisión de los fagémidos se procedió a la secuenciación de sus insertos. Todos ellos resultaron corresponder a una única secuencia de nucleótidos, con una longitud total máxima de 734 pb (Fig. 1). El único marco abierto de lectura que incluía dicha secuencia totalizaba 462 pb. Incluía la secuencia además extremos 5' y 3' no traducidos de 54 y 217 nucleótidos respectivamente, así como una putativa señal de poliadenilación, AATAAA, situada 53 bases tras la señal de fin de la traducción (TAA).

El gen seleccionado codificaba una proteína de 154 aminoácidos, con un peso molecular deducido de 17.48 kDa y un punto isoeléctrico (pI) teórico de 5.95. La secuencia correspondía a una sHSP citosólica de la clase I, según reveló la comparación con las bases de datos disponibles (Fig.2); por tanto, se pasó a denominar la proteína Cs HSP17.5. Presenta un elevado grado de conservación de las dos regiones consenso (consenso I: residuos 61 a 88; consenso II: residuos 111 a 140) definidas para las sHSP vegetales, así como una zona en la región N-terminal (residuos 10 a 24) típica de las proteínas de la clase I (Vierling, 1991; Waters *et al.*, 1996).

-14 *gaattcggcagcag* aaaact 6

gaaactctaaagctcagtgcaagttactataaacaagaagcagatcca 54

ATGGCGCTCAGTCTTTTCGGTGGCCGAAGAAGCAACGTGTTTCGACCC 102

M A L S L F G G R R S N V F D P

TTCTCACTGGACATATGGGACCCATTTGAGGGCTTCAGTGCTGTAGCC 150

F S L D I W D P F E G F S A V A

AACGTTCCCTCCCTCGGCTCGTGAAACCACAGCTTTTGCTACAGCACGC 198

N V P P S A R E T T A F A T A R

ATTGATTGGAAGGAAACCCAGACGCACACATTTTCAAGGCTGATCTT 246

I D W K E T P E A H I F K A D L

CCGGGTCTGAAGAAGGAGGAAGTGAAGTTGAGGTTGAGGATGGGAAT 294

P G L K K E E V K V E V E D G N

GTGTTGCAAATAAGCGGGGAGAGGAGCAAAGAGCATGAGGAAAAGAAT 342

V L Q I S G E R S K E H E E K N

GATAAGTGGCACAGGTTGAGAGGAGCTGTGGCAAGTTTCTTAGGAGG 390

D K W H R V E R S C G K F L R R

TTTAGGTTGCCAGAGAATGCGAAGGTGGAGCAGGTGAAGGCCAATATG 438

F R L P E N A K V E Q V K A N M

GAGAATGGAGTGCTCACTGTGATTGTGCCTAAGGAGGAGCAGAAAAAG 486

E N G V L T V I V P K E E Q K K

ACTGAGGTCAAGTCCATCGAGATCTCTGTTAAatttcaagatgttta 534

T E V K S S I E I S G -

attgtggtgctcttttgtgtgctgtcttttgtcatgttga**ataaaaa** 582

gagtgaggagtgtggatcagtatggcatgttttgtttgctgtgtttg 630

taatgaaagaggctcactgcctgtattgtcgacaatattgtaatggtt 678

tttgttataaatatattgtgagtaagtttctgttaggaaaaaaaaaaaa 726

aaaaaaaa 734

Fig. 1 Secuencia de nucleótidos del ADNc correspondiente a Cs HSP17.5 y secuencia aminoacídica deducida. La secuencia aminoacídica incluye las regiones de consenso I (residuos 61 a 88) y II (residuos 111 a 140) propias de las sHSP vegetales, así como una zona en la región N-terminal (residuos 10 a 24) característica de la clase citosólica I. Aparecen subrayadas las secuencias correspondientes a los péptidos internos obtenidos tras digestión con la endoproteinasa Asp-N de la proteína purificada a partir de semilla (Collada *et al.*, 1997). Se destaca en negrita la señal de poliadenilación (nucleótidos 573 a 578). Los nucleótidos -1 a -14 (en cursiva) pertenecen al vector pBluescript SK e incluyen la diana de restricción *Eco* RI, empleada en experimentos posteriores.

			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Citosólicas I	Cs HSP17.5	1											
	At HSP17.4	2	72.1										
	Gm HSP18.5	3	70.4	72.1									
	Ha HSP17.6	4	71.0	70.1	67.9								
Retículo Endoplásmico	Gm HSP22.0	5	43.6	46.2	46.4	46.5							
	Ps HSP22.7	6	41.6	43.4	45.2	44.6	73.1						
Citosólicas II	Pn HSP18.8	7	38.7	36.9	39.9	36.7	35.5	30.6					
	Ps HSP17.7	8	36.8	35.1	37.5	35.7	37.0	36.2	65.6				
Mitocondria	Ps HSP22.0	9	34.8	34.8	33.1	33.5	27.5	28.5	24.4	31.4			
	At HSP23.6	10	33.3	32.7	34.1	33.7	25.5	26.0	23.5	27.8	57.5		
Cloroplasto	Ta HSP26.6	11	34.0	30.8	31.0	32.9	27.5	22.6	26.4	29.7	32.3	35.4	
	Le HSP21.0	12	30.6	30.0	31.5	31.2	27.6	29.1	28.1	29.6	34.0	35.5	52.1

Fig. 2 B Porcentajes de identidad entre las secuencias aminoacídicas de las sHSP incluidas en el alineamiento (Fig. 2A)

I.3 Identificación de la proteína Cs HSP17.5

Se realizó una electroforesis bidimensional (IEF x SDS-PAGE) a partir de un extracto proteico (Tris/HCl 0.1 M, pH 6.8) de castaña. El análisis mediante *Western Blot* del mismo, empleando anticuerpos monoespecíficos frente a la proteína purificada de semilla, mostró la existencia de dos polipéptidos inmunorreactivos, de tamaño y punto isoeléctrico aparentes compatibles con los valores teóricos obtenidos a partir de la secuencia de ADNc (Fig. 3).

Dichos polipéptidos fueron objeto de análisis MALDI, previa digestión con tripsina. El resultado del análisis mostró que ambas señales correspondían a una misma proteína; además, la masa de los péptidos obtenidos coincide con las teóricas obtenidas a partir de la secuencia aminoacídica deducida (Fig. 4).

Los resultados del análisis bidimensional y MALDI confirman que la proteína detectada corresponde a Cs HSP17.5.

I.4 Caracterización de la actividad chaperona molecular *in vitro*.

Se realizaron ensayos con objeto de profundizar en el estudio de la actividad chaperona de Cs HSP17.5. Previamente se había mostrado este tipo de actividad sobre citrato sintasa de mamífero (Collada *et al.* 1997). En esta ocasión se empleó como sustrato una proteína especialmente abundante en la semilla de castaño, la endoquitinasa Cs Ch1 (Collada *et al.*, 1992). La quitinasa y la sHSP empleadas en tales experimentos fueron purificadas a partir de harina de castaña, tal y como se describe en Material y Métodos.

En estos ensayos se evaluó la capacidad de Cs HSP17.5 tanto de proteger al sustrato de su inactivación térmica como de favorecer su reactivación tras una desnaturalización química. Si bien en el primer caso no se apreció un efecto protector notable, en el segundo se constató un incremento significativo de la actividad quitinasa frente al control negativo (BSA).

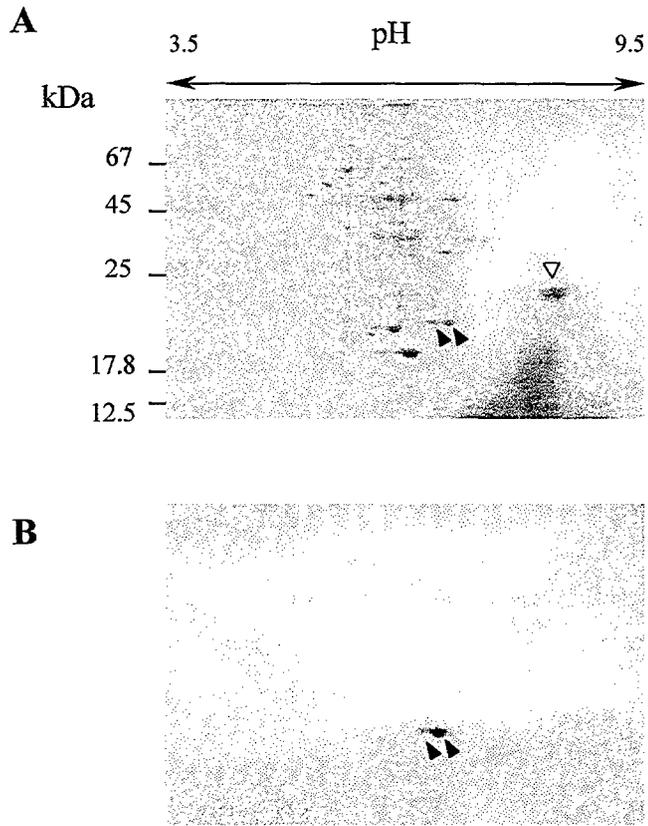


Fig. 3 Electroforesis bidimensional (IEF x SDS-PAGE) de proteínas de castaña extraídas con Tris/HCl 62.5 mM, pH 6.8. **A:** tinción Coomassie. **B:** inmunodetección con anticuerpos monoespecíficos desarrollados frente a la proteína purificada de semilla (Collada *et al.*, 1997). Se señalan los polipéptidos inmunorreactivos (▼) y la endoquitinasa Cs Ch 1 (▽) (apartado I.4).

I.4.1 Cinética de la renaturalización de Cs Ch1

Tras desnaturalizar la quitinasa con cloruro de guanidinio como se describe en Material y Métodos y transcurridos distintos tiempos de renaturalización, un ensayo de actividad quitinasa sirvió para evaluar el grado de renaturalización alcanzado por Cs Ch1. En la mezcla de renaturalización se incluyó Cs HSP17.5, en una relación estequiométrica 1:1 del dodecámero respecto a la quitinasa, de acuerdo con la empleada por Collada *et al.* (1997) con la citrato sintasa.

El resultado de este experimento muestra cómo Cs Ch1 recupera su actividad según una ley casi sigmoïdal, alcanzándose la mayor tasa de reactivación aparentemente en los segundos 15 minutos de renaturalización (Fig. 5A).

A la vista de este experimento se decidió que 60 minutos era un tiempo de renaturalización adecuado para estimar la actividad chaperona de Cs HSP17.5 en las pruebas posteriores, alcanzando la reactivación en presencia de la sHSP un valor aproximadamente 2 veces superior a la mostrada en presencia de BSA (en torno a un 20%, dato no mostrado).

I.4.2 Estequiometría de la interacción Cs HSP17.5/Cs Ch1

Una vez demostrada la actividad chaperona de la sHSP sobre el sustrato escogido, se procedió a estudiar la estequiometría de dicha interacción, incluyendo distintas cantidades relativas de Cs HSP17.5 en la mezcla de renaturalización.

Como se aprecia en la Fig. 5B un incremento en la proporción de chaperona frente a sustrato provoca asimismo un aumento en la renaturalización del mismo, siendo los incrementos decrecientes y saturándose la respuesta en torno a una relación 1:1. Este valor concuerda con el propuesto por Lee *et al.*(1995a) para Ps HSP18.1 recombinante sobre citrato sintasa.

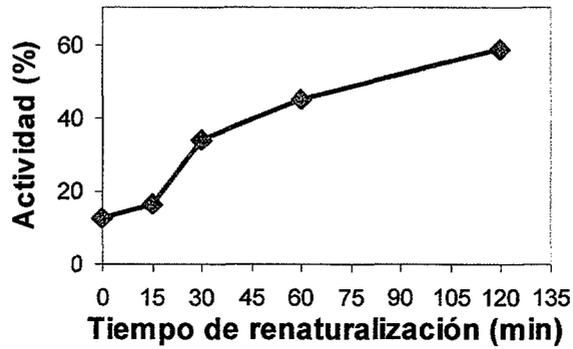
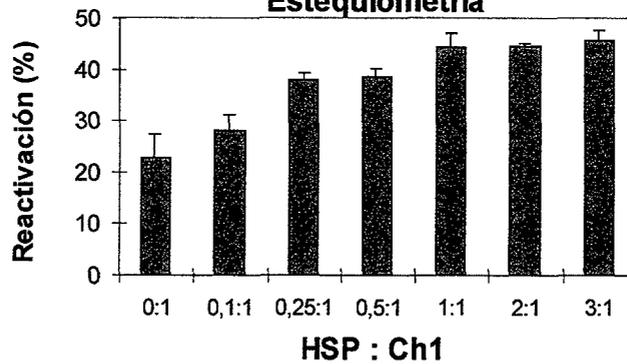
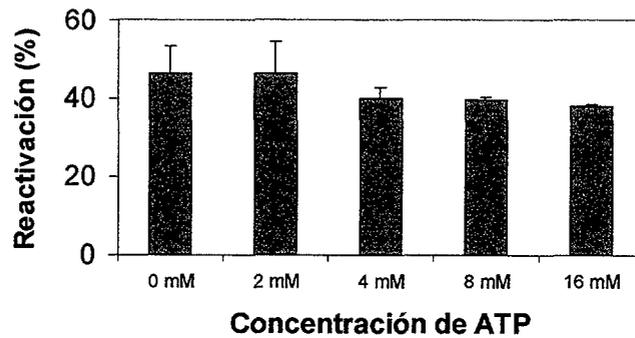
A**Cinética de la renaturalización****B****Estequiometría****C****Efecto del ATP**

Fig. 5 Caracterización de la actividad chaperona *in vitro* de Cs HSP17.5 purificada sobre la endoquitinasa Cs Ch 1 de castaño previamente desnaturada con cloruro de guanidinio. Se incluye la desviación típica de las medidas para cada punto (media de 3 experimentos). **A:** Cinética de la renaturalización. **B:** Estequiometría de la interacción Cs HSP17.5 (dodecámero)/Cs Ch 1. **C:** Efecto del ATP sobre la actividad chaperona.

I.4.3 Efecto del ATP sobre la actividad chaperona

Las HSP mayoritarias en otros organismos eucariotas, como las HSP70 de los mamíferos, presentan un mecanismo de actuación que requiere la hidrólisis de ATP (Fink, 1999; Flaherty *et al.*, 1990). En el caso de las sHSP, las mayoritarias en los vegetales, este aspecto aún no está bien dilucidado; así, mientras que para una proteína homóloga, como es la α B cristalina humana, se ha postulado un aumento de la actividad chaperona dependiente de ATP (Muchowski y Clark, 1998), la actividad de Ps HSP18.1 de guisante es independiente del consumo de ATP y de GTP (Lee *et al.*, 1995a).

Para evaluar si el ATP influye en la interacción de Cs HSP17.5 con Cs Ch1 se realizó un nuevo ensayo en el que se incluyeron diversas cantidades de ATP en la mezcla de renaturalización. A la vista de los resultados anteriores, la renaturalización se prolongó durante 60 minutos, empleando una proporción Cs HSP17.5 (dodecámero)/Cs Ch1 de 1:1. El resultado obtenido indica que el mecanismo de actuación de la chaperona de castaña es independiente del consumo de ATP (Fig. 5C).

II. PROTEÍNAS SHSP DE TALLO DE *CASTANEA SATIVA* MILL.

Como se ha indicado en la Introducción, la mayor parte de los estudios acerca de la expresión de sHSP en plantas se han realizado con especies herbáceas. Por el contrario hay una ausencia casi total de datos de especies arbóreas, fundamentalmente referentes a tejidos vegetativos. Sin embargo, en el caso de las especies caducifolias de la región templada, donde el suelo no se congela de forma habitual, el tallo es el órgano vegetativo más expuesto a temperaturas adversas: carece de una termorregulación contra las altas temperaturas tan efectiva como la de las hojas, y durante el invierno tiene que resistir temperaturas más bajas que la raíz. Por estos motivos se decidió extender el estudio a los tejidos caulinares del castaño.

II.1 Detección de proteínas inmunorreactivas en extractos de tallo

Se abordó la detección de proteínas relacionadas inmunológicamente con Cs HSP17.5 en el tallo de *C. sativa* y otras especies arbóreas forestales. En este estudio fueron incluidas especies con distinto grado de proximidad filogenética respecto al castaño, abarcando desde taxones tan alejados como las gimnospermas hasta especies de su misma familia (*Fagaceae*). Así, se recogieron muestras de rama de las siguientes especies:

<i>Cedrus deodara</i> (D.Don) G. Don fil.	(<i>Pinaceae</i>)
<i>Pinus pinea</i> L.	(<i>Pinaceae</i>)
<i>Acer pseudoplatanus</i> L.	(<i>Aceraceae</i>)
<i>Quercus suber</i> L.	(<i>Fagaceae</i>)
<i>Juglans regia</i> L.	(<i>Juglandaceae</i>)
<i>Aesculus hippocastanum</i> L.	(<i>Hippocastanaceae</i>)

Los extractos proteicos obtenidos a partir de este material fueron sometidos a SDS-PAGE y transferidos a continuación a PVDF. Se realizó entonces una inmunodetección con el anticuerpo desarrollado frente a Cs HSP17.5, cuyo resultado se muestra en la Fig. 6.

Este experimento muestra la presencia de proteínas similares a Cs HSP17.5, en el tallo de todas las especies estudiadas, siendo más abundantes en *C. deodara*, *A. hippocastanum*, *Q. suber* y el propio *C. sativa*, lo que apuntaría hacia un papel relevante de las sHSP en los tejidos del tallo. Sin embargo, la detección a un nivel inferior en *P. pinea*, *A. pseudoplatanus* y *J. regia* puede significar la sustitución en dicha función de las sHSP de la clase I citosólica por otras proteínas, quizá por otra clase de sHSP. Conviene resaltar cómo la presencia o ausencia en distintas especies de proteínas inmunológicamente relacionadas con Cs HP17.5 no está relacionada con la proximidad filogenética, puesto que una de las señales más fuertes se da en el tallo de cedro, muy alejado del castaño, y apenas se aprecia en el tallo del pino piñonero, perteneciente a la misma familia que el anterior.

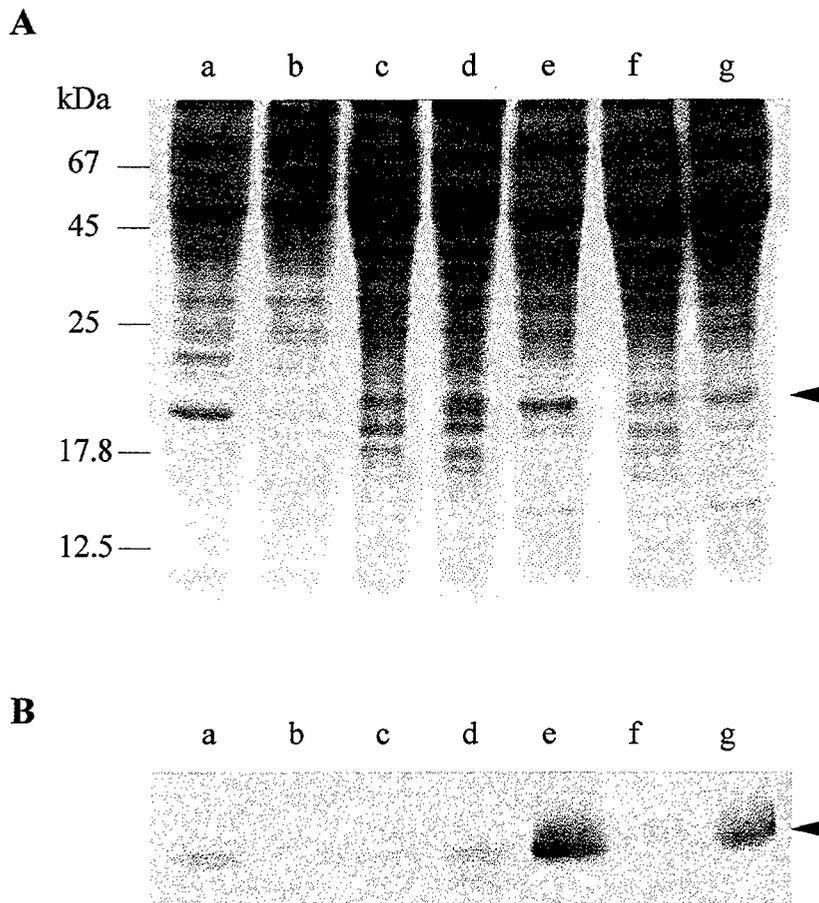


Fig. 6 Detección de proteínas relacionadas inmunológicamente con Cs HSP17.5. **A:** tinción Coomassie de extractos proteicos de tallo de especies arbóreas forestales fraccionados mediante SDS-PAGE. **B:** inmunodetección con anticuerpos monoespecíficos frente a Cs HSP17.5. **Muestras:** **a**, *Cedrus deodara*; **b**, *Pinus pinea*; **c**, *Acer pseudoplatanus*; **d**, *Aesculus hippocastanum*; **e**, *Quercus suber*; **f**, *Juglans regia*; **g**, *Castanea sativa*. Se señala con una flecha la posición correspondiente a Cs HSP17.5.

II.2 Purificación y caracterización parcial de componentes mayoritarios

Se abordó a continuación la purificación de las sHSP mayoritarias en tallo detectadas mediante *Western Blot*. Para ello se realizó una extracción de proteínas de rama de castaños adultos, tal y como se describe en Material y Métodos. El alto contenido en taninos del tallo de castaño dificulta en gran medida la purificación de proteínas del mismo; para solventar este inconveniente, las proteínas del extracto fueron reducidas y carboximetiladas. A continuación se sometieron a una cromatografía de alta resolución (HPLC) de filtración molecular. Las fracciones recogidas fueron sometidas a una nueva inmunodetección, en función de la cual se seleccionó aquella en que la proteína reconocida por el anticuerpo de Cs HSP17.5 era más abundante. Una electroforesis bidimensional de dicha fracción reveló la existencia en la misma de 3 polipéptidos reconocidas por el anticuerpo (Fig. 7). Los dos mayoritarios fueron sometidos a un análisis MALDI, previa digestión con tripsina. El resultado del análisis reveló que las dos señales correspondían a una misma proteína; la masa de los péptidos obtenidos coincidía, además, con las teóricas obtenidas a partir de la secuencia aminoacídica deducida para la Cs HSP17.5 identificada en semilla. No se pudo obtener la secuencia de estos polipéptidos, al estar bloqueado su extremo N-terminal.

Purificación y secuenciación de péptidos internos

En vista de la imposibilidad de secuenciar desde su extremo amino las proteínas de tallo reconocidas por el anticuerpo de Cs HSP17.5, se decidió abordar la secuenciación de péptidos internos de las mismas. Para ello se recortaron las zonas correspondientes a dichas proteínas de las membranas de PVDF. Se realizó a continuación una digestión con la endoproteasa Asp-N. Los péptidos resultantes de la digestión se separaron por RP-HPLC (apartado II.3.2 de Material y Métodos) y dos de ellos fueron secuenciados completamente. El resultado de esta secuenciación de los péptidos indica que se trata de una única proteína; además, las secuencias obtenidas coinciden exactamente con dos de las deducidas a partir de una digestión con endoAsp-N de la secuencia aminoacídica de la Cs HSP17.5 de semilla (Fig. 8).

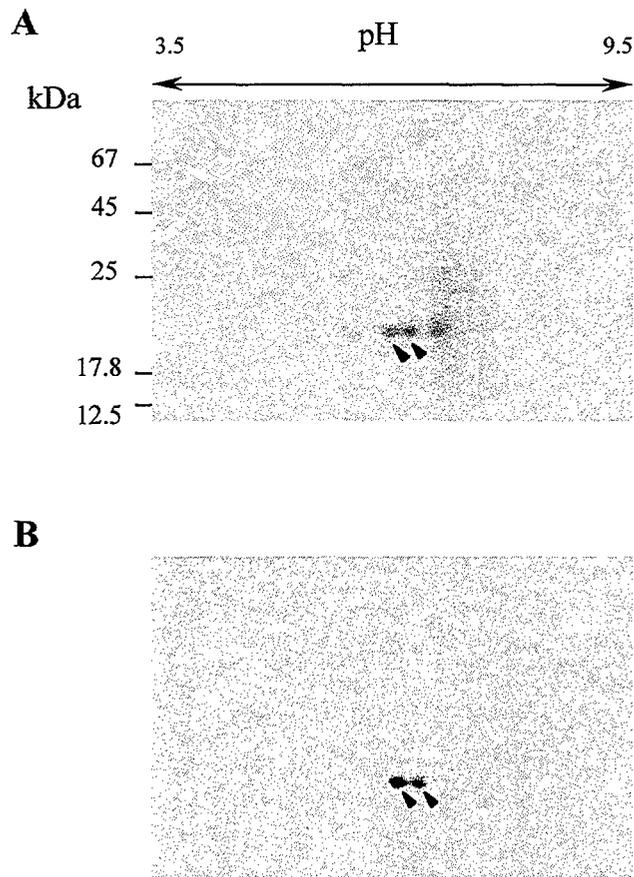


Fig. 7 Electroforesis bidimensional (IEF x SDS-PAGE) de la fracción seleccionada por HPLC de filtración molecular del extracto proteico de tallo de castaño. **A:** tinción Coomassie. **B:** inmunodetección con anticuerpos monoespecíficos frente a Cs HSP17.5. Se señalan con una flecha los polipéptidos inmunorreactivos, que posteriormente serían caracterizados.

II.3 Aislamiento y caracterización del ADNc de la principal sHSP de tallo

II.3.1 Construcción y rastreo de una genoteca de ADNc de tallo

El proceso seguido para la construcción de la genoteca de expresión de tallo de castaño fue análogo al descrito para semilla. El título final de la genoteca fue de 1×10^6 pfu/ μ l. Para el rastreo se empleó como sonda el fragmento comprendido entre los sitios de restricción *EcoRI* y *SalI* del ADNc Cs *hsp17.5* obtenido del rastreo de la genoteca de semilla (nucleótidos -13 a 657, Fig. 1). Se emplearon condiciones de baja restrictividad, procesándose 3.0×10^5 clones. Se seleccionaron un total de 10 candidatos independientes, provenientes cada uno de ellos de distintos clones escogidos en la primera selección.

II.3.2 Caracterización del ADNc

La secuenciación de los candidatos seleccionados mostró que todos los insertos correspondían a un único ADNc. Dicha secuencia, además, resultó ser coincidente con la obtenida en el rastreo de la genoteca de expresión de semilla, Cs *hsp17.5* (Fig. 1), tal y como predecían los datos de secuenciación parcial de las proteínas purificadas (Fig. 8).

M A L S L F G G R R S N V F D P F S L D I W D P F	25
E G F S A V A N V P P S A R E T T A F A T A R I D	50
W K E T P E A H I F K A D L P G L K K E E V K V E	75
V E D G N V L Q I S G E R S K E H E E K N D K W H	100
R V E R S C G K F L R R F R L P E N A K V E Q V K	125
A N M E N G V L T V I V P K E E Q K K T E V K S I	150
E I S G	154

Fig. 8 Secuencia de aminoácidos deducida para el ADNc obtenido del rastreo de la genoteca de expresión de tallo de castaño, idéntico al ADNc Cs *hsp17.5* obtenido de semilla. Aparecen destacados los péptidos purificados y secuenciados tras digestión con endoproteasa Asp-N de las proteínas inmunorreactivas seleccionadas en la electroforesis bidimensional (Fig. 7).

II.3.3 Secuenciación de fragmentos amplificados a partir de ARN poli(A)+ de tallo (RT-PCR)

Con objeto de confirmar la identidad entre la sHSP mayoritaria en los cotiledones y la detectada en el tallo (Cs HSP17.5) se realizó una transcripción inversa a partir de ARN poli(A)+ obtenido de rama de castaño. A continuación, y empleando como molde el ADNc resultante, se realizó una PCR con cebadores específicos de Cs *hsp17.5* que amplificarían un fragmento de 383 pb (Fig. 9A). El resultado de esta reacción fue un fragmento único, del tamaño esperado, tal y como se apreció en EGA (Fig. 9B).

La secuenciación completa de este fragmento, empleando los mismos cebadores que sirvieron para su amplificación confirmó que correspondía, sin una sola discrepancia, al que se amplificaría a partir de Cs *hsp17.5*, lo que apoya que la sHSP detectada en los tejidos del tallo sea la misma que la identificada y purificada a partir de cotiledón.

II.4 Organización genómica de Cs *hsp17.5*

Se procedió a continuación a investigar la posible presencia de genes homólogos a Cs *hsp17.5* en el genoma de *C. sativa*. Para ello se realizó un experimento de *Southern Blot* sobre ADN genómico purificado a partir de semilla. Antes de proceder a la electroforesis, muestras de dicho ADN fueron digeridas con los enzimas *Bam*HI, *Bgl*III y *Sal*I. Estos dos últimos tienen dianas de restricción en la secuencia conocida de ADNc de Cs *hsp17.5* (Fig. 10).

El resultado del *Southern* sugiere la existencia de muy pocos genes homólogos a la sonda empleada, lo que estaría en concordancia con la obtención de una única secuencia en el rastreo tanto de la genoteca de semilla como en el de la genoteca de rama. Por lo tanto, Cs *hsp17.5* podría pertenecer a una familia compuesta por 1-2 miembros homólogos.

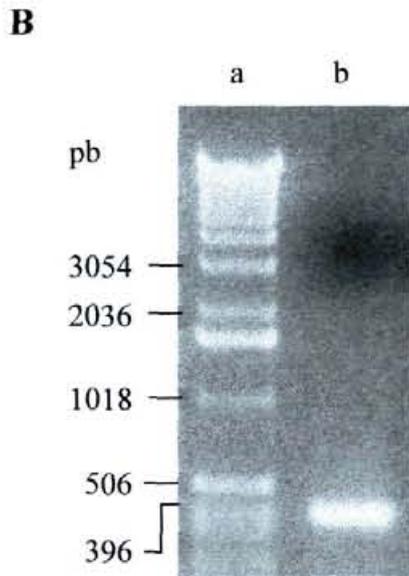
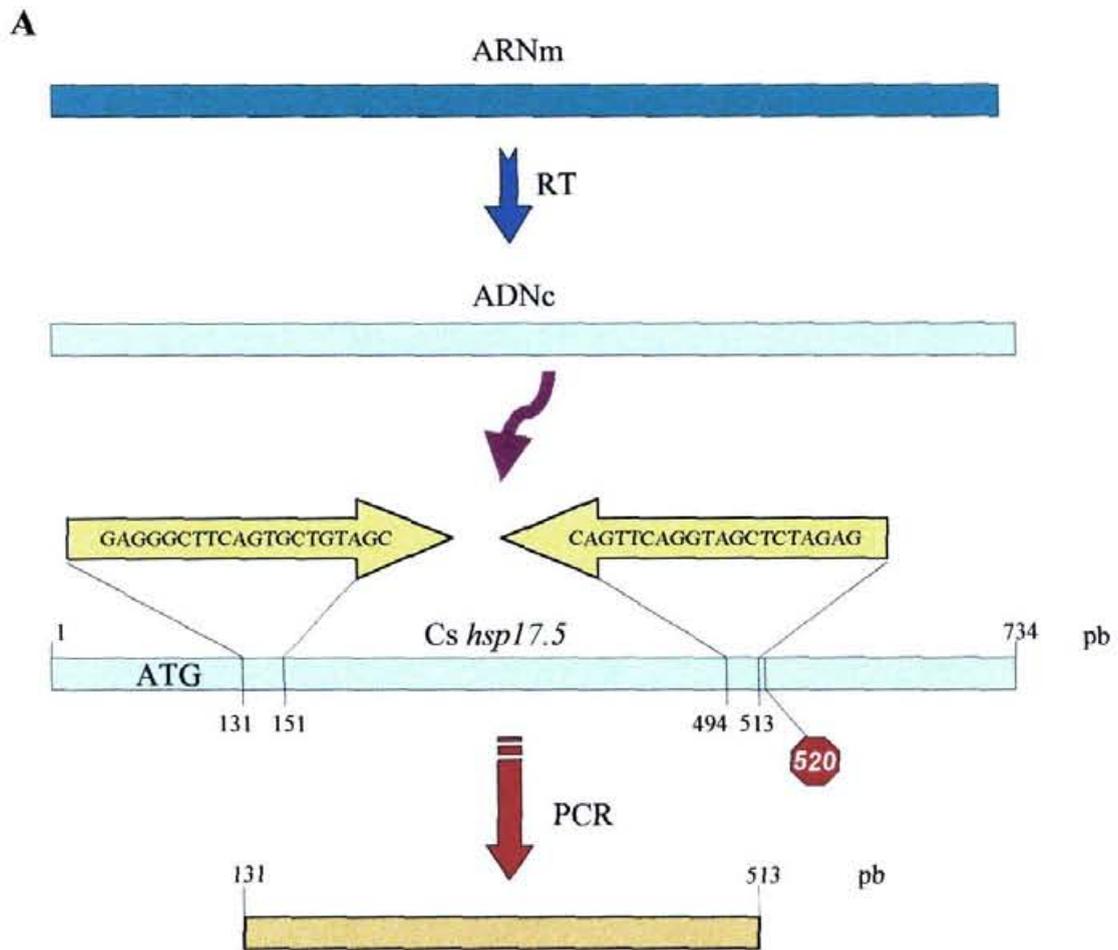


Fig. 9 A: Esquema del experimento de RT-PCR a partir de ARN purificado de tallo de castaño. Mediante transcripción inversa, utilizando como molde ARN poli(A)⁺, se obtuvo ADNc que se empleó a su vez como molde para la amplificación por PCR con cebadores específicos para *Cs hsp17.5*. **B:** Electroforesis en gel de agarosa del resultado de la amplificación anterior. La única banda amplificada, del tamaño esperado, fue secuenciada completamente, confirmando la presencia de *Cs hsp17.5* en el ADNc de tallo.

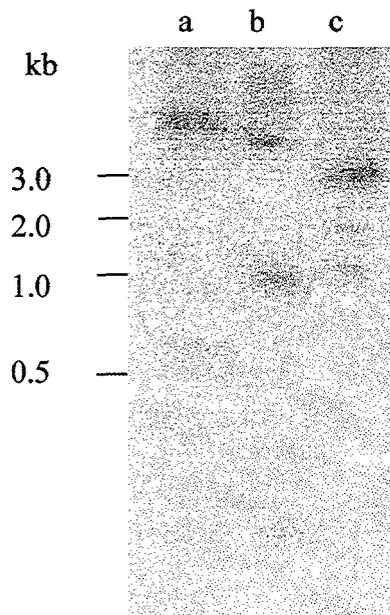


Fig. 10 *Southern blot* de ADN genómico de *C. sativa* digerido con *Bam*HI (a), *Bgl*II (b) y *Sal*I (c). Tanto *Bgl*II como *Sal*I tienen dianas en la secuencia codificante de *Cs hsp17.5*. Como sonda se utilizó el fragmento *Eco*RI-*Sal*I (671 pb) del ADNc *Cs hsp17.5*.

III. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN Y POSIBLE FUNCIÓN *IN VIVO*

III.1 Expresión *in planta*

III.1.1 Localización subcelular

El trabajo previo realizado en el laboratorio había mostrado que la proteína Cs HSP17.5 es una de las más abundantes en las células cotiledonares de las semillas maduras de castaño; por lo tanto, se escogió este tejido para estudiar la localización subcelular de la proteína. Se tomaron cotiledones de semillas en una fase tardía de maduración y se sometieron a inmunodetección con el anticuerpo monoespecífico desarrollado contra Cs HSP17.5. Para esta detección se siguió la técnica descrita por Rodríguez-Cerezo *et al.* (1997), que si bien implica una pérdida de definición en la detección de las estructuras celulares, mantiene un nivel de antigenicidad de las proteínas elevado.

La microscopía revela la ubicación de la proteína exclusivamente en el citosol celular (Fig. 11). No se aprecia señal en los gránulos de almidón, ni en las vacuolas; el anticuerpo tampoco reconoció a la proteína en la pared celular ni en el espacio intercelular. Este resultado demuestra la localización subcelular predicha a la luz de la secuencia del ADNc de Cs HSP17.5, según la cual se había adscrito la proteína Cs HSP17.5 al grupo de las sHSP citosólicas de clase I vegetales.

III.1.2 Localización tisular en tallo

Una vez confirmada la ubicación citosólica de Cs HSP17.5 y demostrada su presencia a niveles significativos en el tallo del castaño (apartado II), se investigó su localización histológica dentro de dicho órgano. Se realizó una inmunodetección sobre secciones transversales, siguiendo el método descrito en Material y Métodos. En la Fig. 12 se muestran imágenes representativas de la inmunodetección, obtenidas por microscopía confocal. Se aprecia la ubicación de Cs HSP17.5 de forma preferente en la zona del cambium y del floema secundario, no siendo apreciable en el xilema secundario ni en la corteza.

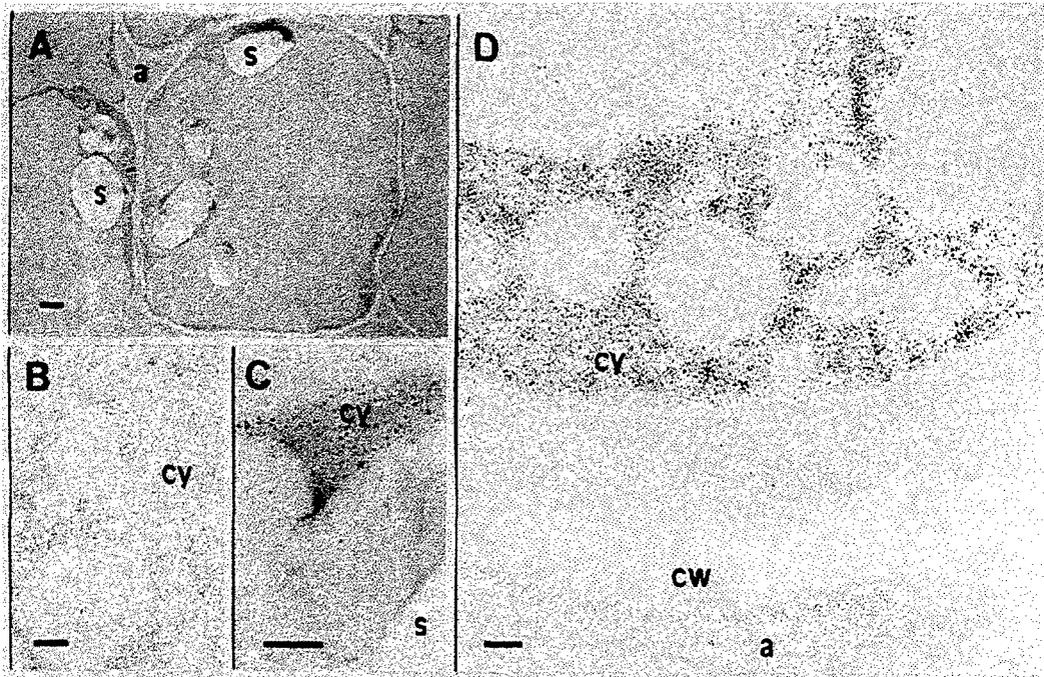


Fig. 11 Localización subcelular de Cs HSP17.5 en células cotiledonares de semillas en desarrollo mediante inmunomicroscopía electrónica. **A:** anatomía típica de las células en este estado de desarrollo. **B:** sección incubada con suero preinmune (control). **C y D:** secciones incubadas con los anticuerpos monoespecíficos frente a Cs HSP17.5. El marcaje con oro coloidal (partículas de 10 nm) ligado al anticuerpo secundario revela la presencia de proteína inmunorreactiva exclusivamente en el citosol. **a:** espacio apoplástico; **cw:** pared celular; **cy:** citoplasma; **s:** gránulos de almidón. Barras: **A:** 2 μ m; **B, C y D:** 200 nm.

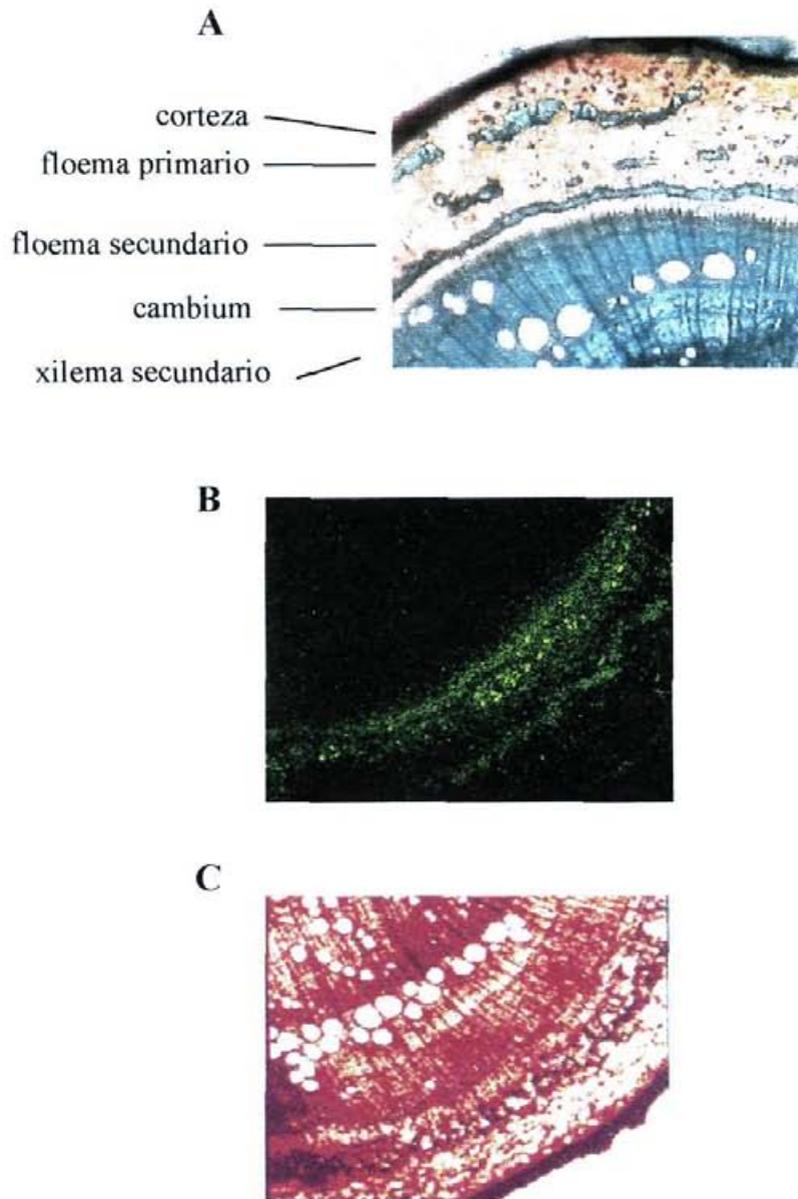


Fig. 12 Localización de Cs HSP17.5 en cortes transversales de tallo de castaño.

A: corte representativo, donde se aprecia la anatomía del tallo; la celulosa se tiñó con Rojo Congo y la lignina con Verde Iodo.

B: inmunolocalización de Cs HSP17.5 empleando anticuerpo secundario conjugados al fluoróforo Alexa 488 (fluorescencia a 510 nm). No se apreció señal fluorescente en el control negativo (dato no mostrado).

C: aspecto del mismo corte del panel B bajo luz visible.

III.1.3 Regulación de la expresión de Cs HSP17.5

Tal y como se ha indicado en la Introducción, el estímulo ambiental que más comúnmente induce la expresión de HSP es el calor, por lo que se comprobó su efecto sobre la transcripción del gen correspondiente a Cs *hsp17.5*. Pero también otros factores pueden influir sobre la expresión de HSP; en este contexto es de especial interés el efecto de las bajas temperaturas, respecto al cual existen referencias contradictorias en la bibliografía (Vierling, 1991; Waters 1996). Por otra parte, también se estudió la expresión de Cs HSP17.5 durante los procesos de maduración y germinación. En todos los casos se empleó como sonda el fragmento comprendido entre los sitios de restricción *EcoRI* y *Sall* del ADNc Cs *hsp17.5* (nucleótidos -13 a 657, Fig. 1).

III.1.3.1 Expresión en semilla

Numerosas referencias bibliográficas muestran la inducción de sHSP en ausencia de estrés durante el desarrollo seminal (Vierling, 1991; zur Nieden *et al.*, 1995; Wehmeyer *et al.*, 1996; Coca *et al.*, 1996), y el trabajo previo realizado en nuestro laboratorio señala a Cs HSP17.5 como una de las proteínas de bajo peso molecular (<25 kDa) más abundantes del cotiledón de la castaña madura (Collada *et al.*, 1997).

Con el fin de profundizar en el estudio de la expresión de Cs HSP17.5 en semilla en ausencia de estrés se realizó un seguimiento de su transcripción a lo largo de los procesos de maduración y germinación. Para ello se recogieron muestras 90, 110 y 130 días tras la aparición del pistilo (estadios de maduración M1, M2 y M3) y 0, 4, 8 y 12 días tras la aparición de la radícula (estadios de germinación G1, G2, G3 y G4).

El resultado del experimento de *Northern Blot* (Fig. 13) muestra en todos los casos la presencia de una única banda reconocida por la sonda y del tamaño esperado en virtud del ADNc. Se aprecia un aumento de la transcripción de Cs *hsp17.5* durante la primera fase de maduración de la semilla, estando ya presente el ARNm desde el primer estadio; la transcripción alcanza un máximo en la segunda etapa de maduración y comienza a descender, alcanzando durante la tercera fase un nivel similar al de la primera. Esta

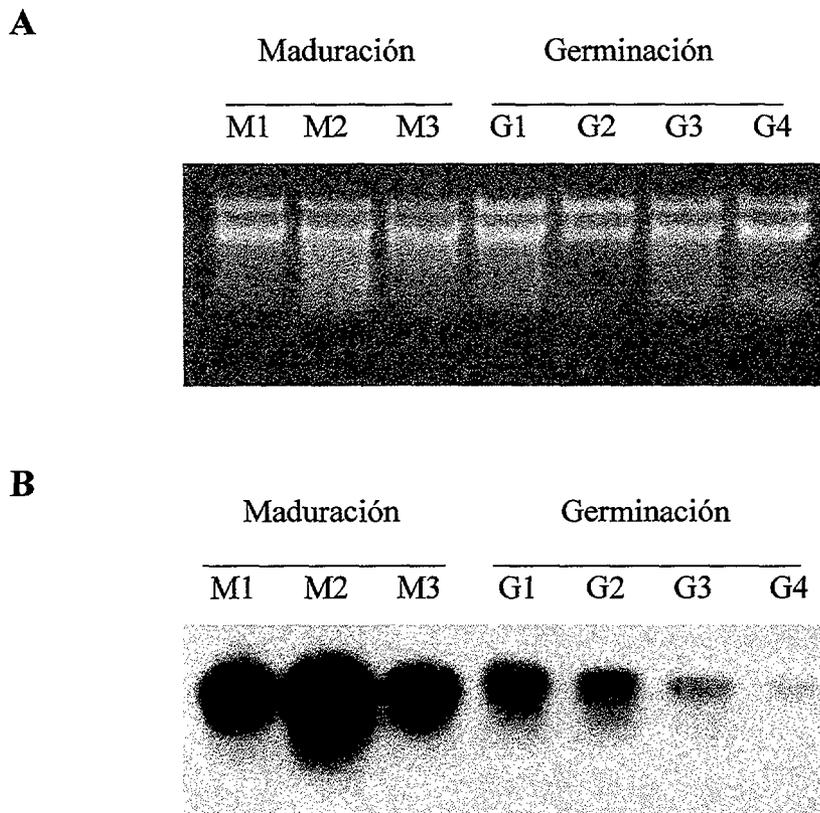


Fig. 13 *Northern blot* de ARN de semilla en los estadios de maduración M1, M2 y M3 (90, 110 y 130 días tras la aparición del pistilo) y en los estadios de germinación G1, G2, G3 y G4 (0, 4, 8 y 12 días tras la aparición de la radícula) **A**: control teñido con bromuro de etidio. **B**: resultado de la hibridación con la misma sonda radiactiva que la indicada en la Fig. 10.

tendencia decreciente en la transcripción de Cs *hsp17.5* continúa durante la germinación de la semilla, llegando casi a anularse por completo en el último estadio de germinación.

III.1.3.2 Expresión en plántula en respuesta a estrés controlado

Estrés de calor

La temperatura habitual empleada en los tratamientos de calor sobre vegetales es de 32°C. El resultado del *Northern Blot* realizado con material procedente de plántulas sometidas a este tratamiento no reveló una respuesta detectable en cuanto a la transcripción de Cs *hsp17.5* en las hojas. Sí se aprecia transcripción en las raíces, aumentando la señal con la duración del tratamiento. Sin embargo, donde más fuerte es esta respuesta es en el tallo, que muestra, además, transcripción de forma constitutiva (Fig. 14A).

Habida cuenta de que las temperaturas estivales que sufren los castaños en la localidad de procedencia de las semillas a partir de las cuales se obtuvieron las plántulas a menudo superan los 32°C, decidió ampliarse este estudio mediante la aplicación de un tratamiento de 40°C. La respuesta detectada en este caso es más intensa que la observada para 32°C. Del mismo modo que para el tratamiento anterior, con la duración del mismo aumenta la señal correspondiente al ARNm; sí se aprecia en este caso transcripción en las hojas, si bien la respuesta sigue siendo más intensa en el tallo (Fig. 14B).

En todos los casos se aprecia una sola banda de ARNm en cada carril, lo que apunta hacia la existencia de un mensajero único. Este dato concuerda con los obtenidos para proteína mediante electroforesis bidimensionales y análisis MALDI (ver apartado I.3).

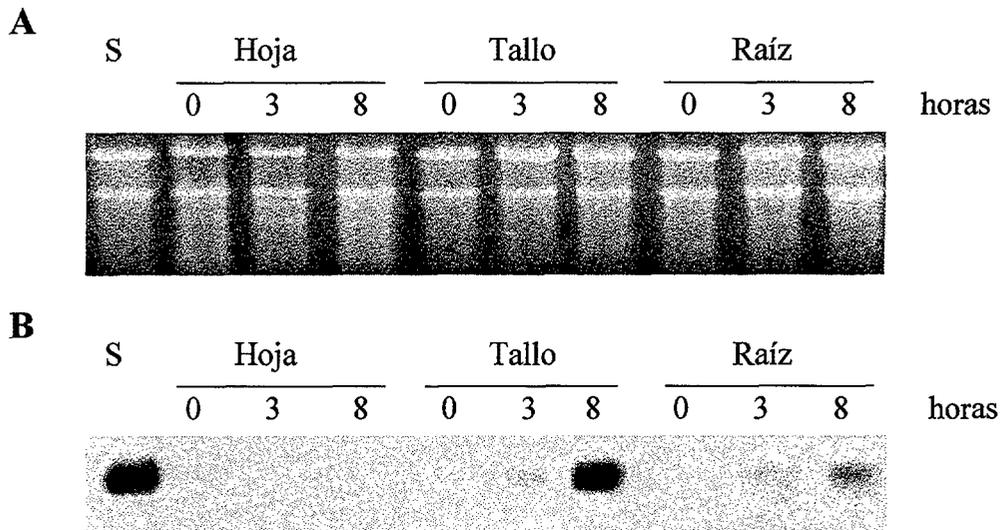


Fig. 14 A Expresión de gen(es) sHSP en respuesta a un tratamiento de calor plántulas sometidas a 32°C. El ARN se aisló a partir de hoja, tallo y raíz de plántulas de castaño a las 0, 3 y 8 horas del inicio del tratamiento. **A:** control teñido con bromuro de etidio. **B:** resultado de la hibridación con la misma sonda radiactiva que se indica en la Fig. 10. **S:** ARN de semilla madura.

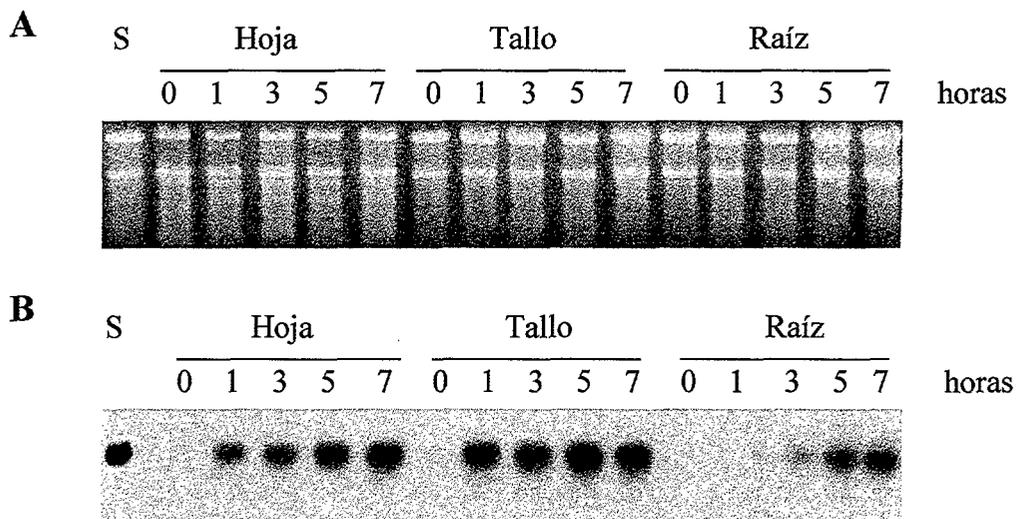


Fig. 14 B Expresión de gen(es) sHSP en respuesta a un tratamiento de calor (40°C). El ARN se aisló a partir de hoja, tallo y raíz de plántulas de castaño a las 0, 1, 3, 5 y 7 horas del inicio del tratamiento. **A:** control teñido con bromuro de etidio. **B:** resultado de la hibridación con la misma sonda radiactiva. **S:** ARN de semilla madura.

Tratamiento de 4°C

El tratamiento de frío tuvo una duración total de 8 semanas. En la Fig. 15 se incluyen muestras recogidas a las 3 y 8 semanas como puntos representativos del mismo. En este caso no se apreció respuesta de ningún tipo en las hojas de las plántulas, pero sí una fuerte inducción en el tallo. Como en el caso del choque térmico, la señal de ARNm aumenta con la duración del tratamiento. La inducción en raíz sigue el mismo patrón que en tallo, aunque es menos intensa.

Tratamiento salino

La salinidad elevada tiene unos efectos sobre los organismos que en parte son similares a los provocados por otros estreses. Así, en vegetales, además del desequilibrio iónico, el estrés osmótico que supone una salinidad elevada induce unas rutas de control de la expresión génica convergentes con aquéllas que se inducen ante la desecación (Uno *et al.*, 2000). También se ha descrito que el estrés salino tiene unos efectos similares a los de la temperatura elevada sobre los sistemas proteolíticos de algunos procariontas (Nekolny y Chaloupka, 2000). Por estas razones se decidió aplicar un tratamiento salino (NaCl 200 mM) a plántulas de castaño, con el fin de comprobar la respuesta en cuanto a transcripción de Cs *hsp17.5*. No obstante, en el experimento de *Northern Blot* no se apreció inducción de la transcripción en ninguna de las muestras (datos no mostrados), lo que sugiere que Cs HSP17.5 no está implicada en una eventual respuesta defensiva contra el estrés salino.

Ácido salicílico. Ácido jasmónico. Herida

Se aplicaron otros tratamientos, de tipo hormonal (ácido salicílico, ácido jasmónico) y mecánico (herida), sobre plántulas de castaño.

Tanto el ácido salicílico como el jasmónico están implicados en numerosas rutas de control génico, no sólo relacionadas con la diferenciación y el crecimiento sino también en respuesta a agresiones externas, ya sean bióticas o abióticas. En este sentido, el ácido salicílico juega un papel central en los procesos defensivos que conducen a la

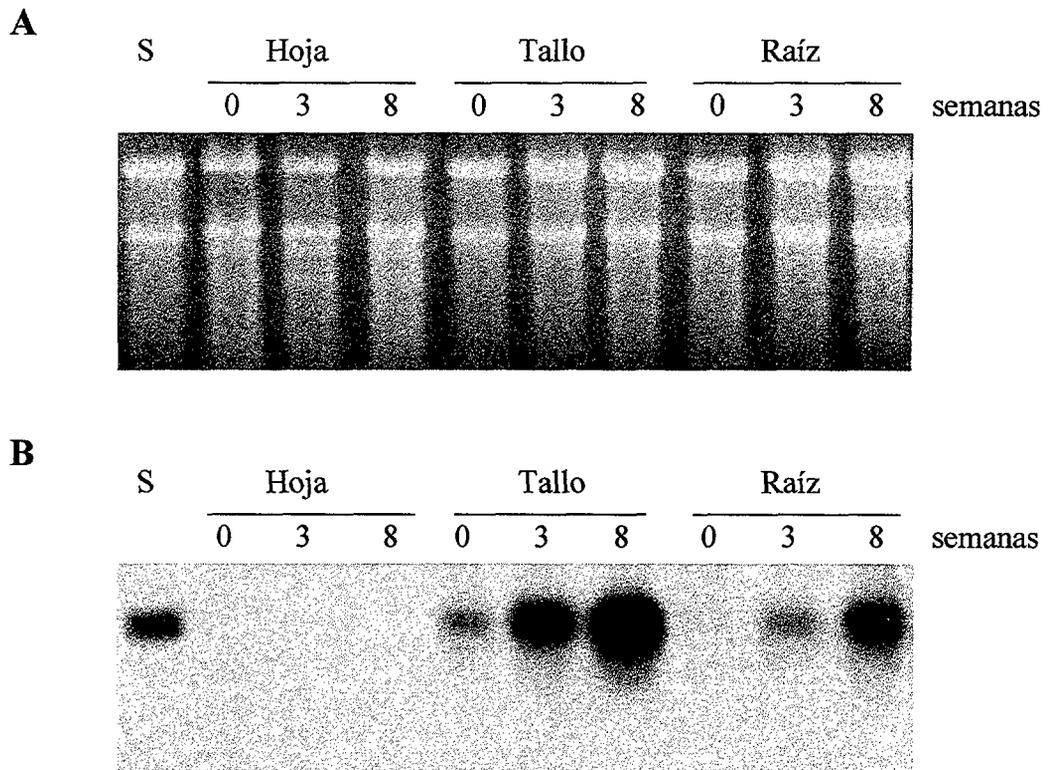


Fig. 15 Expresión de gen(es) sHSP en respuesta a un tratamiento de 4°C. El ARN se aisló a partir de hoja, tallo y raíz de plántulas de castaño a las 0, 3 y 8 semanas del inicio del tratamiento. **A:** control teñido con bromuro de etidio. **B:** resultado de la hibridación con la sonda radiactiva de *Cs hsp17.5*. S: ARN de semilla madura.

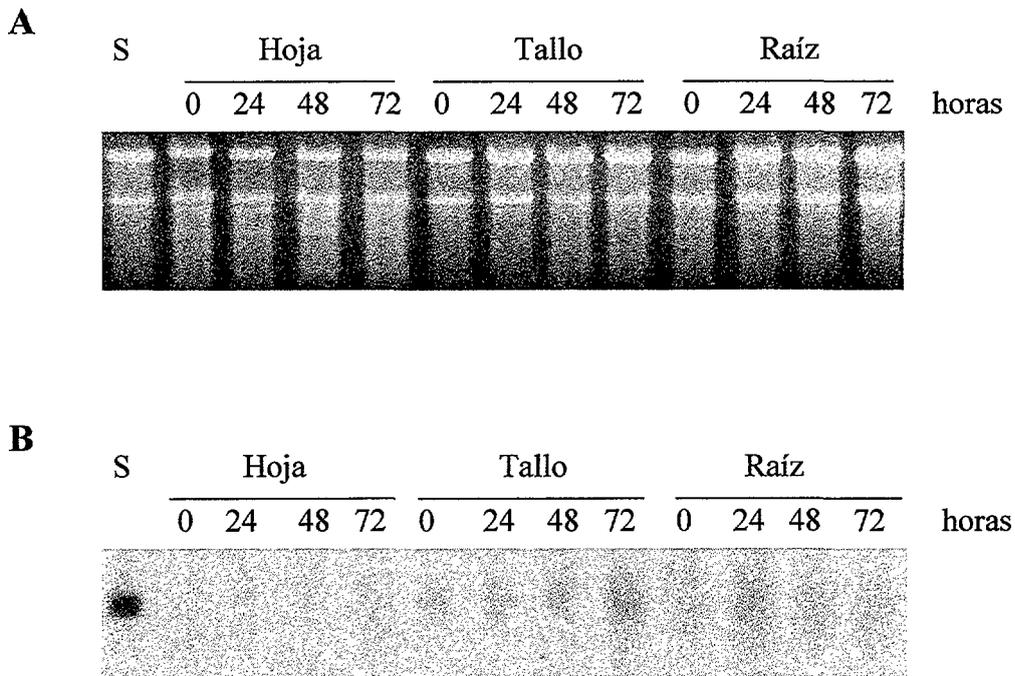


Fig. 16 Expresión de gen(es) sHSP en respuesta a un tratamiento con ácido salicílico. El ARN se aisló a partir de hoja, tallo y raíz de plántulas de castaño a las 0, 24, 48 y 72 horas del inicio del tratamiento. **A:** control teñido con bromuro de etidio. **B:** resultado de la hibridación con la sonda radiactiva. **S:** ARN de semilla madura.

resistencia sistémica adquirida (SAR, *systemic acquired resistance*) y a la apoptosis (McDowell *et al.*, 2000; Dong, 1998; Sticher *et al.*, 1997; Lam *et al.*, 1999). Por su parte, la producción de heridas dispara una serie de reacciones en la planta (Maleck y Dietrich, 1999), que implican rutas de transcripción no del todo conocidas, en las que también intervienen reguladores de la transcripción como los descritos (O'Donnell *et al.*, 1996).

En los experimentos de *Northern Blot* no se apreció ningún incremento en la transcripción de Cs *hsp17.5* en ninguno de los órganos vegetativos en respuesta al tratamiento con ácido jasmónico ni a la herida mecánica producida en las hojas. En cambio sí se apreció una cierta inducción ante el tratamiento con ácido salicílico, aunque no en las hojas (Fig. 16). En tallo y raíz la señal aumenta con el tiempo transcurrido tras la aplicación exógena del tratamiento, siendo siempre más intensa en el tallo. En cualquier caso, el efecto es mucho más tenue que el provocado por los choques de calor o frío.

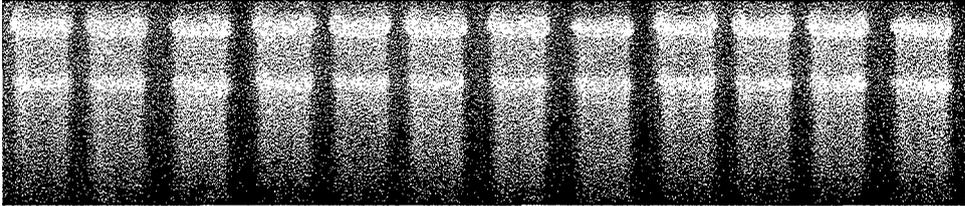
III.1.3.3 Patrón de expresión estacional en castaños adultos

La transcripción constitutiva de Cs *hsp17.5* en tallo, sugiere la relevancia del papel fisiológico jugado por la proteína en el mismo, tal vez no restringida a una respuesta a estrés. Siguiendo esta idea, se procedió a realizar un seguimiento de la transcripción en las ramas a lo largo de todo el año.

El *Northern Blot* muestra la presencia de ARNm de Cs *hsp17.5* en rama durante los doce meses del año, dato al que apuntaba su detección, asimismo, en el tallo de las plántulas empleadas como control de los tratamientos en laboratorio, no sometidas a ningún estrés (Fig. 17A). Se aprecia un incremento notable y paulatino en la señal a lo largo de los meses invernales, comenzando en Noviembre y alcanzando su máximo en Febrero-Marzo. A continuación la transcripción decae drásticamente, alcanzando en Abril el mínimo del ciclo anual. En la segunda parte de la primavera comienza de nuevo a incrementarse la señal, tendencia que se prolonga durante el verano; el máximo de esta inducción estival se da en el mes de Agosto y alcanza niveles similares a los del máximo invernal.

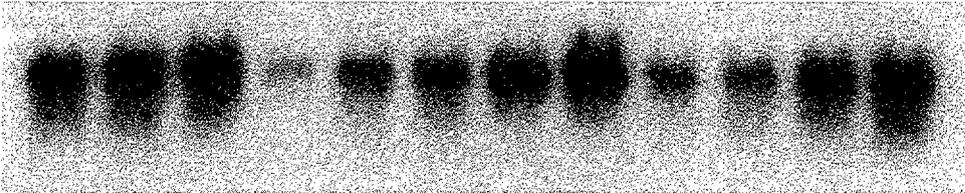
A

Ene Feb Mar Abr May Jun Jul Ago Sep Oct Nov Dic



B

Ene Feb Mar Abr May Jun Jul Ago Sep Oct Nov Dic



C

Ene Feb Mar Abr May Jun Jul Ago Sep Oct Nov Dic



Fig. 17 Expresión del gen *Cs hsp17.5* a lo largo de los 12 meses del año en ramas de ejemplares adultos.

A, B: *Northern blot*. **A:** control teñido con bromuro de etidio. **B:** resultado de la hibridación con la sonda radiactiva.

C: *Western blot*. Resultado de la incubación con anticuerpos monoespecíficos desarrollados contra *Cs HSP17.5*.

Con el fin de complementar estos datos, se decidió estudiar la presencia de la proteína en la rama durante el ciclo anual. Se llevó a cabo, pues, un *Western Blot* con extractos proteicos obtenidos de las mismas muestras de las que se había extraído ARN para el *Northern* (Fig. 17B).

En esta inmunodetección se observa la presencia de Cs HSP17.5 durante todo el año, así como los dos incrementos esperados durante los periodos invernal y estival. Sin embargo, se aprecia un desfase entre transcripción y traducción: mientras que la inducción invernal en aquélla se inicia en Noviembre, la acumulación de proteína no es notable hasta el mes de Diciembre, y el máximo de esta inducción se da netamente en Marzo; por su parte, la inducción de verano se prolonga, en cuanto a presencia de proteína, hasta el mes de Septiembre. Se sigue observando, no obstante, una disminución drástica en la señal correspondiente a Cs HSP17.5 al pasar de Marzo a Abril.

III.2 Estudios de funcionalidad *in vivo*

Se empleó la cepa BL21(DE3) de *Escherichia coli* como sistema modelo en el que abordar este estudio. La utilización de vectores de expresión inducible por IPTG (pET 11d y pRSET b) permitió controlar la síntesis heteróloga de la proteína.

III.2.1 Expresión heteróloga en *E. coli*

III.2.1.1 Expresión mediante el sistema pET 11d

Para el clonaje en pET 11d se escogieron los sitios de restricción *NcoI* y *BamHI*. La diana reconocida por *NcoI* incluye la secuencia ATG, necesaria para el inicio de la traducción, de modo que, mediante su inclusión en el extremo 5' del fragmento a clonar, se logra la expresión íntegra de la proteína sin aminoácidos añadidos en su extremo N-terminal. Por tanto, mediante una reacción de PCR sobre el molde pBluescript SK/Cs *hsp17.5*, resultado del rastreo de la genoteca de expresión de semilla, se generó un fragmento *NcoI-BamHI* que incluía la región codificante completa de Cs *hsp17.5*, así

como 122 pb del extremo 3' no traducido. El producto de esta reacción fue insertado en pET 11d (Fig. 18).

Se provocó mediante la adición de IPTG la expresión de la proteína de castaño en las bacterias transformadas con el producto del clonaje antes descrito [BL21(DE3)/pET-HSP], tal y como se describe en Material y Métodos. El análisis por SDS-PAGE y *Western Blot* (Fig. 19) de los extractos proteicos de las alícuotas tomadas a distintos tiempos tras la adición de IPTG muestra la presencia de una única proteína, en todos los casos con el mismo tamaño que la purificada a partir de semilla de castaño. Por tanto, Cs HSP17.5 se expresa en la bacteria de forma estable, sin degradaciones apreciables. La señal correspondiente a la proteína aumenta durante toda la inducción, siendo máxima para la alícuota tomada al día siguiente de la adición de IPTG; no obstante, la cantidad de proteína producida con este sistema no es muy elevada.

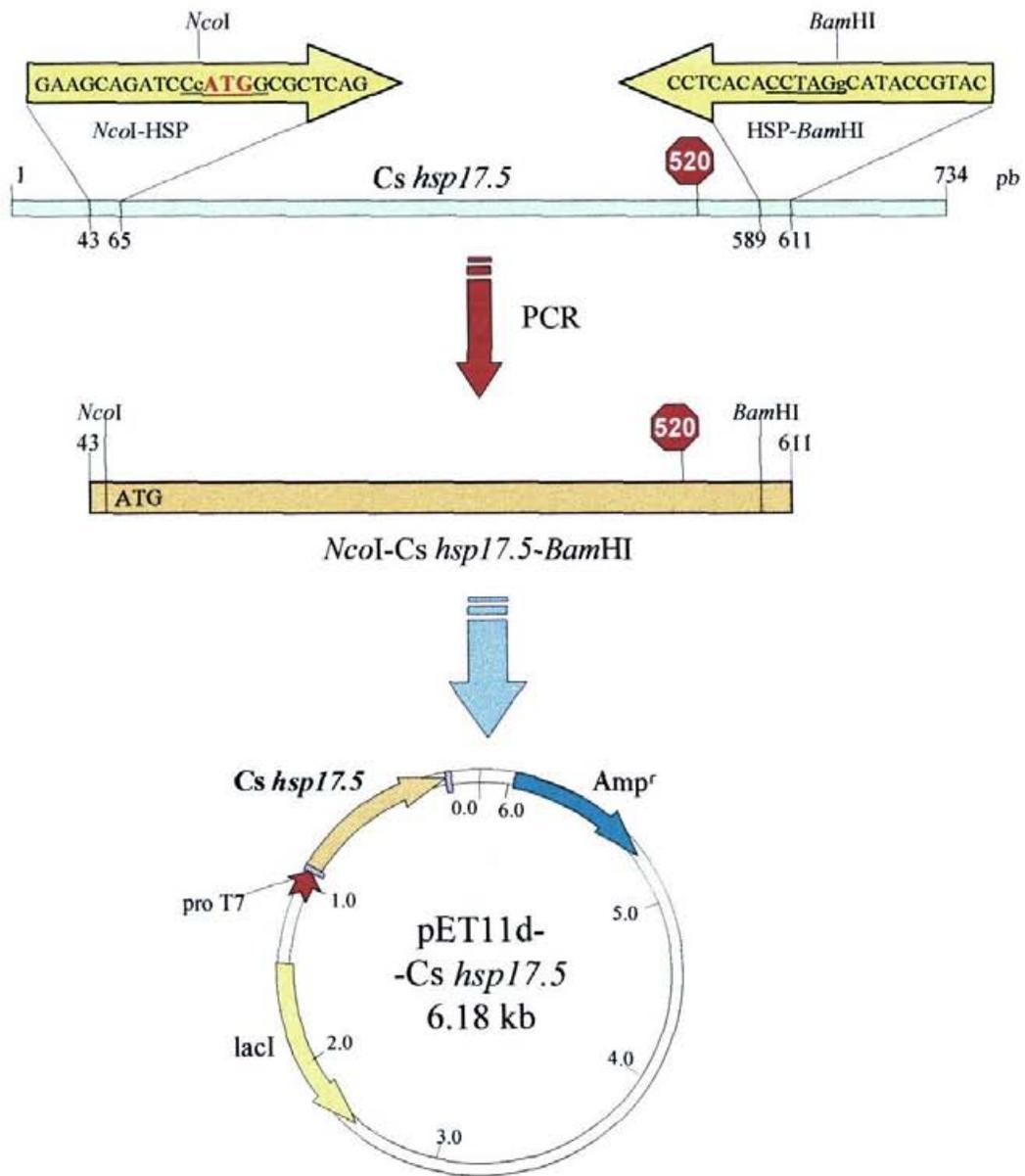


Fig. 18 Clonaje de la secuencia codificante de *Cs hsp17.5* en el vector pET 11d. Empleando como molde el ADNc completo, clonado en pBluescript SK, se generaron por PCR las dianas *NcoI* y *Bam*HI en los extremos 5' y 3', para la inserción del fragmento en el sitio de multiclonaje del plásmido. Se indica la secuencia de los cebadores, con las dianas de restricción subrayadas; en minúscula, los nucleótidos mutados. Se destaca el ATG con que se inicia la traducción. Se numeran los nucleótidos conforme a la secuencia mostrada en la Fig. 1.

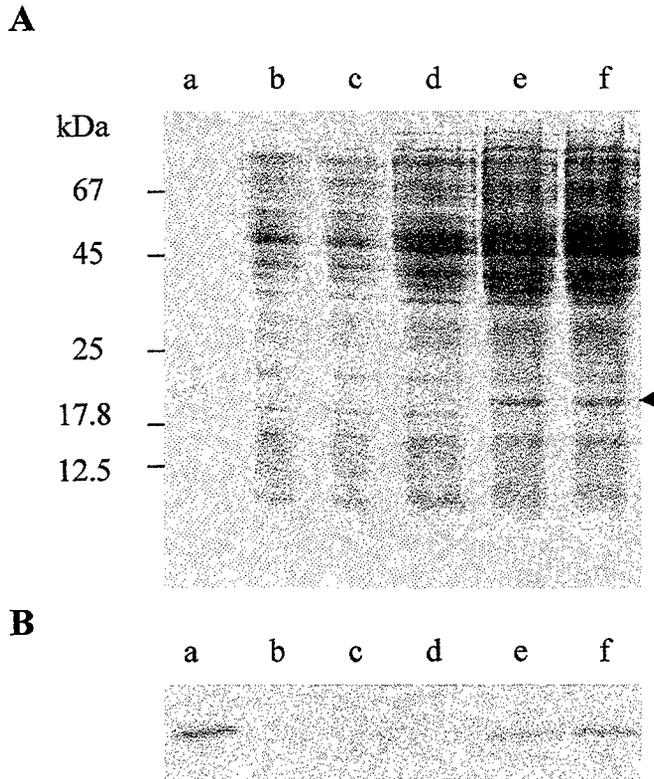


Fig. 19 Inducción de la expresión de Cs HSP17.5 en la cepa BL21(DE3) de *E. coli* empleando el plásmido pET 11d. **A:** SDS-PAGE de extractos proteicos bacterianos. **B:** *Western Blot*, empleando anticuerpos monoclonales contra Cs HSP17.5. **Muestras:** **a**, control (Cs HSP17.5 purificada de semilla); **b-f**, BL21/pET-HSP, 0, 2, 4, 8 y 24 horas, respectivamente, tras la adición de IPTG (1 mM final). Se indica la posición correspondiente a Cs HSP17.5 (◄).

III.2.1.2 Expresión mediante el sistema pRSET b

Dado el bajo nivel de expresión obtenido con el plásmido pET 11d se decidió utilizar el vector de expresión pRSET. Este sistema de expresión, también inducible por IPTG, añade a la proteína en cuestión una cola de 6 histidinas en su extremo amino, lo que facilita su purificación mediante cromatografía de afinidad. Posteriormente, mediante una digestión con enteroquinasa, la cola de histidina puede ser eliminada, si bien queda una cola variable de aminoácidos en posición N-terminal, dependiendo de los sitios escogidos para el clonaje. Con el fin de eludir esta última circunstancia, el clonaje de *Cs hsp17.5* se realizó entre los sitios de restricción de *NdeI* y *BamHI*, fuera del sitio habitual de clonaje en pRSET, pero manteniendo intacto el promotor T7 del plásmido y la inducibilidad por IPTG. La secuencia reconocida por *NdeI* incluye la tripleta ATG, con la que se inicia la traducción de la proteína. Su ubicación en el extremo 5' del ADNc insertado asegura la síntesis de la proteína desde su primer aminoácido, sin residuos añadidos en sus extremos.

Para llevar a cabo dicho clonaje se hubo de eliminar de la secuencia de *Cs hsp17.5* un sitio de restricción *NdeI* endógeno en la posición 115, así como dotar de dianas en los extremos para *NdeI* y *BamHI*, sin modificar la secuencia de aminoácidos deducida a partir del ADNc. Esto se consiguió mediante dos reacciones consecutivas de PCR, descritas en Material y Métodos, empleando en ambas como molde el ADNc *Cs hsp17.5*, resultado del rastreo de la genoteca de expresión de semilla (Fig. 20A,B).

La inducción de la expresión de la proteína se llevó a cabo del mismo modo descrito para pET. El análisis por SDS-PAGE y *Western blot* de los extractos proteicos de las alícuotas tomadas a distintos tiempos tras la adición de IPTG muestra la expresión de *Cs HSP17.5* en BL21(DE3), con el mismo tamaño que la purificada de semilla de castaño, lo que indica que no se producen degradaciones apreciables de la proteína en el citosol bacteriano. Del mismo modo, es notable el aumento continuado de la señal correspondiente a la proteína durante toda la inducción, que es máxima para la alícuota tomada al día siguiente de la adición de IPTG (Fig. 21).

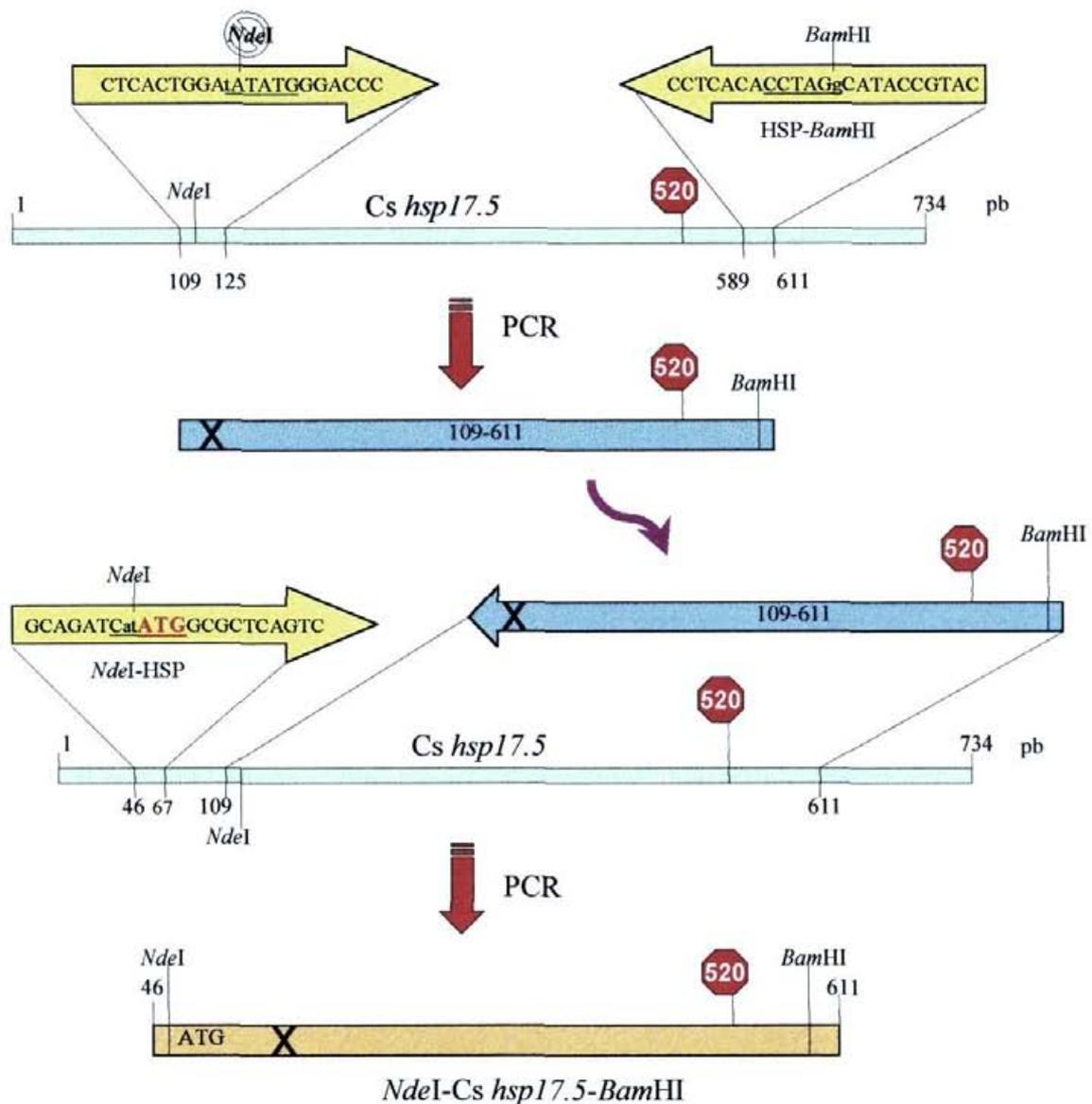


Fig. 20 A Clonaje de la secuencia codificante de *Cs hsp17.5* en el vector pRSETb. Empleando como molde el ADNc completo, clonado en pBluescript SK, en una primera reacción de PCR se generó la diana de restricción *Bam*HI en el extremo 3' y se eliminó la diana *Nde*I en posición 115. El producto de esta reacción se empleó como cebador en una segunda reacción de PCR, sobre el mismo molde, en la que se generó también una diana *Nde*I en el extremo 5'. Se indica la secuencia de los cebadores, con las dianas de restricción subrayadas; en minúscula, los nucleótidos mutados. Se destaca en rojo el ATG inicial. La numeración corresponde a la secuencia de nucleótidos mostrada en la Fig. 1.

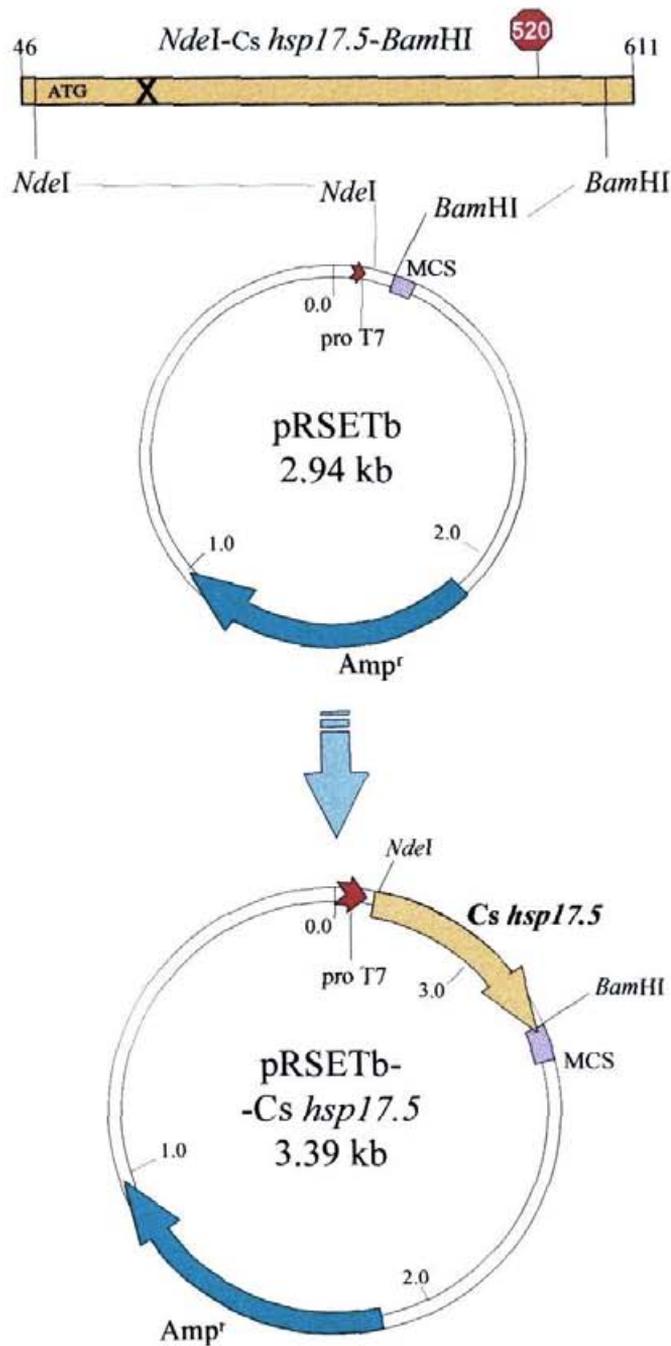


Fig. 20 B Clonaje de la secuencia codificante *Cs hsp17.5* en el vector pRSETb. Inserción del fragmento generado por PCR en las dianas *NdeI* y *BamHI* del plásmido.

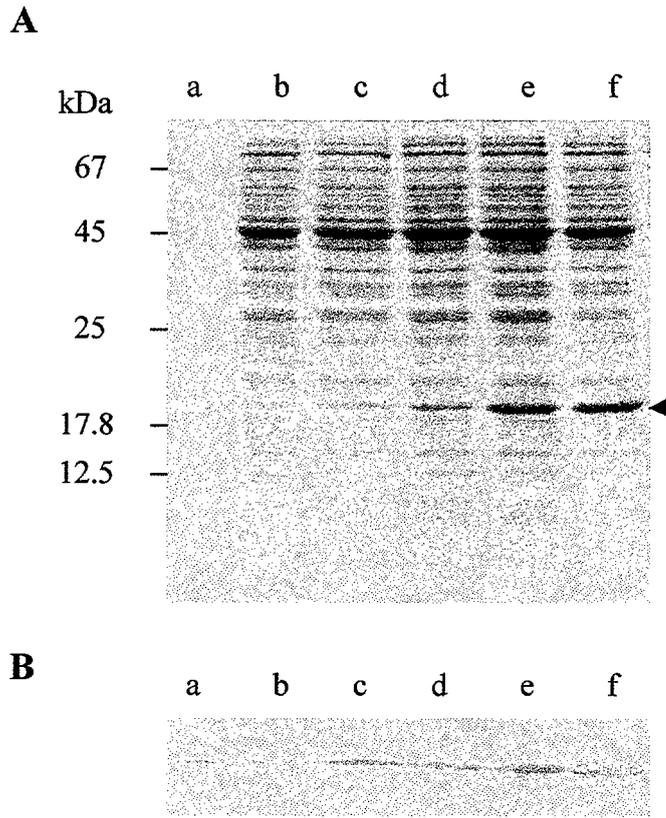


Fig. 21 Inducción de la expresión de Cs HSP17.5 en la cepa BL21(DE3) de *E. coli* empleando el plásmido pRSETb. **A:** SDS-PAGE de extractos proteicos bacterianos. **B:** *Western Blot*, empleando anticuerpos monoespecíficos contra Cs HSP17.5. **Muestras:** a, control (Cs HSP17.5 purificada de semilla); b-f, BL21/pRSET-HSP, 0, 2, 4, 8 y 24 horas, respectivamente, tras la adición de IPTG (1 mM final). Se señala con ◄ la posición correspondiente a Cs HSP17.5.

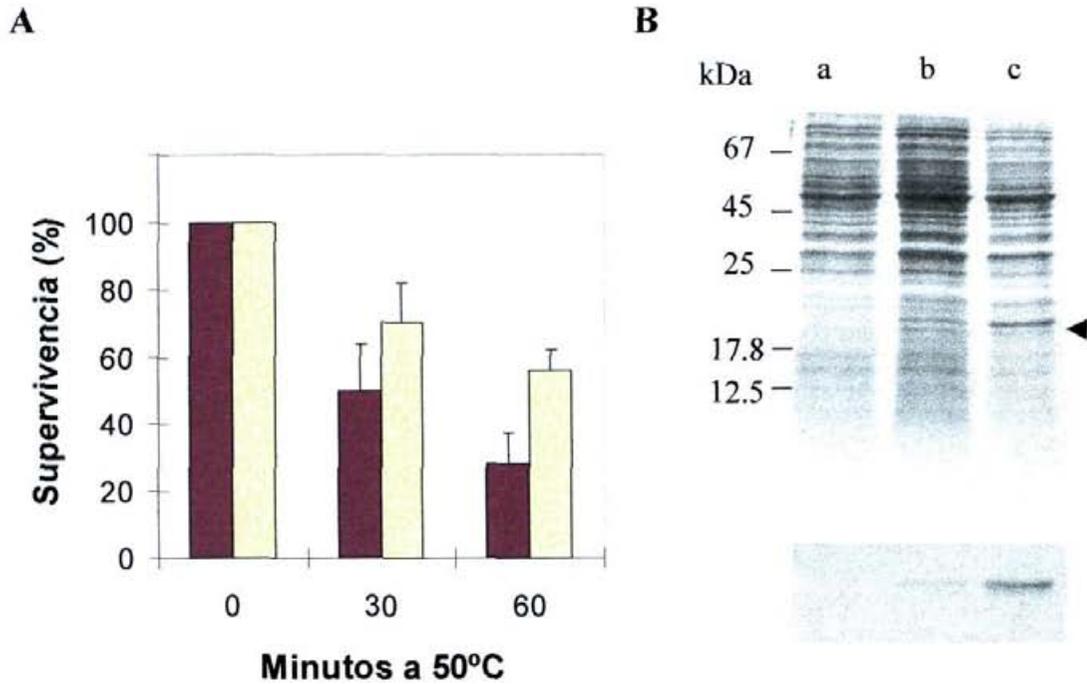
El nivel de expresión logrado con este plásmido es mucho mayor que el obtenido con pET 11d, de modo que se decidió utilizar el sistema pRSET para los ulteriores experimentos que requirieron la expresión heteróloga de Cs HSP17.5.

III.2.2 Tratamientos de estrés *in vivo*

III.2.2.1 Análisis de la viabilidad celular a 50°C. Termoestabilidad de proteínas solubles

A la luz de los resultados obtenidos en los estudios de expresión *in planta* en respuesta a condiciones de estrés controlado, se decidió en primer lugar comprobar el papel que pudiera ejercer Cs HSP17.5 sobre la viabilidad celular frente a un choque térmico. Para ello se procedió a someter a las bacterias, una vez inducida la expresión de la proteína durante 2 horas, a una temperatura de 50°C, letal en condiciones normales, y a comparar la tasa de supervivencia (evaluada mediante el conteo de cfu) con la de las bacterias control [BL21(DE3)/pRSET] en las mismas condiciones. El resultado de este experimento *in vivo* reveló el efecto protector ejercido por Cs HSP17.5 frente a temperaturas elevadas: a los 30 minutos de choque térmico las bacterias que expresaban la proteína [BL21(DE3)/pRSET-HSP] presentaban una supervivencia del 70%, frente al 50% de las bacterias control; al cabo de 60 minutos a 50°C la supervivencia de las bacterias transformadas con pRSET/HSP duplicaba la del control (56% frente a 28%) (Fig. 22A,B).

Con el fin de profundizar en el estudio de la protección frente a las altas temperaturas y habida cuenta de la actividad chaperona mostrada *in vitro* por Cs HSP17.5, se trató de comprobar a continuación si la presencia de la proteína suponía un aumento de la estabilidad a alta temperatura de las proteínas bacterianas. En experimentos idénticos al descrito para evaluar la viabilidad celular se tomaron muestras a distintos tiempos tras al inicio del choque; todas las alícuotas correspondían a un número equivalente de células enteras. Se extrajeron las proteínas solubles y se sometieron a SDS-PAGE. El resultado (Fig. 23) muestra una mayor termoestabilidad de las proteínas solubles en las bacterias que expresan Cs HSP17.5 frente al control: en éste la cantidad de proteínas solubles cae drásticamente desde el comienzo del estrés, mientras que en las células



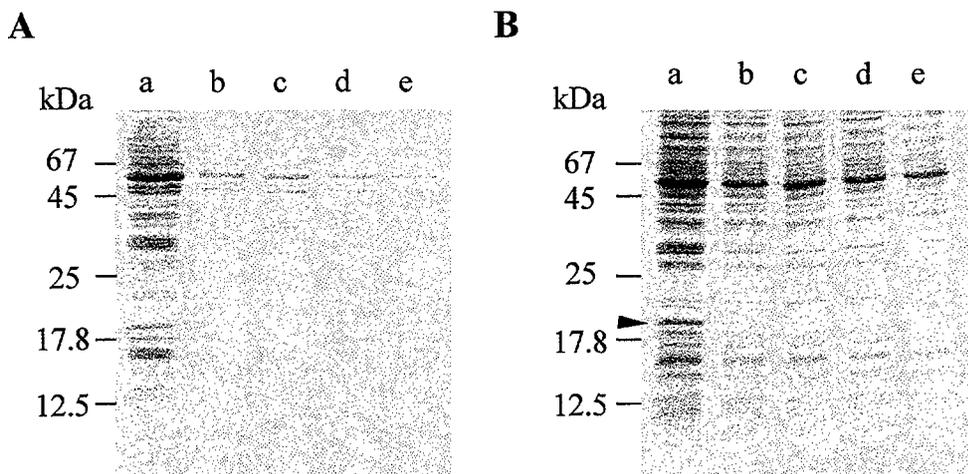


Fig. 23 Efecto de Cs HSP17.5 sobre la termoestabilidad de las proteínas solubles *in vivo*. **A:** SDS-PAGE de extractos proteicos de células BL21/pRSET sometidas a un tratamiento idéntico al de la Fig. 22. **B:** SDS-PAGE de extractos proteicos de células BL21/pRSET-HSP sometidas al mismo tratamiento. **Muestras:** a-e, 0, 15, 30, 45 y 60 minutos a 50°C. Se señala la posición correspondiente a Cs HSP17.5 (►). Se ha comprobado que Cs HSP17.5 purificada no precipita tras el mismo tratamiento.

BL21(DE3)/pRSET-Cs HSP17.5 el descenso es mucho menos acusado. Es de destacar que en ambos casos el daño sobre las proteínas se produce en los primeros minutos del choque, no apreciándose grandes variaciones al prolongarse el tratamiento. Del mismo modo es notable la disminución de la presencia de la propia Cs HSP17.5 en la fracción soluble, lo que no ocurre al someter a 50°C a la proteína purificada sola (datos no mostrados).

III.2.2.2 Análisis de la viabilidad celular a 4°C

En vista de la inducción de la transcripción de Cs *hsp17.5* provocada por las bajas temperaturas (Fig. 15), así como del patrón de expresión mostrado por ejemplares adultos (Fig. 17), se decidió estudiar el posible efecto protector de Cs HSP17.5 frente a bajas temperaturas empleando bacterias BL21(DE3) recombinantes. El método seguido para evaluar este posible papel de la proteína fue análogo al empleado en el estudio de la protección frente a las altas temperaturas: se plaquearon cantidades conocidas de bacterias en las que se había inducido la expresión heteróloga de Cs HSP17.5 y se mantuvieron a 4°C durante distintos períodos de tiempo, estimándose, por conteo de cfu, la proporción de bacterias supervivientes tras el tratamiento (3, 5, 7 y 10 días).

El resultado de este experimento fue concluyente: la mitad de las células que no expresaban la sHSP de castaño habían muerto al cabo de 5-6 días, y la supervivencia al cabo de los 10 días de tratamiento se situó alrededor del 13%; por el contrario, las bacterias que sobreexpresaban la Cs HSP17.5 sobrepasaban el 85% y el 65% de supervivencia al cabo de los mismos periodos. Las diferencias en la mortalidad comienzan a hacerse patentes transcurridos 4-5 días de tratamiento (Fig. 24).

Para poder atribuir las diferencias observadas a Cs HSP17.5 se realizó una extracción de proteínas a partir de células sometidas a idéntico tratamiento y se comprobó su presencia a niveles significativos por inmunodetección (*Dot blot*) (Fig. 25). Este resultado es tanto más relevante cuanto que se trata de la primera evidencia experimental de una protección frente a bajas temperaturas ejercida por una sHSP. Con este experimento se describe, por tanto, una nueva función *in vivo* para esta familia de proteínas.

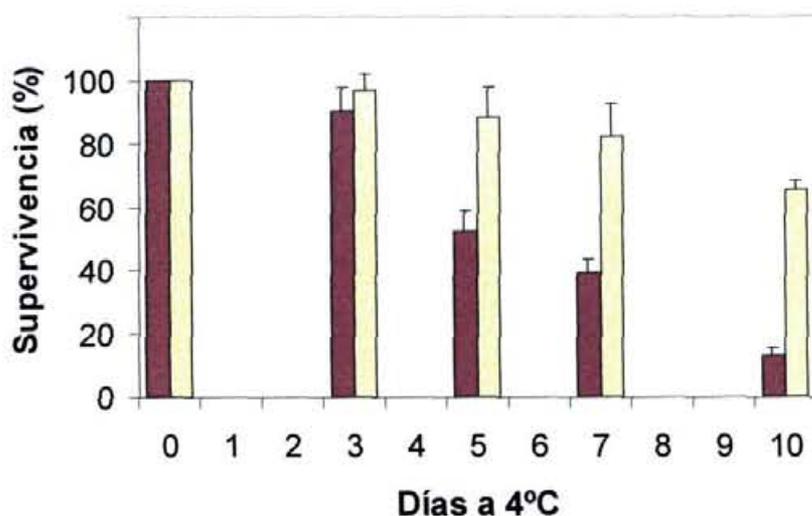


Fig. 24 Efecto protector *in vivo* de Cs HSP17.5 frente a un tratamiento de 4°C. Se representan las tasas de supervivencia (media de 4 experimentos) de BL21/pRSET (control, ■) y BL21/pRSET-HSP (□) a distintos tiempos del tratamiento. Se incluye la desviación típica de las medidas para cada punto.

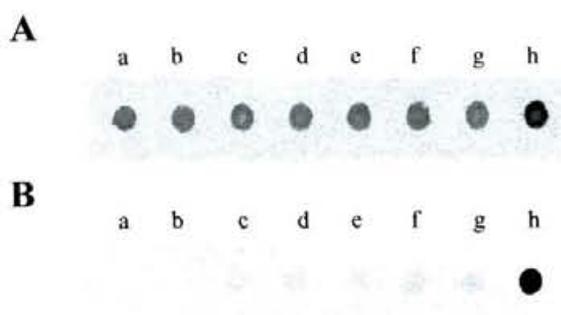


Fig. 25 Inmunodetección por *Dot Blot* de Cs HSP17.5 en las bacterias sometidas al tratamiento de 4°C. **A**: tinción Coomassie. **B**: resultado de la incubación con anticuerpos mono-específicos contra Cs HSP17.5. **Muestras**: **a** y **b**, BL21/pRSET a los 0 y 3 días de tratamiento; **c-g**, BL21/pRSET-HSP a los 0, 3, 5, 7 y 10 días de tratamiento; **h**, control positivo (Cs HSP17.5 purificada de semilla).

III.2.3 Estudio de la asociación a membrana

Las bajas temperaturas afectan a la solubilidad y estabilidad de las proteínas y pueden provocar la desnaturalización de los péptidos en proceso de plegado. El efecto protector ejercido por Cs HSP17.5 frente a las bajas temperaturas en *E. coli* puede deberse, por tanto, a la actividad chaperona de la proteína. No obstante, el frío también afecta a la funcionalidad de las membranas celulares y diversos estudios han vinculado a las HSP con la protección de las mismas (Török *et al.*, 1997; Vígh *et al.*, 1998; Horváth *et al.*, 1998; Glatz *et al.*, 1999) e incluso se ha descrito la asociación a membranas de sHSP en procariotas (Lünsdorf *et al.*, 1995; Jobin *et al.*, 1997). A la vista de estos datos se decidió comprobar si la Cs HSP17.5 recombinante se asocia a la membrana bacteriana durante un tratamiento de 4°C, como prueba indirecta de su actividad chaperona a ese nivel.

Para ello se sometió a 4°C a cultivos de BL21(DE3) inducidos como se ha descrito y, al cabo de 1 y 3 horas de tratamiento, se realizó una separación de las fases membranosa y soluble. Se lisaron las células por cizalladura, para mantener la integridad de los fragmentos de membrana obtenidos (Jobin *et al.*, 1997). La separación de ambas fases se realizó por ultracentrifugación, tal y como se describe en Material y Métodos. El precipitado, correspondiente a la fracción membranosa fue ultracentrifugado dos veces, con objeto de limpiarlo al máximo de restos citoplasmáticos.

Las distintas fracciones obtenidas mostraron patrones muy diferentes en SDS-PAGE (Fig. 26). El resultado del análisis de las fracciones por inmunodetección en *Western blot* muestra la presencia de Cs HSP17.5 en asociación con la membrana en condiciones normales, antes de que las bacterias sean sometidas a tratamiento alguno; a lo largo del tratamiento de frío no se aprecia ninguna variación en el patrón de localización. En ambos casos la señal más intensa se presenta en el sobrenadante de la segunda ultracentrifugación. La conclusión que se desprende de estos resultados es que Cs HSP17.5 se localiza significativamente en la periferia de la membrana, en unión débil con ésta; este tipo de unión probablemente corresponda a interacciones con proteínas asociadas a la membrana. Otros autores también han referido la presencia de sHSP

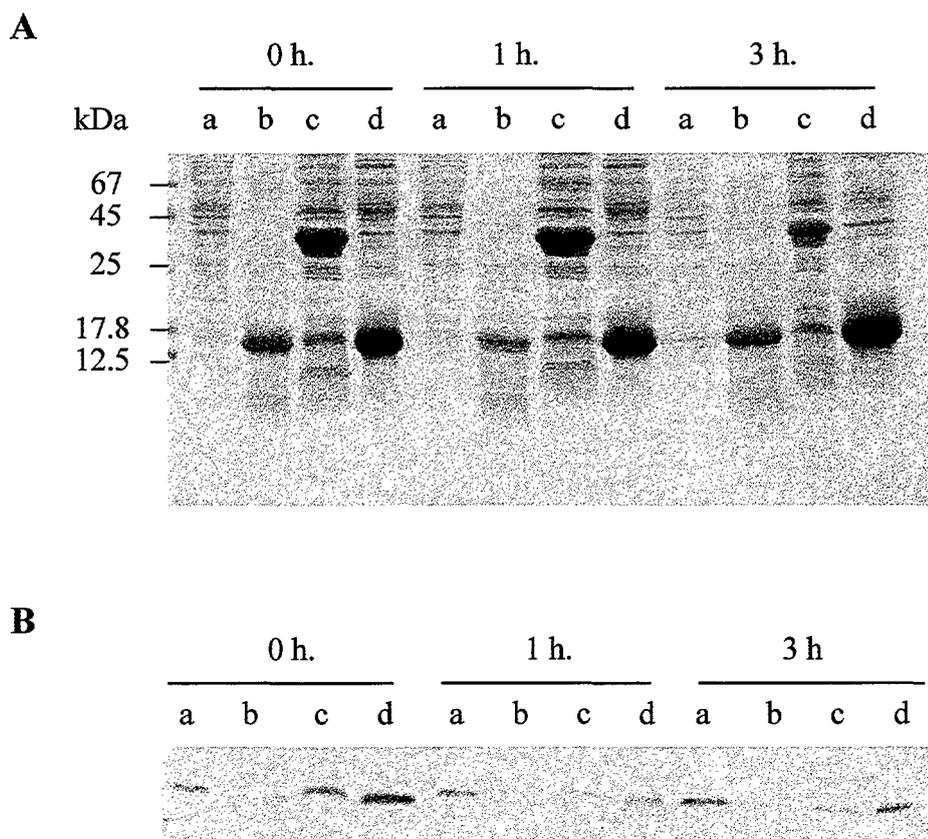


Fig. 26 Análisis de la asociación a membrana de Cs HSP17.5 recombinante. Las fracciones se obtuvieron según el método descrito en el apartado V.2.3 de Material y Métodos, a partir de cultivos inducidos de BL21/pRSET-HSP sometidos a 0, 1 y 3 horas de tratamiento de 4°C. **A:** SDS-PAGE de las fracciones. **B:** *Western blot*, empleando anticuerpos mono-específicos contra Cs HSP17.5. **Muestras:** a, lisado bruto; b, sobrenadante de la primera ultracentrifugación (fracción soluble); c, fracción membranosa; d: sobrenadante de la segunda ultracentrifugación.

endógenas en el citoplasma y en la membrana celular simultáneamente (Jobin *et al.*, 1997; Lünsdorf *et al.*, 1995).

III.3 Estudio preliminar estructura-función

Con objeto de iniciar el estudio de las relaciones estructura-función en la proteína Cs HSP17.5 se procedió a expresar heterológamente en bacteria formas truncadas de la misma. Para ello se generaron por PCR dos fragmentos de la secuencia codificante, como se indica en la Fig. 27. El primero de ellos carecía de los primeros 51 nucleótidos en el extremo 5' y el segundo de 132. En ambos se generó además en ese extremo un sitio de restricción *NdeI*, a fin de dotarles del ATG con el que se iniciaría la traducción.

La primera de estas secuencias codificaba una forma truncada de Cs HSP17.5, en la que se habían delecionado los primeros 17 aminoácidos del extremo N-terminal., mientras que el polipéptido codificado por la segunda carecía de los 44 primeros residuos del mismo extremo. Ambas formas incluían el dominio α -cristalina completo.

Las secuencias de ADNc se clonaron en las dianas *NdeI* y *BamHI* del vector pRSET, dando origen a las construcciones pRSET/DelN17 y pRSET/DelN44 con las que se transformaron células de la cepa BL21(DE3).

Se indujo la expresión de DelN17 y DelN44 en cultivos de las bacterias transformadas, tal y como se describe en Material y Métodos. El tamaño aparente en SDS-PAGE de las formas generadas era de 18 y 15 kDa respectivamente, frente a los 15.6 y 12.7 kDa calculados a partir de las secuencias aminoacídicas. Ambas formas truncadas conservaban la inmunorreactividad frente al anticuerpo de Cs HSP17.5, como mostraron los experimentos de *Western Blot* realizados con extractos proteicos obtenidos de los cultivos inducidos (Fig. 28).

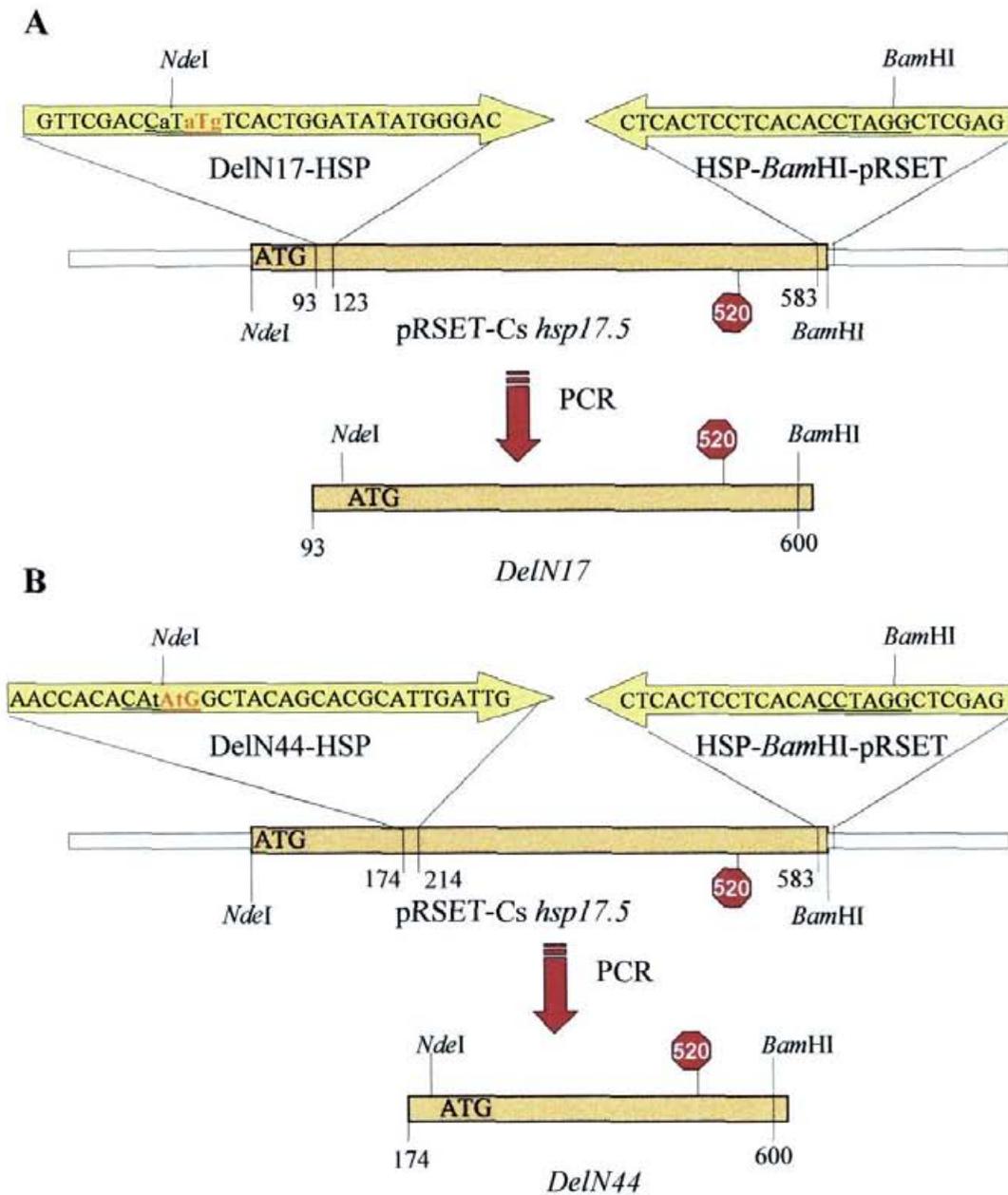


Fig. 27 Clonaje de las secuencias de ADNc correspondientes a las formas truncadas DelN17 (**A**) y DelN44 (**B**). Mediante PCR, empleando como molde pRSET/Cs *hsp17.5*, se generó una secuencia con dianas *NdeI* y *BamHI* (subrayadas; en minúscula, los nucleótidos mutados) en los extremos 5' y 3'. Se destaca en rojo el ATG con que inicia la traducción. La inserción en pRSET se llevó a cabo en ambos casos como se representa en la Fig 20B. La numeración corresponde a la secuencia de nucleótidos mostrada en la Fig. 1

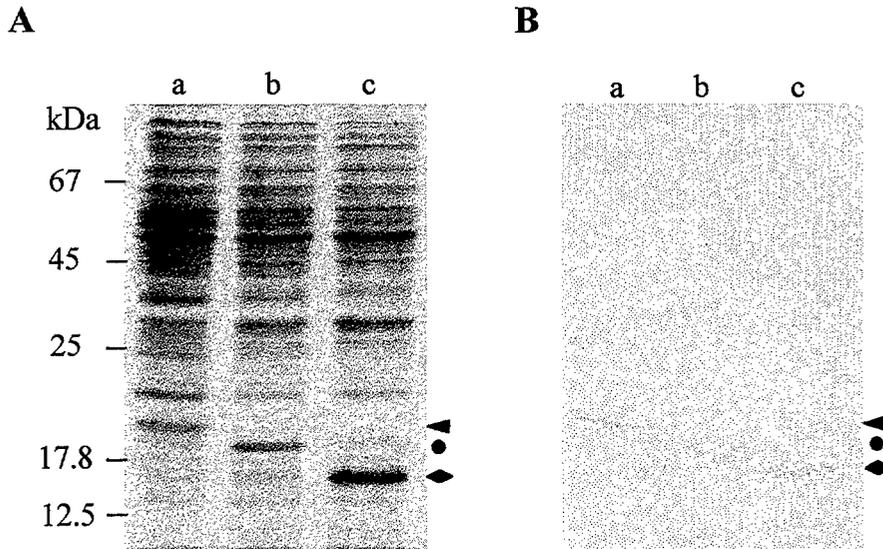


Fig. 28 Expresión de Cs HSP17.5 y las formas truncadas en BL21(DE3). Los extractos proteicos obtenidos a partir de cultivos inducidos se sometieron a SDS-PAGE e inmunodetección. **A:** tinción Coomassie. **B:** resultado de la incubación con anticuerpos monoespecíficos contra Cs HSP17.5. **Muestras:** **a,** BL21/pRSET-HSP; **b,** BL21/pRSET-DelN17; **c,** BL21/pRSET-DelN44. Las posiciones correspondientes a Cs HSP17.5, DelN17 y DelN44 se señalan con ▲, ● y ◆, respectivamente.

Con objeto de investigar el efecto provocado por la eliminación de fragmentos N-terminales en la oligomerización de la proteína, se realizó una inmunodetección sobre los extractos proteicos separados por electroforesis en condiciones no disociantes (VPAGE) (Fig. 29). El resultado de este experimento muestra la influencia del extremo N-terminal en la formación de los oligómeros de Cs HSP17.5: mientras que la proteína completa expresada en *E. coli* forma dodecámeros de unos 240 kDa (al igual que la proteína purificada de semilla), así como oligómeros de unos 310 kDa, que corresponderían a 15 subunidades; la eliminación de 17 residuos en su extremo amino determina la formación de oligómeros de unos 110 y 80 kDa, correspondientes a agrupaciones de 6 y 4 subunidades; por su parte, la supresión de 44 aminácidos en el extremo N-terminal supone la formación de complejos de 180 y 115 kDa (entre 12 y 8 unidades). La existencia de distintos oligómeros para una misma sHSP ha sido descrita en anteriores ocasiones para otras sHSP (Leroux et al., 1997; Haley et al., 1998; Vanhoudt et al., 2000).

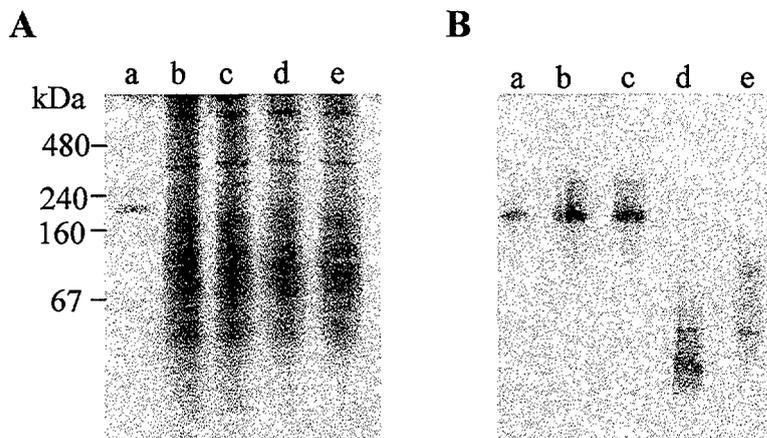


Fig. 29 Efecto de las deleciones sobre la oligomerización. VPAGE de extractos proteicos de cultivos bacterianos inducidos. **A:** tinción Coomassie. **B:** inmunodetección con anticuerpos mono-específicos contra Cs HSP17.5. **Muestras:** **a,** Cs HSP17.5 purificada a partir de semilla; **b,** BL21/pRSET-HSP + Cs HSP17.5 purificada; **c,** BL21/pRSET-HSP; **d,** BL21/pRSET-DelN17; **e,** BL21/pRSET-DelN44.

	PM teórico del monómero (kDa)	PM aparente en SDS-PAGE (kDa)	PM en VPAGE (kDa)	n-mero estimado
Cs HSP17.5	17.5	20	310	¿15-16?
			240	12
DelN17	15.6	18	110	6
			80	4
DelN44	12.7	15	180	12
			110	¿7-8?

Fig. 30 Estimación de la posible composición de los oligómeros detectados en VPAGE para Cs HSP17.5, DelN17 y DelN44.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

Proteínas sHSP de *C. sativa*

Entre las proteínas mayoritarias de la semilla del castaño común se ha descrito una sHSP de bajo peso molecular (Collada *et al.*, 1997), renombrada aquí como Cs HSP17.5. Con el fin de profundizar en el conocimiento de esta familia de proteínas, especialmente relevante en plantas pero mucho menos conocida que las HSP de alto peso molecular, se decidió llevar a cabo una serie de estudios estructurales y funcionales utilizando sHSP de castaño como sistema modelo. Apenas existe información previa sobre las HSP de especies arbóreas, lo que confiere un interés añadido al presente trabajo (Boston *et al.*, 1996).

Se preparó así una genoteca de ADNc a partir de cotiledones de castaña en desarrollo y se rastreó empleando como sonda el ADNc de girasol Ha *hsp17.6* (Almoguera y Jordano, 1992). La secuencia obtenida en el rastreo correspondía a un ADNc completo (Cs *hsp17.5*) de 734 pb, con un único marco abierto de lectura de 462 pb, que codificaba una proteína con un peso molecular teórico de 17.5 kDa. La secuencia peptídica deducida incluía exactamente los péptidos internos secuenciados por Collada *et al.* (1997) así como las regiones consenso I y II definidas para las sHSP vegetales y una zona en la región N-terminal propia de las sHSP citosólicas de clase I (Fig. 1). La comparación con las bases de datos disponibles reveló además un mayor porcentaje de identidad con las secuencias aminoacídicas de otras sHSP vegetales de la clase I (superior al 70%) que con sHSP de las otras 4 clases (inferior al 45%) (Fig. 2).

La adscripción de sHSP a diversas clases se ha basado en general en similitudes de secuencia y en la presencia o ausencia de señales de localización en orgánulos, habiéndose confirmado experimentalmente esta ubicación subcelular en muy pocos casos (Boston *et al.*, 1996). En este trabajo, mediante inmunomicroscopía electrónica se confirmó una localización exclusivamente citosólica para Cs HSP17.5 en células de cotiledón (Fig. 12).

Cs HSP17.5 también está presente constitutivamente y en cantidad significativa en el tallo del castaño. En primera instancia se detectó una proteína inmunorreactiva en extractos proteicos de tallo mediante electroforesis uni- y bidimensional, seguida de *Western blot*. El resultado de la purificación y secuenciación de dos péptidos internos sugirió fuertemente que dicha proteína era la propia Cs HSP17.5. El análisis MALDI reveló que los dos polipéptidos inmunorreactivos detectados en la electroforesis bidimensional correspondían a dicha proteína, pudiendo deberse a modificaciones post-traduccionales la presencia de distintas formas en la electroforesis. Además, el rastreo de una genoteca de ADNc de rama dio como resultado un ADNc idéntico al descrito para semilla. Este resultado fue confirmado también por RT-PCR.

Finalmente, el análisis por *Southern blot* sugiere que el gen que codifica Cs HSP17.5 es único o tiene un solo homólogo en el genoma del castaño; este resultado también está apoyado por la detección de una única señal, del mismo tamaño para semilla y tallo, en los experimentos de *Northern blot* (ver más adelante).

Actividad chaperona molecular de Cs HSP17.5

Resultados obtenidos poco antes del inicio de esta tesis demostraban la actividad chaperona *in vitro* de diversas sHSP vegetales, incluyendo Cs HSP17.5 (Lee *et al.*, 1995a; Jinn *et al.*, 1995; Collada *et al.*, 1997). Sin embargo, en estos estudios se emplearon sustratos comerciales y, en el caso de Lee *et al.* (1995a), sHSP expresadas de forma heteróloga. Con el fin de profundizar en la caracterización de esta actividad para Cs HSP17.5, se ha abordado un estudio más exhaustivo, en el que se han contemplado aspectos cinéticos y estequiométricos de la interacción con el sustrato. Como tal se empleó una proteína endógena, la endoquitinasa Cs Ch 1, que es, junto con la propia Cs HSP17.5, una de las proteínas solubles más abundantes en la semilla de castaño (Fig. 3). Cs HSP17.5 mostró la capacidad de reactivar la quitinasa previamente desnaturalizada con cloruro de guanidinio, aunque no la de protegerla de la inactivación térmica. La reactivación alcanza un máximo con una relación estequiométrica 1:1 del dodecámero de Cs HSP17.5 respecto al sustrato, lo que sugiere la interacción de una molécula del mismo por cada oligómero de chaperona (Fig. 5B). Un resultado análogo ha sido descrito por Lee

et al. (1995a) para las proteínas recombinantes de guisante Ps HSP17.7 y Ps HSP18.1, empleando como sustrato citrato sintasa de mamífero. Por otra parte, en nuestras condiciones experimentales, la reactivación se produce mayoritariamente en los primeros 30 minutos de interacción de la chaperona con el sustrato (Fig. 5A).

Recientemente Muchowski y Clark (1998) han mostrado que la α B-cristalina humana requiere para su actividad consumo de ATP. Nuestro estudio indica que la actividad de Cs HSP17.5 es independiente de ATP, en concordancia con otros datos obtenidos para sHSP vegetales (Lee *et al.*, 1995, 1997). Muy recientemente se ha referido incluso un efecto inhibitorio del ATP sobre la actividad chaperona de una sHSP de tabaco (Smykal *et al.*, 2000). Aunque la α -cristalina tiene homología con las sHSP, la disparidad de secuencia que presenta con las sHSP vegetales (la identidad con Cs HSP17.5 es inferior al 25%) permite contemplar la posibilidad de que exhiba un mecanismo de actuación diferente al de éstas. En este sentido, en un reciente trabajo, Young *et al.* (1999) señalan la existencia de ciertas diferencias en cuanto a los dominios que interaccionan con el sustrato entre las sHSP vegetales y las de otros eucariotas.

Por otra parte, aunque se ha propuesto la cooperación *in vivo* entre las sHSP y otras chaperonas en la recuperación de sustratos desnaturalizados, apoyada por datos obtenidos *in vitro* (Lee *et al.*, 1995; Ehrnsperger *et al.*, 1997; Lee y Vierling, 2000), los resultados obtenidos en este trabajo demuestran la capacidad de al menos ciertas sHSP de reactivar un sustrato por sí mismas, sin la participación de otras chaperonas. Lo más probable, a tenor de una serie de observaciones recientes, es que la respuesta en las células ante una situación que provoque la desnaturalización de las proteínas sea muy compleja, implicando la actuación de varias chaperonas y proteasas, que podrían actuar secuencial o conjuntamente sobre los sustratos (Saibil, 2000).

Posible funcionalidad *in vivo*

La implicación de Cs HSP17.5 en la protección *in vivo* frente a las temperaturas extremas se ha visto confirmada mediante experimentos llevados a cabo con células BL21(DE3) recombinantes.

Las bacterias que expresaban Cs HSP17.5 mostraron una tasa de supervivencia frente a un choque térmico (50°C) que duplicaba la de las células control (56% vs 28%). Cs HSP17.5 podría ejercer este efecto protector sobre las células actuando como chaperona molecular *in vivo*. En favor de esta hipótesis, se ha observado una correlación entre el incremento de la viabilidad celular ante el choque térmico y la termoestabilidad de las proteínas solubles del citosol bacteriano (Fig. 24). Una posible actividad chaperona *in vivo* viene avalada asimismo por los datos recientemente obtenidos por Yeh *et al.* (1997), con una fusión de sHSP de arroz y glutatión-S-transferasa, y por Löw *et al.* (2000), con dos sHSP de tomate, expresadas en células de *Arabidopsis*.

Por otra parte, se ha mostrado un efecto protector *in vivo* frente al estrés por bajas temperaturas (4°C) por primera vez para una proteína de este tipo. Las diferencias de viabilidad en este caso son más acusadas que en el tratamiento de 50°C: la sobreexpresión de la chaperona conlleva una supervivencia por encima del 85% al cabo de 10 días de tratamiento, frente a menos de un 15% para el control. Este resultado es también notable, por cuanto se ha descrito que la sobreexpresión de otras HSP, como GroEL/ES, es nociva en bacterias ante un tratamiento de frío (Kandror *et al.*, 1997). El resultado obtenido viene a mostrar una nueva función para la familia de las sHSP vegetales, y permite refinar la hipótesis previa de que ciertas HSP producidas durante pretratamientos de calor mejoran la conservación en frío de tomates y otros frutos (Sabehat *et al.*, 1996, 1998; Kadyrzhanova *et al.*, 1998).

Es de destacar la disparidad en los tiempos a los que los efectos anteriores se hacen perceptibles: mientras que se aprecian diferencias en la viabilidad celular al cabo de 30 minutos de tratamiento a 50°C, en el caso del frío esta diferencia no es significativa hasta los 4-5 días. Este hecho refleja, probablemente, la distinta incidencia que ambos tipos de estrés tienen sobre el funcionamiento de la célula. En este sentido, se desconoce aún el efecto que un tratamiento a 4°C tiene sobre las bacterias a nivel molecular (Kandror *et al.*, 1997).

Estas diferencias podrían reflejar la existencia de mecanismos de actuación al menos parcialmente distintos en un caso y otro. El frío afecta a la solubilidad y estabilidad

de numerosas proteínas, de modo que la protección frente al mismo por parte de Cs HSP17.5 puede explicarse en función de su actividad chaperona. No obstante, el frío también afecta a la funcionalidad de las membranas celulares, y ciertas HSP han sido vinculadas a la protección de las mismas (Török *et al.*, 1997; Horváth *et al.*, 1998; Heckathorn *et al.*, 1998; Glatz *et al.*, 1999). Incluso se ha relacionado a las membranas con la respuesta al choque térmico, como sensores del mismo y primeros efectores de las rutas que conducen a la síntesis de HSP (Vígh *et al.*, 1998; Horváth *et al.*, 1998; Vígh *et al.*, 1993). La asociación a las membranas celulares se ha descrito para varias HSP, como GroEL/ES (Török *et al.*, 1997) o sHSP de procariotas (Jobin *et al.*, 1997; Lünsdorf *et al.*, 1995). Sin embargo no se ha encontrado una mayor asociación de la Cs HSP17.5 recombinante a la membrana de *E. coli* en respuesta al tratamiento de 4°C. Sí se han obtenido pruebas de la localización de una proporción significativa de esta chaperona en la proximidad de la membrana bacteriana en ausencia de estrés, sin que variara este patrón con el tratamiento aplicado. Los resultados sugieren que Cs HSP17.5 mantiene interacciones débiles con proteínas asociadas a la membrana. Los procariotas acumulan gran cantidad de proteínas en la misma, de modo que Cs HSP17.5 podría alcanzar esa ubicación acompañando a otras proteínas, tal vez colaborando en su plegado correcto. Los resultados obtenidos también son compatibles con la protección de dichas proteínas durante el estrés térmico, lo que podría contribuir a la estabilización de la membrana.

Expresión de sHSP en castaño

La regulación de la expresión de las sHSP es un fenómeno complejo y aún no bien conocido (Almoguera *et al.*, 1998; Wehmeyer y Vierling, 2000). En el presente estudio se ha mostrado la expresión de Cs HSP17.5 durante el desarrollo de la semilla, de forma constitutiva en el tallo y también inducida en respuesta a diversos tratamientos controlados.

Durante la maduración de la castaña se produce una acumulación del ARNm correspondiente a CsHSP17.5, que alcanza su nivel máximo en torno a los 110 días tras la aparición del pistilo. A partir de entonces el nivel comienza a descender paulatinamente y lo mismo ocurra durante la germinación. La persistencia de Cs HSP17.5 en la castaña

durante un período que puede prolongarse por varios meses es notable, considerando que las HSP sintetizadas en respuesta al estrés térmico tienen una vida media en la célula de pocos días tras el fin de éste (Vierling, 1991).

Cs HSP17.5 se expresa asimismo en respuesta al estrés de calor. Los experimentos llevados a cabo sobre plántulas han mostrado que esta inducción está relacionada con la intensidad y la duración del choque. De este modo, el tratamiento de 32°C no llega a producir una respuesta apreciable en las hojas de la plántula, aunque sí en el tallo y la raíz. En cambio, a 40°C tiene lugar una fuerte inducción en todos los órganos vegetativos, superior incluso en la hoja que en la raíz. Tanto a 32 como a 40°C la respuesta más intensa se aprecia en el tallo.

Uno de los resultados más reseñables del estudio acerca de la expresión *in vivo* es el referido a la inducción en respuesta a las bajas temperaturas (Fig. 16). En este caso no se aprecia ninguna respuesta en la hoja, mientras que en el tallo la inducción es comparable a la provocada por el estrés de calor. Esta respuesta diferencial frente a la inducción térmica puede deberse al estrés efectivo a que cada órgano está sometido. Así, en el suelo la temperatura es más templada que en la superficie y las hojas disponen de una termorregulación eficiente merced a la transpiración. Por otra parte, las bajas temperaturas suelen acompañarse en el medio natural por un cambio en el fotoperíodo, desencadenándose en las especies caducifolias como el castaño unos procesos que llevan finalmente a la caída de la hoja. En cambio el tallo es el órgano vegetativo que más expuesto queda a las temperaturas extremas.

Al igual que se ha comentado respecto a los tratamientos sobre bacterias recombinantes, las diferencias en la cinética de la inducción que se observan entre el estrés de calor y el de frío pueden indicar las distintas necesidades generadas por cada tratamiento y, probablemente, los diferentes mecanismos de actuación de Cs HSP17.5.

Durante la realización de estos estudios se ha observado la presencia de Cs HSP17.5 en el tallo de castaño de forma constitutiva. Se trata de un dato novedoso, puesto que la expresión de sHSP en ausencia de estrés sólo había sido citada en referencia al desarrollo de las estructuras reproductivas (por ejemplo, Whemeyer *et al.*, 1996;

Almoguera *et al.* 1998; Atkinson, 2000; Whemeyer y Vierling, 2000); en cambio, una expresión constitutiva en tejidos vegetativos no había sido detectada hasta la fecha, si bien este tipo de estudio sólo se ha investigado en especies herbáceas. Se procedió entonces a investigar el patrón anual de expresión de Cs HSP17.5 en ramas de ejemplares adultos (Fig. 18), confirmándose la presencia de la proteína durante todo el año y la acumulación paulatina tanto del ARNm como de la proteína durante los períodos invernal y estival.

Todos estos datos apuntan hacia la importancia del papel funcional que presumiblemente juega Cs HSP17.5 en el tallo de castaño. La relativa abundancia de sHSP en el tallo no es una particularidad del castaño, pues en este mismo estudio se han detectado proteínas inmunológicamente relacionadas con Cs HSP17.5 en el tallo de otras especies leñosas forestales, principalmente cedro y alcornoque (Fig. 6). Los niveles de estas proteínas detectados no están relacionados directamente con la proximidad filogenética; un ejemplo claro es la elevada presencia de proteína detectada en el cedro del Himalaya frente a la apenas perceptible del pino piñonero, aun perteneciendo ambos a la familia de las Pináceas, y muy alejadas filogenéticamente del castaño. Del mismo modo que se ha descrito que la expresión en ausencia de estrés durante el desarrollo de los órganos y estructuras reproductivos atañe a sólo un subconjunto de las sHSP del individuo, en general de las clases citosólicas I y II (Wehmeyer *et al.*, 1996; Coca *et al.*, 1996; DeRocher y Vierling, 1994), la función ejercida en el tallo por Cs HSP17.5 y las otras proteínas homólogas puede haber sido asumida en otras especies, particularmente herbáceas, por sHSP de otra clase.

En el tallo Cs HSP17.5 se concentra preferentemente en la zona del floema secundario y el cambium (Fig. 13). Este hecho podría estar relacionada con la importancia que tiene en ambos tejidos el citoesqueleto, bien para dirigir el transporte a través de los plasmodesmos, bien para la división en el meristemo y la formación de la pared vegetal, habiendo sido descrita recientemente la interacción de sHSP con la actina y la tubulina (Hino *et al.*, 2000; Muchowski *et al.*, 1999; Perng *et al.*, 1999). También es posible que esta presencia esté relacionada con el estrés oxidativo generado por la lignificación de los tejidos colindantes, contribuyendo la chaperona a mantener la integridad de los tejidos metabólicamente más activos del tallo (Parsell y Lindquist, 1994; Pla *et al.*, 1998).

Relaciones estructura-función

Si bien las regiones de consenso I y II, en la zona C-terminal de las sHSP están claramente definidas, así como otras regiones conservadas en posiciones N-terminales, propias de las distintas clases en que se subdividen las sHSP, aún no están bien dilucidadas las funciones que ejerce cada una de ellas. Así, como se detalla en la Introducción, se ha propuesto que la región N-terminal interviene principalmente en la formación de los homo-oligómeros de sHSP (Leroux et al., 1997), presuntamente necesarios para la actividad chaperona (Waters et al., 1996); según este esquema, el extremo C-terminal, incluyendo las regiones consenso I y II, contribuiría a la estabilidad de estos complejos y sería la responsable de la interacción con los sustratos (Leroux et al., 1997). Otros autores han aportado pruebas indirectas apoyando este modelo, según las cuales la región N-terminal ocuparía la parte interna de los oligómeros, con forma de esferoides huecos, interaccionando los sustratos con las regiones C-terminales en la superficie del complejo (Lee et al., 1997; Muchowski et al., 1999.). La única estructura tridimensional de uno de estos complejos descrita hasta la fecha (Kim et al., 1998a) es totalmente compatible con este modelo, si bien los autores indican la posibilidad de que pequeños péptidos desplegados atravesaran las "ventanas" que el oligómero presenta en la superficie, plegándose en el interior mediante interacciones con las colas N-terminales. Otros autores, como Yeh et al., 1997, proponen que, por el contrario, es una región más N-terminal, incluyendo el consenso II, la que establece uniones con los sustratos.

Con objeto de dilucidar el comportamiento en este aspecto de Cs HSP17.5, se ha abordado en la última etapa de esta tesis el clonaje y expresión de formas truncadas de la proteína (apartado III.3). Estas formas carecen de los 17 y 44 primeros residuos del extremo N-terminal, aunque conservaban íntegro el dominio α -cristalina. En primera instancia se ha investigado el efecto de estas deleciones en la oligomerización de la proteína (Fig. 30): la eliminación de los primeros 17 aminoácidos implica la formación de complejos de unos 110 y 80 kDa, correspondientes a oligómeros de 6 y 4 subunidades respectivamente, mientras que la eliminación de 44 aminoácidos en el extremo N-terminal

supone la formación de oligómeros de unos 180 y 110 kDa, correspondientes a su vez a complejos de 12 y 8 subunidades. Por tanto, el extremo N-terminal parece influir de forma determinante en la oligomerización de la proteína. Este mismo estudio ha mostrado la formación de oligómeros de 240 y 310 kDa por parte de la proteína completa recombinante (complejos de 12 y 16 subunidades, respectivamente. Estos datos son compatibles con los datos de Leroux et al. (1997), Haley et al. (1998) o Vanhoudt et al. (2000), que señalan la existencia de toda una serie de complejos para una misma sHSP.

Young *et al.* (1999), tras haber demostrado la interacción del extremo N-terminal de una sHSP de arroz en la unión al sustrato, sugieren la existencia de diferentes mecanismos de actuación entre las sHSP vegetales y las de otros eucariotas, en las que el extremo C-terminal protagoniza tal interacción. Con objeto de confirmar esta hipótesis, se requerirán nuevos experimentos para determinar si las formas truncadas de Cs HSP17.5 generadas mantienen su actividad funcional.

RESUMEN Y CONCLUSIONES

RESUMEN Y CONCLUSIONES

Las conclusiones más significativas de esta tesis son las siguientes:

1.- A partir de una genoteca de castaña en desarrollo se ha aislado y secuenciado el correspondiente ADNc que codifica una proteína de 154 aminoácidos, con un peso molecular deducido de 17.5 kDa, denominada Cs HSP17.5. La comparación de secuencias indica que la proteína pertenece a la clase citosólica I de la familia de las sHSP vegetales. Mediante inmunomicroscopía electrónica de células de cotiledón se ha confirmado la localización exclusivamente citosólica de esta proteína.

2.- Se han detectado proteínas inmunológicamente relacionadas con Cs HSP17.5 en el tallo de diversas especies arbóreas, aparte del castaño común. La presencia en el tallo de castaño de la misma proteína mayoritaria identificada en semilla se ha demostrado mediante la purificación y secuenciación de péptidos internos y análisis MALDI, así como a través del rastreo de una genoteca de ADNc de rama. En este órgano la proteína se localiza principalmente en el cambium y el floema secundario, como ha revelado la detección por inmunomicroscopía confocal.

3.- Se ha caracterizado con mayor detalle la actividad chaperona molecular *in vitro* de Cs HSP17.5, empleando como sustrato una de las proteínas solubles más abundantes en la semilla madura, la endoquitinasa Cs Ch 1. Se ha investigado la capacidad de Cs HSP17.5 para reactivar la endoquitinasa desnaturalizada químicamente en sus aspectos cinéticos y estequiométricos.

4.- Se ha investigado la expresión de la chaperona en la semilla durante la maduración y la germinación. Se ha detectado la presencia del correspondiente ARNm a lo largo de todo el proceso, alcanzándose el nivel máximo antes de finalizar la maduración y decreciendo paulatinamente durante la germinación.

5.- Se ha investigado asimismo la expresión de esta proteína en plántulas sometidas a diversas situaciones de estrés y a tratamientos hormonales. No se ha

apreciado inducción significativa en respuesta a los tratamientos con ácido jasmónico ni ácido salicílico, así como tampoco en respuesta a la producción de heridas en las hojas o al estrés salino. Sí se ha demostrado la fuerte inducción de la transcripción del gen ante las temperaturas extremas, tanto altas como bajas, especialmente en el tallo. Respecto al estrés de calor, se ha observado una relación directa de la inducción con la duración e intensidad del tratamiento. La inducción provocada por las bajas temperaturas (4°C) alcanza un nivel comparable a la del tratamiento de 40°C, siendo de nuevo más intensa en el tallo.

6.- Se ha observado la expresión de Cs HSP17.5 de forma constitutiva en el tallo de castaño, no habiendo sido descrita hasta ahora una expresión de este tipo para las sHSP vegetales. Se ha investigado el patrón de expresión durante el año en ramas de ejemplares adultos, detectándose la presencia de dos máximos que se alcanzan de manera paulatina durante el invierno y el verano, tanto en los niveles de ARNm como de proteína.

7.- La proteína ha sido expresada heterológamente en *E. coli* de forma estable, empleándose estas células como modelo donde estudiar su posible actividad *in vivo*. En este sentido, se ha demostrado que ejerce una protección sobre las células frente al choque térmico; este efecto está correlacionado con un aumento de la termoestabilidad de las proteínas solubles de la bacteria. Por otra parte, se ha demostrado que la proteína de castaño protege a las células frente a las bajas temperaturas, incrementando su viabilidad ante un tratamiento de 4°C. Hasta la fecha un efecto protector de este tipo no había sido descrito para esta familia de proteínas.

8.- Por último, se ha iniciado una investigación de las bases estructurales de la oligomerización y funcionalidad de la proteína. A este efecto se han expresado de forma estable en *E. coli* dos formas truncadas de Cs HSP17.5, carentes de 17 y 44 residuos respectivamente en su extremo N-terminal. La eliminación de estas regiones afecta a la formación de oligómeros y al número de subunidades de que éstos se componen.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Alamillo, J.; Almoguera, C.; Bartels, D.; Jordano, J. (1995) "Constitutive expression of small heat shock proteins in vegetative tissues of the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*" *Plant Mol. Biol.* **29**, 1093-1099.
- Almoguera, C.; Coca, C. A.; Jordano, J. (1993) "Tissue-specific expression of sunflower heat shock proteins in response to water stress" *Plant J.* **4**, 947-958.
- Almoguera, C.; Jordano, J. (1992) "Developmental and environmental concurrent expression of sunflower dry-seed-stored low-molecular-weight heat-shock protein and Lea mRNAs" *Plant Mol. Biol.* **19**, 781-792.
- Almoguera, C.; Prieto-Dapena, P.; Jordano, J. (1998) "Dual regulation of a heat shock promoter during embryogenesis: stage-dependent role of heat shock elements" *Plant J.* **13**, 437-446.
- Anfinsen, C. B. (1973) "Principles that govern the folding of protein chains" *Science* **181**, 223-230.
- Arrigo, A. P. (2000) "sHsp as novel regulators of programmed cell death and tumorigenicity" *Pathologie Biologie* **48**, 280-288.
- Atkinson, B. G.; Raizada, M.; Bouchard, R. A.; Frappier, J. R. H.; Walden, D. B. (1993) "The independent stage-specific expression of the 18-kDa heat shock protein genes during microsporogenesis in *Zea mays* L." *Devel. Genet.* **14**, 15-26.
- Ausubel, F. M.; Brent, R.; Kingston, R. E.; Moore, D. D.; Seidman, J. G.; Smith, J. A.; Struhl, K. eds. (1994) "Current Protocols in Molecular Biology" *Current Protocols. Greene Publishing Associates, Inc. y John Wiley and Sons, In. USA.*
- Boston, R. S.; Viitanen, P. V.; Vierling, E. (1996) "Molecular chaperones and protein folding in plants" *Plant Mol. Biol.* **32**, 191-222.

- Braig, K. (1998) "Chaperonins" *Curr. Opin. Struct. Biol.* **8**, 159-165.
- Braig, K.; Otwinowski, Z.; Hedge, R.; Boisvert, D. C.; Joachimiak, A.; Horwich, A. L.; Sigler, P. B. (1994) "The crystal structure of the bacterial chaperonin GroEL at 2.8 Å" *Nature* **371**, 578-586.
- Bukau, B.; Horwich, A. L. (1998) "The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines" *Cell* **92**, 351-366.
- Carranco, R.; Almoguera, C.; Jordano, J. (1997) "A plant small heat shock protein gene expressed during zygotic embryogenesis but noninducible by heat stress" *J. Biol. Chem.* **272**, 27470-27475.
- Caspers, G. J.; Leunissen, J. A. M.; De Jong, W. W. (1995) "The expanding small heat-shock protein family, and structure predictions of the conserved α -crystallin domain" *J. Mol. Evol.* **40**, 238-248.
- Chang, Z.; Primm, T. P.; Jakana, J.; Lee, I. H.; Serysheva, I.; Chiu, W.; Gilbert, H. F.; Quicho, F. A. (1996) "*Mycobacterium tuberculosis* 16-kDa antigen (Hsp16.3) functions as an oligomeric structure *in vitro* to suppress thermal aggregation" *J. Biol. Chem.* **271**, 7218-7223.
- Chang, S.; Puryear, J.; Cairney, J. (1993) "A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees" *Plant Mol. Biol. Rep.* **11**, 113-116.
- Chen, Q.; Vierling, E. (1991) "Analysis of conserved domains identifies a unique structural feature of a chloroplast heat shock protein" *Mol. Gen. Genetics* **226**, 425-431.
- Chernoff, Y. O.; Lindquist, S. L.; Ono, B.; Inge-Vechtomov, S. G. (1995) "Role of the chaperone protein Hsp104 in propagation of the yeast prion-like factor [psi+]" *Science* **268**, 880-884.

- **Clark, J. I.; Muchowski, P. J. (2000)** "Small heat-shock proteins and their potential role in human disease" *Curr. Opin. Struct. Biol.* **10**, 52-59.
- **Coca, M. A.; Almoguera, C.; 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**, 479-492.
- **Coca, M. A.; Almoguera, C.; Thomas, T. L.; 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**, 863-876.
- **Collada, C.; Casado, R.; Fraile, A.; Aragoncillo, C. (1992)** "Basic endochitinases are major proteins in *Castanea sativa* cotyledons" *Plant Physiol.* **100**, 778-783.
- **Collada, C.; Gómez, L.; Casado, R.; Aragoncillo, C. (1997)** "Purification and *in vitro* chaperone activity of a class I small heat-shock protein abundant in recalcitrant chestnut seeds" *Plant Physiol.* **115**, 71-77
- **DeRocher, A.; Vierling, E. (1994)** "Developmental control of small heat shock protein expression during pea seed maturation" *Plant J.* **5**, 93-102.
- **Derham, B. K.; Harding, J. J. (1999)** "Alpha-crystalline as a molecular chaperone" *Prog. Ret. Eye Res.* **18**, 463-509.
- **Dong, X. (1998)** "SA, JA, ethylene and disease resistance in plants" *Curr. Opin. Plant Biol.* **1**, 316-323
- **Ehrnsperger, M.; Gräber, S.; Gaestel, M.; Buchner, J. (1997)** "Binding of non-native protein to Hsp25 during heat shock creates a reservoir of folding intermediates for reactivation" *EMBO J.* **16**, 221-229.

- Ehrnsperger, M.; Lilie, H.; Gaestel, M.; Buchner, J. (1999) "The dynamics of Hsp25 quaternary structure. Structure and function of different oligomeric species." *J. Biol. Chem.* **274**, 14867-14874.
- Feder, M. E.; Hofmann, G. E. (1999) "Heat-shock proteins, molecular chaperones and the stress response: evolutionary and ecological physiology" *Annu. Rev. Physiol.* **61**, 243-282.
- Feldman, D. E.; Frydman, J. (2000) "Protein folding *in vivo*: the importance of molecular chaperones" *Curr. Opin. Struct. Biol.* **10**, 26-33.
- Fenton, W. A.; Horwich, A. L. (1997) "GroEL-mediated protein folding" *Protein Sci.* **6**, 743-760.
- Fink, A. L. (1999) "Chaperone-mediated protein folding" *Physiol. Rev.* **79**, 425-445.
- Flaherty, K. M.; DeLuca-Flaherty, C.; McKay, D. B. (1990) "Three-dimensional structure of the ATPase fragment of a 70K heat shock cognate protein" *Nature* **346**, 623-628
- Forreiter, C.; Kirschner, M.; Nover, L. (1997) "Stable transformation of an *Arabidopsis* cell suspension culture with firefly luciferase providing a cellular system for analysis of chaperone activity *in vivo*" *Plant Cell* **9**, 2171-2181.
- Fray, R. G.; Lycett, G. W.; Grierson, D. (1990) "Nucleotide sequence of a heat-shock and ripening related cDNA from tomato" *Nucl. Ac. Res.* **18**, 7148.
- García, M. A.; Campillos, M.; Ogueta, S.; Valdivieso, F.; Vázquez, J. (2000) "Identification of amino acid residues of transcription factor AP-2 involved in DNA binding" *J. Mol. Biol.* **25**, 807-816.
- García-Casado, G.; Collada, C.; Allona, I.; Casado, R.; Pacios, L. F.; Aragoncillo, C.; Gómez, L. (1998) "Site-directed mutagenesis of active site residues in a class I endochitinase from chestnut seeds" *Glycobiology* **8**, 1021-1028.

- **Glatz, A.; Vass, I.; Los, D. A.; Víg, L. (1999)** "The *Synechocystis* model of stress: from molecular chaperones to membranes" *Plant Physiol. Biochem.* **37**, 1-12.
- **Glover, J. R.; Lindquist, S. (1998)** "Hsp104, Hsp70 and Hsp40: a novel chaperone system that rescues previously aggregated proteins" *Cell* **94**, 73-82.
- **Goloubinoff, P.; Mogk, A.; Peres Ben Zvi, A.; Tomoyasu, T.; Bukau, B. (1999)** "Sequential mechanism of solubilization and refolding of stable protein aggregates by a bichaperone network" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 13732-13737.
- **Graw, J. (1997)** "The crystallins: genes, proteins and diseases" *Biol. Chem.* **378**, 1331-1348.
- **Haley, D. A.; Horwitz, J.; Stewart, P. L. (1998)** "The small heat-shock protein, α B-crystallin, has a variable quaternary structure" *J. Mol. Biol.* **277**, 27-35.
- **Hanahan, D. (1983)** "Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids" *J. Mol. Biol.* **136**, 557-580.
- **Hay, B.; Short, J. M. (1992)** *Strategies* **5**, 16-18.
- **Heckathorn, S. A.; Downs, C. A.; Sharkey, T. D.; Coleman, J. S. (1998)** "The small, methionine-rich chloroplast heat-shock proteins protects photosystem II electron transport during heat stress" *Plant Physiol.* **116**, 439-444.
- **Hesterkamp, T.; Bukau, B. (1998)** "Role of the DnaK and HscA homologs of Hsp70 chaperones in protein folding in *E. coli*" *EMBO J.* **17**, 4818-4828.
- **Hino, M.; Kurogi, K.; Okubo, M. A.; Murata-Hori, M.; Hosoya, H. (2000)** "Small heat shock protein 27 (HSP27) associates with tubulin/microtubules in HeLa cells" *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **271**, 164-169.
- **Hong, S. W.; Vierling, E. (2000)** "Mutants of *Arabidopsis thaliana* defective in the acquisition of tolerance to high temperature stress" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 4392-4397.

- **Horváth, I.; Glatz, A.; Varvasovski, V.; Török, Z.; Páli, T.; Balogh, G.; Kovács, E.; Nádasdi, L.; Benkő, S.; Joó, F.; Vígh, L. (1998)** "Membrane physical state controls the signalling mechanism of the heat shock response in *Synechocystis* PCC6803: identification of *hsp17* as a 'fluidity gene'" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 3513-3518.
- **Horwich, A. L.; Weber-Ban, E. U.; Finley, D. (1999)** "Chaperone rings in protein folding and degradation" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 11033-11040.
- **Howarth, C. J. (1991)** "Molecular responses of plants to an increased incidence of heat shock" *Plant Cell Environ.* **14**, 831-841.
- **Jerpseth, B.; Greener, A.; Short, J. M.; Viola, J.; Kretz, P. L. (1992)** *Strategies* **5**, 81-83.
- **Jinn, T. L.; Chen, Y. M.; Lin, C. Y. (1995)** "Characterization and physiological function of class I low-molecular-mass, heat-shock protein complex in soybean" *Plant Physiol.* **108**, 693-701.
- **Jobin, M.-P.; Delmas, F.; Garmyn, D.; Diviès, C.; Guzzo, J. (1997)** "Molecular characterization of the gene encoding an 18-kilodalton small heat shock protein associated with the membrane of *Leuconostoc oenos*" *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 609-614.
- **Kadyrzhanova, D. K.; Vlachonasios, K. E.; Ververidis, P.; Dilley, D. R. (1998)** "Molecular cloning of a novel heat induced/chilling tolerance related cDNA in tomato fruit by use of mRNA differential display" *Plant Mol. Biol.* **36**, 885-895.
- **Kammenga, J. E.; Arts, M. S. J.; Oude-Breuil, W. J. M. (1998)** "HSP60 as a potential biomarker of toxic stress in the nematode *Plectus acuminatus*" *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **34**, 253-258.
- **Kandror, O.; Goldberg, A. L. (1997)** "Trigger factor is induced upon cold shock and enhances viability of *Escherichia coli* at low temperatures" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 4978-4981.

- **Kato, K.; Shinohara, H.; Goto, S.; Inaguma, Y.; Morishita, R.; Asano, T. (1992)** "Copurification of small heat shock protein with alpha B crystallin from human skeletal muscle" *J. Biol. Chem.* **267**, 7718-7725.
- **Kim, K. K.; Kim, R.; Kim, S. H. (1998 a)** "Crystal structure of a small heat-shock protein" *Nature* **394**, 595-599.
- **Kim, R.; Kim, K. K.; Yokota, H.; Kim, S. H. (1998 b)** "Small heat shock protein of *Methanococcus jannaschii*, an hyperthermophile." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 9129-9133.
- **Kimpel, J. A.; Key, J. L. (1985)** "Heat shock in plants" *Trends Biochem. Sci.* **10**, 353-357.
- **Kitagawa, M.; Matsumura, Y.; Tsuchido, T. (2000)** "Small heat shock proteins, IbpA and IbpB, are involved in resistances to heat and superoxide stresses in *Escherichia coli*" *FEMS Microbiol. Lett.* **184**, 165-171.
- **Krishna, P.; Sacco, M.; Cherutti, J. F.; Hill, S. (1995)** "Cold-induced accumulation of hsp90 transcripts in *Brassica napus*" *Plant Physiol.* **107**, 915-923.
- **Laemmli, U. K. (1970)** "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4" *Nature* **227**, 680-685.
- **Lam, E.; Pontier, D.; del Pozo, O. (1999)** "Die and let live – programmed cell death in plants" *Curr. Opin. Plant Biol.* **2**, 502-507
- **Lawrence, S. (1993)** "Identification and characterization of cDNA clones for chromoplast-associated proteins in tomato fruit" *Gainesville: University of Florida.*
- **Lee, G. J.; Pokala, N.; Vierling, E. (1995 a)** "Structure and *in vitro* molecular chaperone activity of cytosolic small heat shock proteins from pea" *J. Biol. Chem.* **270**, 10432-10438

- Lee, G. J.; Roseman, A. M.; Saibil, H. R.; Vierling, E. (1997) "A small heat shock protein stably binds heat-denatured model substrates and can maintain a substrate in a folding-competent state" *EMBO J.* **16**, 659-671.
- Lee, G. J.; Vierling, E. (2000) "A small heat shock protein cooperates with heat shock protein 70 system to reactivate a heat-denatured protein" *Plant Physiol.* **122**, 189-198.
- Lee, J. H.; Hübel, A.; Schöffl, F. (1995 b) "Derepression of the activity of genetically engineered heat shock factor causes constitutive synthesis of heat shock protein and increased thermotolerance in transgenic *Arabidopsis*" *Plant J.* **8**, 603-612.
- Leger, J. P.; Smith, F. M.; Currie, W. (2000) "Confocal microscopic localization of constitutive and heat shock-induced proteins HSP70 and HSP27 in the rat heart." *Circulation*, **102**, 191-194.
- Leroux, M. R.; Melki, R.; Gordon, B.; Batelier, G.; Candido, E. P. M. (1997) "Structure-function studies on small heat shock protein oligomeric assembly and interaction with unfolded polypeptides" *J. Biol. Chem.* **272**, 24646-24656.
- Lin, C. Y.; Roberts, J. K.; Key, J. L. (1984) "Acquisition of thermotolerance in soybean seedlings" *Plant Physiol.* **74**, 152-160.
- Lindquist, S. (1986) "The heat shock response" *Annu. Rev. Biochem.* **45**, 39-72.
- Lindquist, S.; Craig, E. A. (1988) "The heat shock proteins" *Annu. Rev. Genet.* **22**, 631-677.
- Lobradou, G.; Begueret, J.; Turcq, B. (1997) "A mutation in an Hsp90 gene affects the sexual cycle and suppresses vegetative incompatibility in the fungus *Podospora anserina*" *Genet.* **147**, 581-588.
- Löw, D.; Brandle, K.; Nover, L.; Forreiter, C. (2000) "Cytosolic heat-stressproteins Hsp17.7 class I and Hsp17.3 class II of tomato act as molecular chaperones *in vivo*" *Planta* **211**, 575-582.

- **Lünsdorf, H.; Schairer, H. U.; Heidelberg, M. (1995)** "Localization of the stress protein SP21 in indole-induced spores, fruiting bodies, and heat-shocked cells of *Stigmatella aurantiaca*" *J. Bacteriol.* **177**, 7092-7099.
- **Maleck, K.; Dietrich R. A. (1999)** "Defense on multiple fronts: how do plants cope with diverse enemies?" *Trends Plant Science* **4**, 215-219
- **Martin, J.; Hartl, F. U. (1997)** "Chaperone-assisted protein folding" *Curr. Opin. Struct. Biol.* **7**, 41-52.
- **Merck, K. B.; Groenen, P. J. T. A.; Voorter, C. E. M.; de Haard-Hoeckman, W. A.; Horwitz, J.; Bloemendal, H.; de Jong, W. W. (1993)** "Structural and functional similarities of bovine alpha crystallin and mouse small heat-shock proteins" *J. Biol. Chem.* **268**, 1046-1052.
- **McDowell, J. M.; Dangl, J. L. (2000)** "Signal transduction in the plant immune response" *Trends Biochem. Sci.* **25**, 79-82
- **Mirny, L. A.; Abkevich, V. I.; Shakhnovich, E. I. (1998)** "How evolution makes proteins fold quickly" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 4976-4981.
- **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 Develop.* **12**, 3788-3796.
- **Muchowski, P. J.; Clark, J. I. (1998)** "ATP-enhanced molecular chaperone functions of the small heat-shock protein human α B crystallin" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 1004-1009
- **Muchowski, P. J.; Valdez, M. M.; Clark, J. I. (1999 a)** " α B-crystallin selectively targets intermediate filament proteins during thermal stress" *Invest. Ophthalmol. Visual Sci.* **40**, 951-958.

- Muchowski, P. J.; Wu, G. J. S.; Liang, J. J. N.; Adman, E. T.; Clark, J. I. (1999 b) "Site-directed mutations within the core " α -crystallin" domain of the small heat-shock protein, human α B-crystallin, decrease molecular chaperone functions" *J. Mol. Biol.* **289**, 397-411.
- Nagar, S.; Pedersen, T. J.; Carrick, K. M.; Hanley-Bowdoin, L.; Robertson, D. (1995) "A geminivirus induces expression of a host DNA synthesis protein in terminally differentiated plant cells" *Plant Cell* **7**, 705-719.
- Nathan, D. F.; Vos, M. H.; Lindquist, S. (1997) "In vivo functions of the *Saccharomyces cerevisiae* Hsp90 chaperone" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 12949-12956.
- Nekolny, D.; Chaloupka, J. (2000) "Protein catabolism in growing *Bacillus megaterium* during adaptation to salt stress" *FEMS Microbiol. Lett.* **184**, 173-177.
- Nover, L.; Munsche, D.; Neumann, D.; Scharf, K. D.; Serfling, E. (1984) "The heat shock response of eukaryotic cells" *Biol. Zentralbl.* **103**, 357-435.
- O'Donnell, P. J.; Calvert, C.; Atzorn, R.; Wasternack, C.; Leyser, H. M. O.; Bowles D. J. (1996) "Ethylene as a signal mediating the wound response of tomato plants" *Science* **274**, 1914-1917.
- Park, S. Y.; Chang, K. C.; Shivaji, R.; Luthe, D. S. (1997) "Recovery from heat shock in heat-tolerant and nontolerant variants of creeping bentgrass" *Plant Physiol.* **115**, 229-240.
- Park, S. Y.; Shivaji, R.; Krans, J. V.; Luthe, D. S. (1996) "Heat shock response in heat tolerant and nontolerant variants of *Agrostis palustris* Huds." *Plant Physiol.* **111**, 515-524.
- Pearl, L. H.; Prodromou, C. (2000) "Structure and *in vivo* function of Hsp90" *Curr. Opin. Struct. Biol.* **10**, 46-51.

- **Perng, M. D.; Cairns, L.; van den Ijssel, P.; Prescott, A.; Hutcheson, A.; Quinlan, R. A. (1999)** "Intermediate filament interactions can be altered by HSP27 and α B-crystallin" *J. Cell Sci.* **112**, 2099-2112.

- **Pla, M.; Huguet, G.; Verdaguer, D.; Puigderrajols, P.; Llompart, B.; Nadal, A.; Molinas, M. (1998)** "Stress proteins co-expressed in suberized and lignified cells and in apical meristems" *Plant Sci.* **139**, 49-57.

- **Pratt, W. B. (1997)** "The role of the Hsp90-based chaperone system in signal transduction by nuclear receptors and receptors signalling via MAP kinase" *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **37**, 297-326.

- **Richardson, A.; Landry, S. J.; Georgopoulos, C. (1998)** "The ins and outs of a molecular chaperone machine" *TIBS* **23**, 138-143.

- **Rodríguez-Cerezo, E.; Findlay, K.; Shaw, J. G.; Lomonossoff, G. P.; Qiu, S. G.; Lindstead, P.; Shanks, M.; Risco, C. (1997)** "The coat anti cylindrical inclusion proteins of a potyvirus are associated with connections between plant cells" *Virology* **236**, 296-306

- **Sabehat, A.; Lurie, S.; Weiss, D. (1998)** "Expression of small heat-shock proteins at low temperatures. A possible role in protecting against chilling injuries" *Plant Physiol.* **117**, 651-658.

- **Sabehat, A.; Weiss, D.; Lurie, S. (1996)** "The correlation between heat-shock protein accumulation and persistence and chilling tolerance in tomato fruit" *Plant Physiol.* **110**, 531-537.

- **Saibil, H. (2000)** "Molecular chaperones: containers and surfaces for folding, stabilising or unfolding proteins" *Curr. Opin. Struct. Biol.* **10**, 251-258.

- **Sambrook, J.; Fritsch, E. F.; Maniatis, T. (1989)** "Molecular cloning: a laboratory manual" *Cold Spring Harbor Laboratory*, Cold Spring Harbor, NY, USA.

- **Santoro, M. G. (2000)** "Heat shock factors and the control of the stress response." *Biochem. Pharmacol.* **59**, 55-63.
- **Smykal, P.; Masin, J.; Hrdy, I.; Konopasek, I.; Zarsky, V. (2000)** "Chaperone activity of tobacco HSP18, a small heat-shock protein, is inhibited by ATP." *Plant J.* **23**, 703-713.
- **Sticher, L.; Mauch-Mani, B.; Metraux, J. P. (1997)** "Systemic acquired resistance" *Annu. Rev. Phytopathol.* **35**, 235-270.
- **Studier, F. W.; Moffat, B. A. (1986)** "Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes" *J. Mol. Biol.* **189**, 113.
- **Sun, T. X.; Das, B. K.; Liang, J. J. N. (1997)** "Conformational and functional differences between recombinant human lens α A- and α B-crystallin" *J. Biol. Chem.* **272**, 6220-6225.
- **Sun, T. X.; Das, B. K.; Liang, J. J. N. (1998)** Intermolecular exchange and stabilization of recombinant human A- and B-crystallin" *J. Biol. Chem.* **273**, 286-290.
- **Török, Z.; Horváth, I.; Goloubinoff, P.; Kovács, E.; Glatz, A.; Balogh, G.; Víg, L. (1997)** "Evidence for a lipochaperonin: Association of active protein-folding GroESL oligomers with lipids can stabilize membranes under heat shock conditions" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 2192-2197.
- **Uno, Y.; Furihata, T.; Abe, H.; Yoshida, R.; Shinozaki, Yamaguchi-Shinozaki, K. (2000)** "*Arabidopsis* basic leucine zipper transcription factors involved in an abscisic acid dependent signal transduction pathway under drought and high-salinity conditions" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 11632-11637.
- **van der Berg, B.; Ellis, R. J.; Dobson, C. M. (1999)** "Effects of macromolecular crowding on protein folding and aggregation" *EMBO J.* **18**, 6927-6933.

- **Vanhoudt, J.; Abgar, S.; Aerts, T.; Clauwaert, J. (2000)** "Native quaternary structure of bovine alpha-crystallin" *Biochemistry* **39**, 4483-4492.
- **Vierling, E. (1991)** "The roles of heat shock proteins in plants" *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **42**, 579-620
- **Vígh, L.; Los, D. A.; Horváth, I.; Murata, N. (1993)** "The primary signal in the biological perception of temperature: Pd-catalyzed hydrogenation of membrane lipids stimulated the expression of the *desA* gene in *Synechocystis* PCC6803" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 9090-9094.
- **Waters, E. R.; (1995)** "The molecular evolution of the small heat shock proteins in plants" *Genet.* **141**, 785-795.
- **Waters, E. R.; Lee, G. J.; Vierling, E. (1996)** "Evolution, structure and function of the small heat shock proteins in plants" *J. Exp. Bot.* **47**, 325-338.
- **Waters, E. R.; Vierling, E. (1999 a)** "The diversification of plant cytosolic small heat shock proteins preceded the divergence of mosses" *Mol. Biol. Evol.* **16**, 27-39.
- **Waters, E. R.; Vierling, E. (1999 b)** "Chloroplast small heat shock proteins: evidence for atypical evolution of an organelle-localized protein" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 14394-14399.
- **Wehmeyer, N.; Hernández, L. D.; Finkelstein, R. R.; Vierling, E. (1996)** "Synthesis of small heat-shock proteins is part of the developmental program of late seed maturation" *Plant Physiol.* **112**, 747-757
- **Wehmeyer, N.; Vierling, E. (2000)** "The expression of small heat shock proteins in seeds responds to discrete developmental signals and suggests a general protective role in desiccation tolerance" *Plant Physiol.* **122**, 1099-1108.

- **Werner, I.; Nagel, R. (1997)** "Stress proteins HSP60 and HSP70 in three species of amphipods exposed to cadmium, diazinon, dieldrin and fluoranthene" *Environ. Toxicol. Chem.* **16**, 2393-2403.
- **Wickner, S.; Maurizi, M. R.; Gottesman, S. (1999)** "Posttranslational quality control: folding, refolding and degrading proteins." *Science* **286**, 1888-1893
- **Woolf, A. B.; Lay-Yee, M. (1997)** "Pretreatments at 38 degrees C of 'Hass' avocado confer thermotolerance to 50 degrees C hot water treatments" *Hort Sci.* **32**, 705-708.
- **Xu, Z. H.; Horwich, A. L.; Sigler, P. B. (1997)** "The crystal structure of the asymmetric GroEL-GroES-(ADP)₇ chaperonin complex" *Nature* **388**, 741-750.
- **Yang, H.; Huang, S.; Dai, H.; Gong, Y.; Zheng, C.; Chang, Z. (1999)** "The *Mycobacterium tuberculosis* small heat shock protein Hsp16.3 exposes hydrophobic surfaces at mild conditions: conformational flexibility and molecular chaperone activity" *Protein Sci.* **8**, 174-179.
- **Yeh, C. H.; Chang, P. F. L.; Yeh, K. W.; Lin, W. C.; Chen, Y. M.; Lin, C. Y. (1997)** "Expression of a gene encoding a 16.9-kDa heat-shock protein, Oshsp16.9, in *Escherichia coli* enhances thermotolerance" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 10967-10972.
- **Young, L. S.; Yeh, C. H.; Chen, Y. M.; Lin, C. Y. (1999)** "Molecular characterization of *Oryza sativa* 16.9 kDa heat shock protein." *Biochem. J.* **344**, 31-38.
- **Yue, L.; Karr, T. L.; Nathan, D. F.; Swift, H.; Srinivasan, S.; Lindquist, S. (1999)** "Genetic analysis of viable Hsp90 alleles reveals a critical role in *Drosophila* spermatogenesis" *Genet.* **151**, 1065-1079.
- **Zarsky, V.; Garrido, D.; Eller, N.; Tupy, J.; Vicente, O.; Schöffl, F.; Heberle-Bors, E. (1995)** "The expression of small heat shock genes is activated during induction of tobacco pollen embryogenesis by starvation" *Plant Cell Environ.* **18**, 139-147.

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