



Universitat de Girona

LES sHsps SURERA: CAPACITAT PROTECTORA
ENFRONT L'ESTRÉS I VARIABILITAT GENÈTICA

Anna JOFRÉ FRADERA

ISBN: 84-689-0621-2
Dipòsit legal: GI-1595-2003



Universitat de Girona

Facultat de Ciències
Departament de Biologia

**LES sHSPs EN SURERA: CAPACITAT
PROTECTORA ENFRONT L'ESTRÈS I
VARIABILITAT GENÈTICA**

ANNA JOFRÉ i FRADERA

Girona, gener de 2003



Universitat de Girona

Facultat de Ciències
Departament de Biologia

**LES sHSPs EN SURERA: CAPACITAT
PROTECTORA ENFRONT L'ESTRÈS I
VARIABILITAT GENÈTICA**

Memòria presentada per ANNA JOFRÉ i FRADERA, inscrita en el programa de doctorat de Biotecnologia de l'Institut de Tecnologia Agroalimentària, Campus Agroalimentari de Girona, Institut d'Ecologia Aquàtica, Departament de Biologia i Departament EQATA, per optar al grau de doctora en biologia per la Universitat de Girona. El present treball s'ha realitzat a l'Àrea de Biologia Cel·lular del Departament de Biologia de la Universitat de Girona sota la direcció de la Dra. MARIA PLA.

Vist i plau de,

Dra. Maria Pla
Directora de tesi

Anna Jofré
Autora

*En solitud, però no solitaris,
reconduim la vida amb la certesa
que cap esforç no cau en terra eixorca.
Dia vindrà que algú beurà a mans plenes
l'aigua de llum que brolli de les pedres
d'aquest temps nou que ara esculpim nosaltres.*

Miquel Martí i Pol

ABREVIATURES

1D	unidimensional
2D	bidimensional
cDNA	DNA complementari
cfu	unitat formadora de colònia
C-terminal	carboxi terminal
dATP	trifosfat de desoxiadenosina
dCTP	trifosfat de desoxicitosina
DEPC	dietilpirocarbonat
dGTP	trifosfat de desoxiguanina
dNTPs	mescla dels desoxiribonucleòtids dATP, dTTP, dGTP i dCTP
dsDNA	DNA de doble cadena
DTT	ditiotreitòl
dTTP	trifosfat de desoxitimina
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	àcid etilen-diaminotetraacètic
EMBL	<i>European Molecular Biology Laboratory</i>
HCV	virus de l'Hepatitis C
HSE	element de xoc de calor
HSF	factor de xoc de calor
Hsp	proteïna de xoc de calor
IEF	isoelectroenfoc
IPTG	isopropil- β -D-tiogalactopiranòsid
kDa	kilodalton
Lea	<i>Late embryogenesis abundant</i>
mRNA	RNA missatger
N-terminal	amino terminal
$\cdot\text{O}_2^-$	radical superòxid
$\cdot\text{OH}$	radical hidroxil
OD	densitat òptica
PAGE	electroforesi en gel de poliacrilamida
pb	parells de bases
PCR	reacció en cadena de la polimerasa
pfu	unitat formadora de calbes de lisi
pI	punt isoelèctric
PM	pes molecular
Pn	grau de polimorfisme
PVDF	difluorur de polivinilidè
RNasa	ribonucleasa
rNTP	mescla dels ribonucleòtids rATP, rTTP, rGTP i rCTP
ROS	espècies d'oxigen reactives
rpm	revolucions per minut
RT	transcripció reversa
SD	desviació estàndard
SDS	dodecil sulfat sòdic
sHsp	proteïna de xoc de calor de baix pes molecular
sHsp-C1	proteïna de xoc de calor de baix pes molecular citoplasmàtica de classe I
ssRNA	RNA de cadena senzilla
UV	ultravioleta
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indòtil- β -D-galactopiranòsid
BER	reparació per escissió de bases
NER	reparació per escissió de nucleòtids

ÍNDIX

PRESENTACIÓ	1
1. Àmbit i antecedents del treball.	1
2. Objectius generals	5
3. Estructura de la memòria.	9
I. INTRODUCCIÓ	11
I.1. Les proteïnes de xoc de calor	15
1. LES PROTEÏNES DE XOC DE CALOR DE BAIX PES MOLECULAR.	15
1.1. La família de les sHsps de planta	16
1.2. L'expressió de sHsps en plantes	16
1.2.1. Inducció per estrès	16
1.2.2. L'expressió durant el desenvolupament	17
1.2.3. Regulació per estrès i al llarg del desenvolupament	19
1.3. Estructura de les sHsps i α -cristal·lins	19
1.4. La formació de complexos oligomèrics.	20
1.5. La funció xaperona	20
1.5.1. Les xarxes multixaperona.	21
1.5.2. Estabilització de membranes	21
I.2. L'acumulació de mutacions als àcids nucleics	23
1. LES MUTACIONS ESPONTÀNIES ALS ÀCIDS NUCLEICS	23
2. MUTACIONS I ESTRÈS OXIDATIU	24
2.1. Les espècies d'oxigen reactives.	24
2.2. L'estrès oxidatiu i l'acumulació de mutacions	26
2.3. Anàlisi de bases modificades per GC-MS	28
4. LES HspS TAMPONEN MUTACIONS	30
5. LA HIPERMUTABILITAT DELS VIRUS DE RNA.	31
5.1. Anàlisi de mutacions minoritàries	31

II. MATERIAL I MÈTODES	33
1. Material biològic	35
2. Estressos de plàntules de surera i embrions	35
3. Mètodes generals de manipulació d'àcids nucleics i proteïnes	36
3.1. Anàlisi de proteïnes.....	36
3.1.1. Extracció de proteïnes totals.	36
3.1.2. L'electroforesi.	37
3.1.3. El Western blot.	39
3.2 Anàlisi d'RNA.....	40
3.2.1. Extracció d'RNA total	40
3.2.2. Purificació d'RNA poli(A)+	42
3.2.3. Síntesi de cDNA: transcripció reversa.	42
3.2.4. Transferència a membrana: Northern blot.	42
3.2.5. Hibridació i marcatge d'àcids nucleics.	43
3.3 Anàlisi de DNA.....	44
3.3.1. Extracció de DNA.	44
3.3.2. Reacció en cadena de la polimerasa (PCR)	44
3.3.3. TAIL-PCR.	45
3.3.4. Clonatge de seqüències de DNA.	46
3.3.5. Transformació d' <i>E. coli</i> per xoc tèrmic	47
3.3.6. Empaquetament, titulació i purificació del fag λ gt11.	47
3.3.7. Seqüenciació.	48
3.3.8. Crivellat d'una llibreria de cDNA.	49
4. Assajos de viabilitat en bacteris	49
5. Cromatografia de gasos-espectrometria de masses	50
III. RESULTATS	51
III.1. Les sHsps-CI: acumulació i protecció enfront l'estrès	53
Article I: Developmentally and stress-induced small heat shock proteins in cork oak somatic embryos.	55
Article II: A 10 kDa class CI sHsp protects <i>E. coli</i> from high temperature and oxidative stress.	65
Altres resultats no publicats	83
1. Clonatge de sHsps-CI en mRNA de fel·lema, rel i DNA.	85
2. Anàlisi de l'expressió de <i>Qshsp17.4-CI</i> i <i>Qshsp10-CI</i>	91
3. Assajos dirigits a l'obtenció de la seqüència completa de <i>Qshsp10-CI</i>	93
III.2. Variabilitat genètica de <i>Qshsp17.4-CI</i>	95
Article III: Large accumulation of mRNA and DNA point modifications in a plant senescent tissue	97
Article IV: Oxidative and spontaneous modifications in plant genomic DNA and mRNA.	103

IV. <u>DISCUSSIÓ GENERAL</u>	121
V. <u>CONCLUSIONS</u>	133
VI. <u>BIBLIOGRAFIA</u>	137
VII. <u>ANNEX</u>	147
VII.1. Comparació del patró d'expressió en fulles d' Arabidopsis salvatge <i>Col-0</i> i el mutant amb senescència prematura <i>rcd1</i> mitjançant <i>microarrays</i>	149
VII.2. Article V: Expression of low molecular weight heat-shock proteins (sHsps) and total antioxidant activity in the Mediterranean woody <i>Quercus ilex</i> L. in relation to seasonal and diurnal changes in physiological parameters.	161
Agraïments	185

PRESENTACIÓ

Aquest treball s'emmarca dins l'estudi de les cèl·lules del fel·lema de la surera (*Quercus suber L.*) a nivell molecular. En aquest estudi, a partir d'una llibreria de cDNA de fel·lema en procés de suberificació activa, es van identificar diversos gens implicats en la resistència a l'estrès, entre ells, una sHsp de classe CI, família objecte d'estudi en aquest treball.

1. Àmbit i antecedents del treball

El fel·lema de la surera, el suro

El fel·lema és un teixit limitant present a totes les plantes terrestres. És el teixit senescent que forma la capa externa de la peridermis, la qual substitueix a l'epidermis en el creixement secundari. Durant la diferenciació, les cèl·lules del fel·lema estan sotmeses a un fort estrès metabòlic, principalment oxidatiu. Aquest estrès oxidatiu és degut a la generació d'espècies d'oxigen reactives per part de les lacases i peroxidases de la paret cel·lular durant el procés de suberització (Whetten i Sederoff, 1995; Wojtaszek 1997). Malgrat això, les cèl·lules del fel·lema sobreviuen durant un cert temps en aquestes condicions, creixent i acumulant gran quantitat de suberina i ceras a la paret cel·lular. Un cop mortes, les cèl·lules del fel·lema es converteixen en una eficient barrera protectora davant la radiació, pèrdua d'aigua i entrada de patògens.

En la majoria de plantes llenyoses, el fel·lema forma una capa prima i discontinua de cèl·lules que moren ràpidament (Romberger *et al.* 1993). En el fel·lema de la surera, de manera única i contràriament al que passa en altres quercínies amb les quals comparteix territori i s'hibrida, a cada estació de creixement es produeixen unes 60 noves capes de cèl·lules que són altament homogènies i contenen gairebé exclusivament cèl·lules suberificades. Aquestes capes de cèl·lules formen un anell gruixut i continu que s'acumula a l'escorça de l'arbre constituint el suro.

La nostra hipòtesi de treball és que les cèl·lules del fel·lema tenen uns mecanismes de protecció, un dels quals podrien ser les *small Heat shock proteins* (sHsps), que els permeten sobreviure en condicions d'estrès oxidatiu endogen. D'acord amb això, el fel·lema de l'alzina surera seria un bon model per estudiar la resposta cel·lular a l'estrès, principalment oxidatiu.

QsHsp17.4-CI, una sHsp de classe CI

En un treball anterior, en el nostre laboratori, es va clonar a partir d'una llibreria de cDNA de fel·lema una sHsp-CI, *Qshsp17.4-CI*¹. Aquesta, va ser expressada en *E. coli* i es van obtenir anticossos policlonals en conill.

Mitjançant anàlisis immunohistoquímiques i hibridacions *in situ* es va observar una acumulació constitutiva de QsHsp17.4-CI en el teixit vascular i, especialment en el fel·lema, teixits sotmesos a estrès oxidatiu endogen.

D'altra banda, l'anàlisi per 1D-*Western blot* utilitzant l'anticòs policlonal anti-QsHsp17.4-CI va mostrar que les tiges i rels de plàntules de surera en condicions normals de creixement no presentaven acumulació de QsHsp17.4-CI. En canvi, l'aplicació d'estrès oxidatiu en forma d'H₂O₂, estrès tèrmic, estrès hídric o el tractament de les plàntules amb àcid abscísic induïa l'acumulació de QsHsp17.4-CI (Pla *et al.* 1998).

¹ D'acord amb la nova nomenclatura proposada per Scharf *et al.* 2001, Qs_Hsp17 s'ha anomenat QsHsp17.4-CI.

2. Objectius

Per estudiar les cèl·lules del fel·lema i els seus mecanismes protectors ens hem plantejat dos objectius principals: per una banda **(I)** estudiar les sHsps-CI del fel·lema de surera, especialment en relació a l'estrès oxidatiu. Per altra banda **(II)** analitzar si les condicions extremes d'estrès oxidatiu endogen del fel·lema afecten la integritat genètica de les cèl·lules i, en conseqüència, la integritat de les pròpies sHsps-CI. L'acumulació de mutacions s'ha relacionat amb la senescència de les cèl·lules. Aquesta acumulació de mutacions en els gens de les proteïnes amb funció xaperona pot ser la desencadenant d'una catàstrofe concatenada que porti a la mort cel·lular.

Per altra banda i de manera complementària ens hem proposat **(I.6)** estudiar l'acumulació de les sHsps-CI en relació a la síndrome general d'adaptació a l'estrès de les plantes mediterrànies i **(II.3)** iniciar un estudi dels gens que podrien tenir un paper en l'estrès oxidatiu.

I. Les sHsps del fel·lema en relació a l'estrès oxidatiu

Les sHsps són proteïnes d'estrès molt abundants a les plantes. Estan relacionades amb la protecció enfront l'estrès i s'indueixen per diferents factors com temperatura, deshidratació, ABA i estrès oxidatiu. En diverses plantes s'ha descrit que les sHsps formen famílies multigèniques i possiblement, entre els diferents membres de la família hi hagi un cert grau de divergència funcional i presentin una diferent regulació. Com s'ha exposat anteriorment sabem que les cèl·lules del fel·lema de *Q. suber* expressen QsHsp17.4-CI i sembla probable que s'hi expressin també altres sHsps-CI. El nostre objectiu és investigar el caràcter multigènic de les sHsps-CI a la surera, conèixer els diferents membres de la família que s'expressen al fel·lema i investigar possibles diferències en els mecanismes protectors i de regulació.

Per assolir aquest objectiu ens proposem els següents objectius concrets:

- I.1. Aprofundir en la caracterització de QsHsp17.4-CI mitjançant l'estudi amb electroforesi 2D.** (article I)
- I.2. Aïllar altres possibles sHsps-CI a més de Qshsp17.4-CI.** (article II i Resultats no publicats)
- I.3. Analitzar el patró d'acumulació dels diferents membres de la família de les sHsps-CI en condicions d'estrès.** (article I i II)

- I.4. Investigar la capacitat protectora enfront l'estrès oxidatiu de les sHsps-CI, especialment en relació amb l'estrès oxidatiu.** (article II)
- I.5. Constatant la important truncació d'una de les sHsp-CI del fel.lema, estudiar el paper dels diferents dominis de les sHsp-CI en l'activitat xaperona *in vivo*.** (article II)
- I.6. Estudiar l'acumulació de sHsp-CI i d'antioxidants en relació a canvis estacionals i diürns en condicions de camp en l'alzina, *Q. ilex*.** *Q. ilex és una espècie molt pròxima a Q. suber amb qui comparteix territori i molt ben caracteritzada fisiològicament. El fet de disposar d'un anticòs de surera capaç de reconèixer les sHsps-CI d'alzina, paràmetres fisiològics i una parcel.la d'estudi ens va determinar a utilitzar aquesta espècie.* (annex: article V)

II. Efecte de les condicions del fel.lema sobre la integritat dels àcids nucleics

Donades les extremes condicions d'estrès oxidatiu de les cèl.lules del fel.lema i sabent que l'estrès oxidatiu es relaciona amb l'acumulació de mutacions, volem conèixer si les cèl.lules del fel.lema acumulen mutacions en relació a un teixit control, si aquestes mutacions estan relacionades amb l'estrès oxidatiu i fins a quin grau l'acumulació de mutacions pot comprometre la integritat genètica de sistemes com les sHsps, que han de servir per protegir de l'estrès.

En relació a aquest objectiu ens proposem els següents objectius concrets:

- II. 1. Analitzar el grau de variabilitat del DNA i l'mRNA al gen *Qshsp17.4* en comparació a un teixit control.** (article III)
- II.2. Determinar quines mutacions predominen en suro i teixit control (àpex radicular).** (article IV)
- II.3. Analitzar l'acumulació de lesions a les bases del DNA que poden ser conseqüència de l'acció de les espècies d'oxigen reactives (ROS) pròpies de l'estrès oxidatiu i que poden generar mutacions.** (article IV)
- II.4. Determinar quins gens s'expressen en relació a l'estrès oxidatiu.** *En aquest cas i com a primer pas, els estudis s'han fet utilitzant el mutant radical induced cell death 1 (*rcd1*) d'*Arabidopsis thaliana*, sensible a l'estrès oxidatiu, aplicant la tècnica dels microarrays. Els resultats han de servir per una posterior aplicació en surera.* (annex)

3. Estructura de la memòria

Aquesta memòria consta dels següents apartats: Introducció, Material i mètodes, Resultats, Discussió general, Conclusions, Bibliografia i Annex.

I. Introducció. S'ha estructurat en dos apartats d'acord amb els resultats i objectius proposats: I.1. Les proteïnes de xoc de calor i I.2. L'acumulació de mutacions als àcids nucleics.

II. Material i mètodes. Es descriu de forma breu la metodologia utilitzada al llarg de la realització d'aquest treball.

III. Resultats. Els resultats s'han agrupat en dos apartats que es corresponen amb els dos objectius principals d'aquest treball.

III.1. Les sHsps-CI: acumulació i protecció enfront l'estrès. Compren l'article I (Developmentally and stress-induced small heat shock proteins in cork oak somatic embryos. *Journal of Experimental Botany* (2002) 53:1445-1452), l'article II (A 10 kDa class CI sHsp protects *E. coli* from high temperature and oxidative stress. *Planta*, en revisió) i altres resultats no publicats. Tots aquests resultats fan referència a la caracterització de la família multigènica de les sHsps-CI en fellema i altres teixits de surera així com la capacitat protectora enfront l'estrès que presenta un dels seus membres.

III.2. Variabilitat genètica de *Qshsp17.4-CI*. Inclou l'article III (Large accumulation of mRNA and DNA point modifications in a plant senescent tissue. *FEBS Letters* (2000) 472:14-16) i l'article IV (Oxidative and spontaneous modifications in plant genomic DNA and mRNA) en els quals s'estudia l'efecte de l'estrès oxidatiu en la integritat dels àcids nucleics de les cèl·lules del fellema en base a l'anàlisi de les mutacions al gen *Qshsp17.4-CI*.

IV. Discussió. Es discuteixen conjuntament les aportacions d'aquest treball.

V. Conclusions.

VI. Bibliografia. Inclou de forma detallada tota la bibliografia citada en la Presentació, Introducció i Discussió general.

VII. Annex. Es presenten dos treballs no inclosos a la discussió general:

VII.1. Anàlisi del mutant d'*Arabidopsis rcd1*, sensible a l'estrès oxidatiu mitjançant la tècnica dels *microarrays* per tal d'identificar gens relacionats amb l'estrès oxidatiu.

VII.2. Un cinquè article en el qual s'ha utilitzat la tècnica de les electroforesis 2D per l'estudi de les sHsps-CI en *Quercus ilex* (*Plant, Cell and environment*, en revisió).

I. INTRODUCCIÓ

I.1. Les proteïnes de xoc de calor

I.2. L'acumulació de mutacions als àcids nucleics

I. INTRODUCCIÓ

En resposta a l'estrès els patrons d'expressió gènica canvien. Mentre que alguns gens s'expressen més, altres són reprimits. El reconeixement de l'estrès comença quan el senyal és rebut pels receptors i es generen segons missatgers que activen les vies de transducció del senyal i produeixen, en últim terme, l'activació de gens de resposta a l'estrès. La duració i severitat de l'estrès és el que dicta la magnitud de la resposta (Xiong *et al.* 2002).

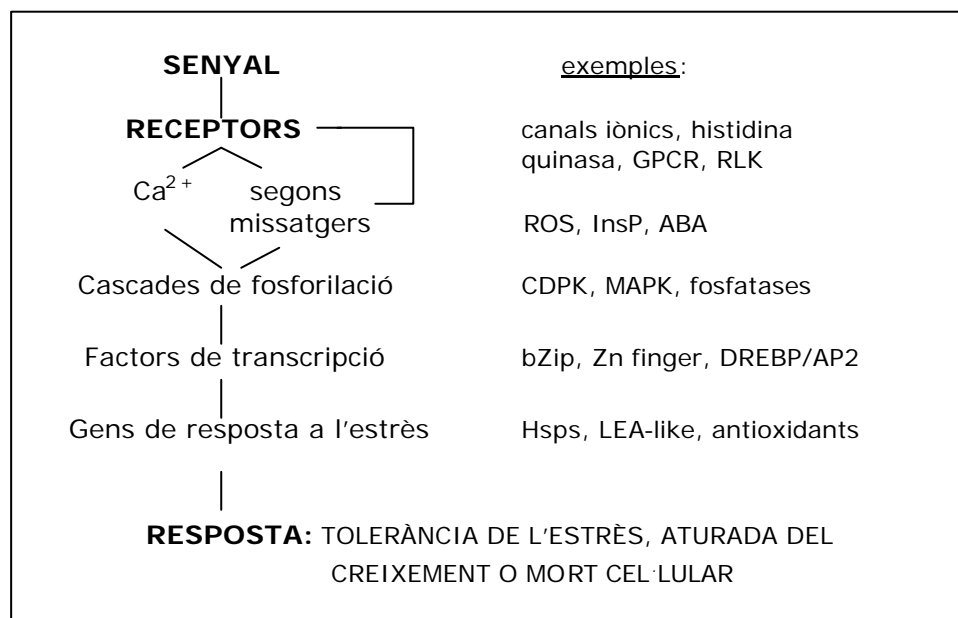


Figura 1. Ruta genèrica de transducció d'un senyal d'estrès. Modificat de Xiong *et al.* 2002. GPCR, *G protein-coupled receptors*; RLK, *receptor-like kinases*; CDPK, *calcium dependent protein kinases*; MAPK, *mitogen activated protein kinase*; DREBP/AP2, *drought-responsive element binding protein*; LEA, *late embryogenesis abundant*.

En plantes la transducció del senyal en resposta a diferents estressos abiòtics (temperatures extremes, estrès oxidatiu, sequera, salinitat, etc.) té característiques comunes. La ruta de transducció d'un senyal d'estrès comença amb la percepció del senyal i va seguida de la generació de segons missatgers com fosfats d'inositol (InsP) o ROS. Aquests segons missatgers modulen els nivells de Ca^{2+} intracel·lular que provoquen l'inici d'una cascada de fosforilació. Finalment, s'activen proteïnes directament relacionades amb la protecció cel·lular o factors de transcripció que controlen grups de gens regulats per estrès. Els productes d'aquests gens poden participar en la generació de molècules reguladores com hormones (àcid abscísic (ABA), etilè i àcid salicílic (SA), que poden iniciar una segona ronda del senyal (Fig. 1).

Un fet comú a la majoria d'estressos és la inducció de l'acumulació d'espècies d'oxigen reactives (ROS) (Polle i Rennenberg, 1993). Aquestes ROS poden participar en la transducció del senyal així com en la inducció de mecanismes protectors enfront les ROS (*e.g.* ROS scavengers) o altres agents que contribueixen al dany que provoca l'estrès als àcids nucleics, proteïnes i lípids (Xiong *et al.* 2002).

I.1. Les proteïnes de xoc de calor

Els organismes responen a les altes temperatures i a molts altres estressos sintetitzant un grup de proteïnes anomenat proteïnes de xoc de calor o Hsps (*Heat Shock Proteins*). La universalitat i conservació al llarg de l'evolució d'aquesta resposta fa pensar que les Hsps tenen un paper fonamental en la supervivència en condicions d'estrès (Jinn *et al.* 1993).

En eucariotes s'han descrit diverses classes de Hsps que es classifiquen segons l'homologia i el pes molecular aproximat en proteïnes de xoc de calor d'alt pes molecular o *High molecular weight* Hsps (Hsp110, Hsp90, Hsp70, Hsp60) i proteïnes de xoc de calor de baix pes molecular o sHsps (*small Heat shock proteins*), de 15 a 30 KDa. Si bé és probable que diferents Hsps tinguin propietats funcionals diferents, totes estan relacionades pel caràcter de xaperones moleculars. Les xaperones moleculars formen un grup de proteïnes que es defineix per la seva capacitat de reconèixer i unir-se a proteïnes en un estat inestable i inactiu prevenint l'agregació o promovent un replegament correcte (Beissinger i Buchner 1998).

La transcripció de les Hsps està regulada pels factors de xoc de calor (HSFs). Els HSF formen l'últim component de la via de transducció del senyal que acaba amb l'activació de gens que responen a l'estrès tèrmic i molts altres tipus d'estrès (Nover *et al.* 2001). L'acció dels HSFs es basa en la unió a seqüències palindròmiques del DNA, els elements promotors de xoc de calor (HSE), que es troben a les regions promotores de totes les Hsps d'eucariotes. Aquesta unió provoca canvis en l'organització de l'estructura cromatínica de les regions 5' dels gens i activa la seva transcripció (Wu, 1995).

1. Les proteïnes de xoc de calor de baix pes molecular

Les proteïnes de xoc de calor de baix pes molecular (sHsps) formen un grup de proteïnes ubicu i divers relacionat principalment amb la resistència a l'estrès però, que també s'expressen en etapes del desenvolupament embrionari, la divisió cel·lular, la diferenciació i la mort cel·lular programada (Morange 1998). A més, les

sHsps humanes han estat relacionades amb malalties com el Parkinson, l'Alzheimer, les cataractes i alguns tipus de càncer (Horwitz 2000).

1.1. La família de les sHsps de planta

A diferència dels llevats i de les cèl·lules animals, les plantes sintetitzen molt abundants i diverses sHsps. Les sHsps de plantes han estat classificades en funció de la seva localització intracel·lular i homologia de seqüència en cinc famílies multigèniques nuclears conservades, dues localitzades al citoplasma (classe I i II) i les altres tres al reticle endoplasmàtic (ER), cloroplasts (P) i mitocondris (M), (Waters *et al.* 1996).

L'anàlisi del genoma complet d'*Arabidopsis thaliana* ha revelat 19 seqüències relacionades amb les sHsps de plantes: sis proteïnes citosòliques de classe CI, dues de classe CII, una cloroplàstica, una de reticle endoplasmàtic i dues mitocondrials. A més, una de lleugerament relacionada amb la classe CII que ha estat designada com a classe CIII i sis altres amb menor homologia anomenades sHsp-like proteins (Scharf *et al.* 2001). El caràcter multigènic de la família de les sHsps també s'ha confirmat en diferents espècies com la perera (DeRocher *et al.* 1991) i la maduixera (Medina-Escobar *et al.* 1998) mitjançant Southern *blot*. L'elevat grau de diversificació de les sHsps probablement reflecteix adaptacions moleculars a condicions d'estrès úniques en plantes (Waters *et al.* 1996).

1.2. L'expressió de sHsps en plantes

1.2.1. Inducció per estrès

Les sHsps en plantes s'indueixen per calor i també per altres tipus d'estrès com l'estrès oxidatiu (ozó, peròxid d'hidrogen, radiació UV i gamma), baixes temperatures, estrès hídric, tractaments hormonals, metalls pesats, etc. (revisat per Sun *et al.* 2002), (Taula 1). Els patrons d'acumulació de sHsps són complexos. Els estudis mitjançant electroforesi 2D mostren com el patró de distribució i número de polipèptids detectats varia segons l'espècie i el teixit. La majoria de comparacions s'han realitzat entre llavors deshidratades i fulles de plantes sotmeses a xoc de calor (DeRocher *et al.* 1991; Hernández i Vierling, 1993; zur Nieden *et al.* 1995 i Wehmeyer *et al.* 1996). També s'ha vist diferent patró d'expressió en resposta als estressos tèrmic i hídric (Coca *et al.* 1994).

L'acumulació de sHsps a la cèl·lula proporciona tolerància a diferents tipus d'estrès. Una preexposició a un xoc de calor suau, a baixes concentracions de H₂O₂, a agents generadors de O₂⁻, a etanol o metalls pesats induïx tolerància enfront elevades temperatures o una concentració letal del mateix agent (Nover 1991; Crawford i Davies 1994; Banzet *et al.* 1998). També s'ha observat protecció creuada, és a dir, que una preexposició a un xoc de calor proporciona resistència a l'estrès oxidatiu (Crawford i Davies 1994; Banzet *et al.* 1998) l'estrès salí (Harrington i Alm 1988), metalls tòxics (Wollgiehn i Neumann 1995) i fred (Sabehat *et al.* 1996 i 1998). Aquesta protecció creuada suggereix que les sHsps podrien tenir una funció protectora dels efectes perjudicials compartits pels diversos tipus d'estrès i que constitueixen bàsicament la inducció de l'acumulació d'espècies d'oxigen reactives (ROS), (Polle i Rennenberg, 1993; Smirnof, 1998).

1.2.2. L'expressió durant el desenvolupament

Algunes sHsps s'expressen a temperatures normals en processos claus com el cicle cel·lular, la gametogènesi, la maduració dels fruits i l'embriogènesi (Nover, 1997). L'expressió de sHsps es dona tant en l'embriogènesi somàtica com en la zigòtica (Pitto *et al.* 1983). Aquesta expressió és transitòria i depèn de l'estat de desenvolupament de la llavor. La síntesi i acumulació de sHsps comença a lloc abans que es doni una dessecació notable de la llavor i augmenta fins arribar a un màxim en l'embrió madur. La desaparició de les sHsps té lloc durant la primera etapa de la germinació, de forma ràpida o en pocs dies segons les espècies. Aquest patró d'expressió mimetitzava el dels gens *Lea* (*Late embryogenesis abundant*), que s'acumulen en llavors dessecades i desapareixen durant la germinació (lectines, inhibidors enzimàtics, proteïnes de membrana dels cossos lipídics, proteïnes de reserva i molts mRNAs i proteïnes de funció desconeguda) (Dure III *et al.* 1989).

Es creu que les sHsps tenen una funció en els processos finals de la maduració de la llavor quan s'adquireix la dormància i la tolerància a la dessecació (Coca *et al.* 1994; Wehmeyer *et al.* 1996; Wehmeyer i Vierling, 2000). La tolerància a la dessecació permet a la llavor assecar-se, ser emmagatzemada per un període de temps llarg i continuar retenint la viabilitat (Ingram i Bartels, 1996). El fet que sHsps regulades pel desenvolupament s'expressin en resposta a l'estrès hídric (Coca *et al.* 1994 i 1996) i que en altres teixits diverses sHsps s'expressin en resposta a la deshidratació (Alamillo *et al.* 1995; Pla *et al.* 1998), juntament amb l'anàlisi de diversos mutants de maduració de la llavor en *Arabidopsis* (Wehmeyer i Vierling, 2000) indica que les sHsps serien essencials per la tolerància a la dessecació.

Condicions	Espècie	sHsp
Desenvolupament embrionari	<i>Heliantus annus</i>	<i>HaHsp17.6-CI</i> (1) <i>HaHsp17.9-CII</i> (2)
	<i>Pisum sativum</i>	<i>PsHsp18.1-CI</i> i 3 de relacionades (3) <i>PsHsp17.7-CII</i> i 2 de relacionades (3)
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>AtHsp17.4-CI</i> , <i>AtHsp17.6-CI</i> (4) <i>AtHsp17.7-CII</i> (5)
	<i>Lycopersicon esculentum</i>	<i>LpHsp17.7-CI</i> homòleg (6) <i>LpHsp17.3-CII</i> homòleg (6)
Germinació	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>AtHsp17.4-CI</i> , <i>AtHsp17.6-CI</i> (4) <i>AtHsp17.7-CII</i> , <i>AtHsp17.6-CII</i> (5)
	<i>Pseudotsuga menziesii</i>	cDNA DF4-5 (classe CI) (7)
	<i>Hordeum vulgare</i>	<i>HvHsp26.8-P</i> , <i>HvHsp26.9-P</i> (8)
	<i>Douglas fir</i>	<i>PM18.2A</i> (classe CI) (13)
Embriogènesi somàtica	<i>Medicago sativa</i>	<i>Hsp18.1</i> (classe CI) (9) <i>MsHsp18.2-CI</i> (9)
	<i>Nicotiana tabacum</i>	<i>NtHsp18-CI</i> (10)
Desenvolupament del pol·len	<i>Lilium</i>	cDNA homòleg a sHsps-CI (11)
	<i>Zea mays</i>	<i>ZmHsp17-CII</i> (12)
	<i>Nicotiana tabacum</i>	<i>NtHsp18-CI</i> (13)
Maduració dels fruits	<i>Lycopersicon esculentum</i>	<i>LpHsp17.7-CI</i> homòleg (6) <i>LpHsp17.3-CII</i> homòleg (6) <i>LeHsp23.8-P</i> (14)
		<i>TOM111</i> (classe P) (14)
Estrès osmòtic	<i>Heliantus annus</i>	<i>HaHsp17.6-CI</i> (15) <i>HaHsp17.9-CII</i> (15)
	<i>Craterostigma plantagineum</i>	<i>HaHsp17.6-CI</i> homòlegs (16) <i>HaHsp17.9-CII</i> homòlegs (16)
	<i>Quercus suber</i>	<i>QsHsp17.4-CI</i> (17)
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>AtHsp17.4-CI</i> , <i>AtHsp17.6-CI</i> (5)
Àcid abscísic	<i>Quercus suber</i>	<i>QsHsp17.4-CI</i> (17)
	<i>Heliantus annus</i>	<i>HaHsp17.6-CI</i> (1)
	<i>Craterostigma plantagineum</i>	<i>HaHsp17.6-CI</i> homòlegs (16) <i>HaHsp17.9-CII</i> homòlegs (16)
		<i>PM18.2A</i> (classe CI) (13)
GA, MeJA i auxina Estrès oxidatiu	<i>Douglas fir</i>	<i>PM18.2A</i> (classe CI) (13)
	<i>Quercus suber</i>	<i>QsHsp17.4-CI</i> (17)
	<i>Lycopersicon esculentum</i>	<i>Hsp22</i> (classe M) (18)
	<i>Petroselinum crispum</i>	<i>Hsp17.9-CI</i> (19)
	<i>Oryza sativa</i>	<i>OsHsp26.6-P</i> (20)
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>AtHsp17.7-CII</i> (5)
Fred	<i>Solanum tuberosum</i>	<i>CI19</i> (classe ER) (21)
	<i>Lycopersicon esculentum</i>	<i>TOM66</i> (classe CI) (22) <i>TOM111</i> (class P)/ <i>LeHsp23.8-P</i> (22)
	<i>Morus bombycis</i>	<i>WAP20</i> (classd ER) (23)
	<i>Castanea sativa</i>	<i>CsHsp17.5-CI</i> (24)
Metalls pesats	<i>Medicago sativa</i>	<i>Hsp18.1</i> (classe CI) (9) <i>MsHsp18.2-CI</i> (9)
		<i>AtHsp17.7-CII</i> , <i>AtHsp17.6-CIII</i> (26)
Fotoperíode Temperatura normal	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>sHsp-1</i> (classe CII) (25)
	<i>Craterostigma plantagineum</i>	<i>HaHsp17.6-CI</i> homòlegs (16)

Taula 1. Expressió de sHsps en condicions diferents de l'estrès tèrmic. Els noms estan adaptats segons la nomenclatura proposada per Scharf *et al.* 2001. Els noms de les sHsps que no estan completament seqüenciades no s'han adaptat però, s'indica la classe a la qual pertanyen: CI i CII (citoplàsmiques/nuclears), ER (reticle endoplasmàtic), P (plastidis/cloroplasts) i M (mitocondrials). GA: àcid giberèl·lic; MeJA: metil jasmonat. Modificat De Sun *et al.* 2002. Referències: (1)Almoguera *et al.* 1992; (2)Coca *et al.* 1994; (3)DeRocher *et al.* 1994; (4)Wehmeyer *et al.* 1996; (5)Sun *et al.* 2001; (6)Löw *et al.* 2000; (7)Tranbarger *et al.* 1996; (8)Kruse *et al.* 1993; (9)Györgyey *et al.* 1991; (10)Zarsky *et al.* 1995; (11)Bouchard 1990; (12)Dietrich *et al.* 1991; (13) Kaukinen *et al.*1996; (14)Lawrence *et al.* 1997; (15)Almoguera *et al.* 1993; (16)Alamillo *et al.* 1995; (17)Pla *et al.* 1998; (18)Lee *et al.* 1997; (19)Eckey-Kaltenbach *et al.* 1997; (20)Lee *et al.* 2000; (21)van Berkel *et al.* 1994; (22)Sabehat *et al.* 1998; (23)Ukaji *et al.* 1999; (24)Soto *et al.* 1999; (25)Krishna *et al.* 1992; (26) Sun *et al.* 2002.

1.2.3. Regulació per estrès i al llarg del desenvolupament

En general, només un grup de sHsps de classe CI o CII estan regulades pel desenvolupament, però els embrions poden manifestar una resposta a un xoc de calor completa, expressant totes les sHsps induïbles per calor en la plàntula (De Rocher i Vierling, 1994; Puigderrajols *et al.* 2002). Aquest fet suggereix que hi ha una regulació diferent i possiblement diferents funcions durant la maduració de l'embrió i en resposta a l'estrès. En embrions de plantes transgèniques la utilització de promotors de sHsps fusionats amb gens marcadors (GUS) confirmen aquesta diferent regulació (Wehmeyer i Vierling, 2000).

1.3. Estructura de les sHsps-CI i α -cristal·lins

La família de les sHsps, que també inclou les α -cristal·lins de la lent ocular dels vertebrats (Mörner 1894), es caracteritza per presentar un domini C-terminal conservat d'aproximadament 90 aminoàcids anomenat domini α -cristal·lí que inclou les seqüències consens I i II (de Jong *et al.* 1998). Aquest domini α -cristal·lí, de caràcter hidrofòbic, està flanquejat per una extensió C-terminal curta, polar i flexible i per una regió N-terminal menys conservada (MacRae 2000) (Fig. 2).

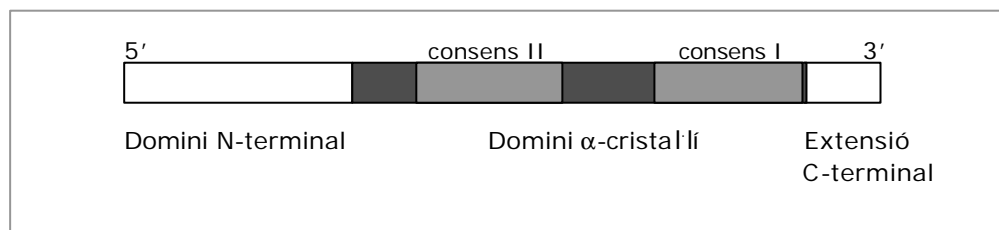


Figura 2. Esquema de l'estructura de les sHsps-CI

Se sap que les sHsps interaccionen amb els substrats desnaturalitzats a través d'interaccions hidrofòbiques (Das *et al.* 1996). El paper del domini α -cristal·lí en l'activitat xaperona ha estat àmpliament estudiat i els residus hidrofòbics exposats d'aquest domini sembla que estan implicats en la unió a proteïnes desnaturalitzades (Trewick *et al.* 2000, Rajaraman *et al.* 2001). Lee *et al.* (1997) van identificar dos possibles llocs d'unió en Hsp18.1 de pèsol mitjançant la unió d'una sonda hidrofòbica. Un d'aquests llocs, el qual podia ser bloquejat per la prèvia unió d'alcohol deshidrogenasa desnaturalitzada, se situa en la regió de consens II i se

superposa amb una regió similar identificada a les α -cristal·lines (Sharma *et al.* 1998). Aquesta seqüència ha estat mapejada a l'estructura cristal·lina de la Hsp16.9

de blat i es localitza a l'esclatxa hidrofòbica que forma el domini α -cristal·lí (van Montfort *et al.* 2001).

1.4. La formació de complexos oligomèrics

Una altra característica que defineix les sHsps és la formació de complexos homo-oligomèrics. Aquests complexos són de 200-300 kDa en plantes (Waters *et al.* 1996) i d'entre 400 i 800 kDa en les α -cristal·lines i sHsps de llevats i mamífer (Groenen *et al.* 1994; Ehrnsperger *et al.* 1999; Kirschner *et al.* 2000). El domini N-terminal de les sHsps sembla ser necessari per l'oligomerització ja que la seva eliminació impedeix la formació de complexos oligomèrics d'elevat pes molecular (Leroux *et al.* 1997b). Per altra banda, la solubilitat i estabilitat de l'oligòmer estaria lligada amb l'extensió C-terminal, la truncació d'un terç de la qual no té cap efecte en l'oligomerització (Smulders *et al.* 1996; Leroux *et al.* 1997b).

La resolució de l'estructura cristal·lina de la Hsp16.9 de blat, la primera sHsp eucariota resolta per cristal·lografia, indica que s'ensambla en un dodecàmer format per dos discos, cadascun d'ells organitzat en un trímer de dímers. En cada disc el domini α -cristal·lí i l'extensió C-terminal són externs, mentre que el domini N-terminal compactaria l'oligòmer i aportaria rigidesa a l'ensamblatge (van Montfort *et al.* 2001). Les dades obtingudes suggereixen que la forma activa d'unió a substrat és el dímer i que l'oligòmer, enlloc d'incloure el substrat al seu interior, actuaria com a forma d'emmagatzematge a temperatura ambient (van Montfort *et al.* 2001). La comparació de Hsp16.9 de blat amb Hsp16.5 de *Methanococcus jannaschii* (Kim *et al.* 1998) mostra que, tot i que l'homologia entre les dues proteïnes és només del 23% i l'estructura quaternària és diferent, els dos dominis α -cristal·lins són similars i utilitzen un dímer semblant com a precursor per l'ensamblatge. De totes maneres, l'oligomerització és necessària però no suficient per l'activitat xaperona de les sHsps (Yeh *et al.* 2002)

1.5. La funció xaperona

Tot i que hi ha abundants treballs que correlacionen la resistència a l'estrès i l'acumulació de sHsps a les plantes (Waters *et al.* 1996 (revisió); Wehmeyer i

Vierling 2000; Crawford i Davies 1994), els mecanismes moleculars de l'activitat d'aquestes sHsps són poc coneguts.

Per diverses sHsps de classe CI ha estat demostrada l'activitat xaperona *in vitro*, és a dir, la capacitat de prevenir l'agregació irreversible de proteïnes desnaturalitzades químicament o per calor i facilitar-ne la renaturalització mitjançant un mecanisme independent d'ATP (Lee *et al.* 1995 i 1997; Collada *et al.* 1997; Lee i Vierling 2000). Per altra banda, també s'han obtingut evidències d'activitat xaperona utilitzant un sistema *in vivo* amb cèl·lules d'*E. coli*. La sobreexpressió de Hsp17.5 de castanyer o de les proteïnes de fusió glutatí S-transferasa/Hsp16.9 d'arròs o H6/TLHS1 de tabac, produeix un augment de la viabilitat en condicions d'estrès tèrmic (Soto *et al.* 1999, Yeh *et al.* 1997 i Joe *et al.* 2000, respectivament). També en cultius de cèl·lules d'*Arabidopsis*, l'expressió transitòria de sHsps prevé la inactivació tèrmica de la luciferasa (Forreiter *et al.* 1997 i Löw *et al.* 2000).

Per altra banda, estudis amb sHsps de *C.elegans* amb truncacions al domini N-terminal, domini essencial per la oligomerització, han mostrat que l'activitat xaperona *in vitro* és únicament possible quan les proteïnes es troben en forma oligomèrica. La truncació d'un terç de l'extensió C-terminal conserva l'activitat xaperona (Leroux *et al.* 1997a; Leroux *et al.* 1997b). Recentment, Yeh i col·laboradors han realitzat diverses truncacions en la sHsp-CI Hsp16.9 d'arròs i han determinat que els aminoàcids 30 a 36 del domini N-terminal i 73 a 78 de la regió de consens II del domini α -cristal·lí són imprescindibles per la interacció amb proteïnes desnaturalitzades i per augmentar la viabilitat de les cèl·lules d'*E. coli* en condicions d'estrès tèrmic.

1.5.1. Les xarxes multixaperona

El paper de les sHsps consisteix en la unió d'intermediaris proteics desplegats per tal de protegir-los d'una agregació irreversible (Narberhaus, 2002). Però, les proteïnes estabilitzades per sHsps no es poden replegar espontàniament sinó que cal una cooperació entre els diferents sistemes de xaperones cel·lulars. Per això, les sHsps treballen integrades en una xarxa multixaperona flexible i sinèrgica que ha evolucionat per tal de mantenir el control de qualitat proteica a la cèl·lula. Veinger i col·laboradors han mostrat que IbpB, una sHsp d'*E. coli*, uneix i estabilitza proteïnes desnaturalitzades que posteriorment són entregades al sistema de xaperones Hsp70 (format per tres proteïnes, DnaK/DnaJ/GrpE (KJE)) on es produeix un replegament dependent d'ATP i, en alguns casos, amb la col·laboració del sistema de xaperonines o Hsp60 (format per GroEL/GroES (LS)), s'assoleix la conformació nadiua (Veinger *et al.* 1998; Fig. 3).

1.5.2. Estabilització de membranes

Encara que el mecanisme que produeix la mort cel·lular per elevades temperatures no es coneix del tot, les membranes es troben entre els elements més sensibles a la

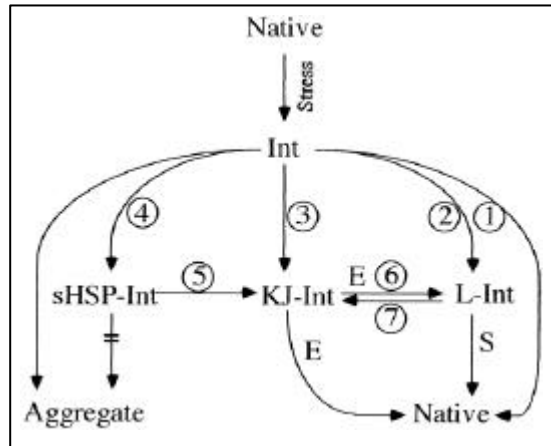


Figura 3. Replegament de proteïnes desnaturalitzades mitjançant una xarxa multixaperona. Un intermediari de plegament desnaturalitzat per estrès (Int) pot formar un agregat si no s'uneix a sHsps, replegar-se espontàniament (1) o preferentment unir-se a: LS (2), KJE (3), sHsps (4), o a diverses xaperones alhora. Les proteïnes unides a xaperones podrien passar directament a l'estat nadiu o, depenent de la proteïna, transferir-se de la sHsp a KJE (5) o, indirectament a LS. La transferència entre KJE i LS pot ser unidireccional o bidireccional depenent de la proteïna desnaturalitzada (6). De Veinger *et al.* 1998.

calor. En cianobacteris l'augment irreversible de la permeabilitat de les membranes que produeixen les elevades temperatures té profundes repercussions en la viabilitat de les cèl·lules (Inoue *et al.* 2000). Török i col·laboradors (2001) han mostrat que, a més de participar en la xarxa multixaperona de plegament proteic, la Hsp17 de *Synechocystis* s'uneix de forma específica i reversible als lípids de les membranes actuant com a factor estabilitzador. Aquesta acció es basaria en contrarestar l'augment de fluidesa que indueix la temperatura unint-se a dominis específics i preservant la integritat funcional i estructural de les membranes.

I.2. L'acumulació de mutacions als àcids nucleics

1. Les mutacions espontànies als àcids nucleics

El DNA és una molècula inestable que es troba constantment sotmesa a estressos genotòxics induïts tant per factors ambientals (radiació ultraviolada, calor, dessecació, productes químics, etc.) com pels productes del metabolisme cel·lular normal (agents oxidants i alquilants). Aquests estressos poden produir diferents danys al DNA, la persistència dels quals pot bloquejar la replicació i transcripció o causar l'aturada del cicle cel·lular i l'entrada en apoptosi (Lindahl i Wood, 1999). Les mutacions puntuals poden ser causades per una modificació química del DNA que canvia directament una base o per un mal funcionament en la reparació del DNA que causa la inserció d'una base incorrecta. Tots els organismes tenen mecanismes protectors que reparen la gran varietat de lesions del DNA i que són necessaris per mantenir la integritat genètica de la cèl·lula. Tot i això, es donen errors espontanis tant al DNA com a l'RNA o la síntesi proteica amb unes taxes, en bacteris, de l'ordre de 10^{-9} , 10^{-5} i 10^{-4} per residu, respectivament (Ninio, 1991).

Els errors en la síntesi de DNA poden produir gens mutants que condueixen a la síntesi de proteïnes alterades. Tot i això, les mutacions que es donen durant la transcripció i la traducció produeixen major nombre i varietat de proteïnes que contenen errors.

El càlcul de les taxes de mutació s'avalua generalment pel guany o pèrdua de funció de gens concrets. Les metodologies emprades són diverses i sovint la comparació de les diferents taxes descrites és difícil. En bacteris, les mutacions espontànies que inactiven la funció gènica es donen a una taxa de 10^{-6} – 10^{-5} vegades per gen i per generació (10^{-9} i 10^{-8} per parell de bases). La taxa de mutació reversa sembla ser unes 10 vegades inferior (Lewin, 1997). En organismes eucariotes la majoria d'estudis es limiten a gens introduïts en plasmidis que posteriorment són recuperats i analitzats. Utilitzant aquest mètode en ratolí i el peix *Brachydanio rerio* es van obtenir unes freqüències de mutació de l'ordre de 10^{-10} - 10^{-9} per parell de bases amb variacions en funció del teixit analitzat (Dycaico *et al.* 1994; Amanuma *et al.* 2000). En plantes s'ha

utilitzat un sistema similar. La introducció d'un plasmidi amb el gen *uidA* (β -glucuronidasa) inactivat per diverses mutacions sense sentit en *Arabidopsis* ha mostrat una freqüència de reversió (*reverse mutations*) espontània d'entre 10^{-8} i 10^{-7} vegades per parell de bases (Kovalchuk *et al.* 2000). La freqüència depèn de la posició del transgen al genoma, de la posició i tipus de codó stop introduït al gen *uidA* i del nivell de transcripció. Per tant, la freqüència de mutació (*forward mutation*) seria de 10^{-7} – 10^{-6} vegades per parell de bases, una freqüència similar a la trobada en *Arabidopsis* per McCallum *et al.* 2000. El fet de trobar una freqüència de mutació superior en *Arabidopsis* es podria explicar pel fet que les plantes són sèssils i no poden evitar l'acció dels factors ambientals. Degut a això, probablement tinguin uns genomes més flexibles. Per altra banda, les mutacions somàtiques en plantes són especialment importants ja que poden convertir-se en mutacions heretables si no es reparen abans de la replicació de la cèl·lula (Stapleton, 1992). Les plantes tenen diversos mecanismes de reparació del DNA, els principals són la fotoreactivació, la reparació per escissió de bases (BER), la reparació per escissió de nucleòtids (NER) i la reparació associada a la transcripció (TCR) (revisats a Vonarx *et al.* 1998). Per tant, no només diferents organismes tenen freqüències de mutació espontània diferents sinó que diferents agents incrementen la freqüència de mutació de manera diferent.

2. Mutacions i estrès oxidatiu

2.1. Les espècies d'oxigen reactives

Entre els agents potencials que danyen els àcids nucleics, les espècies d'oxigen reactives (ROS) tenen una elevada importància biològica (Polle i Rennenberg, 1993).

L'estrès oxidatiu es deu a l'acumulació d'espècies d'oxigen reactives (ROS) dins la cèl·lula (Fig. 4). Les ROS inclouen H_2O_2 , $\cdot O_2^-$, radicals hidroxil ($\cdot OH$) i oxigen singlet, que es formen durant el metabolisme cel·lular normal i que en condicions d'estrès poden veure la seva formació accelerada (Noctor i Foyer, 1998). La formació de $\cdot O_2^-$, que existeix en equilibri amb la seva forma protonada $\cdot O_2H$, requereix energia. A pH fisiològic, $\cdot O_2^-$ és relativament no tòxic vers les macromolècules i en solució aquosa es descomposa en H_2O_2 i $\cdot O_2H$, tan

espontàniament com per l'acció de la superòxid dismutasa. Durant la descomposició de $\cdot\text{O}_2^-$ es forma H_2O_2 , una ROS relativament estable i neutre elèctricament. L' H_2O_2 pot travessar les membranes i arribar a compartiments cel·lulars allunyats del seu lloc de síntesi. L' H_2O_2 pot ser degradada per catalases i peroxidases, però les catalases també en poden produir (Fig. 5) (Wojtaszek, 1997).

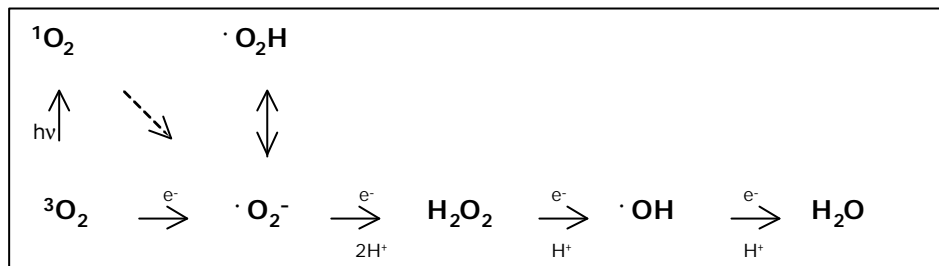


Figura 4. Formació de $\cdot\text{O}_2^-$, H_2O_2 i $\cdot\text{OH}$.

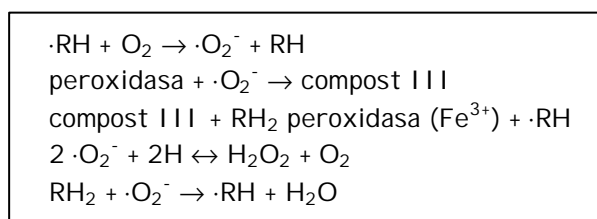


Figura 5. Formació d' H_2O_2 per peroxidases. RH i $\cdot\text{RH}$ representen hidrocarburs orgànics i els respectius radicals.

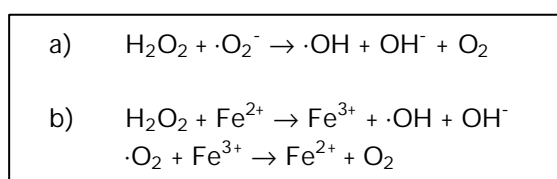


Figura 6. Reacció de Harber-Weiss (a) i reacció de Fenton (b).

L' $\cdot\text{OH}$ que es produeix en la reacció de Harber-Weiss (Fig. 6a) és la ROS més nociva en els teixits de plantes. En condicions normals la reacció de Harber-Weiss es dona molt lentament i es forma poca quantitat de $\cdot\text{OH}$. En la reacció de Fenton, en canvi, l' $\cdot\text{OH}$ es forma en quantitats importants (Fig. 6b) en presència de metalls de transició com el Fe^{2+} i el Cu^+ i la subsegüent reacció amb $\cdot\text{O}_2^-$ (Wojtaszek, 1997).

2.2. L'estrès oxidatiu i l'acumulació de mutacions.

Les ROS oxiden ribonucleòtids (rNTPs) i desoxiribonucleòtids (dNTPs) amb eficiència similar. Tant el *pool* cel·lular de NTPs com l'RNA de cadena senzilla són més susceptibles a la modificació que el DNA de doble cadena (Taddei *et al.* 1997). S'ha observat *in vitro* que els NTPs oxidats són incorporats als àcids nucleics i un cop inclosos a la cadena de DNA són eficientment replicats i transcrits tant *in vitro* com en cèl·lules d'*E. coli* (Viswanathan *et al.* 1999; Bridges, 1999).

Nombrosos treballs mostren que l'estrès oxidatiu augmenta la taxa de mutació. L'estrès oxidatiu pot ser aplicat exogenament mitjançant agents generadors de ROS o bé alterant alguna via relacionada amb la protecció. En bacteris, *oxyR* és un gen que controla un reguló implicat en la defensa enfront l'estrès oxidatiu. En *Salmonella pyphimurium* la seva deleció provoca un augment d'entre 10 i 55 vegades la freqüència de reversió de mutants His⁻ essent el tipus de mutació més freqüent la transversió TA→AT (Storz *et al.* 1987). La mutació TA→AT ha estat descrita com la més freqüentment causada pels oxidants químics (Levin *et al.* 1986). En canvi, la sobreexpressió d'*oxyR* o de gens regulats per *oxyR* (catalasa i hidroperòxid reductasa) en cèl·lules amb el gen *oxyR* deletionat, redueix la freqüència de mutació a nivells semblants als bacteris salvatges (Storz *et al.* 1987).

Per altra banda, una anàlisi detallada del gen *lacI* d' *E. coli* ha mostrat que l'espectre de mutacions espontànies està format per canvis de base, alteracions de la pauta de lectura, delecions, etc (Schaaper *et al.* 1986). L'espectre de mutacions d' *E. coli* sotmesa a radiació UV mostra un predomini de canvis deguts a la formació de dímers de pirimidines (Schaaper *et al.* 1987). El tractament de cèl·lules de mamífer amb H₂O₂ provoca un augment fins a 4 vegades el nombre de mutacions que es produeixen en comparació amb els valors espontanis (Moraes *et al.* 1990) i en *Arabidopsis* aquest augment és fins a 56, 3 i 2 vegades després del tractament amb UV- C, rajos X i MMS, respectivament (Kovalchuk *et al.* 2000).

La Taula 2 mostra un resum de les substitucions nucleotídiques més freqüentment causades per diversos agents oxidants així com les originades de forma espontània. Com s'ha esmentat al principi d'aquest capítol, les mutacions espontànies són presents, en major o menor grau, a totes les cèl·lules a causa

de lesions directes de les bases degut a les ROS endogenes, correccions errònies o errors de les DNA i RNA polimerases.

Espontànies	Radiació g		H ₂ O ₂	O ₂ ⁻	Estress oxidatiu	UV
a	b	c	a	d	e-f	g
CG→TA	CG→TA	CG→TA	CG→TA	CG→TA	TA→AT	CG→TA
CG→AT	TA→GC	AT→GC	GC→CG	CG→AT	CG→AT	
CG→GC	TA→AT	CG→AT	CG→AT	AT→CG	CG→TA	
AT→GC	AT→GC	CG→GC	AT→CG	CG→GC		
AT→TA	CG→GC	TA→AT	TA→AT	AT→GC		
	GC→CG	AT→GC		TA→AT		
cèl·lules mamífer	cèl·lules mamífer	<i>E. coli</i>	cèl·lules mamífer	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella</i>	cèl·lules humanes

Taula 2. Canvis de base observats en l'espectre de mutacions espontànies. Les mutacions estan escrites de dalt a baix en ordre decreixent de freqüència d'aparició. Referències: (a) Moraes *et al.* 1990, (b) Grosovsky *et al.* 1998, (c) Sargentini i Smith 1994, (d) Ono *et al.* 1995, (e) Storz *et al.* 1987, (f) Levin i Ames 1986, (g) Ziegler *et al.* 1994.

També s'ha observat una relació entre l'acumulació de mutacions, l'estress oxidatiu i l'envelliment o senescència. Hi ha nombroses evidències que els danys al DNA i les mutacions augmenten amb l'edat. A més, hi ha estudis que mostren que també hi ha una disminució de la reparació del DNA la qual explicaria, en part, l'augment dels danys al DNA i l'augment de la freqüència de mutació (Walter *et al.* 1997). Michikawa i col·laboradors van observar una gran acumulació de mutacions puntuals a la regió de control de la replicació del DNA mitocondrial humà relacionada amb l'edat. Les mutacions al DNA mitocondrial també han estat relacionades amb malalties degeneratives (Arnheim *et al.* 1992; Ozawa 1995) i, les cèl·lules apoptòtiques presenten una major acumulació de mutacions al DNA que les cèl·lules control (Esteve *et al.* 1999). En neurones postmitòtiques es dona una elevada freqüència de mutacions puntuals que alteren la pauta de lectura, especialment en neurones amb elevada activitat metabòlica. Aquest tipus de mutacions han estat identificades en transcrits de la vasopresina en rates Brattleboro (Evans *et al.* 1994) i també al gen de la β APP i Ubi-B en pacients amb síndrome de Down i Alzheimer (van Leeuwen *et al.* 1998). En conjunt, aquests estudis mostren que les neurones postmitòtiques, cèl·lules que no es divideixen, estarien sotmeses a una elevada freqüència de mutacions somàtiques. S'ha estimat que la freqüència de mutació en el gen de la

vasopresina és de l'ordre de 10^{-6} - 10^{-5} per parell de bases. Una freqüència elevada si es compara amb freqüència d'entre 10^{-10} i 10^{-8} que es dona en les cèl·lules somàtiques (Evans *et al.* 1994).

2.3. Anàlisi de bases oxidades per GC-MS

Les lesions a les bases del DNA induïdes per les ROS han estat àmpliament analitzades mitjançant la cromatografia de gasos lligada a l'espectrometria de masses (GC-MS). La Taula 3 mostra les principals modificacions per oxidació de les bases del DNA. Aquesta tècnica permet una precisa identificació d'un gran nombre bases modificades i la seva precisa quantificació. La tècnica es basa en barrejar el DNA amb marcadors interns, hidrolitzar el DNA per obtenir les bases lliures, derivatitzar-les per fer-les volàtils i finalment separar-les mitjançant una columna (GC). Les bases s'elueixen de la columna a diferents temps en funció de la modificació que hagin patit. Gràcies a la connexió entre la columna i l'espectròmetre de masses (MS) es pot determinar el PM de la base i identificar-la.

Derivats de pirimidines		
TIMINA	Timina glicol	(TG)
	5-(hidroximetil)hidantoïna	(5OHMeHid)
	5-Formil Uracil	(5FormilU)
	5-(OH,Me)Uracil	(5OHMeU)
CITOSINA	Uridina glicol	(UG)
	5-OH Uracil	(5-OHUr)
	5-OH Citosina	(5-OHC)

Derivats de purines		
ADENINA	Fapy Adenina	(FapyA)
	8-OH Adenina	(8OHA)
	2-OH Adenina	(2OHA)
GUANINA	8-OH Guanina	(8OHG)
	Xantina	(Xan)
	Fapy Guanina	(FapyG)

Taula 3. Modificacions de la timina, citosina, adenina i guanina per l'atac de radicals lliures. Nom abreuiat entre parèntesis.

Diversos estudis que han utilitzat aquesta tècnica mostren que en condicions normals, al DNA de les cèl·lules de mamífer s'acumula un gran nombre de bases modificades oxidativament. Aquestes modificacions augmenten amb l'edat, després de l'aplicació d'algun tipus d'estrès oxidatiu com l' H_2O_2 , la radiació

gamma i la UV o la llum fluorescent i en processos cancerosos (Wang *et al.* 1995; Jaruga i Dizdaroglu, 1996; Cooper *et al.* 1997; Lipinski *et al.* 1999). A més, els elements traça i especialment el ferro, tenen gran importància perquè poden servir de catalitzadors de la reacció de Fenton (Dizdaroglu *et al.* 1991b). D'altra banda, cal destacar que diferents tipus de ROS produeixen patrons de bases modificades diferents. El tractament amb H_2O_2 induïx la formació d'un patró de modificacions característiques del radical hidroxil (Dizdaroglu *et al.* 1991a i 1991b, Jaruga i Dizdaroglu, 1996). El tipus de lesions que genera l' H_2O_2 i la inhibició de la seva formació per *scavengers* de radicals hidroxil, suggereix que les lesions provocades per l' H_2O_2 es produeixen a través d'aquest radical (Dizdaroglu *et al.* 1991b).

En plantes, l'única anàlisi per GC-MS realitzada se centra en els nòduls que formen les plantes lleguminoses a les arrels. Aquests nòduls presenten una senescència prematura degut a la producció d' H_2O_2 i altres ROS. Amb l'envelliment dels nòduls s'observa un augment dels peròxids, dels grups carbonil de les proteïnes i de la modificació de les bases del DNA, especialment xantina i hipoxantina (Evans *et al.* 1999).

Enfront l'oxidació de bases del DNA, la primera resposta cel·lular la formen els antioxidants i l'eliminació de les bases modificades per escissió (BER o NER) (Freeman i Crapo, 1982). Jaruga i Dizdaroglu (1996) van estudiar la reparació de lesions al DNA de limfoblasts humans tractats amb H_2O_2 . Després del tractament amb H_2O_2 , les onze bases modificades estudiades havien augmentat però una posterior incubació de les cèl·lules en condicions no oxidants, va retornar els seus nivells a valors control. El Xeroderma pigmentosum és una malaltia humana en la qual es produeix una deficiència en l'eliminació de bases modificades a través de NER. Els pacients presenten una major incidència de càncer de pell degut a l'acumulació de lesions al DNA (Cooper *et al.* 1997; Lipinski *et al.* 1999)

Les conseqüències biològiques d'un número de bases modificades han estat estudiades (Taula 4). Algunes d'elles tenen propietats mutagèniques ja que provoquen aparellaments incorrectes que condueixen a la formació de mutacions. Unes de les substitucions predominants en els espectres de mutacions espontànies i induïdes per estrès oxidatiu són la transició GC→AT i la transversió GC→TA (Fig. 2). Els productes de l'oxidació de la guanina i la citosina semblen els candidats a originar aquests canvis. La 8oxoG (o 8OHGua)

es produeix per oxidació de dGTP i actualment és una de les lesions més ben caracteritzades. És un potent mutagen que s'incorpora al DNA i si no és eliminat s'aparella amb la mateixa freqüència a C que A produint la transversió GC→TA (Wood *et al.* 1990). L'anàlisi més recent de les propietats mutagèniques de lesions derivades de citosina expliquen els canvis GC→AT (Kreutzer i Essigmann, 1998).

BASE	PROPIETATS MUTAGÈNIQUES		
	Bacteris	Mamífers	<i>in vitro</i>
8OHG	G→T	G→T, G→A ^a	G→T, A→C
8OHA	no mutació	A→G, A→C	A→C, A→T
2OHA	A→T, A→G	nd	A→G, A→T, A→C, C→T
5OHC	C→T, C→G	nd	C→T, C→G, A→G
5OHU	C→T	nd	C→T
Ug	C→T	nd	C→T
TG	T→C, aturada replicació	nd	G→A, C→T, aturada replicació
5OHMeU	no mutació	nd	T→C
5FormilU	AT→GC > GC→AT > GC→TA >> AT→TA > AT→CG ^{b,c}	T→G, T→A ^d	T→G, G→A

Taula 4. Propietats mutagèniques de les bases modificades. Actualitzada de Wang *et al.* 1998. ^aKamiya *et al.* 1995; ^bFujikawa *et al.* 1998; ^cAnensen *et al.* 2001; ^dKamiya *et al.* 2002.

3. Les Hsps tamponen mutacions

Alguns organismes augmenten les taxes de mutació en resposta a l'estrès per tal de generar més diversitat genètica (Pennisi, 1998). Moltes de les mutacions que es produeixen a l'atzar tenen conseqüències nefastes per la cèl·lula però en alguns casos poden provocar canvis que afavoreixen l'adaptació de l'organisme. Rutherford i Lindquist al 1998, treballant amb *Drosophila* i Hsp90 van proposar un nou paper per les Hsps: estabilització de proteïnes mutades que poden continuar realitzant la seva funció i permeten als organismes tenir un reservori de mutacions. Aquestes mutacions, però, es manifesten en canvis morfològics importants quan Hsp90 és inhibida o l'organisme està en condicions d'estrès i Hsp90 ha de realitzar la seva funció protectora i deixa d'estabilitzar les proteïnes mutants. Recentment, aquest mateix fet s'ha observat en *Arabidopsis* i s'han obtingut peculiars fenotips (Queitsch *et al.* 2002).

4. La hipermutabilitat dels virus d'RNA

Els virus d'RNA tenen una taxa de mutació de $10^{-5} - 10^{-3}$ per nucleòtid i cicle de replicació, uns quants ordres de magnitud superior a la del DNA cel·lular (Fig. 7). Donades aquestes taxes de mutació tan elevades i la mida dels genomes ($3 \cdot 10^3 - 3 \cdot 10^4$ pb) dels virus d'RNA, aquests esdevenen poblacions heterogènies en només uns quants cicles de replicació. La població de genomes diferents però molt relacionats que resulta, formen el que s'anomena quasiespècies (Martell *et al.* 1992; Meyerhans *et al.* 1989).

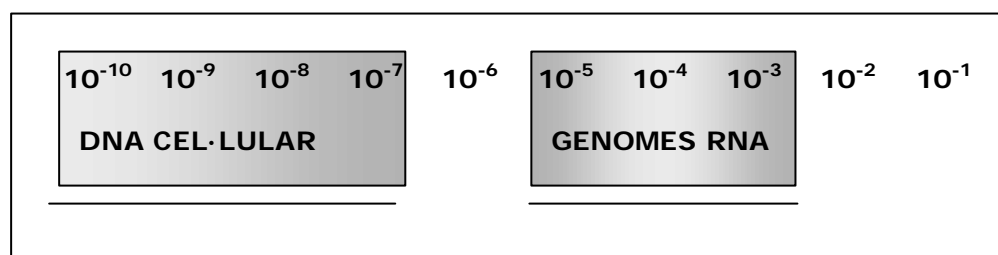


Figura 7. Taxa de mutació del DNA cel·lular i dels genomes dels virus d'RNA (Domingo 1994).

Les quasiespècies es defineixen com un conjunt de seqüències genòmiques estretament relacionades entre si que només difereixen en una o diverses posicions (espectre de mutants), distribuïdes al voltant d'una seqüència majoritària (seqüència principal) (Fig. 8). L'estructura de les quasiespècies aporta informació sobre l'evolució del virus i la resistència als tractaments antivirals.

4.1. Anàlisi de mutacions minoritàries

La composició de les quasiespècies del virus de l'Hepatitis C (HCV) s'ha establert mitjançant clonatge i seqüenciació directa de la regió E2-NS2 del virus però, amb aquest mètode, les seqüències poc representades, minoritàries, són difícils d'obtenir (Cabot *et al.* 2000). El desenvolupament d'un nou mètode basat en la selecció *in vitro*, mitjançant enzims de restricció ha permès aïllar subpoblacions de seqüències mutants del HCV diferents de les més abundants. Aquesta metodologia desenvolupada per Cabot i Gómez (2002), permet clonar seqüències que estiguin fins a 10^5 vegades menys representades que la

seqüència principal. Cal tenir en compte, però, que el nivell de detecció de les seqüències resistents

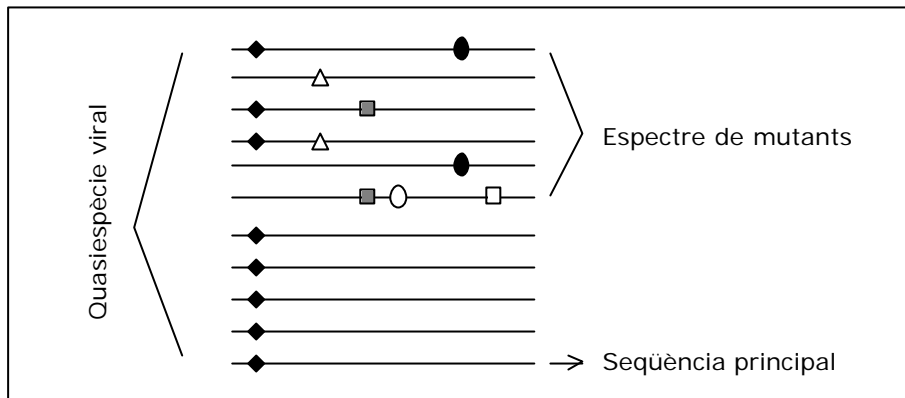


Figura 8. Distribució en quasispècie del genoma dels virus d'RNA.

varia segons el seu predomini en el conjunt de seqüències. Mentre que una seqüència resistent que es troba en una proporció de 1:1 respecte una seqüència no resistent (salvatge) es recupera en el 100% dels clons que s'obtenen al final del protocol, una altra que es troba en una proporció de $1:10^{-5}$, només es detecta en el 7% dels clons.

II. MATERIAL i MÈTODES

II. MATERIAL I MÈTODES

Els materials i mètodes utilitzats es descriuen més específicament en l'apartat corresponent de cadascun dels articles.

1. Material biològic

Les plàntules de surera s'han obtingut a partir de la germinació de glans. Les condicions de creixement han estat 22°C, 70% d'humitat i 16 h de fotoperíode durant aproximadament 1 mes.

Els embrions somàtics constitueixen un sistema de micropropagació molt útil que permet tenir embrions aïllats i en diferents estadis als quals se'ls pot aplicar els mateixos estressos que a les plàntules. S'han obtingut d'una línia embriogènica recurrent mantinguda en medi sense reguladors del creixement i a 25°C i 16 h de fotoperíode (Puigderrajols *et al.* 1996). Per promoure la maduració dels embrions, els que no presentaven signes d'embriogènesi secundària han estat sotmesos a 7 dies de deshidratació parcial a 25°C i de 30 dies a 4°C. Seguidament s'ha continuat el creixement en les mateixes condicions.

2. Estressos de plàntules de surera i embrions

Estrès tèrmic: 30°C, 37°C o 42°C durant 3 h

Estrès osmòtic: 3% o 6% w/v de sacarosa i 2.5%, 5% o 10% (w/v) PEG400 durant 3h

Estrès hídric (deshidratació): sotmetre a un flux d'aire constant (plàntules) o entre dos fulls de paper de filtre secs (embrions).

Estrès uvC: irradiació a 15 cm de la làmpada (312nm, 100 μ W cm⁻²)

Estrès H₂O₂: H₂O₂ al 5% (v/v) durant 5 h (plàntules). H₂O₂ al 0.1%, 0.5%, 1% o 3% durant 3 h (embrions)

Tots els estressos en embrions s'han realitzat a la foscor.

3. Mètodes generals de manipulació d'àcids nucleics i proteïnes

A continuació es presenten tots els mètodes emprats en la realització dels treballs i un breu comentari de cadascun d'ells. Tots ells estan basats en Sambrook *et al.* (1989), Ausbel *et al.* (1994) o seguint les instruccions dels fabricants quan es tractava de kits (Purificació productes de PCR, Purificació de fragments de DNA a partir de gels d'agarosa, minipreparacions de DNA plasmídic, enzims de restricció i modificació del DNA, etc.). Es pot trobar informació més detallada en les corresponents publicacions.

3.1 Anàlisi de proteïnes

3.1.1. Extracció de proteïnes totals

Per tal d'extreure les proteïnes totals s'han utilitzat dos protocols diferents, un per realitzar gels SDS-PAGE d'una sola dimensió i un altre per les mostres que havien de ser analitzades per electroforesi bidimensional. La quantificació s'ha realitzat amb el mètode descrit per Bradford (Bradford 1976).

Extracció per SDS-PAGE

Homogeneïtzar el teixit en N₂ líquid i resuspendre en 56 mM Na₂CO₃, 56 mM DTT, 2% (v/v) SDS, 12% (w/v) sacarosa i 2mM EDTA. Incubar durant 15 min a 70°C, centrifugar 10 min a 10.000 rpm i 4°C i guardar el sobrenedant en alíquotes a –20°C.

Extracció per electroforesi bidimensional

Homogeneïtzar el teixit en N₂ líquid i resuspendre en 9M urea, 2% (v/v) Triton X-100, 130 mM DTT, 2% (v/v) Pharmalyte 3-10 (Amersham Pharmacia Biotech), 2 mM PMSF i 2% (v/v) PVP. Centrifugar 10 min a 10.000 rpm i 4°C i guardar el sobrenedant en alíquotes a –80°C.

* Per tal d'evitar la modificació de les proteïnes (carbamilació) que estan en solucions d'urea, és molt important utilitzar urea d'elevada qualitat o desionitzar-la, evitar successives congelacions-descongelacions de les mostres i guardar-les en alíquotes a –80°C. No escalfar les solucions d'urea a més de 37°C i preparar-les al moment o bé utilitzar alíquotes congelades a –80°C.

Determinació de la concentració de proteïna

Per quantificar els extractes s'ha utilitzat el mètode de Bradford (Bradford, 1976).

3.1.2. L'electroforesi

L'electroforesi és la separació de molècules basada en la seva mobilitat en un camp elèctric. L' SDS-PAGE separa les proteïnes en funció del seu pes molecular i l'isoelectroenfoc les separa segons el seu punt isoelectríic. L'electroforesi bidimensional es basa en la combinació d'aquestes dues tècniques i permet una elevada resolució.

SDS-PAGE

Les SDS-PAGE dels gels d'una dimensió s'han realitzat amb el sistema Mini-Protean II (BioRad) utilitzant gels separadors del 12-15% d'acrilamida i gels apiladors del 3% d'acrilamida.

Electroforesis bidimensionals

Per les electroforesis 2D s'ha utilitzat l'equipament Multiphor II (Pharmacia Biotech) i gels preparats per la mateixa casa comercial. El protocol utilitzat és el recomanat pel fabricant amb algunes modificacions. Requereix 2-3 dies i consta d'una rehidratació dels gels de primera dimensió, isoelectroenfoc (1a dimensió) i SDS-PAGE (2a dimensió).

- Rehidratació

En la primera dimensió o isoelectroenfoc s'utilitzen els gels *Immobiline DryStrips pH 3-10L* (11 cm) (Amersham Pharmacia Biotech). Aquests gels, abans de ser utilitzats, s'han de rehidratar amb 750 µl de tampó durant un mínim 6 hores. Tampó de rehidratació: 8M urea, 0.5 % (v/v) Triton X-100, 13 mM DTT, 4mM àcid acètic, 0.5 % (v/v) *Pharmalyte 3-10* (AmershamPharmaciaBiotech).

- Primera dimensió: isoelectroenfoc

Un cop rehidratats els gels es procedeix a l'isoelectroenfoc. Per la càrrega de les mostres s'han utilitzat *sample cups*, tots ells d'Amersham Pharmacia Biotech.

Tampó de mostres: 9M urea, 0.5 % (v/v) Triton X-100, 65 mM DTT, 2 % (v/v) *Pharmalyte 3-10*.

1. Posar 3-4 ml de querosè sobre la placa refrigeradora a 20°C i posar-hi la safata a sobre.
2. Posar dins la safata 10 ml d'oli de parafina i posar-hi l'alineador de gels.
3. Mullar dues tires de paper secant (*IEF electrode strips*) amb aigua i una amb DTT 0.13 M. Eixugar molt bé l'excés pressionant suaument amb paper humit.
4. Posar els gels rehidratats a l'alineador amb el costat punxegut a l'ànode. Se'n poden córrer un màxim de 12 hores.

5. Posar els papers molls amb aigua sobre els extrems (ànode i càtode) dels gels i posar els corresponents elèctrodes a sobre. Posar la tira de paper molla amb DTT sobre la part catòdica dels gels, a 1 cm de l'elèctrode.
6. Col·locar a l'ànode (si la mostra té SDS o les proteïnes d'interès són àcídiques, carregar al càtode) i carregar la mostra. Les *sample cups* permeten carregar fins a 100 µl de mostra o volums més grans si es carreguen en dues vegades. Les mostres es dilueixen 1/3 – 1/2 en tampó de mostres.
7. Cobrir els gels i *sample cups* amb querosè per evitar evaporació.
8. Iniciar el programa (mode gradient) i deixar córrer tota la nit:

Fase	Voltatge	mA	W	Temps (h)	Vh
1	300	1	5	0.01	1
2	300	1	5	4.5	1350
3	2000	1	5	5	5750
4	2000	1	5	6.5	13000
total				16	20100

9. Un cop finalitzat el programa eliminar l'excés de querosè amb paper humit i procedir a la segona dimensió o guardar els gels a – 80°C.

- Segona dimensió: SDS-PAGE (15°C).

En la segona dimensió o SDS-PAGE s'utilitzen gels *ExcelGel SDS gradient 8-18%* i els tampons *ExcelGel SDS buffer strips* (Amersham Pharmacia Biotech). Els gels de segona dimensió permeten córrer dos isoelectroenfocs.

Tris stock solution: Tris 0.5 M pH 6.8

Tampó d'equilibració (preparar-ne 28ml): 6M urea, 30% (v/v) glicerol, 1% (w/v) SDS, 10% (v/v) Tris stock solution.

1. Incubar dos gels d'isoelectroenfoc 15 min amb 14 ml de solució d'equilibració a la qual s'ha afegit 300 µl DTT 1M en una placa de Petri petita.
2. Fer una segona incubació de 15 min amb 14ml de solució d'equilibració a la qual s'ha afegit 168mg de iodoacetamida.
3. Posar les tires de gel de cantó sobre un paper humit per eliminar excés de solució d'equilibració com a mínim durant 3 min.
4. Posar 3 ml de querosè a la placa refrigerant a 15 °C i posar-hi el gel a sobre.
5. Col·locar a l'ànode del gel l'*anodic SDS buffer strip* i el *catòdic SDS buffer strip al càtode*. Aquestes tires de gel contenen tot el tampó necessari per l'electroforesi.
6. Paral·lelament al *catòdic SDS buffer strip* i a 1 mm de separació, col·locar els dos gels amb els paperets aplicadors a les puntes.
7. Passar unes pinces per sobre les tires de gel per eliminar possibles bombolles d'aire entre els dos gels que impedirien la transferència de les proteïnes.
8. Posar la tapa i engegar el programa (mode step).

Fase	Voltatge	mA	W	Temps (min)
1	600	20	30	20
2	600	50	30	5
3	600	50	30	70
total				95

- Quan el blau de bromofenol hagi corregut 4 - 6 mm treure els gels i els paperets aplicadors, deixar avançar el front uns 2 mm més i moure el *catodic SDS buffer strip*, col.locant-lo a sobre d'on eren els gels.
- Finalitzat el programa es procedeix a l'electrotransferència i immunomarcatge.

Tinció amb blau de Coomassie

Aquesta tècnica permet fixar i tenyir les proteïnes separades en un SDS-PAGE. Després de l' SDS-PAGE els gels es fixen amb 50% metanol – 7% àcid acètic durant 20 min, es tenyeix amb blau de Coomassie al 0.2% en àcid acètic, metanol i aigua (1:4:4) durant 10 min i finalment es retira l'excés de colorant amb àcid acètic al 7%.

3.1.3. El Western blot

Electrotransferència

En el Western blot, les proteïnes són transferides del gel de SDS-PAGE a una membrana de PVDF (Millipore) per tal de facilitar la seva manipulació i caracterització. Per la immunodetecció de sHsps-CI la transferència s'ha realitzat a un voltatge constant de 100 V durant 1.5 h per als gels unidimensionals i a 30 V durant tota la nit per als gels bidimensionals utilitzant Mini trans-Blot cell i Trans-Blot cell, respectivament (BioRad).

Tampó de transferència: 23 mM glicerina, 25 mM Tris, 15% metanol.

- Equilibrar els gels incubant 15-20 min en tampó d'electrotransferència.
- Preparar les membranes: activar durant 1-2 segons amb metanol 100%, incubar amb aigua durant 5 min i 10-15 min amb tampó de transferència.
- Muntar el sistema de transferència. Realitzar la transferència en fred.
- Finalitzada la transferència s'inicia l'immunomarcatge de la membrana.

Detecció de proteïnes transferides a membranes de PVDF

La detecció de QsHsp17.4-CI i, degut a la seva elevada homologia, d'altres sHsps de classe I de surera, s'ha realitzat amb anticòs policlonal de conill anti-QsHsp17.4-CI recombinant.

Tampó Tris/NaCl/Tween: 10 mM Tris pH 7.5, 100mM NaCl, 0.05% Tween-20

- Bloquejar la membrana amb tampó Tris/NaCl/Tween més 10% de llet desnatada en pols (tampó de bloqueig) com a mínim 2 h.
- Incubar la membrana durant 1 h a temperatura ambient amb anticòs anti-QsHsp17.4-CI diluït 1:4000 en tampó de bloqueig.

3. Rentar 4 cops la membrana amb tampó Tris/NaCl/Tween durant 8 min.
4. Incubar la membrana durant 1 hora a temperatura ambient amb GAR-Po (*Goat anti-rabbit IgG peroxidase conjugated*, Nordic Immunology) diluït 1:4000 en tampó de bloqueig.
5. Rentar 4 cops la membrana amb tampó Tris/NaCl/Tween durant 8 min.
6. Revelar la membrana utilitzant un mètode quimioluminiscent (BM Chemiluminescence Western Blotting Substrate (Boehringer Mannheim) o SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce) seguint les instruccions del fabricant. Les exposicions s'han fet amb film d'autoradiografia Hyperfilm MP (Amersham Pharmacia Biotech) durant 30 s – 30 min segons la intensitat de la senyal.

3.2 Anàlisi d'RNA

En el treball amb RNA el principal problema és la degradació per RNases, uns enzims molt estables i difícils d'eliminar, resistents a l'autoclau, que solen trobar-se a tots els teixits. Treballarem sempre amb guants i utilitzarem material lliure d'RNases. El millor sistema per eliminar les RNases és fornejar el material durant 6 hores a 200°C. El material que no resisteix el forn es pot rentar amb sabó, esbandir primer amb aigua i després amb etanol, tractar amb una solució d'H₂O₂ al 2% durant un mínim de 10 min i esbandir amb aigua DEPC.

Per les solucions, destinar un grup de reactius només per utilitzar per RNA. No fer servir espàtules ni posar objectes dins els pots. Usar aigua ultrapura i autoclavada. També es poden tractar totes les solucions que ho resisteixin (que no continguin grups amino) amb DEPC 0.2% final. Eliminar-lo autoclavant la solució.

3.2.1. Extracció d'RNA total

MÈTODE 1. És el que s'ha utilitzat en els articles 2, 3 i 4 és una modificació del mètode descrit per Varadarajan *et al.* (1991).

1. Triturar amb morter i nitrogen líquid 1 g de teixit.
2. Posar 10 ml d'*isolation buffer* (100mM Tris-Cl pH 7.4, 50 mM EDTA pH 8, 500 mM NaCl) en un tub Corex 30 i afegir l'homogeneïtzat.
3. Agitar i afegir IMMEDIATAMENT 140 µl de β-mercaptoetanol (evita l'oxidació de polifenols) i 1ml SDS 20%
4. Agitar exhaustivament i incubar 15 min a 65°C.
5. Per eliminar les proteïnes afegir 3.3 ml d'acetat potàssic 5M i agitar vigorosament.
6. Incubar durant 10 min a -20°C (o 30 min a 0°C) (temps han de ser exactes sinó comencen a precipitar els àcids nucleics).
7. Centrifugar durant 30-50 min a 10000rpm (4°C).
8. Recuperar el sobrenedant i afegir 7 ml d'isopropanol fred. Agitar per inversió.
9. Incubar a -20°C durant 1 h.

10. Centrifugar a 10000 rpm durant 45 min i descartar el sobrenedant.
11. Assecar el *sediment* com a màxim 15 min amb el Corex invertit.
12. Resuspendre amb 700 µl TE-1 i passar a tubs Eppendorf de 1.5 ml.
13. Centrifugar durant 10 min a 10000 rpm i passar el sobrenedant a un tub nou.
14. Precipitar amb 75µl de 3M AcONa pH 5.2 (1/10V) i 500 µl isopropanol (0.7V) deixant tota la nit a -20°C (com més temps millor serà el rendiment).
15. Centrifugar entre 1 i 10 min a 14000 rpm.
16. Rentar el *sediment* amb 1ml d'etanol 80%. Assecar i resuspendre amb aigua DEPC (100-200 µl).
17. Incubar 2-3 min a 65°C, centrifugar durant 10 min i recuperar el sobrenedant.
18. Guardar a -80°C.

MÈTODE 2. Aquest mètode s'ha utilitzat per extreure RNA per realitzar Northern blots. És un mètode descrit l'extracció d'RNA d'Arabidopsis però que també s'ha utilitzat satisfactòriament en surera.

Tampó d'extracció d'RNA: 0.2M Tris-HCl (pH 8.8), 0.4M LiCl₂, 25mM EDTA (pH 8.0), 1% SDS.

1. Homogenitzar el material amb N₂ líquid fins obtenir una fina pols. Omplir 1/3 d'un eppendorf amb la pols i afegir 700 µl de tampó d'extracció. Evitar que el teixit es descongeli abans d'afegir el tampó. Barrejar bé.
2. Afegir 1V de fenol:cloroform: alcohol isoamílic (25:24:1). Barrejar bé.
3. Centrifugar 3 min a 14000 rpm i 4°C.
4. Agafar la fase superior i mesurar el volum.
5. Afegir 1V de cloroform:alcohol isoamílic (24:1). Barrejar bé.
6. Centrifugar 2 min a 14000 rpm i 4°C.
7. Agafar la fase superior i mesurar el volum.
8. Afegir ¼ de volum de 10M LiCl₂. Barrejar suaument. Incubar en gel durant 1 h.
9. Centrifugar a 14000 rpm i 4°C durant 15-20 min.
10. Llençar el sobrenedant i resuspendre el pellet en 100 µl d'aigua
11. Precipitar amb 1/10 volum d'acetat sòdic 3M i 2.5 volums d'etanol absolut fred. Incubar almenys 1 h a -20°C o 30 min a -80°C.
12. Centrifugar 30 min a 14000 rpm i 4°C.
13. Eliminar totalment el sobrenedant. Afegir 500µl d'etanol fred al 75% i treure'l aspirant amb una pipeta. No vortexar.
14. Deixar els tubs amb el tap obert i en gel almenys 30 min.
15. Dissoldre el pellet amb 30-50µl d'aigua.

MÈTODE 3. Extracció d'RNA amb TRIzol. Aquest mètode permet obtenir gran quantitat d'RNA. S'ha utilitzat per l'anàlisi amb *microarrays*.

1. Homogenitzar 1g de material amb N₂ líquid fins obtenir una pols. Transferir a un tub de centrifuga de 50 ml amb tap i afegir 15 ml de TRIzol *reagent* (Invitrogen).

2. Incubar a 60 °C durant 5 min.
3. Centrifugar 10 min a 11000 rpm i 4°C.
4. Decantar el sobrenedant a un altre tub i afegir 3 ml de cloroform.
5. Barrejar vigorosament durant 15 s i deixar 2-3 min a temperatura ambient.
6. Centrifugar 15 min a 10000 rpm i 4°C.
7. Agafar 7 ml de la fase superior i precipitar l'RNA afegint 3.5 ml d'isopropanol i 3.5 ml de NaCl 1.2M. Barrejar per inversió.
8. Incubar a temperatura ambient 10 min.
9. Centrifugar 10 min a 10000 rpm i 4°C i eliminar el sobrenedant per decantació.
10. Rentar el pellet amb 20 ml d'etanol 75%. Vortexar 3 min.
11. Centrifugar 10 min a 10000 rpm i 4°C. Decantar el sobrenedant i assecar el pellet amb el tub cap per avall un màxim de 10 min.
12. Resuspendre amb 250 µl d'aigua i afegir 1µl d'inhibidor d'RNases (aseERASE). Si no es resuspèn bé incubar 10 min a 55-60 °C.
13. Transferir a un eppendorf i centrifugar a màxima velocitat 5 min a temperatura ambient.
14. Transferir a un nou tub.

MÈTODE 4. L'extracció d'RNA mitjançant *UltraClean Plant Total RNA isolation kit* (MoBio Laboratories) és un sistema ràpid que permet obtenir petites quantitats d'RNA de bona qualitat que s'han utilitzat per RT-PCR.

3.2.2. Purificació d'RNA poli(A)+

L'obtenció de la fracció d'RNA poliadenilada (RNA poli(A)+) s'ha realitzat amb el sistema PolyA Track IV (Promega) o GenoPrep mRNA Beads (Genovision). Aquests sistemes utilitzen l'encebador oligo d(T) biotinitat per hibridar amb la cua poliA de l'mRNA. Els híbrids són capturats i rentats en condicions d'elevada astringència mitjançant un suport magnètic, utilitzant estreptavidina unida a partícules paramagnètiques. L'mRNA és eluït de la fase sòlida amb aigua. Es van seguir les instruccions dels fabricants.

3.2.3. Síntesi de cDNA: transcripció reversa

La transcripció reversa (RT) s'ha utilitzat per generar cDNA a partir d'RNA poli(A)+ utilitzant la M-MLV RT (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase). Com a encebador s'ha utilitzat oligo d(T) o un oligonucleòtid específic de QsHsp17.4-Cl. En el primer cas es retrotranscriuen tots els RNAs poli(A)+, en el segon, la retrotranscripció és específica de les seqüències que hibridin amb l'oligonucleòtid encebador.

La RT es pot combinar amb una subsegüent amplificació per PCR (apartat 3.3.3) del cDNA que permet la detecció i amplificació d'RNA mitjançant PCR.

3.2.4. Transferència d'RNA a membrana: Northern blot

Aquesta tècnica es basa en la transferència per capilaritat de fragments d'RNA separats en gels d'agarosa a una membrana. Un cop transferit l'RNA és immobilitzat a la membrana mitjançant llum UV.

Barreja desnaturalitzant de glioxal (500 µl DMSO, 220 µl glioxal desnaturalitzat al 30%, 20 µl tampó fosfat 50x)

Tampó de càrrega (2.5 mg Xilen cianol, 2.5 mg Blau de bromofenol, 20 µl 50x tampó fosfat, 980 µl aigua)

50x tampó fosfat pH 6.8 (500 ml 0.5M Na₂HPO₄ i 500 ml 0.5M NaH₂PO₄ i autoclavar)

1. Afegir 30 µl de barreja desnaturalitzant de glioxal a 10 µg d'RNA en 10 µl d'aigua.
2. Incubar 60 min a 50 °C.
3. Afegir 1 µl de tampó de càrrega just abans de carregar el gel.
4. Durant la incubació de les mostres preparar un gel d'agarosa a l'1.2% en 1x tampó fosfat.
5. Carregar les mostres i córrer el gel en 1x tampó fosfat a 100V.
6. Muntar la transferència de la manera següent (tallar els papers de 20x20 cm):

1.5 Kg

vidre

5 – 6 cm de paper de diari

10 fulls de paper 3MM sec

2 fulls de 3MM molls amb 6xSSC

membrana (Hybond N, Amersham)

gel (de cap per avall i amb les butxaques allisades)

2 fulls de 3MM molls amb 6xSSC

vidre

7. Comprovar que el pes estigui ben centrat i deixar que es transfereixi per capilaritat durant tota la nit a la campana.
8. Posar la membrana a un paper de filtre i *cross-linkar* l'RNA a la membrana amb llum UV (10 s en el transiluminador o 1200 µJ/cm²)
9. Posar la membrana 2 h a 80 °C per eliminar el glioxal.
10. Esbandir la membrana amb àcid acètic al 5% i tenyir amb Blau de metilè al 0.04% en acetat sòdic 0.5M, destenyir amb aigua, embolicar amb plàstic i fer una fotocòpia o escanear.
11. La membrana es pot guardar o començar la hibridació.

3.2.5. Hibridació i marcatge d'àcids nucleics

Es basa en l'aparellament que es dona entre dues molècules d'àcid nucleic de cadena senzilla i seqüència complementària. La utilització de sondes de DNA

marcades radioactivament permet detectar fragments d'RNA de seqüència idèntica o homòloga. El marcatge de les sondes s'ha realitzat per *Random Priming*.

50x Denhardt's (1% Ficoll, 1% PVP, 1% BSA)

Solució de prehibridació (6x SSC, 5x Denhardt's, 0.5% SDS)

Solució de rentat (2x SSC, 0.1% SDS o 1x SSC, 0.1% SDS)

1. Posar la membrana en el cilindre d'hibridació i afegir 15 ml de solució d'hibridació i 100 µl de DNA d'esperma d'arengada 10 mg/ml desnaturalitzat.
2. Prehibridar com a mínim 1 h a 65 °C.
3. Desnaturalitzar la sonda que durant la prehibridació ha estat marcada amb *Rediprime labeling kit* i ³²P-dCTP (ambdós d'Amersham Pharmacia Biotech) seguint les instruccions del fabricant.
4. Afegir la sonda a la solució de prehibridació i hibridar durant tota la nit amb rotació constant dels cilindres i 65-68°C.
5. Descartar la solució d'hibridació i rentar la membrana amb 2xSSC, 0.1% SDS 5 min a 65 °C. Repetir les vegades que sigui necessari. Per eliminar més radioactivitat augmentar la temperatura i/o disminuir la concentració de SSC i SDS.
6. Embolicar la membrana amb plàstic i exposar a un film de rajos X en una pantalla intensificadora i a -80 °C des de diverses hores a diversos dies. No deixar que la membrana s'assequi si es vol hibridar amb una altra sonda. Per deshibridar cal rentar amb 0.1 % SDS, 0.1 x SSC a 80 °C durant 30 min.

3.3 Anàlisi de DNA

3.3.1. Extracció de DNA

Miniextraccions de DNA genòmic

Les miniextraccions de DNA s'han realitzat amb el mètode del CTAB amb l'addició del 2% de PVP al tampó d'extracció per tal d'eliminar els fenols. El DNA és posteriorment passat per una columna de purificació de productes de PCR.

Extracció de DNA a gran escala

Per obtenir grans quantitats de DNA de bona qualitat s'ha utilitzat un kit d'extracció de DNA genòmic de plantes (Macherey-Nagel) El mètode es basa en el del CTAB seguit d'una purificació per columna de sílica i permet obtenir uns 150-200 µg de DNA a partir de 2 g de teixit jove de surera.

La quantificació del DNA s'ha realitzat per espectrometria i en gels d'agarosa tenyits amb bromur d'etidi.

3.3.2. Reacció en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacció en cadena de la polimerasa (PCR) permet una amplificació exponencial de fragments de DNA a partir de quantitats inicials molt petites basant-se en cicles de

desnaturalització, unió dels encebadors i síntesi de DNA dirigida per una DNA polimerasa resistent a elevades temperatures.

Les condicions habituals usades han estat les següents:

DNA	10- 100 ng
Tampó de la polimerasa	1x
dNTPs	150 mM cadascun
MgCl ₂	2.1 mM
oligonucleòtids	23 pmol de cadascun
DNA polimerasa	1 u
H ₂ O	fins a V final de 100 µl

El programa utilitzat habitualment ha estat el següent:

1 cicle:	30 s, 95 °C (desnaturalització)
30 cicles:	30 s, 95 °C (desnaturalització)
	45 s, x °C (la temperatura d'anellament depèn de la Tm dels oligonucleòtids, sol ser uns 5 graus per sota)
	1 min, 72 °C (extensió, a l'últim cicle s'allarga a 10 min)

Els oligonucleòtids utilitzats han estat:

Qshsp17.4	ATGGCGCTCAGTCTTTTCGGTGGCCGAAGAA GCAACGTGTTCGACCCCTTC TCACCTGGACATCTGGGACCC	—————HS3—————→
Qshsp10	-----TCGCTCGACGTGTGGGACCC	
		* * * * *
Qshsp17.4	ATTGAGGGCTTCAGTGCTGTAGCCAG-GTTCCCTCCCTCGGCTCGTGAACCACAGCTTTTGCTACAGCA	←—————HSb1—————
Qshsp10	ATTCGAGGGCTTCC CACCACTATCCTCTCACTCCAA CTTCCCCTC-CGAAACGTGTCATTCGCCGCCGCT	—————HSb2—————→
		* * * * *
Qshsp17.4	CGCATTGATTGGAAGGAAACCCAGAGGCACATATTTTCAAGGCTGATCTCCAGGTCTGAAGAAGGAGGA	
Qshsp10	AAACTGGACTGGAAGGAAACCCAAACGCACACGTGTTT---GCCGACGTGCCTGGGCAAAGAAAGAGGA	
		* * * * *
Qshsp17.4	AGTGAAAGTTGAGTTGAGGATGTAATGTGTTGCAAATAAGTGGGGAGAGGAGCAAAGACACGAGGAAA	
Qshsp10	AGTGAAGTTGAGATCGAGGATCGTCGGTCTCCAGATAAAGTGGGGAGAGGAGTCAAGACTAGGAAGAGA	
		* * * * *
Qshsp17.4	AGAATGATAAGTGGCACAGGGTTGAGAGGAGCTGTGGCAAGTTTATGAGGAGGTTTAGGTTGCCAGAGAAT	←—————HSb3—————
Qshsp10	AGAGTGACACGTGGCACCCTGGAGCGGAG CAGCAGAAGGTTCTCGAGGAG TTTCAGGCTGTCCGAGAAC	
		* * * * *
Qshsp17.4	GCGAAGGTGGATCAGGTGAAGGCTAAT TGGAGAATGGAGTGCTCACT GTGATGGTGCCTAAGGAAGAGCA	←—————HS4—————
Qshsp10	ACGAAGGTGAGGAAAGTCAAGGCTACT-----	
		* * * * *

3.3.3. TAIL-PCR

La TAIL-PCR (Thermal asymmetric intercalated - PCR) permet amplificar fragments de DNA adjacents a seqüències conegudes intercalant cicles d'amplificació a elevades i baixes temperatures i mitjançant la combinació d'oligonucleòtids específics i degenerats (Liu i Whittier, 1995).

Els oligonucleòtids específics del gen *Qshsp10-CI* utilitzats han estat Hsb3 i Hsb1. Com a oligonucleòtids no específics se n'han utilitzat dos de diferents de forma independent, AD2: NGTCGA(GC)(AT)GANA(AT)GAA i AD3: (AT)GTGNAG(AT)ANCANAGA.

Les condicions de la primera reacció de PCR han estat: tampó de la polimerasa 1X, MgCl₂ 2,5 mM, dNTPs 0,25 µM cadascun, oligonucleòtid HSB1 0,3 µM, oligonucleòtid AD 5 µM, DNA polimerasa (BioLine) 0,8 u/ml, 500 ng - 50 ng de DNA motlle. S'ha realitzat una amplificació utilitzant el programa TAIL1.

Programa TAIL1: 95 °C 2 min, 68 °C 6 min + 5 cicles (95 °C 30 s, 68 °C 6 min) + 94 °C 15 s, 45 °C 3 min, 68 °C 6 min + 5 cicles (94 °C 15 s, 45 °C 30 s, 68 °C 6 min) + 12 cicles (94 °C 15 s, 68 °C 7 min, 94 °C 15 s, 68 °C 7 min, 94 °C 15 s, 45 °C 30 s, 68 °C 7 min)

Després de la primera amplificació, la mostra es dilueix 50 vegades i se n'utilitza 1 µl com a motlle per la segona reacció de PCR. La segona reacció de PCR es realitza en tampó de la polimerasa 1X, MgCl₂ 2,5 mM, dNTPs 0,25 µM cadascun, oligonucleòtid HSB2 0,2 µM, oligonucleòtid AD 2 µM, DNA polimerasa (BioLine) 0,8 u/ml. L'amplificació es realitza amb el programa TAIL2.

Programa TAIL2: 94 °C 30 s + 15 cicles (94 °C 15 s, 68 °C 7 min, 94 °C 15 s, 68 °C 7 min, 94 °C 15 s, 45 °C 30 s, 68 °C 7 min)

*a més de 68°C també s'han realitzat, en ambdós programes, proves a altres temperatures.

En aquest punt s'ha d'obtenir una banda en un gel d'agarosa que pot ser retallada, clonada a un vector i sequenciada.

3.3.4. Clonatge de seqüències de DNA

Vectors i soques emprades

Els vectors (plasmidis i bacteriòfags) i les corresponents soques d'*E. coli* utilitzades han estat les següents:

pET29a - *E. coli* BL21(DE3)

pBluescript (SK-) - *E. coli* DH5α

Bacteriòfag λgt11 - *E. coli* Y1090r-

Preparació del DNA a inserir

El DNA a clonar ha estat digerit amb el o els enzims de restricció adequats. S'han utilitzat enzims de restricció de Roche, Fermentas i New England Biolabs utilitzant les condicions recomanades pel fabricant i un volum que no superi el 10% del volum total de la reacció.

Els extrems roms s'han generat amb la *Bacteriophage T4 DNA polymerase*.

Per la purificació de fragments de DNA a partir de gels d'agarosa s'han utilitzat kits comercials.

Lligació

La T4 DNA lligasa uneix covalentment fragments de DNA d'extrem roms o cohesius que tinguin l'extrem 5' fosforilat. Per evitar la recircularització del plasmidi si aquest està digerit amb un únic enzim de restricció és recomanable desfosforilar-lo prèviament (Fosfatasa alcalina, CIP). La relació molar entre quantitat d'insert i de plasmidi que s'ha utilitzat ha estat d'entre 10:1 i 3:1. En les reaccions de lligació insert-plasmidi s'ha utilitzat un màxim del 10% de lligasa i fins a un 20% en el cas de lligació amb braços de fag λ gt11. El temps d'incubació ha estat d'entre 3 hores i tota la nit a la nevera.

3.3.5. Transformació d'*E. coli* per xoc tèrmic

La transformació d'*E. coli* amb vectors plasmídics permet mantenir i amplificar fragments de DNA forans. Per introduir el vector al bacteri, aquest ha de ser competent, és a dir, ha de tenir la paret cel·lular modificada de manera que el plasmidi pugui penetrar a l'interior de la cèl·lula. Les cèl·lules competents s'han obtingut pel mètode d'incubació amb clorur de calci descrit per Seidman (1977).

1. Afegir a l'alíquota de cèl·lules competents (50 μ l) una part de la lligació i barrejar suaument.
2. Mantenir 30 min en gel perquè el DNA s'adhereixi a les cèl·lules.
3. Incubar 90 s a 42 °C, el xoc tèrmic provoca l'entrada del DNA a les cèl·lules.
4. Incubar 2 min en gel
5. Afegir 250 μ l de medi SOB i incubar 1 h a 37 °C amb agitació.
6. Plaquejar en plaques que continguin l'antibiòtic al qual el plasmidi confereix resistència

3.3.6. Empaquetament, titulació i purificació del fag λ gt11**Empaquetament del DNA i titulació**

Un cop inserit el fragment de DNA en el genoma de λ gt11 s'ha procedit a l'empaquetament del DNA recombinant amb les proteïnes de la càpside del fag utilitzant el *Ready to go lambda packaging kit* (Amersahm Pharmacia Biotech). Un cop empaquetat el DNA ja es disposa del lisat amb el qual s'infecten cèl·lules d'*E. coli* Y1090r- preparades específicament.

- Preparació de les cèl·lules:

1. Fer créixer una colònia *E. coli* Y1090r- en LB + 0.2% maltosa + 10mM MgSO₄ fins A₆₀₀=1.
2. Centrifugar 5 ml de cultiu a 4000g durant 10 min.
3. Resuspendre el sediment en 10mM MgSO₄ fins A₆₀₀=2.
4. Guardar les cèl·lules a 4°C com a màxim una setmana.

Abans de plaquejar tot el lisat aquest es titula per tal de després poder plaquejar les pfu (*plate forming units*) per placa desitjades. El fag λ gt11 permet determinar,

mitjançant l'addició d'IPTG i X-Gal, la proporció de fags que s'han relligat sense incorporar el DNA insert, en aquest cas les calbes de lisi seran de color blau.

Un cop determinat el títol del lisat, es plaqueja a una densitat d'unes 50-200 pfu/placa si es volen recollir les pfu independentment o de forma confluent si es vol purificar el DNA de fag

- Titulació:

1. Diluir el lisat en medi SM (fer dilucions entre 10^{-2} i 10^{-5}).
2. Barrejar 100 μ l de lisat diluït amb 100 μ l de cèl·lules *E. coli* Y1090r- preparades (usar tubs, no eppendorfs)
3. Deixar 20 min a RT.
4. Afegir 1.5 μ l IPTG 1M + 50 μ l Xgal 20 mg/ml (no tirar directament sobre les cèl·lules perquè és tòxic).
5. Afegir 3 ml de top-agarosa a 48°C.
6. Tirar a una placa d'LB temperada i escampar bé fent moviments circulars.
7. Deixar tota la nit a 37°C.

- Recollida de pfus individualment:

1. Picant amb una pipeta Pasteur les pfu que no siguin blaves i posar-les en eppendorfs amb 300 μ l de medi SM + 10 μ l cloroform.
2. Guardar indefinidament a 4°C.

Purificació de DNA de fag lambda

- Preparació del lisat

1. Infectar cèl·lules d'*E. coli* amb el lisat a una densitat màxima de 50.000 pfu/placa.
2. Al dia següent afegir 2 ml de medi SM a cada placa, recollir la top-agarosa, posar-la a un tub i deixar-ho 1 h a temperatura ambient agitant de tant en tant.
3. Centrifugar 10 min a 10.000g i 4 °C.
4. Guardar el sobrenedant amb 0.3% de cloroform a 4°C.

- Purificació

Aquesta purificació s'ha realitzat amb el *Wizard Lambda Preps DNA Purification System* seguint les instruccions del fabricant. L'única modificació introduïda ha estat l'addició d'un volum de cloroform seguit d'una centrifugació de 5 min a 3000g i 4 °C abans de barrejar la solució de DNA de fag amb la *Purification Resin*.

3.3.7. Seqüenciació

S'ha utilitzat el mètode de seqüenciació amb didesoxinucleòtids descrit per Sanger (1977). La seqüenciació s'ha fet amb l'aparell ABI PRISM 310 i el *DNA sequencing kit dRhodamine terminator cycle sequencing ready reaction* (PE Biosystems) que conté didesoxinucleòtids marcats amb 4 colorants fluorescents diferents que permeten obtenir una seqüència amb un sol tub de reacció. Per cada reacció de

seqüència s'han utilitzat 60 - 90 ng de DNA amplificat per PCR o 500 – 900 ng de DNA plasmídic.

3.3.8. Crivellat d'una llibreria de cDNA

Transferència del DNA de les calbes a una membranes

Plaquejar la llibreria. Al cap s'unes 10 h posar les plaques a la nevera perquè l'agarosa quedi el màxim de sòlida possible i seguidament aplicar les membranes durant 2 min per tal que el DNA es transfereixi. Per desnaturalitzar el DNA posar les membranes amb el DNA a la part superior sobre papers molls amb:

NaOH 0.5M + NaCl 1.5M durant 2 min

Tris-HCl 0.5M pH8 + NaCl 1.5M

2x SSC + Tris-HCl 0.2M pH7.5 durant 30 s com a mínim

Seguidament, posar al forn a 80 °C durant 1.5 h. Continuar amb l'experiment o guardar les membranes.

Preparació de la sonda i hibridació

La sonda s'ha marcat per PCR substituint, en la barreja de nucleòtids una part de dTTP per digoxigenina-11-dUTP (Boehringer Mannheim).

Abans de la hibridació s'ha realitzat una prehibridació de les membranes de com a mínim 2 h a 65 °C i en agitació. Després s'afegeix la sonda desnaturalitzada i s'hibrida durant tota la nit a 65 °C constant.

Solució d'hibridació: 6x SSC, 0.5% SDS, 5x Denhardt's i 2 mg tRNA de llevat.

Rentats i revelat

Finalitzada la hibridació es renten les membranes amb les següents solucions:

2x SSC + 0.1% SDS a temperatura ambient durant 3 min

2x SSC + 0.1% SDS a 65 °C durant 15 min

1x SSC + 0.1% SDS a 65 °C durant 15 min

0.5x SSC + 0.1% SDS a 65 °C durant 15 min

0.2x SSC + 0.1% SDS a 65 °C durant 15 min, repetir 2 vegades.

La digoxigenina-11-dUTP es detecta amb anticòs anti-digoxigenina (Boehringer Mannheim) i un revelat colorimètric amb NBT-BCIP (Boehringer Mannheim).

4. Assajos de viabilitat en bacteris

Per mostrar si una proteïna té, en condicions d'estrès, un efecte protector en bacteris que l'expressen s'han realitzat assajos de viabilitat.

S'han aplicat estressos (55 °C durant 1 h i paraquat 0.2, 2 i 20 mM durant 30, 60 i 120 min) a cultius d'*E. coli* induïts amb IPTG i en fase exponencial de creixement i s'ha fet un recompte de viables abans i després de l'aplicació de l'estrès. Les mostres s'han plaquejat per triplicat a la dilució adequada i s'han considerat vàlids els valors de cfu entre 3 i 300. Els resultats representen la mitjana d'almenys 5

experiments independents. La viabilitat s'ha expressat com a $\log N/No$ (N, nombre de viables després de l'estrès; No, viables abans de l'estrès).

5. Cromatografia de gasos – Espectrometria de masses

Aquesta tècnica permet l'anàlisi de gran quantitat de modificacions de bases. El DNA de surera purificat ha estat enviat a la *National University of Singapore* on el Dr. Matt Whiteman ha realitzat les anàlisis. Breument, la tècnica consisteix en:

1. Extreure DNA amb un mètode que no utilitzi fenol. Si el DNA està en una solució amb tampó Tris, aquest s'ha d'eliminar dialitzant en aigua tota la nit. Finalment es mesura espectrofotomètricament la concentració de DNA ($1OD_{260} = 50 \mu\text{g dsDNA/ml}$).
2. Repartir el DNA en alíquotes de 100 μg i afegir marcadors interns.
3. Hidrolitzar les mostres amb 0.5 ml d'àcid fòrmic al 60% incubant a 150 °C 45 min
4. Refredar, liofilitzar i es derivatitzar les mostres en una atmosfera de nitrogen afegint 100 μl de BSTFA (+1% TMCS) / acetonitril (4:1 v/v) a temperatura ambient 1 h. La derivatització o trimetilsililació de les bases és necessària per tal d'augmentar el seu PM i fer-les volàtils. Per cada grup polar s'augmenta la massa 115 unitats.
5. Anàlisi per cromatografia de gasos lligada a espectrometria de masses and *Hewlett-Packard 5890II gas chromatography* i *Hewlett-Packard 5917A mass selective detector*. Les mostres se separen a través d'una columna la temperatura de la qual s'incrementa de 125 a 175 °C a 8 °C/min després d'estar 2 min a 125 °C, llavors de 175 a 220 °C a 30 °C/min, es deixa a 220 °C durant 1 min i finalment de 220 a 290 °C a 40 °C/min i es deixa a 290 °C durant 20 min. La SIM (*Selected-ion monitoring*) es realitza a 70 eV i 185 °C. Per quantificar les bases modificades de les mostres es relaciona l'àrea del pic de cada compost amb l'àrea del pic del corresponent marcador intern.

III. RESULTATS

**III.1. Les sHsps-CI: acumulació i protecció
enfront l'estrès**

III.2. Variabilitat genètica de *Qshsp17.4-CI*

III.1. Les sHsps-CI: acumulació i protecció enfront l'estrès

Els resultats que es presenten a continuació mostren que els patrons d'acumulació de les sHsps-CI de surera són complexos i estan formats principalment per dos grups d'espècies proteiques a l'entorn dels 10 i 17 kDa que mostren una inducció diferencial en funció del teixit i l'estrès. Mentre que les espècies proteiques de 17 kDa s'indueixen per temperatura, les de ca. 10 kDa ho fan per estrès oxidatiu. A més, les espècies proteiques de ca. 10 kDa constitueixen les sHsps més petites descrites fins al moment.

Donada la complexitat del patró proteic de les sHsps-CI en surera i el caràcter multigènic de les sHSP-CI d'altres plantes, es van voler clonar nous membres d'aquesta família en surera, especialment aquells corresponents a les sHsps-CI de ca. 10 kDa que es detecten en les immunodeteccions 2D. Aquest clonatge va permetre obtenir seqüències parcials que codifiquen per tres noves sHsps-CI. Una d'elles, *Qshsp10-CI*, presenta una important truncació al mig del domini α -cristal·lí, s'expressa específicament per estrès oxidatiu i tindria un PM teòric d'aproximadament 10 kDa. Aprofitant l'oportunitat que oferia aquesta sHsp de ser utilitzada com a model per l'estudi de la importància del domini α -cristal·lí i l'extensió C-terminal en l'activitat protectora enfront l'estrès, es va voler determinar la capacitat que tenia d'augmentar la viabilitat de cèl·lules d'*E. coli* en condicions d'estrès tèrmic i oxidatiu. Els resultats mostren que *Qshsp10-CI*, tot i la important truncació que té, és capaç de protegir cèl·lules d'*E. coli* en condicions d'estrès tèrmic i, remarcablement, en condicions d'estrès oxidatiu.

Journal of Experimental Botany, vol. 53, No. 373, pp. 1445-1452, June
2002

Developmentally and stress-induced small heat shock proteins in cork oak
somatic embryos

Pere Puigderrajols, Anna Jofré, Gisela Mir, Maria Pla, Dolors Verdaguer, Gemma Huguet and
Marisa Molinas

Article II

A 10 kDa class CI sHSP protects E. coli from high temperature and oxidative stress

A 10 kDa class CI sHsp protects *E. coli* from oxidative and high temperature stress

Anna Jofré, Marisa Molinas* and Maria Pla¹

Laboratori del Suro. Facultat de ciències. Universitat de Girona. Campus Montilivi. Girona E-17071. Spain.

*Corresponding author (Tel. +34 972 418165, Fax. +34 972 418150, e-mail: marissa.molinas@udg.es)

¹ Present address: Tecnologia dels Aliments INTEA-EQATA. Universitat de Girona. E-17071 Girona. Spain.

Abstract

We report on a new cDNA clone of a *Quercus suber* L. class CI sHsp (*Qshsp10-CI*) obtained from cork, a highly oxidatively stressed plant tissue. The deduced gene product lacks the C-terminal extension and 55% of the α -crystallin domain, being the more C-terminal truncated sHsp reported to date. In an attempt to prove that a protective function is possible for such a truncated sHsp, we overexpressed in *E. coli* two recombinant sHsps-CI, one (rQsHsp10-CI) showing the same truncation as *Qshsp10-CI*, and the other (rN49) lacking the whole α -crystallin domain. The overexpression of rQsHsp10-CI but not rN49 enhanced cell viability under high temperature and, interestingly, under oxidative stress. These results show that most of the α -crystallin domain and all the C-terminal extension are dispensable, but amino acids 1 to 41 of the α -crystallin domain (including the consensus II region) are essential for sHsps-CI protective activity. On the other hand, 2D immunodetection showed accumulation of ca. 10 kDa sHsp-CI immunorelated polypeptides in cork and other oxidatively stressed tissues but not in control and heat stressed tissues. We discuss the possible role of highly truncated sHsps in relation to oxidative stress.

Key words: Chaperone activity – Heat stress – Oxidative stress – *Quercus* – small Heat Shock Proteins

Introduction

Small heat shock proteins (sHsps) are widely distributed low-molecular-mass proteins (15-30 kDa) involved in stress response and also in embryonic development, cell division and differentiation and programmed cell death, but these cell functions are usually linked to the cellular stress response (Morange 1998). Moreover, sHsps have been related to human diseases such as Alzheimer's, Parkinson's disease and eye cataracts (Horwitz 2000). Plant cells synthesize multiple sHsps encoded by five nuclear multigene families (Waters et al. 1996). In *Arabidopsis thaliana*, Scharf et al. (2001) recognized 13 different sHsps grouped in six classes based on the intracellular localization and sequence relatedness and, from them, 6 were cytosolic-nuclear class I sHsps (sHsps-CI). Moreover, in *Arabidopsis* the above authors recognized other 6 sHsp-like proteins related with sHsp-CI. The high diversification in plant sHsps probably reflects molecular adaptation to stressful conditions unique to plants (Waters et al. 1996). On the other hand, literature reporting on strong correlation between sHsps accumulation and plant resistance to stress is abundant (see Waters et al. 1996 (review) and Wehmeyer and Vierling 2000; for oxidative stress see Crawford and Davies 1994).

It has been proved that sHsps possess molecular chaperone activity (Lee et al. 1997; Lee and Vierling 2000). Molecular chaperones protect cells by preventing aggregation or promoting correct refolding of denatured proteins (Beissinger and Buchner 1998). Evidence for *in vivo* chaperone function of plant sHsps has been obtained by overexpression in *E. coli* cells. *E. coli* cells expressing glutathione S-transferase/rice Hsp16.9, *H₆*/tobacco TLHS1 or chestnut Hsp17.5 showed increased viability under heat stress (Yeh et al. 1997 and 2002, Joe et al. 2000 and Soto et al. 1999, respectively). Moreover, transient expression of sHsps in cultured cells of *Arabidopsis* prevented thermal inactivation of firefly luciferase (Forreiter et al. 1997 and Löw et al. 2000). Furthermore, *in vitro* plant sHsps prevent irreversible aggregation of heat denatured proteins (Lee et al. 1995 and 1997; Collada et al. 1997; Lee and Vierling 2000). It seems very likely that sHsps participate in the chaperone network to maintain denatured proteins in a folding competent state (Veinger et al. 1998).

Despite the large amount of research, the molecular basis of sHsps chaperone activity remains poorly understood. *In vitro* studies of mammalian sHsps demonstrated an ATP-independent capacity to protect non-native proteins (Beissinger and Buchner 1998). The vertebrate eye lens protein α -crystallin, which shares an evolutionarily conserved α -crystallin domain with the sHsps-CI, prevents heat-induced aggregation of actin filaments (Wang and Spector 1996). However, the role of the α -crystallin domain in sHsps-CI chaperone activity is still unclear. In sHsps, the α -crystallin domain is flanked by a short, polar, unstructured C-terminal

extension and by a hydrophobic N-terminal region (MacRae 2000). Exposed hydrophobic binding sites in the α -crystallin region are thought to be involved in binding denatured proteins (Lee et al. 1997, Rajaraman et al. 2001). It has been recently demonstrated that amino acids 73 through 78 in the consensus II of the α -crystallin domain are essential for providing thermotolerance and form an important part of the substrate-binding site in rice OsHsp16.9 sHsp-CI (Yeh et al. 2002). As shown by deletion studies, the N-terminal domain is required for achieving multimerization of sHsps into complexes of high molecular weight (Leroux et al. 1997a). The solubility and stability of multimers is linked with the C-terminal extension (Smulders et al. 1996, van Montfort et al. 2001).

This paper focuses on a partial cDNA clone (*Qshsp10-CI*) obtained from cork, a highly oxidatively stressed plant tissue. *Qshsp10-CI* codes for the longest C-terminal truncated sHsp-CI known to be naturally expressed in cells. The deduced gene product lacks the C-terminal extension and 55% of the α -crystallin domain, although maintains the α -crystallin consensus II region. Here, in an attempt to find evidence of a possible protective role for *Qshsp10-CI*, we constructed and expressed in *E. coli* two recombinant proteins, one (rQsHsp10-CI) showing the same truncation as *Qshsp10-CI* and the other (rN49) lacking the whole α -crystallin domain. Our results demonstrate that overexpression of rQsHsp10-CI but not rN49 enhance *E. coli* cells viability under temperature and oxidative stress. This work contributes to a better understanding of the function of the α -crystallin domain in sHsps-CI.

Materials and methods

Plant material. Cork oak (*Quercus suber* L.) plantlets were obtained by germination of acorns in water-imbibed peat for 1 month. The standard growth conditions were 22°C at 70% humidity in a light/dark cycle of 16/8 h for all experiments. Cork oak xylem and cork tissues were isolated from 2-3 year old sprouts during the growing season.

Class CI sHsps cloning. Total RNA from phellem (cork) tissue was extracted as Varadarajan et al, 1991. Poly (A)+ mRNA was purified with polyATract system 1000 (Promega) and used as template in Reverse Transcription (RT) with oligo-d(T). Polymerase Chain Reaction (PCR) was performed with high fidelity Pfu DNA polymerase (Promega) using oligonucleotides 5'CTCTGAATTTCGCAACGTGTTTCGACCCTTTC3' and 5'CTCTGAATTTCGTGAGCACTCCATTCTCCAT3', corresponding to *Qshsp17.4-CI* nucleotides 33 to 53 and 384 to 404 (amino acids 11 to 17 and 128 to 134),

respectively, with the addition of *EcoRI* restriction sites (underlined) plus a 4-nucleotide tail. Both oligonucleotides are located in regions which are highly conserved among the published plant sHsps-CI. Amplified fragments were digested with *EcoRI* and cloned into λ gt11 phage (Amersham Pharmacia Biotech). Phages were plated in an appropriate dilution and individual plate forming units (pfu) were independently collected and sequenced. The terminology proposed by Scharf et al. (2001) to name sHsps-CI is used.

Construction of the plasmids. pET29a (Novagen) was used as expression vector to construct pET-rQsHsp10-CI. The QsHsp10-CI sequence was cloned 3' of the S-tagTM peptide coding sequence from pET29a and *Qshsp17.4-CI* nucleotides 1-27 (corresponding to amino acids 1-10). QsHsp10-CI coding region was excised from the phage clone λ gt11-QsHsp10-CI by *EcoRI* digestion, blunt ending and *BsmFI* digestion. It was cloned in the vector resulting from *BsmI* digestion, blunt ending and *BsmFI* digestion of pBluescript-Hsp17.4 (Pla et al. 1998). This intermediate plasmid was digested with *EcoRI* and *XhoI* and the insert was subsequently cloned into pET29a expression vector, previously digested with the same restriction enzymes. The plasmid pET-rN49 was constructed by cloning the amplified PCR product of the intermediate plasmid with oligonucleotides 5'GCGCGAAATTAACCCTCACTAAAG3' (in T3 promoter) and 5'CTCTCTCGAGCTACAGTTTAGCGGCGCGA3' (nucleotides 131 to 147 of QsHsp10-CI, including a STOP codon at position 148-150 (bold) and a *XhoI* restriction site (underlined) plus a 4-nucleotide tail) into pET29a, both previously digested with *EcoRI* and *XhoI*. All plasmids including pET29a -without any inserted DNA sequence, to be used as control- were transformed into *E. coli* BL21 (DE3) cells. All clonings were checked by sequencing. Cells were grown at 37°C while agitated in Luria broth (LB) medium supplemented with kanamycin 20 µg/ml.

Cell viability experiments using transformed E. coli cells. To measure cell viability under stress conditions of high temperature (55°C) and paraquat (0.2, 2 and 20 mM), exponentially-growing *E. coli* BL21 (DE3) cells, transformed with pET-rQsHsp10-CI, pET-rN49 or pET-S-tagTM were grown at 37 °C to mid-exponential phase. Then cultures were induced with IPTG for 1 h and diluted to O.D.₆₀₀ = 0.4 before stress treatments. Stressed culture aliquots of 100 µl were collected 1 h after heat treatment and at 30 min, 1 h and 2 h after paraquat addition. Serial dilutions were plated on LB agar plates containing kanamycin and cell viability was determined by counting colony forming units (cfu) after incubation of the plates overnight at 37°C. After the stress treatments, rQsHsp10-CI, rN49 and S-tagTM expressing cells were collected by centrifugation and suspended in SDS-gel loading buffer to be analyzed in SDS-PAGE gels.

Stress treatments and protein extraction. For heat stress, young cork oak plantlets were incubated at 42°C for 3h. For H₂O₂ treatment, plantlets were incubated for 5 h in 5% H₂O₂. Controls were performed by incubation in water. Immediately after treatments, samples were frozen in liquid nitrogen, homogenized and suspended in 9M urea, 2 % (v/v) Triton X100, 130 mM DTT, 2 % (v/v) Pharmalyte 3-10 (Amersham Pharmacia Biotech), 2 mM PMSF and 2 % (v/v) PVP. Protein concentrations were determined by the Bradford method.

Electrophoresis and immunological detection of proteins. One-dimensional SDS-PAGE was performed with a Mini-Protean II apparatus (BioRad), using a 12 % (w/v) resolving gel and a 3 % (w/v) stacking gel. The relative level of rQsHsp10-CI was quantified using densitometry measured with Quantity One software package (BioRad). Two-dimensional electrophoresis was performed with a Multiphor II (Amersham Pharmacia Biotech) according to the instructions of the manufacturer, using Immobiline DryStrip pH 3-10L for the IEF and ExcelGel SDS gradient 8-18 % and ExcelGel SDS buffer strips for the SDS-PAGE. 130 µg of protein were loaded in each gel. In both one- and two-dimensional electrophoresis, proteins were transferred onto PVDF membranes (Millipore) and incubated with polyclonal antibody raised against recombinant QsHsp17.4-CI protein in rabbit (Pla et al. 1998). Bound antibodies were detected using peroxidase conjugated goat anti-rabbit IgG (GAR-Po, Nordic Immunology) and a chemiluminiscent system (BM Chemiluminiscence Western Blotting Substrate, Boehringer Mannheim). Plant sHsps belonging to the same class share a major sequence identity and do not cross-react with antibodies raised against other classes (Jinn et al. 1993).

Results

sHSPs-CI in cork tissue.

With the aim of identifying new members of class CI sHsps in cork oak, a series of RT-PCR assays were performed. Living cork cells were obtained from phellem (outer bark of cork oak trees). For the RT-PCR assays, two oligonucleotides were used designed in highly conserved regions near the 5' and 3' ends of a previously cloned cork oak *Qshsp17.4-CI* (Pla et al. 1998) (Fig.1). From these experiments, *Qshsp17.4-CI*, three new partial sHsp-CI clones were obtained: *Qshsp10-CI* (AJ243825), *QshspC-CI* (AJ243825) and *QshspD-CI* (AJ24382). At the deduced protein level, QsHspC-CI and QsHsp17.4-CI revealed the highest similarity with chestnut Hsp17.5 (86% and 98%, respectively), and QsHsp10-CI and QsHspD-CI (93% similitude between them) showed the highest similarity with strawberry Hsp17.4 (82% and 87% respectively). Interestingly, *Qshsp10-CI* showed a stop codon at position 220, coinciding with the end of the consensus region II in the α-

crystallin domain thus coding for a truncated sHsp that lacks the last 49 amino acids of the α -crystallin domain (55%) and all the C-terminal extension (Fig. 1). As *Qshsp10-CI* was independently cloned several times from mRNA and DNA extracted from different cork samples, it can be assumed that *Qshsp10-CI* is expressed in cork cells, and so that, a putative function for its gene product can be speculated. On the other hand, given the absence of the whole C-terminal extension and more than half of the α -crystallin domain, a putative chaperone activity for such a sHsp cannot be assumed before testing.

rQsHsp10-CI but not rN49 protects E. coli cells from oxidative and high temperature stress.

In an attempt to prove or discard an *in vivo* protective function for QsHsp10-CI, a recombinant protein, rQsHsp10-CI, showing the same truncation of *Qshsp10-CI* was expressed in *E. coli* cells and tested for cell viability under stress conditions. As a control, we also expressed a second recombinant protein, rN49, in which the remaining portion of the α -crystallin domain (from amino acid 50 to 91) was deleted (see Fig.1). Both recombinant proteins included the S-tag™ peptide from the pET29a and residues 1 to 10 of QsHsp17.4-CI at the 5' end. As an additional control, S-tag™ peptide alone was also expressed. Recombinant proteins were clearly detected in *E. coli* cells 1 h after IPTG addition and reached the highest accumulation levels after 4 h (Fig. 2). rQsHsp10-CI and rN49 but not S-tag™ peptide, showed immunoreactivity against anti-Qs-sHsp17.4-CI polyclonal antibody. In the absence of stress, the growth rate before and after IPTG induction was similar for rQsHsp10-CI, rN49 or S-tag™ expressing cells (data not shown). Resolution of rQsHsp10-CI by 2D electrophoresis showed a single immunospot (not shown).

Heat stress was performed as follows: mid-exponential phase *E. coli* cells were induced with IPTG for 1 h and aliquots of cells at O.D.₆₀₀=0.4 (at least 3 per treatment) were shifted to 55°C for 1h. After heat treatment, cell viability was determined by the colony count method. All results were the mean of at least five independent experiments. Under heat stress, cells overexpressing rQsHsp10-CI showed increased tolerance to high temperature when compared to cells overexpressing rN49 or S-tag™ peptide. Incubation at 55°C for 1 h drastically reduced viability of S-tag™ and rN49 expressing cells ($5.3 \log_{10} \pm 0.41$ and $5 \log_{10} \pm 0.12$ units, respectively). Moreover, heat treatment decreased cell viability of rQsHsp10-CI expressing cells but in a lower degree ($3.7 \log_{10} \pm 0.34$ units). Viability values between rQsHsp10-CI and controls (rN49 and S-tag™) are statistically different (*t* test, $p < 0.05$).

For oxidative stress assays, transformed *E. coli* cells were subjected to 0.2, 2 and 20 mM of paraquat. Cell viability was determined by the colony count method as

for heat stress tests at 30 min, 1 h and 2 h after the paraquat treatment. Under oxidative stress, the overexpression of rQsHsp10-CI improved cell viability in comparison to controls. Fig. 3 shows the survival curves for *E. coli* pET-rQsHsp10-CI, pET-rN49 and pET-S-tag™ transformed cells treated with 0.2, 2 and 20 mM concentrations of paraquat. Cell viability decreased in correlation with increasing paraquat concentrations in rQsHsp10-CI, rN49 or S-tag™ overexpressing cells, but cells overexpressing rQsHsp10-CI were more resistant than controls at all paraquat concentrations (between 0.3 and 2.8 log₁₀ units). Cell viability values of rQsHsp10-CI and controls (rN49 and S-tag™) were statistically different (*t* test, *p*<0.05) for all paraquat concentrations and time points. On the other hand, cell viability of rN49 and S-tag™ expressing cells are not statistically different (*t* test, *p*>0.05). In all cases, the most dramatic drop in cell viability occurred within the first 30 min of treatment.

2D immunodetection showed ca. 10 kDa class sHsps-CI in oxidatively stressed tissues.

To investigate the possible accumulation in cork cells of highly truncated sHsps, we performed 2D immunoassays using a polyclonal antibody anti-Hsp17.4-CI (Pla et al. 1998). For this purpose, cork and wood tissue which are both under similar endogenous oxidative stress conditions were analysed in addition to stem tissue of plantlets growing in standard conditions and subjected to heat (42 °C 3h) or to oxidative stress (5% H₂O₂, 5h). In the 2D patterns, the antiserum strongly reacted with polypeptides at ca. 10 kDa and at 17 kDa regions. At the 17 kDa region, the detected set of immunospots corresponds to QsHsp17.4-CI (see Puigderrajols et al. 2002). These polypeptides were highly accumulated in cork, wood and in heat stressed plantlets, but were scarce in non-stressed plantlets and could not be detected in those oxidatively stressed. Interestingly, the ca. 10 kDa polypeptides, with pI ranging from 4.5 to 6.5, were highly accumulated in cork and wood tissue and in plantlets subjected to oxidative stress and only small amounts were present in heat stressed and standard growing plantlets.

Discussion

Results from our RT-PCR experiments show a diversity of sHsps-CI in cork oak. The presence of at least four different sHsps-CI mRNAs in cork cell extracts may reflect a certain degree of functional divergence among them and different regulatory controls may be speculated for their corresponding genes (Waters et al. 1996). Among this different sHsps-CI, *Qshsp10-CI* attracted our attention as it is the more C-terminal truncated sHsp described to date naturally expressed in any organism and offers an interesting opportunity for contributing to the elucidation of sHsps-CI structure-function relationship. Moreover, *Qshsp10-CI* may possibly have a specific

role in cork, a tissue capable of surviving under high endogenous oxidative stress conditions associated with suberin synthesis (Pla et al. 2000; Kolattukudy et al. 1984).

By expressing in *E. coli* cells the recombinant construct rQsHsp10-CI, we showed that a very low MW sHsp-CI can protect cells from heat and, interestingly, oxidative stress. Although the sHsps-CI size varies (15-30 kDa), it is generally agreed that the minimal functional unit consists of the α -crystallin domain of about 85-90 amino acids, flanked by an N-terminal region of at least 39 residues (in *E. coli* IbpA), and by a C-terminal extension of at least 12 residues (in *Neurospora crassa* Hsp30). The only known exception is a family of 12.2-12.6 kDa sHsps from *C. elegans*, with a complete α -crystallin domain flanked by a short (25 amino acids) N-terminal domain and an extremely short (2 amino acids) C-terminal extension in Hsp12.6. However, no *in vitro* function could be assigned to Hsp12.6 (Leroux et al. 1997b).

Our results show that rQsHsp10-CI, lacking more than half of the α -crystallin domain and all the C-terminal extension, gives protection against temperature and oxidative stress when expressed in *E. coli* cells, but rN49 which has a further deletion and lacks consensus II region, does not. From this it can be deduced that the C-terminal extension and at least consensus I region of the α -crystallin domain are not essential for the protective effect of sHsps-CI. In agreement, overexpression of the artificially C-terminal truncated class CI OsHsp16.9 (including consensus II but lacking consensus I region) led to thermotolerant *E. coli* cells (Yeh et al. 1997). Lee et al. (1997) suggested the importance of consensus II region for substrate binding, specially the motif ADLPGLKKEEVKVEVEDDR. It has been mapped in wheat Hsp16.9 crystal structure and lines the hydrophobic groove in the α -crystallin domain (van Montfort et al. 2001). Besides, a 6 amino acid deletion into this motif eliminates the capacity of *E. coli* cells overexpressing OsHsp16.9-CI to survive at 47.5°C (Yeh et al. 2002). A homologous motif, ADVPGQKKEEVKVEIEDRR, is present in rQsHsp10-CI eleven amino acids upstream of the C-terminus (Fig. 1). Above results point to consensus II region as essential for conferring protection not only against heat but, interestingly, also against oxidative stress.

It should be noted that rQsHsp10-CI is, to our knowledge, the only eukaryotic sHsp-CI shown to increase the viability of *E. coli* cells under oxidative stress conditions. Only *E. coli* sHsps ibpA and ibpB have been reported to confer oxidative stress protection when overexpressed in *E. coli* cells. However, results with an ibpAB-disrupted strain were not conclusive (Kitagawa et al. 2000). On the other hand, 2D immunodetection showed the presence of ca. 10 kDa class CI immunorelated polypeptides in relation to oxidative stress. Ca. 10 kDa spots were

detected in cork and wood, which are endogenously oxidatively stressed tissues and in oxidatively stressed cork oak plantlets. The accumulation of *ca.* 10 kDa sHsps-CI immunorelated polypeptides in cork agrees with the fact that *Qshsp10-CI* is expressed in cork cells. Moreover, the 2D-electrophoresis pattern of rQsHsp10-CI showing a single spot seems to indicate that more genes should code for *ca.* 10 kDa sHsps-CI.

Furthermore, the *in vivo* protective effect shown in this paper for rQsHsp10-CI is consistent with a chaperone activity for a highly truncated sHsp such as QsHsp10-CI. *The in planta* function of highly truncated sHsps requires further investigation.

References

- Beissinger M, Buchner J (1998) How chaperones fold proteins. *Biol Chem.* 379: 245-259
- 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
- Crawford DR, Davies KJA (1994) Adaptive response and oxidative stress. *Environ Health Persp.* 102 (Suppl. 10): 25-28
- 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.* 12: 2171-2181
- Horwitz J (2000) The function of alpha-crystallin in vision. *Semin Cell Devel. Biol.* 11: 53-60
- Jinn TL, Wu SH, Yeh CH, Hsieh MH, Yeh YC, Chen YM, Lin CY (1993) Immunological kinship of class I low molecular weight heat shock proteins and thermostabilization of soluble proteins *in vitro* among plants. *Plant Cell Physiol.* 34: 1055-1062
- Joe MK, Park SM, Lee YS, Hwang DS, Hong CB (2000) High temperature stress resistance of *Escherichia coli* induced by a tobacco class I low molecular weight heat-shock protein. *Mol Cells.* 10: 519-524
- Kolattukudy PE, Podila GK, Roberts E, Dickman MD (1984) Gene expression resulting from early signals in plant-pathogen interaction. *Can. J. Bot.* 62, 2918-2933.
- 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 Microbiology Letters.* 184: 165-171
- Lee GJ, Pokala N, Vierling E (1995) Structure and *in vitro* molecular chaperone activity of cytosolic small heat shock proteins from pea. *J Biol Chem.* 270: 10432-10438

- Lee GJ, Roseman AM, Saibil HR, 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 GJ, Vierling E (2000) A small heat shock protein cooperates with heat shock protein 70 systems to reactivate a heat-denatured protein. *Plant Physiol.* 122: 189-197
- Leroux MR, Ma BJ, Batelier G, Melki R, Candido EP (1997a) Unique structural features of a novel class of small heat shock proteins. *J Biol Chem* 272: 12847-12853
- Leroux MR, Melki R, Gordon B, Batelier G, Candido EP (1997b) Structure-function studies on small heat shock protein oligomeric assembly and interaction with unfolded polypeptides. *J Biol Chem.* 272: 24646-24656
- Löw D, Brändle K, Nover L, Forreiter C (2000) Cytosolic heat-stress proteins Hsp17.7 class I and Hsp17.3 class II of tomato act as molecular chaperones in vivo. *Planta.* 211: 575-582
- MacRae TH. (2000) Structure and function of small heat shock/alpha-crystallin proteins: established concepts and emerging ideas. *Cell Mol Life Sci.* 57: 899-913
- Morange, M., Favet, N., Loones, M.-T., Manuel, M., Mezger, V., Michel, E., Rallu, M. and Sage, J. (1998) Heat Shock genes and development. In *Stress of Life : From molecules to man*, P. Csermely ed., *Annals of the New York Academy of Sciences* 851, 117-122
- Pla M, Huguet G, Verdaguer D, Puigderrajols P, Llompарт B, Nadal A, Molinas M. (1998) Stress proteins co-expressed in suberized and lignified cells and in apical meristems. *Plant Sci.* 139: 49-57
- Pla M, Jofré A, Martell M, Molinas M, Gómez J (2000) Large accumulation of mRNA and DNA point modifications in a plant senescent tissue. *FEBS Letters* 472: 14-16
- Puigderrajols P, Jofré A, Mir G, Pla M, Verdaguer D, Huguet G, Molinas M (2002) Temporal and spatial distribution patterns of developmental and stress-induced small heat shock proteins in cork oak somatic embryos. *J Exp Bot.* 53(373):1445-1452
- Rajaraman K, Raman B, Ramakrishna T, Rao CM (2001) Interaction of human recombinant alphaA- and alphaB-crystallins with early and late unfolding intermediates of citrate synthase on its thermal denaturation. *FEBS Lett.* 497: 118-23
- Scharf K-D, Siddique, M, Vierling E (2001) The expanding family of Arabidopsis thaliana small heat proteins containing α -crystallin domains (Acd proteins). *Cell Stress and Chaperones* 6 (3): 225-237
- Smulders RHPH, Carver JA, Lindner RA, van Boekel MA, Bloemendal H, de Jong WW (1996) Immobilization of the C-terminal extension of bovine alphaA-crystallin reduces chaperone-like activity. *J Biol Chem.* 271: 29060-29066.
- Soto A, Allona I, Collada C, Guevara M, Casado R, Rodriguez-Cerezo E, Aragoncillo C, Gómez L (1999) Heterologous expression of a plant small heat shock protein enhances Escherichia coli viability under heat and cold stress. *Plant Physiol.* 120: 521-528
- van Montfort RL, Basha E, Friedrich KL, Slingsby C, Vierling E (2001) Crystal structure and assembly of a eukaryotic small heat shock protein. *Nat Struct Biol.* 8: 1025-30

- Varadarajan GS, Prakash CS (1991) A rapid and efficient method for the extraction of total DNA from sweet potato and its related species. *Plant Mol Biol Repr.* 9: 6-12
- Veinger L, Diamant S, Buchner J, Goloubinoff P (1998) The small heat-shock protein IbpB from *E.coli* stabilizes stress-denatured proteins for subsequent refolding by a multichaperone network. *J Biol Chem.* 273:11032-11037
- Wang K, Spector (1996) A alpha-crystallin stabilizes actin filaments and prevents cytochalasin-induced depolymerization in a phosphorylation-dependent manner. *Eur J Biochem.* 242: 56-66
- Waters ER, Lee GJ, Vierling E (1996) The molecular evolution of smHSP in plants. *J Exp Bot.* 47:325-338
- 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
- Yeh CH, Chang PF, Yeh KW, Lin WC, Chen YM, Lin CY (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
- Yeh CH, Chen YM, Lin CY (2002) Functional regions of rice heat shock protein Oshsp16.9, required for conferring thermotolerance in *Escherichia coli*. *Plant Physiology* 128:661-668

Figure legends

Fig. 1. Amino acid sequence alignment of plant class CI sHsps (ClustalW). The sequences are from *Fragaria x ananassa* FaHsp17.4 (U63631), QsHsp10-CI (AJ243825), QsHsp17.4-CI (AJ000691), *Oriza sativa* OsHsp16.9 (P27777), *Triticum aestivum* Hsp16.9 (S21600) and *Pisum sativum* PsHsp18 (M33899). Plant class I sHsps specific consensus regions I and II are indicated. Critical regions for substrate binding in PsHsp18-CI (Lee et al. 1997) are in bold and essential amino acid residues in this region in OsHsp16.9-CI are in italics and bold (Yeh et al. 2002). Underlined are the amino acids corresponding to the oligonucleotides used in RT-PCR experiments. Consensus line: identical residues in all sequences (*), conserved substitutions (:), and (.) semi-conserved substitutions. Note that QsHsp10-CI contains an α -crystallin domain of only 41 amino acids.

Fig. 2. Overexpression of rQsHsp10-CI and rN49 in *E. coli* cells. **a**, Exponentially growing cell cultures bearing the plasmids pET-S-tag™ and pET-QsHsp10-CI and pET-rN49 were induced by IPTG. Similar amounts of protein were subjected to SDS-PAGE (12% acrylamide) and Coomassie staining. **b**, S-tag™ expressing cells after 1h of induction (lane 1), pET-QsHsp10-CI non-induced cells (lane 2), and rQsHsp10-CI expressing cells after 1 h, 2 h, 3 h, 4 h and 5 h of induction (lanes 3 to 7,

respectively). b, pET-rN49 non-induced cells (lane 1), and rN49 expressing cells after 1 h, 2 h, 3 h, 4 h and 5 h of induction (lanes 2 to 6, respectively).

Fig. 3. Survival curves for *E. coli* cells transformed with pET-QsHsp10-CI (*circles*), pET-rN49 (*squares*) or pET-S-tagTM (*triangles*) plasmids after paraquat treatment. Cultures of pET-QsHsp10-CI, pET-rN49 and pET-S-tagTM-bearing cells were grown at 37°C, induced with IPTG for 1 h and treated with 0.2 (a), 2 (b) or 20 mM (c) paraquat for 30 min, 1 h and 2 h. Results are means \pm SE. QsHsp10-CI and control values (rN49 and S-tagTM) in each paraquat concentration are statistically different (*t* test, $p < 0.05$).

Fig. 4. 2D Western blot analysis of cork oak mature tissues: cork cells, wood and young tissues: stems of early plantlets grown under regular conditions, heat stressed (42°C for 3 h) and treated with 5% H₂O₂ for 5 h. 130 μ g of total protein was loaded. Extracts were focused in 3-10 IEF gels and then resolved in 8-18% acrylamide gradient gels. After blotting, membranes were incubated with anti-QsHsp17.4-CI polyclonal antibody. Arrow: QsHsp17.4-CI main spot. Arrowhead: ca. 10 kDa sHsps main spot.

Figure 1

N-terminal domain

```

FaHsp17.4-CI      MALS-LFGNSRRSNVDFPFLSLDTWDPFQ--FGPLMNSSSTA-GDTSAFATRI 50
rQsHsp10-CI      MALS-LFG-GRRSNVDFPFLSLDIWDPFEG--FPPLSSHNSNP-SETSSFAAACL 49
rN49              MALS-LFG-GRRSNVDFPFLSLDIWDPFEG--FPPLSSHNSNP-SETSSFAAACL 49
QsHsp17.4-CI     MALS-LFG-GRRSNVDFPFLSLDIWDPFEG--FSAVASVPPSA-RETTAFATARI 49
OsHsp16.9-CI     MSLV-----RRSNVDFPFLSLDLW-DPFDSVFRSVVPATSD--NDTAAAFANARI 45
TaHsp16.9-CI     MSIV-----RRSNVDFPFA-DLWADPFDF-FRSIVPAISGGGSETAAAFANARM 46
PsHsp18.1-CI     MSLIPSFSSGRRSNVDFPFLSLDVWDPDKDFPFSNSSPSASFP-RENPAFVSTRV 53
*::              *****: * * . * :.:*.: :.:
    
```

α-crystallin domain

```

                                     consensus II                consensus I
FaHsp17.4-CI      DWKETPEAHVFKADLPGLKKEEVKVELEEENLVQISGERSKEQEEKNDKWHRVERSSGKFVRRFRLLPDNAKVDQVKAMENGLTVMVPK 90
rQsHsp10-CI      DWKETPNAHVF-ADVPGQKKEEVKVEIEDRRVLQISGERSQD----- 41
rN49              -----
QsHsp17.4-CI     DWKETPEAHIFKADLPGLKKEEVKVEVEDGNVLQISGERSKEHEEKNDKWHRVERSCGKFMRFRLLPENAKVDQVKAMENGLTVMVPK 90
OsHsp16.9-CI     DWKETPESHVFKADLPGVKKEEVKVEVEEENLVVISGQRSKEKEDKNDKWHRVERSSGQFMRRFRLLPENAKVDQVKAGLENGVLTVMVPK 90
TaHsp16.9-CI     DWKETPEAHVFKADLPGVKKEEVKVEVEDGNVLVVSGERTEKEEDKNDKWHRVERSSGKFVRRFRLLLEDKAVEVKAGLENGVLTVMVPK 90
PsHsp18.1-CI     DWKETPEAHVFKADLPGLKKEEVKVEVEDDRVLQISGERSVEKEDKNDKDEWHRVERSSGKFLRRFRLLPENAKMDKVKAMENGLTVMVPK 90
*****:.*:*.**:* *****:.*: .** :**:*: :.:**:*:*****.*:***** :.:**:*: ***** **
    
```

C-terminal extension

```

FaHsp17.4-CI      APEPKPQVKSIDISGA 16
rQsHsp10-CI      ----- -
rN49              ----- -
QsHsp17.4-CI     EEQKKPAVKAIIEISG- 15
OsHsp16.9-CI     AEVKKPEVKAIIEISG- 15
TaHsp16.9-CI     AEVKKPEVKAIQISG- 15
PsHsp18.1-CI     EEIKKAEVKSIEISG- 15
* . **:*:****
    
```

Figure 2

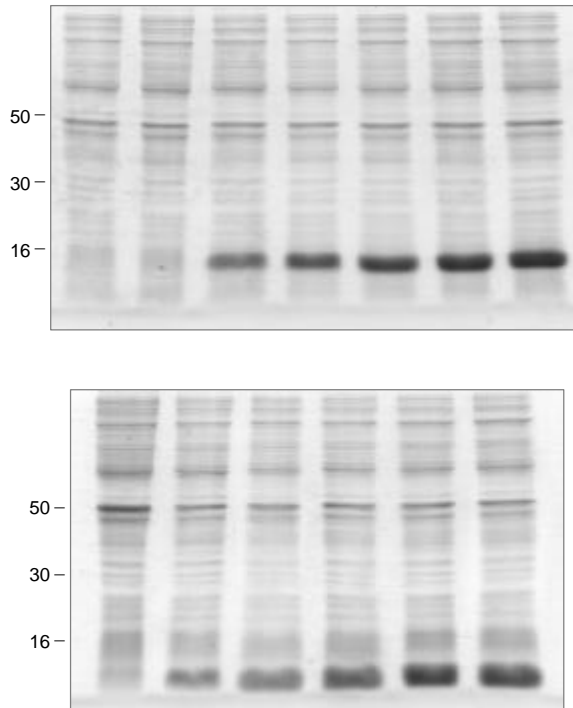
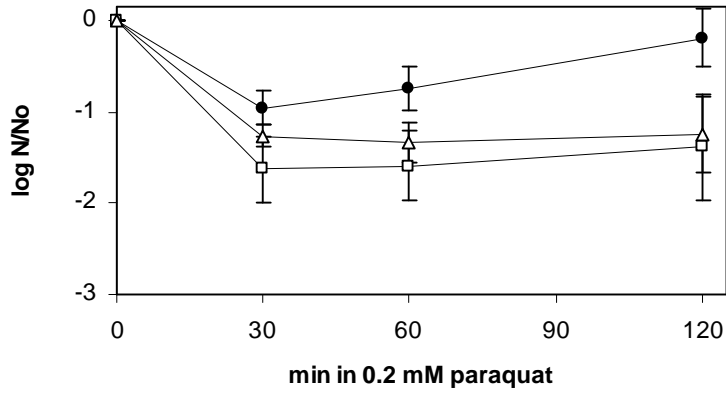
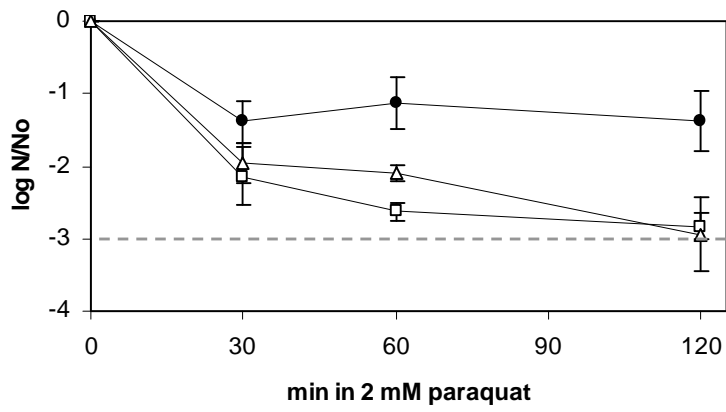


Figure 3

a



b



c

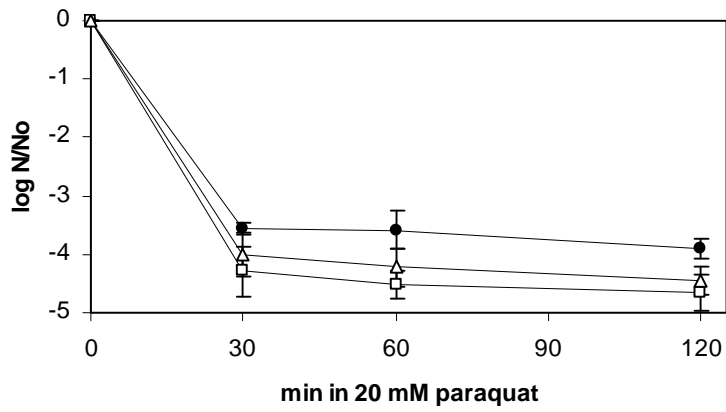
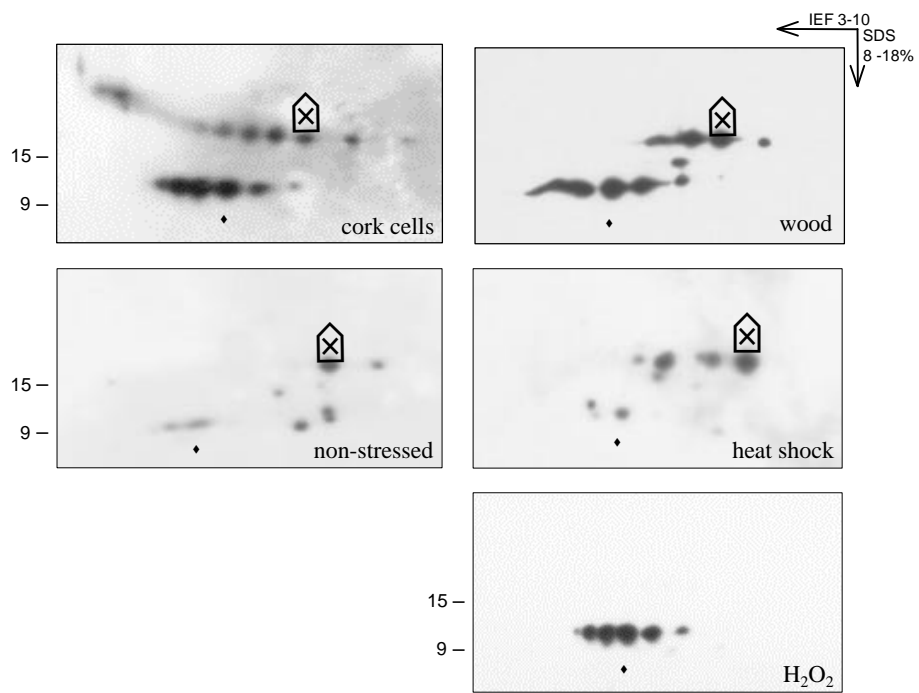


Figure 4



Altres resultats no publicats

Altres resultats no publicats

Un dels objectius d'aquest treball de tesi ha estat el clonatge de nous membres de la família de les sHsps-CI de surera a més de *Qshsp17.4-CI*. Les relacions d'homologia dels nous clons obtinguts entre ells i amb sHsps-CI d'altres plantes han estat breument descrits a l'article II però en aquest apartat s'aporten noves dades i es fa una discussió més detallada del seu origen. Es presta especial atenció a un d'ells, *Qshsp10-CI*, del qual s'ha estudiat l'expressió mitjançant RT-PCR i s'ha intentat obtenir el clo sencer amb el crivellatge d'una llibreria i per TAIL-PCR.

1. Clonatge de sHsps-CI a partir de DNA i mRNA de fel·lema i rel

Qshsp10-CI, *QshspC-CI*, *QshspD-CI* són les tres noves sHsps-CI clonades a partir d'mRNA de cèl·lules de fel·lema en procés de suberificació activa, d'àpex radicular i de DNA genòmic de surera.

Els resultats que es presenten a continuació deriven dels experiments que han donat lloc a la publicació de l'article III. Durant l'estudi de les seqüències de *Qshsp17.4-CI* en fel·lema i rel de surera es van obtenir una sèrie de clons que no corresponien al mateix gen, sinó a d'altres de relacionats. El coneixement d'aquestes seqüències ha obert les portes a l'estudi dels gens de la família de les sHsp-CI de surera.

El clonatge d'aquests gens en fag λ gt11 es va realitzar mitjançant una amplificació per RT-PCR a partir de mRNA de fellema i, independentment, de rel; així com a partir de PCR sobre DNA genòmic, utilitzant els oligonucleòtids HS3 i HS4. Amb l'objectiu d'amplificar no només *Qshsp17.4-CI*, sinó també el major fragment possible d'altres sHsps-CI, aquesta parella d'oligonucleòtids va ser dissenyada a *Qshsp17.4-CI*, en regions altament conservades de la regió codificant de les sHsps-CI de plantes i el màxim d'allunyats possible entre si. L'homologia d'aquestes regions entre diferents sHsps-CI publicades és de 81% per HS3 i el 90% per HS4 (Fig 9).

La seqüenciació d'alguns dels clons obtinguts a partir d'aquestes llibreries enriquides en sHsps-CI ha permès obtenir diverses vegades i de forma independent *Qshsp10-CI*, *QshspC-CI*, *QshspD-CI* a més de *Qshsp17.4-CI* (Taula 5). El fet d'haver-los clonat no només a partir de DNA sinó també a partir de molècules d'mRNA de diferent origen (fellema i rel) indica que aquests gens s'expressen i no són pseudogens.

	HS3	HS4
surera	5' ..gcAACgtgTTCgaccCtTtc.....	ATGgagAATggaGTGctcAC..3'
castanyer	...GCAACGTGTTTCGACCCTTTC.....	ATGGAGAATGGAGTGCTCAC....
maduixa	...GCAACGTCTTCGATCCCTTT.....	ATGGAGAATGGGCTGCTTAC....
arròs	...GCAACGTGTTTCGACCCTTTC.....	ATGGAGAATGGCGTGCTCAC....
P.glaucum	...GCAACGTGTTTCGACCCTTTC.....	ATGGAGAACGGCGTGCTCAC....
pastanaga1	...GCAACGTCTTCGACCCTTTC.....	ATGGAGAATGGGCTGCTTAC....
arabidopsis1	...CAAACGTCTTIGATCCGTTTC.....	ATGGAGAATGGTGTGCTTAC....
arabidopsis2	...CAAACGTCTTIGATCCGTTTC.....	ATGGAGAATGGTGTGCTTAC....
arabidopsis3	...CAAACGTCTTIGATCCGTTTC.....	ATGGAGAATGGTGTGCTTAC....
arabidopsis4	...CAAACGTCTTIGATCCGTTTC.....	ATGGAGAATGGTGTGCTTAC....
pèsol	...GCAATGTITTCGATCCCTTTC.....	ATGGAGAACGGCGTTCTGAC....
soja	...GCAGTGTITTCGACCCTTTC.....	ATGGAAAATGGGTTCTCAC....
tomaca1	...GCAGCATGTTTCGATCCATTT.....	ATGGAGAATGGAGTGCTTAC....
tomaca2	...GCAGCATGTTTCGATCCATTT.....	ATGGAGAATGGAGTGCTTAC....
girasol 1	...GCAACATATTCGACCATTTC.....	ATGGAGAACGGTGTGCTGAC....
pastanaga2	...GCAACGTGTTTCGACCATTTC.....	ATGGC GAATGGGCTGTTTAC....
opi	...GTAATGTITTCGATCCATTT.....	ATGGAGAATGGAGTGCTTAC....
C.japonica	...GCAACGCCTTIGATCCGTTTC.....	ATGGAGAACGGCGTGCTCAC....
girasol2	...CAAACGCTTCGACCCTTTC.....	ATGGAGAACGGTGTGTTGAC....
girasol3	...GCAACATATTCGACCATTTC.....	ATGGAGAACGGTGTGTTGAC....
C.rubrum	...GCAACATCTTCGACCATTTC.....	ATGGAGAATGGGTTCTTAC....
	** ** * * *	**** * * * * *

Figura 9. Alineació de les seqüències nucleotídiques de diverses sHsps-CI de planta en la regió dels oligonucleòtids HS3 i HS4 mitjançant Clustal W. La primera seqüència, *Qshsp17.4-CI*, mostra la pauta de lectura. Les regions sombrejades són homòlogues a *Qshsp17.4-CI*. Els números d'accés són: AJ000691, AJ009880, U63631, U83670, X94193, U47094, X17295, AY088849, AY070385, AY122948, M33899, X01104, AF123255, X56138, U46545, , X53851, U08601, AB017273, U46544, Z95153, X53870, respectivament. Els noms científics abreviats corresponen a *Pennisetum galucum*, *Cuscuta japonica* i *Chenopodium rubrum*.

La Taula 5 mostra els percentatges de clonació de cadascun dels gens de les sHsps-CI en surera. Cal tenir en compte, però, que aquests valors no són totalment representatius del predomini que té cada clo en els diferents teixits sinó que el percentatge d'obtenció depèn de l'homologia entre el clo amplificat i els

oligonucleòtids HS3 i HS4, a més de dependre del seu grau d'expressió en el cas dels mRNAs i del número de còpies al genoma en el cas del DNA. D'aquesta manera, el predomini de *Qshsp17.4-CI* (de 86.8 a 96%) es veu afavorit pel 100 % d'homologia que presenta amb els oligonucleòtids. En canvi, el fet d'haver clonat més vegades *QshspC-CI* que *Qshsp10-CI* o *QshspD-CI*, pot indicar una major expressió d'aquest gen o una major homologia amb els oligonucleòtids. Per tant, no es poden comparar els nivells d'expressió dels gens en un mateix teixit sinó que únicament es pot dir que s'expressen.

	mRNA fel·lema (%)	mRNA rel (%)	DNA (%)
<i>Qshsp17.4-CI</i>	86.8	96	94.3
<i>Qshsp10-CI</i>	4.4	2	1.4
<i>QshspC-CI</i>	5.9	2	4.3
<i>QshspD-CI</i>	2.9	-	-
Total clons	68	50	70

Taula 5. Clonatge de *Qshsp17.4-CI*, *Qshsp10-CI*, *QshspC-CI*, *QshspD-CI*. S'indica el percentatge d'obtenció de cadascun dels clons i el número total de clons obtinguts per cada teixit i àcid nucleic.

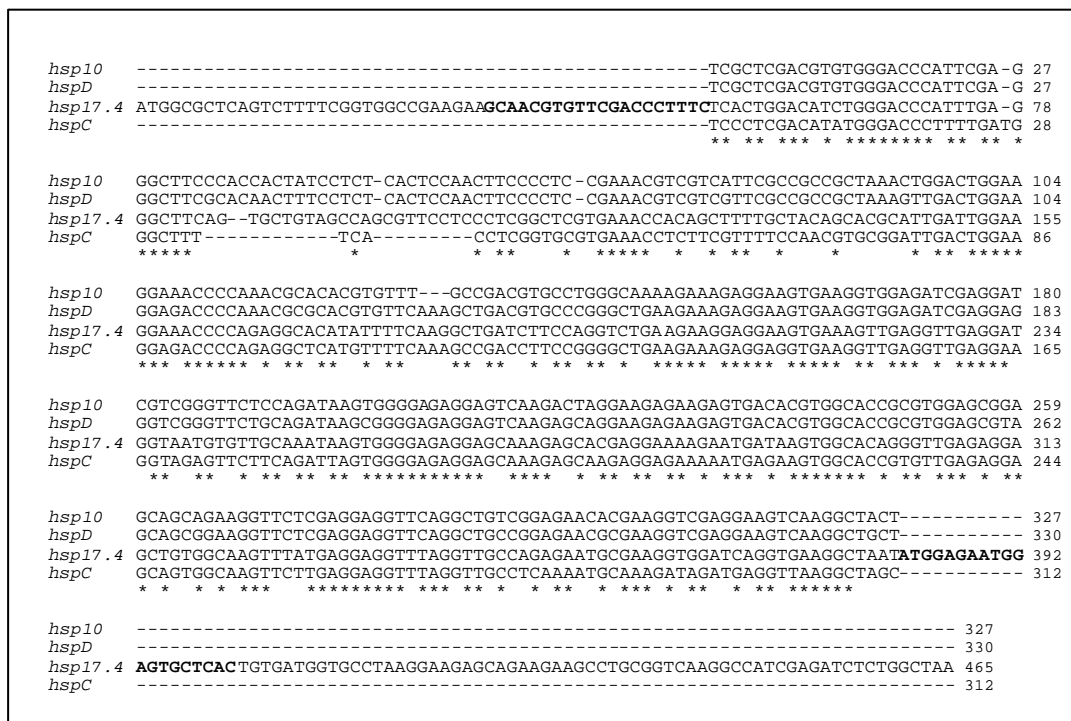


Figura 10. Alineació de les seqüències nucleotídiques de *Qshsp10-CI*, *QshspD-CI*, *Qshsp17.4-CI* i *QshspD-CI* (Clustal W). Els asteriscs indiquen posicions conservades a les quatre seqüències. Les seqüències corresponents als oligonucleòtids HS3 i HS4 estan en negreta.

En canvi, si que es pot comparar el nivell d'expressió dels diferents gens en cada teixit. El fet/lema és el teixit en què la població d'mRNAs de les sHsps clonades és més diversa, ja que *Qshsp17.4* només està representat en un 86.8% dels clons; en canvi en rel, aquest gen representa un 96% dels clons trobats. Aquest fet es veu recolzat per l'acumulació major i més variada de proteïnes sHsps-CI en fet/lema que en teixits no estressats (articles I i II). El fet que *QshspD-CI* no s'hagi pogut clonar a partir de DNA indicaria una reduïda afinitat dels oligonucleòtids per la seva seqüència.

La similitud entre les sHsps-CI de plantes no només se situa a la regió dels oligonucleòtids sinó que s'estén al llarg de tota la seqüència, especialment a l'extrem C-terminal (Fig. 10). Anàlisis de comparació de seqüències homòlogues utilitzant el *software Blastn* indiquen que *QshspC-CI*, *Qshsp10-CI* i *QshspD-CI* corresponen a sHsp-CI (no mostrat). A més, l'anàlisi de l'homologia a nivell de seqüència nucleotídica mostra que *Qshsp17.4-CI* i *Qshsp10-CI* són les sHsps-CI clonades que presenten un percentatge d'identitat menor (59.0%) i, conseqüentment, una major divergència (39.1%) en el fragment de regió codificant que ha estat clonat. *Qshsp10-CI* i *QshspD-CI* són les que presenten major identitat (90.8%), seguides de *Qshsp17.4-CI* i *QshspC-CI* (75.3%) (Taula 6). Tot i que *Qshsp10-CI* i *QshspD-CI* són molt similars a nivell de seqüència, difereixen molt en la longitud de la regió codificant i, per tant, en el PM de la proteïna per la qual codifiquen.

Percentatge d'identitat					
	<i>hsp10</i>	<i>hsp17.4</i>	<i>hspC</i>	<i>hspD</i>	
<i>hsp10</i>		59.0	61.9	90.8	<i>hsp10</i>
<i>hsp17.4</i>	39.1		75.3	63.3	<i>hsp17.4</i>
<i>hspC</i>	35.6	22.8		68.3	<i>hspC</i>
<i>hspD</i>	7.7	36.0	31.0		<i>hspD</i>
	<i>hsp10</i>	<i>hsp17.4</i>	<i>hspC</i>	<i>hspD</i>	

Percentatge de divergència

Taula 6. Matriu de similitud (part superior) i divergència (part inferior) entre les quatre sHsps-CI de surera. Seqüència dels oligonucleòtids descartada (programa MegAlign).

Les proteïnes deduïdes a partir de les seqüències de *Qshsp10-CI*, *QshspD-CI*, *Qshsp17.4-CI* i *QshspD-CI* s'han comparat entre si i amb les seqüències d'sHsps-CI de plantes més similars trobades al GenBank utilitzant el programa *Clustal W* (Fig. 11a) i s'han calculat els percentatges de similitud i divergència (Fig. 11b). Les sHsps-CI alineades presenten una elevada homologia, especialment al domini α -

crystal·lí. Aquesta homologia, que ja era elevada a nivell de seqüència nucleotídica, encara és major a nivell proteic perquè moltes de les diferències nucleotídiques se situen a la tercera base del codó provocant canvis silenciosos. Algunes de les seqüències presenten *gaps* respecte d'altres que en general són de tres o un múltiple de 3 nucleòtids i impliquen l'eliminació d'un o més codons però no alteren la pauta de lectura. La matriu de substitució de residus mostra que molts dels canvis que s'han donat en les sHsps-CI analitzades són de tipus conservatiu o semiconservatiu (Fig. 12). Tot i que s'hauria de tenir en compte la posició de cadascun dels residus en la proteïna, una anàlisi general mostra que els tres canvis majoritaris: A→S, E→D i V→I, produeixen canvis conservatius.

		TO																					
		C	S	T	P	A	G	N	D	E	Q	H	R	K	M	I	L	V	F	Y	W		
FROM	C		2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	C	
	S	2		20	14	48	12	31	1	2	0	1	7	1	1	3	7	5	2	0	0	S	
	T	0	20		5	21	1	6	0	0	2	0	2	6	6	2	0	7	2	0	0	T	
	P	0	14	5		3	0	1	0	6	1	1	0	2	0	0	4	1	0	0	0	P	
	A	0	48	21	3		6	5	0	11	2	0	0	0	1	1	2	1	0	0	0	A	
	G	0	12	1	0	6		1	6	4	0	0	4	1	0	0	0	0	3	0	1	G	
	N	0	31	6	1	5	1		2	2	3	0	5	8	0	1	1	0	0	0	0	N	
	D	0	1	0	0	0	6	2		48	1	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	D	
	E	0	2	0	6	11	4	2	48		17	0	0	3	1	1	0	4	0	0	0	E	
	Q	0	0	2	1	2	0	3	1	17		1	0	6	0	0	4	1	0	0	0	Q	
	H	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1		2	0	0	0	0	0	0	0	0	H	
	R	0	7	2	0	0	4	5	0	0	0	2		23	0	0	0	0	0	0	0	R	
	K	0	1	6	2	0	1	8	0	3	6	0	23		1	0	0	1	0	0	0	K	
	M	0	1	6	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1		5	16	10	0	0	0	M	
	I	0	3	2	0	1	0	1	2	1	0	0	0	0	5		13	40	8	0	0	I	
	L	0	7	0	4	2	0	1	0	0	4	0	0	0	16	13		16	10	0	0	L	
	V	0	5	7	1	1	0	0	0	4	1	0	0	1	10	40	16		3	0	0	V	
	F	0	2	2	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	8	10	3		1	4	1	F	
	Y	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1		1	1	Y
	W	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	1		1	W
		C	S	T	P	A	G	N	D	E	Q	H	R	K	M	I	L	V	F	Y	W		

Figura 12. Matriu de substitució de residus de les sHsps-CI enumerades a la Fig. 11 (Programa *MegAlign*). La primera columna indica els residus ancestrals. En negreta, els canvis que s'han donat amb major freqüència.

En base a la matriu d'identitat i divergència entre les diverses sHsps-CI (Fig. 11b), es pot generar un arbre filogenètic que proporciona una primera estimació de les relacions entre les diferents seqüències de sHsps-CI (Fig. 13). L'arbre mostra com la major proximitat entre les sHsps-CI de surera la presenten QsHsp10-CI i QsHspD-CI, tot i que cal tenir en compte que QsHsp10-CI està truncada. Ambdues s'assemblen més a Hsp17.4 de maduixera que a les altres sHsps de surera. QsHsp17.4-CI presenta la màxima similitud amb Hsp17.5 de castanyer, una altra llenyosa, amb una diferència d'únicament 5 aminoàcids i QsHspC-CI presenta major homologia amb una branca formada per gira-sol3, tabac1 i tabac2.

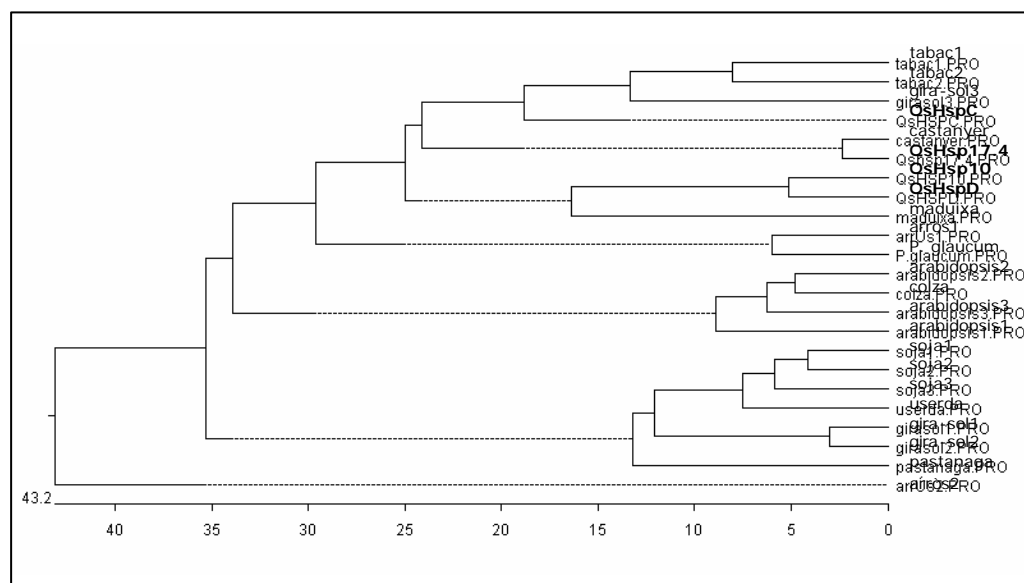


Figura 13. Relacions filogenètiques entre les seqüències proteiques de diferents sHsps-CI. La longitud de les branques indica la distància entre les seqüències (Programa *MegAlign*).

En una anàlisi evolutiva Waters i col·laboradors al 1996, tot i no disposar del gran nombre de seqüències de sHsps que es tenen actualment, van mostrar que les diferents classes de sHsps es van originar per duplicació gènica abans de la divergència dels grups principals d'angiospermes. El fet que dins la classe-CI algunes de les proteïnes d'una espècie s'assemblin més a proteïnes d'altres espècies que a les de la pròpia espècie, tal i com es pot veure a la Fig. 13 en surera, gira-sol, arròs i arabidopsis, indicaria que la diversificació dins la classe-CI també es va donar abans de la divergència de les angiospermes.

2. Anàlisi de l'expressió de *Qshsp17.4-CI* i *Qshsp10-CI*

S'ha analitzat mitjançant RT-PCR la possible inducció de *Qshsp17.4-CI* i *Qshsp10-CI* en tiges de plàntules de surera en resposta a estrès tèrmic (42°C, 5h) i oxidatiu (5% H₂O₂, 5h). A partir de RNA total es va realitzar una RT utilitzant com a encebador oligod(T). Seguidament, el cDNA generat es va amplificar per PCR utilitzant diferents parelles d'oligonucleòtids (a l'apartat 3.3.3 del Material i mètodes es descriu la seva posició):

- **HS3 i HS4**, estan dissenyats sobre *Qshsp17.4* en regions altament conservades de les sHsp-CI de plantes. Per tant, amplifiquen *Qshsp17.4-CI* amb una elevada eficiència i totes les sHsps-CI amb una eficiència depenent de l'homologia entre el gen a amplificar i els oligonucleòtids. Amplifiquen un fragment de 390 pb a *Qshsp17.4-CI* i de 387 a *Qshsp10-CI*.

- **Hsb2 i Hsb3**, tot i l'elevada homologia entre *Qshsp17.4-CI* i *Qshsp10-CI* aquests oligonucleòtids, dissenyats a les regions menys homòlogues entre ambdós gens, permeten una amplificació específica de *Qshsp10-CI* (Fig. 14a). Amplifiquen un fragment de 246 pb.

- **EF1aFw i EF1aRv**, amplifiquen el factor d'elongació de la polimerasa, un gen constitutiu que s'utilitza per normalitzar la quantitat de cDNA de partida en totes les amplificacions.

En tiges de plàntules de surera *Qshsp17.4-CI* i altres sHsps-CI s'expressen fortament després d'un tractament a 42 °C durant 3 h. En canvi, no s'observa expressió de *Qshsp10-CI* en aquestes condicions. Després d'un tractament amb estrès oxidatiu per H₂O₂ s'indueixen lleugerament tant *Qshsp10-CI* com sHsps-CI

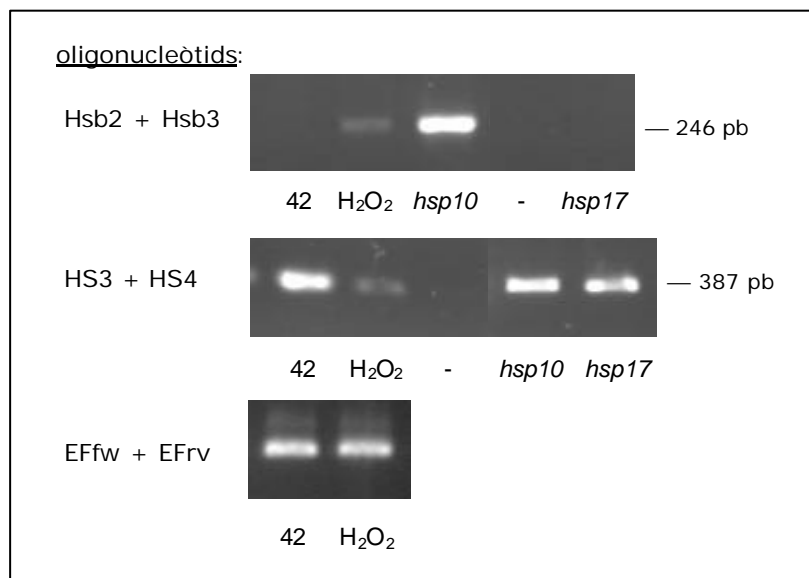


Figura 14. Nivells d'expressió de: *Qshsp10-CI* i altres sHsps-CI utilitzant els oligonucleòtids Hsb2 i Hsb3 (a); *Qshsp17.4-CI* utilitzant els oligonucleòtids HS3 i HS4 (b); i nivells del gen constitutiu EF1α (c) en tiges de plàntules de surera sotmeses 5 h a estrès tèrmic (42°C) o oxidatiu (5% H₂O₂). *hsp10* i *hsp17* representen l'amplificació de DNA control dels gens *Qshsp10-CI* i *Qshsp17.4-CI* respectivament.

(Fig. 14). Per tant, en general les sHsp-CI de surera, principalment *Qshsp17.4-CI*, s'expressen molt més fortament en resposta a l'estrès tèrmic que a l'oxidatiu. *Qshsp10-CI*, en canvi, sembla tenir un patró d'expressió diferent, induint-se per H_2O_2 però no per calor. Cal notar que la proteïna recombinant rQshsp10-CI ha mostrat una acció protectora de cèl·lules d'*E. coli* en condicions d'estrès oxidatiu (article II).

La quantificació més precisa del nivell d'expressió de cada shsp-CI en resposta a diferents estressos requeriria la utilització de PCR a temps real. La PCR convencional ens és útil, no obstant, per fer estimacions semi-quantitatives quan la quantitat de producte no ha arribat encara a saturar la reacció.

3. Assajos dirigits a l'obtenció de la seqüència completa de *Qshsp10-CI*

Per tal d'obtenir la seqüència completa de *Qshsp10-CI* s'han realitzat dues aproximacions diferents, el crivellat d'una llibreria de cDNA de fel·lema de surera i la realització d'una TAIL-PCR, però, amb cap d'elles s'ha pogut obtenir el clo sencer.

Crivellat d'una llibreria de cDNA

El crivellat de 35.000 clons d'una llibreria d'expressió de fel·lema de surera utilitzant com a sonda els 387 parells de bases clonats de *Qshsp10-CI* marcats amb digoxigenina no va permetre obtenir el clo sencer de *Qshsp10-CI* sinó que *Qshsp17.4-CI* va ser la única sHsp obtinguda. L'elevada homologia entre *Qshsp17.4-CI* i *Qshsp10-CI* i la inclusió de la seqüència dels oligonucleòtids a la sonda, no van permetre seleccionar aquesta última en les condicions d'astringència utilitzades. Aquest fet indicaria un predomini de *Qshsp17.4-CI* en l'mRNA de les cèl·lules del fel·lema a partir de les quals es va realitzar la llibreria.

Recentment ha estat descrit un mecanisme, l'NMD (*Nonsense-mediated mRNA decay*), pel qual els trànscrips d'mRNA amb mutacions que generen codons stop prematurs (*nonsense*) podrien ser eliminats en les cèl·lules eucariotes disminuint, d'aquesta manera, la seva vida mitja (Moore 2002). Si aquest mecanisme actués sobre els mRNAs de *Qshsp10-CI*, podria explicar la dificultat de clonar-los a partir d'una llibreria d'expressió.

TAIL-PCR

La TAIL-PCR (Thermal asymmetric intercalated-PCR; Liu i Whittier, 1995) és una tècnica que permet amplificar fragments de DNA adjacents a seqüències conegudes utilitzant un oligonucleòtid específic, en aquest cas de *Qshsp10-CI*, junt amb uns altres de més curts i degenerats (*AD primers*) dissenyats per trobar al genoma, per atzar, una diana cada 1000-2000 parells de bases. La tècnica es basa en alternar cicles de PCR a temperatures d'aparellament altes i baixes. Com que aquest mètode és propens a generar artefactes, després de la primera amplificació per PCR es realitza una segona amplificació utilitzant un oligonucleòtid específic més a 5' que el primer (*nested primers*).

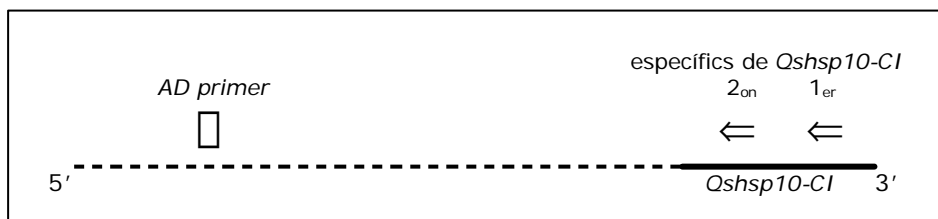


Figura 14. Esquema de TAIL-PCR sobre DNA genòmic de surera.

Després de les dues amplificacions esperariem obtenir un fragment de DNA que a 5' tindria una seqüència del genoma de la surera que ha hibridat amb un dels oligonucleòtids degenerats i a 3' l'oligonucleòtid específic (Fig. 14). Tot i que els AD primers provats (AD2 i AD3) van ser dissenyats pel genoma d'*Arabidopsis* (Liu i Whittier, 1995) i han donat bons resultats per una espècie tan llunyana com el blat de moro (Hernández et al. 2002), no han permès obtenir cap banda específica en surera. La llunyania i diferències entre el genoma d'aquestes tres espècies en podria ser la causa.

III.2. Variabilitat genètica de *Qshsp17.4-CI*

L'estrès oxidatiu provoca lesions al DNA que poden produir errors en la replicació, transcripció o traducció i generar proteïnes aberrants. En aquest apartat s'ha volgut estudiar l'efecte que té l'estrès oxidatiu al qual estan sotmeses les cèl·lules del fellema, en la variabilitat dels àcids nucleics. Amb aquest objectiu i en col·laboració amb el grup del Dr. Jordi Gómez de la unitat d'Hepatologia de l'Hospital General Universitari Vall d'Hebrón, ens vam proposar determinar la taxa de mutació de la regió codificant del gen *Qshsp17.4-CI* en mRNA i DNA de fellema i àpex radicular, un teixit jove i en creixement actiu.

Sorprenentment, vam detectar en el fellema unes taxes de mutació molt elevades (1/1784 pb en mRNA i 1/1520 pb en DNA genòmic) i similars a les dels virus d'RNA d'evolució ràpida (article III). Aquest nivell de mutacions no havia estat descrit mai per cap genoma nuclear eucariota. Amb aquestes taxes de mutació, 1/3 dels mRNAs del fellema de la surera contindrien missatges aberrants i la supervivència de les cèl·lules es veuria compromesa. Això implica que el fellema hauria de ser considerat com un mosaic de cèl·lules genèticament heterogènies, i per tant, una sola seqüència no defineix en tota la seva amplitud un gen en aquest teixit. Amb l'objectiu d'aprofundir en el coneixement de les mutacions que es donen en aquests dos teixits i per tal de poder fer una anàlisi qualitativa més completa que permetés especular sobre el seu origen, es va adaptar en surera un mètode desenvolupat per la detecció de mutacions minoritàries en el virus de l'hepatitis C (VHC) (article IV). Les mutacions detectades en fellema en els articles III i IV es corresponen amb les que, en altres sistemes d'àcids nucleics no nuclears (plasmidis, fags i DNA bacterià), s'han

relacionat amb l'estrès oxidatiu. En conseqüència, l'estrès oxidatiu al qual estan sotmeses les cèl·lules del fel·lema podria ser el causant de l'elevada taxa de mutació detectada. A més, s'ha volgut analitzar químicament (en col·laboració amb el Dr. Matt Whiteman del Departament de Bioquímica de la *National University of Singapore*) el tipus productes d'oxidació de les bases del DNA que s'acumulen en brots de plàntules de surera en resposta a agents oxidants. S'ha observat inducció de bases amb diferents modificacions per oxidació. Cadascuna d'aquestes modificacions pot causar unes determinades mutacions degut a aparellaments incorrectes durant la replicació o la transcripció del DNA. Els danys induïts en plàntules de surera a conseqüència d'agents oxidants produeixen majoritàriament el mateix tipus de mutacions que s'han observat a l'mRNA de fel·lema.

La major sensibilitat d'aquest nou mètode ha permès ampliar l'espectre de mutacions que es donen en fel·lema i trobar mutacions en molècules de mRNA de rel, teixit en el qual amb el mètode de clonatge i seqüenciació utilitzat a l'article III, no n'havíem trobat. Tot i això, el tipus de mutacions trobades no estan relacionades amb l'estrès oxidatiu sinó amb errors en la reparació dels àcids nucleics.

FEBS letters. Vol. 472, no. 1, April 2000 pp. 1445-1452

[doi:10.1016/S0014-5793\(00\)01424-1](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)01424-1)

<http://www.febsletters.org/article/PIIS0014579300014241/abstract>

Large accumulation of mRNA and DNA point modifications in a plant
senescent tissue

Maria Pla^a, Anna Jofré^a, Maria Martell^o, Marisa Molinas^a, Jordi Gómez^o

^a Laboratori del Suro, Universitat de Girona, Campus Montilivi sn, E-17071 Girona, Spain

^o Liver Unit, Department of Medicine, Universitat Autònoma de Barcelona, Hospital General Universitari Vall d'Hebron, E-08035 Barcelona, Spain

Received 26 January 2000. Available online 20 April 2000

Abstract

Although nucleic acids are the paradigm of genetic information conservation, they are inherently unstable molecules that suffer intrinsic and environmental damage. Oxidative stress has been related to senescence and aging and, recently, it has been shown that mutations accumulate at high frequency in mitochondrial DNA with age. We investigated RNA and DNA modifications in cork, a senescent plant tissue under high endogenous oxidative stress conditions. When compared to normally growing young tissue, cork revealed an unexpected high frequency of point modifications in both cDNA (Pn=1/1784) and nuclear DNA (Pn=1/1520). Cork should be viewed as a mosaic of genetically heterogeneous cells. This has biological implications: it supports somatic mutation models for aging and challenges 'single cDNA clone' as descriptor for the molecular genetics of senescent tissues.

Author Keywords: mRNA damage; DNA damage; Point mutation; Senescence; Oxidative stress; Heat-shock protein

Article IV

Oxidative and spontaneous modifications in plant genomic
DNA and mRNA

Oxidative and spontaneous modifications in plant genomic DNA and mRNA

Anna Jofré¹, Jordi Gómez², Matt whiteman³, Beatriz Cabot², Marisa Molinas^{1,*} and Maria Pla^{1,4}

¹Laboratori del Suro, Facultat de ciències, Universitat de Girona, Campus Montilivi, Girona E-17071, Spain

²Liver Unit, Department of Medicine, Universitat Autònoma de Barcelona, Hospital General Universitari Vall d'Hebron, Barcelona E-08035, Spain

³Department of Biochemistry, National University of Singapore, 10 Kent Ridge Crescent, 119260 Singapore

⁴ Present address: Tecnologia dels Aliments INTEA-EQATA, Universitat de Girona, E-17071 Girona, Spain

*Corresponding author; e-mail: marissa.molinas@udg.es

Abstract

The nuclear plant genome accumulates a high level of mutation in the oxidatively stressed cork cells from *Quercus suber*. Here, we *in vitro* selected mutant sequences of the *Qshsp17.4-CI* mRNA population from cork cells. We show a characteristic pattern of mutations with predominance of TA→AT (35.7%), CG→AT (14.3%) and CG→TA (28.6%) mutations, all associated to oxidative stress damage. The sensitivity of the method allowed the detection of some mutant sequences in root tip, a young and actively growing tissue. They were predominantly AT→GC (77%), which has been related with deficient DNA repair. We used *Q. suber* shoots treated or not with H₂O₂ as a model system to chemically analyse DNA modifications that arise in response to oxygen radicals. Hydroxyl radical-derived modified bases appeared after H₂O₂ treatment. We show a correspondence between the mutagenic properties of the major DNA modifications and the major mutations found in cork mRNA. Taken together, our results are consistent with the normal cell operations producing a basal level of mutations, and the abnormal level of oxygen radicals generated in cork cells resulting in an additional accumulation of other type of mutations.

Introduction

We previously showed that a nuclear plant genome may undergo a high frequency of mutation which, in turn, may cause numerous aberrant messages and ultimately lead to cell death. This was the case of cork, the outermost covering tissue (bark) in *Quercus suber L.* It is a senescent plant tissue directly exposed to external oxidative agents such as UV radiation, and also submitted to high endogenous oxidative stress due to H₂O₂ generated by cell wall lacases and peroxidases during the suberification process. Cork cells revealed an unexpectedly high frequency of point mutations in both nuclear DNA and mRNA, with mutation rates of 1/1520 and 1/1784, respectively, similar to those detected in quick evolving RNA viral quasispecies. According to that, the genetic integrity of cork cells is not maintained and cork should be viewed as a mosaic of genetically heterogeneous cells (Pla et al. 2000).

To further analyse the spectrum of mutations in cork nucleic acids, it was important to sequence a high number of mutant molecules. One of the problems associated with this task, when using the direct cloning and sequencing method, was that increasing the number of sequenced clones led to the accumulation of redundant information represented by the most abundant sequences while rare sequences, minority represented, become difficult to obtain. Available information regarding spectra of mutations is based on a functional selection of mutant sequences. Oxygen radicals induce a characteristic pattern of mutations in DNA from bacteriophages (Decuyper-Debergh et al. 1987), bacteria (Storz et al. 1987, Schapper et al. 1987), plasmids in cultured mammalian cells (Moraes et al. 1990) and mitochondria (Michikawa et al. 1999). Moreover, in epidermal actinic keratoses, the p53 gene has a characteristic pattern of sunlight-derived mutations (Ziegler et al. 1994). An alternative method to selectively rescue mutant sequences out of a complex DNA population has been recently developed by Cabot i Gómez (2002). This method was used to analyse the pattern of sequences that form Hepatitis C virus (HCV) quasispecies. It was based on the use of restriction enzymes to selectively digest wild type sequences and thus excluding them from the subsequent analyses. Here we report on the adaptation of this new method to study the complexity of the mRNA population of a plant nuclear gene in cork and other tissues.

Oxidative base modification has been shown to have premutagenic properties (Jaruga and Dizdaroglu, 1996; Wang et al. 1998; Cadet et al. 1999). Mutations can arise by either chemical modification that directly changes the base; or insertion of incorrect bases due to mispairing during DNA replication or transcription (Ninio, 1991). Approximately 20 major products of oxidative damage to DNA can be

characterised by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS), including purine- and pyrimidine-derived bases. This method provides both precise identification of molecules with structural evidence and quantification of a large number of modified bases (Dizdaroglu 1985; Fuciarelli et al. 1989). H_2O_2 , through generation of $\cdot OH$, induces a characteristic pattern of DNA modifications in mammalian cells (Dizdaroglu et al. 1991). For a number of individual oxidative lesions the structure and mutagenic properties are well characterised (for a review, see Wang et al. 1998). This is the case of 8OHGua, a potent mutagen that has been proposed to be an index of oxidative damage.

Normal cellular aerobic metabolism produces oxygen radicals as by-products that cause damage to nucleic acids. Repair mechanisms are necessary to maintain the genetic integrity of cells. Lesions derived from endogenously produced oxygen radicals have been proposed as major contributors to ageing and the degenerative diseases associated with it. The root tip is an actively growing young tissue that, if grown under controlled conditions, can be used as a model tissue to study the spontaneous mutations that occur in response to normal aerobic metabolism in spite of regular repair mechanisms.

Here, we report on the mutational analysis of the *Qshsp17.4-CI* mRNA, corresponding to a small heat-shock protein highly expressed in cork and induced upon oxidative stress in cork tissues (Pla et al. 1998). We show a characteristic pattern of mutations in cork. Moreover, we have been able to detect mutations in root tip, a normally growing young tissue, although with a different pattern.

GC-MS results reveal the appearance of hydroxyl radical-derived modified bases in *Q. suber* shoots treated with H_2O_2 . Facing the impossibility of GC-MS analysing cork DNA, this model system allowed us to get insight into the pattern of chemical modifications that may occur in cork as a consequence of oxygen radicals. We discuss the correspondence between cork mRNA mutation and H_2O_2 -treated shoots DNA modifications, which seems to indicate that oxidative lesions might play an important role in the integrity of cork nucleic acids.

Materials and methods

Plant material and mRNA extraction.

A sheet of pure cork (phellem) tissue was peeled off from an actively growing shoot of a cork oak tree (*Q. suber*), during June. Root tip tissue was obtained from the primary root of a single acorn from the same tree by germination in water-soaked peat. The seedling was allowed to grow for 1 month at 22°C and 70% humidity in a

light /dark cycle of 16/8 h. Then, a segment of 1.5 cm up from the root cap junction was sectioned for analysis. For details in apical organisation of the primary root see (Verdaguer and Molinas, 1999). RNA was extracted as Varadarajan et al. (1991) and Poly (A)+ RNA was purified with PolyA Tract System 1000 (Promega).

Selection and sequencing a significant number of mutant *Qshsp17.4-CI* mRNA transcripts

We adapted to *Q. suber* an *in vitro* selection method recently developed by Cabot i Gómez (2002). It makes use of restriction enzymes to isolate mutant sequences different to the most abundant sequence. An average of 10^5 *Qshsp17.4-CI* mRNA copies from both cork and root tissue were *in vitro* reverse-transcribed with oligo d(T) (15 min at 42°C, 3 min at 95°C and 5 min at 5 °C) and PCR amplified with oligonucleotides HS3 (5'CTCTGAATTCGCAACGTGTTTCGACCCTTTC3') and HS4 (5'CTCTGAATTCGTGAGCACTCCATTCTCCAT3') containing *EcoRI* restriction sites (underlined). This yields a fragment of 390 bp of the *Qshsp17.4-CI* coding region (Pla et al. 2000). PCR amplifications were performed in 100 µl reaction volumes using 1 unit of High Fidelity Pfu DNA polymerase (Stratagene), 1x reaction buffer, 150 µM each dNTP and 23 pmol each primer. PCR mixtures were denatured at 95°C for 1 min and subjected to 30 cycles of: 30 s at 95 °C, 45 s at 59 °C, 1 min at 72°C (in the last cycle 7 min at 72°C). The amplified fragments were digested with *EcoRI* and ligated into λgt11 arms (Amersham Pharmacia Biotech). The ligation reactions were packaged and the λgt11 phages used to infect *E. coli* 1090r- host strain. 10^5 phages were plated and DNA was purified with *Wizard Lambda Preps DNA Purification System* (Promega).

Nine different restriction enzymes with 1 single cleavage site were used to specifically select mutant sequences. They had a sequence target of 6 (*BsmI*), 5 (*AlwI*, *BseNI*, *BsmFI*, *BseGI* and *HphI*) or 4 (*BseDI*, *BseLI* and *ScrFI*) base pairs. Aliquots of 75 ng of purified λgt11 phage DNA were independently digested with one of the selected RE for 2 h in a volume of 5-10 µl, and PCR amplified with HS3 and HS4 oligonucleotides. PCR mixtures were denatured at 95°C for 1 min and subjected to 20 cycles of: 20s at 95 °C, 25s at 59°C and 4 min at 72°C. Digestion of the *Qshsp17.4-CI* fragment with each of the selected RE should render wild type sequences unable for amplification. Only the sequences carrying a mutation in a particular cleavage site should not be cut and thus susceptible to PCR amplification. Although control DNA appeared completely digested in agarose gel, the PCR products were further purified (Concert, GibCo) and digested with the same RE to minimise the appearance of false-resistant bands due to partial digestion. Half of each digestion reaction was loaded on an agarose gel and the rest was dephosphorilated

to avoid re-ligation of the wild type sequences, *EcoRI* digested and cloned into pUC18 vector previously digested with the same enzyme. Transformed cfus were independently cultured in LB media plus 50 µg/ml ampicillin. Plasmid DNA was purified and sequenced using the ABI PRISM dRhodamine terminator cycle sequencing ready reaction kit and an ABI PRISM 310 device (Applied Biosystems). Identical mutations obtained from different clones were considered only once since they may arise from the same mRNA molecule (through PCR amplification). The occurrence of each mutation was normalised according to the frequency of each wild type nucleotide in the 42-nucleotide positions of the restriction sites.

Analysis of DNA base modification by gas chromatography-mass spectrometry.

1-month-old cork oak plantlets were treated for 5 and 10 h in 5% H₂O₂ solution. Control plantlets were incubated in water. Shoot DNA was extracted from control and H₂O₂ treated plantlets using Plant XL DNA extraction kit (Machery-Nagel) following the instructions of the manufacturer and eluting the DNA with water. For Gas Chromatography-Mass Spectrometry, hydrolysis of lyophilised DNA samples, trimethylsilylation and analysis of trimethylsilylated hydrolysates by GC-MS were performed essentially as previously described (Spencer et al. 2000).

Results

Selection of RE resistant sequences.

With the aim of isolating and sequencing a significant number of mutant *Qshsp17.4-CI* mRNA transcripts we adapted to *Q. suber* an *in vitro* selection method recently developed by Cabot i Gómez (2002). We selected 9 different RE with cleavage sites of 6, 5 or 4 base pairs, covering together 42 nucleotide positions distributed as 28.6 % AT and 71.4 % GC that correspond to 11.4 % of the gene fragment.

As shown in Fig. 1 we detected cork *Qshsp17.4-CI* sequences resistant to all the restriction enzymes analysed. This is in accordance with the high mutation rates described previously in cork tissue (Pla et al. 2000). Interestingly, we were also able to detect *BseNI*, *BsmI* and *AlwI* resistant *Qshsp17.4-CI* sequences when root mRNA was used as template. However, at this stage we could not discard digestion efficiency below 100%.

As expected, we did not obtain any transformed cell from root *Qshsp17.4-CI* digested with the enzymes not showing any amplified sequence in the agarose gel (*ScaI*, *BseDI*, *BseGI*, *BseLI*, *BsmFI* or *HphI*, Fig.1). Sequencing of the *Qshsp17.4-CI* insert from all positive clones rendered a proportion of wild type restriction sites,

indicating a certain degree of partial digestion which affected all RE. It varied from 1/2 (*HphI* and *BseNI*) to 8/9 (*AlwI*) and was independent from the DNA source (cork or root) (Table1). Clones obtained from transformation of the faintest bands in the agarose gel, corresponding to *ScrFI* and *BseGI* (cork) and *AlwI* (root) digestions, rendered only 1, 3 and 5 clones corresponding to wild type sequences. Thus, bright bands in the agarose gel included RE resistant sequences; while in the faintest bands we have not always been able to detect mutant restriction sites.

Cork and also root tip cells contain mutant Qshsp17.4-CI mRNA molecules.

A total of 39 clones were found to contain mutation in a RE site in cork *Qshsp17.4-CI* mRNA, and 25 in root mRNA. In all cases mutations corresponded to single point base substitutions. After excluding identical mutations found at least in 2 different clones from the same tissue, we identified 15 different cork *Qshsp17.4-CI* mRNA molecules with a single point mutation in the 42 base positions analysed. Surprisingly, we also identified 7 different mutant *Qshsp17.4-CI* mRNA molecules in *Q. suber* root tip.

To exclude PCR, digestion and cloning artefacts as potential source for the cDNA observed mutations; we submitted to the whole analysis a sequence including a single point mutation in the *BsmI* RE site as a control. All sequences selected through *BsmI* digestion (21 clones) were identical to the original one. We analysed in parallel a wild type sequence and selected mutants by digestion with *BsmI*. As expected, we only obtained wild type sequences (10 clones) due to partial digestion.

Different spectra of Qshsp17.4-CI mRNA mutations in cork and root tip.

The distribution of mutations along the cleavage sites was analysed (Table 2). Cork *Qshsp17.4-CI* mutations were regularly distributed, except for nucleotides 110 to 113 and 118 to 121 (comprising *BseNI* and *BsmFI* restriction sites) where 2 out of 3 possible base substitutions were found in G residues belonging to a CTGG motif. Although less abundant, all mutations identified in root tip sequences were concentrated in nucleotides 113 to 116 and 408 to 411.

Table 3 summarises the type of mutations found in cork and root tip mRNA. They were all single base substitutions, but their nature was substantially different in both tissues. Cork mRNA showed at least 5 of the 6 possible base substitution mutations whereas root tip showed only 2. The most frequent base substitution in cork was TA→AT (35.7 %), followed by CG→TA (28.6 %), AT→GC (11.9 %) and finally CG→GC (9.5 %), being the ratio of transitions to transversions 1:1.5. This essentially agreed with the frequency of each substitution reported for the whole *Qshsp17.4-CI* 290 bp fragment, although the number of mutant sequences was then

very low (Pla et al. 2000). In contrast, 77.0 % of the root tip mRNA changes were AT→GC and 23 % were CG→TA. In this tissue we only found transitions.

Oxidative DNA base lesions after H₂O₂ exposure.

We compared oxidative DNA base modifications in shoots of control plantlets and plantlets exposed to 5% H₂O₂ for 5 and 10 h by GC-MS analysis. We analysed twelve major products of oxidative damage to DNA, including 6 pyrimidine-derived (Thymine glycol (TG), 5-(hydroxymethyl) hydantoin (5-OHMeHyd), 5-Formyl Uracil, 5-OH Uracil, 5-(OH,Me)Uracil and 5-OH Cytosine) and 6 purine-derived lesions (Fapy Adenine, 8-OH Adenine, Xantine, Fapy Guanine, 2-OH Adenine and 8-OH Guanine). A significant extent of all modified DNA bases was observed in 5% H₂O₂ treated plantlets and, except for 8OH Guanine, also in control plantlets. However, the pattern of base lesion was different in H₂O₂ treated and untreated shoots (Fig. 2).

Upon treatment with 5% H₂O₂ for 5 h, the levels of modified bases increased by 0.7 to 67-fold. 8OHGua and 2OHAda increased 67- and 17.6-fold; 8OHAda, Xan and FapyGua increased 3.6-, 2.7- and 2.7-fold, respectively and TG, 5OHUra, 5OHMeHyd, 5FormylUra, 5OHMeUra, 5OHCyt and FapyAde increased less than 2.4-fold when compared to control plantlets.

5OHUra and Xan kept accumulating after 10 h of exposure to H₂O₂, reaching 3.6- and 12-fold levels, respectively, when compared to control plantlets. In contrast, most of the base products of oxidative damage decreased in relation to values found after only 5h of H₂O₂ treatment. 8OHGua, 2OHAda, 8OHAda, FapyGua, TG and 5FormylUra slightly decreased but 5OHMeHyd, 5OHMeUra, 5OHCyt and FapyAde reached the background levels found in control plantlets.

Accumulation of DNA lesions upon H₂O₂ treatment was significantly different depending on the particular modification (see Fig. 2). As shown in Fig. 3, there was a predominance of oxidised purines (A and G, especially FAPyGua and 8OHAda) above oxidised pyrimidines (C and T), and that was more remarkable (up to 85.6%) in H₂O₂ treated than in control shoots.

Discussion

In cork, a senescent plant tissue submitted to high endogenous oxidative stress, *Qshsp17.4-CI* undergoes a high frequency of point mutation at both, the genomic DNA and mRNA level (Pla et al. 2000). In this report we further analysed the spectrum of mutations in cork mRNA, which can arise from damage to DNA, mRNA

or the cellular pool of nucleotides. As a control, we used the root tip of *Q. suber* plantlets.

Unexpectedly, the method used to rescue minority mutant sequences allowed the identification of *Qshsp17.4-CI* mRNA molecules with a single point mutation not only in cork but also in the control tissue. This indicated that a young and actively growing plant tissue does undergo a certain degree of spontaneous mutation. In a previous report (Pla et al. 2000) we described a mutation rate of 1/1784 nucleotides in the same region of *Qshsp17.4-CI* mRNA from cork but not from root tip (mutation rate below 1/12250 nucleotides). However, in this report we show that the nature of the mutations found in both tissues is substantially different. We thus conclude that the RE-based selection of mutant sequences allowed a highest sensitivity than the direct cloning and sequencing method used before.

Half of the mutations we found in cork (8 out of 15) and root tip (4 out of 7) *Qshsp17.4-CI* mRNA molecules were located within or adjacent to a CTGG motif. This seems to indicate that the distribution of mutations along the cleavage sites is, at least partially, sequence-dependent. Besides, the rest of the mutations identified in root tip sequences concentrated in 4 consecutive nucleotides, flanked by 2 purine runs. On the other hand, the rest of the mutations from cork distributed along the analysed sequences without a clear pattern, although most of them were within or next to GA-rich sequences. A GAGAG motif has been described to suffer a high frequency of deletions in neurons from Alzheimer disease patients. Our results support the idea that transcript mutation may be a widely occurring phenomenon in transcripts containing a susceptible motif, thus reflecting the influence of the DNA structure (van Leeuwen et al. 1989; Pla et al. 2000).

The substantial differences in the spectrum of mutations found in cork and root tip tissues support the hypothesis that accumulation of mutations depends on multiple components, each characterised by its own distinct pattern. Cork is a senescent tissue, submitted to a high endogenous oxidative stress as a consequence of an active suberin synthesis. The three most frequent types of mutation found in cork mRNA have been associated to oxidative damage. Chemical oxidants (Levin and Ames, 1986) and bacteria subjected to oxidative stress (Storz et al. 1987) predominantly result in TA→AT transversions. Oxidation of GTP to 8OHGua leads to CG→AT transversion (Taddei et al. 1997). CG→TA transition has been reported to appear as a consequence of sunlight, γ radiation, H₂O₂ and superoxide radicals in bacterial systems and cultured mammalian cells (Ziegler et al. 1994; Grosovsky et al. 1988; Glickman et al. 1980; Sargentini and Smith, 1994; Moraes et al. 1990;

Tkeshelashvili et al. 1991). However, the latter has also been associated to spontaneous mutation (Glickman et al. 1980; Moraes et al. 1990; Shaaper and Dunn, 1991; Sargentini and Smith, 1994) and was found, even though in low percentage, in root tip. Oxidative stress and damage to DNA is a necessary consequence of aerobic life as many by-products of endogenous metabolism are highly reactive species. DNA damage by endogenous free radicals occurs and accumulates *in vivo*, and there is a steady-state level of free radical-modified bases in cellular DNA (Fraga et al. 1990; Epe 2002).

The AT→GC transition has also been reported, although at a lower level, in control and oxidatively stressed bacterial or mammalian cells (Moraes et al. 1990; Grosovsky et al. 1998; Sargentini i Smith 1994; Ono et al. 1995). Moreover it was strongly associated to DNA replication errors in *E. coli* strains defective in mismatch correction (Shaaper and Dunn, 1987). This was the most frequent base substitution found in the root tip (77 %), and it was also present (but only 11.9%) in cork cells. The predominance of such a mutation in root tip *Qshsp17.4-CI* mRNA, a young and actively growing tissue, is consistent with the normal cell operations being the origin of this type of mutation. Moreover, in tissues submitted to genotoxic agents such as cork, other mutations become quantitatively more important.

Our results suggest that the endogenous oxidative stress suffered by cork cells could be one of the main causes of mutations in this tissue. In an attempt to evaluate the chemical nature of DNA damage occurring as a result of oxidative stress in *Q.suber*, which could entail mutant transcripts, we compared oxidative DNA base modifications in shoots of control plantlets and plantlets exposed to 5% H₂O₂ for 5 and 10 h by GC-MS analysis.

Treatment of shoots with 5% H₂O₂ produced an increase in the levels of all tested modified bases. The significant accumulation of typical hydroxyl radical-induced products of DNA bases (reviewed in von Sonntag, 1987) indicated the involvement of these radicals in the mechanism of nuclear DNA damage in *Q. suber* shoot cells caused by H₂O₂. The same type of DNA modifications were found in cultured human lymphoblast cells and murine hybridomas exposed to oxidative stress by H₂O₂ (Dizdaroglu et al. 1991; Jaruga and Dizdaroglu, 1996). Although with a different pattern of base lesions, our results indicated that young tissues such as shoots also are exposed to a basal level of oxidation, which is in agreement with GC-MS data from mammalian cells (Abalea et al. 1998; Fraga et al. 1990; Harris et al. 1994).

The rate of lesion accumulation should reflect the relationship between the rates of its formation and repair. After long exposure to H₂O₂, only 2 (5OHUra and Xan) base

modifications kept accumulating. Most of the base lesions dropped to moderate or background levels. These results would indicate the activation of repair pathways under oxidative conditions. Jaruga and Dizdaroglu (1996) reported that human cells form modified DNA base products upon H₂O₂ treatment that are repaired in a time-dependent manner in non-oxidative conditions. Little is known about the distribution and efficiency of DNA repair systems, but repair of some DNA modifications appears preferential than others. In general, the rate of repair of purine-derived lesions is slower than that of pyrimidine-derived lesions (Abalea et al. 1998; Jaruga and Dizdaroglu, 1996). This might explain the low levels of modified pyrimidines compared to purines detected in both control and H₂O₂ stressed plantlets.

H₂O₂ treatment induced a differential accumulation of particular DNA lesions, with a predominance of oxidised purines above oxidised pyrimidines that might be due to the high reactivity of ·OH toward guanine residues in cells (Dizdaroglu, 1992). If unrepaired, lesions persist in nucleic acids and can inhibit replication, transcription and cause mutagenesis. We could speculate that the same type of modifications would affect the mRNA molecules in the same cells. Moreover, single-stranded RNA is more susceptible to lesions than double-stranded DNA (Taddei et al. 1997). In agreement, 52.4% of mutations found in *Qshsp17.4-CI* mRNA in the endogenous oxidatively stressed cork cells affect purines, especially G. However, in control root tip cells the percentage of purine substitutions found in the same gene reached only 23%.

Pre-mutagenic properties of some base lesions have been described. In particular, 2OH-Ade and 5OHUra (strongly induced upon H₂O₂ treatment in *Q. suber* shoots) have been associated to AT→TA and CG→TA, respectively, in bacterial systems (reviewed in Wang et al. 1998). Those are the major mutations found in cork *Qshsp17.4-CI* mRNA. 8OHdG is formed by the direct attack of hydroxyl radicals on guanine and is the most distinctive oxidative biomarker of DNA damage. It was under the level of detection in *Q. suber* control shoots, and after H₂O₂ treatment it raised in a strong but transitory manner. It produces CG→AT transversions, one of the predominant mutations found in cork *Qshsp17.4-CI* mRNA.

The correlation between base modifications found in H₂O₂-treated young shoots and mutations in *Qshsp17.4-CI* mRNA of cork cells would suggest that the endogenous oxidative stress suffered along differentiation and senescence of cork cells may entail an accumulation of base lesions in nucleic acids, which may lead to aberrant transcripts and altered proteins synthesis. Moreover, young and actively growing tissues are also subjected to a certain degree of base lesions and mRNA mutations.

However, both mutational spectrum and accumulation levels are different compared to oxidatively stressed tissues.

References

- Abalea V, Cillard J, Dubos MP, Anger JP, Cillard P, Morel I. (1998) *Carcinogenesis* 19:1053-1059.
- Cabot B i Gómez J. (2002) In preparation.
- Decuyper-Debergh D, Piette J, Van de Vorst A. (1987) *EMBO J.* 6:3155-61.
- Dizdaroglu M, Nackerdien Z, Chao BC, Grajewski E, Rao G. (1991) *Archiv Biochem Biophys* 285:388-390.
- Dizdaroglu M. (1992) *Mutation Res.* 275:331-342.
- Dizdaroglu M (1985) *Annal Biochem.* 144:593-603.
- Epe B. (2002) *Biol Chem.* 383:467-475.
- Fraga CG, Shinenaga MK, Park JW, Degan P, Ames BN. (1990) *Proc Natl Acad Sci USA.* 87:4533-4537.
- Fuciarelli AF, Wefher BJ, Gajewski E, Dizdaroglu M, Blakely WF. (1989) *Radiat Res.* 119:219-231.
- Glickman BW, Rietveld K, Aaron CS. (1980) *Mutation Res* 69:1-12
- Grosovsky AJ, de Boer JG, de Jong PJ, Drobetsky EA, Glickman BW. (1988) *Proc Natl Acad Sci USA.* 85:185-188.
- Harris G, Bashir S, Winyard PG. (1994) *Carcinogenesis* 15:411-413.
- Jaruga P, Dizdaroglu M. (1996) *Nucleic Acids Res* 24:1389-1394.
- Levin DE, Ames BN. (1986) *Environ Mutagen.* 8(1):9-28
- Moraes EC, Keyse SM, Tyrrell RM. (1990) *Carcinogenesis* 11:283-293.
- Pla M, Jofré A, Martell M, Molinas M, Gómez J (2000) *FEBS Lett* 472:14-16.
- Sargentini NJ, Smith KC (1994) *Mutation Res* 309:147-163.
- Shaaper RM, Dunn RL (1991) *Genetics* 129:317-326.
- Shaaper RM, Dunn RL. (1987) *Proc Natl Acad Sci USA.* 88:6220-6224.
- Spencer JPE, Whiteman M, Jenner A, Halliwell B. (2000) *Free Rad Biol Med.* 28:1039-1050.
- Storz G, Christman MF, Sies H, Ames BN. (1987) *Proc Natl Acad Sci USA.* 84, 8917-8921.
- Taddei F, Hayakawa H, Bouton MF, Cirinesi AM, Matic I, Sekiguchi M, Radman M. (1997) *Science* 278, 128-130.

Tkeshelashvili LK, McBride T, Spence K, Loeb LA. (1991) *J Biol Chem.* 266:6401-6406.

van Leeuwen FW, de Kleijn DPV, van den Hurk HH, Neubauer A, Sonnemans, MAF, Sluijs JA, Köycü S, Ramdjelal RDJ, Salehi A, Martens GJM, Grosveld FG, Burbach PH, Hol EM. (1998) *Science* 279, 242-247.

Varadarajan GS, Prakash CS (1991) *PI Mol Biol Rep.* 9:6-12.

Verdaguer D. and Molinas M. (1999) *Int J Plant Sci.* 160, 471-481.

von Sonntag C. (1987) *The Chemical Basis of Radiation Biology*, Taylor & Francis, London.

Wang D, Kreutzer DA, Eissigman JM (1998) *Mutation Res.* 400:99-115

Ziegler A, Jonason AS, Leffell DJ, Simon JA, Sharma HW, Kimmelman J, Remington L, Jacks T, Brash DE. (1994) *Nature* 372:773-776.

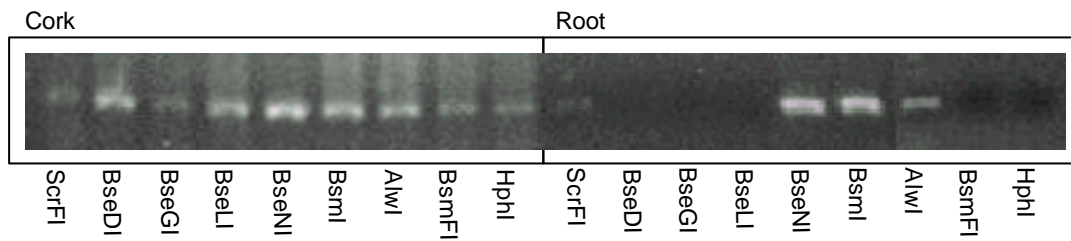


Figure 1. Cork and root tip *Qshp17.4-CI* amplification products after RE digestion.

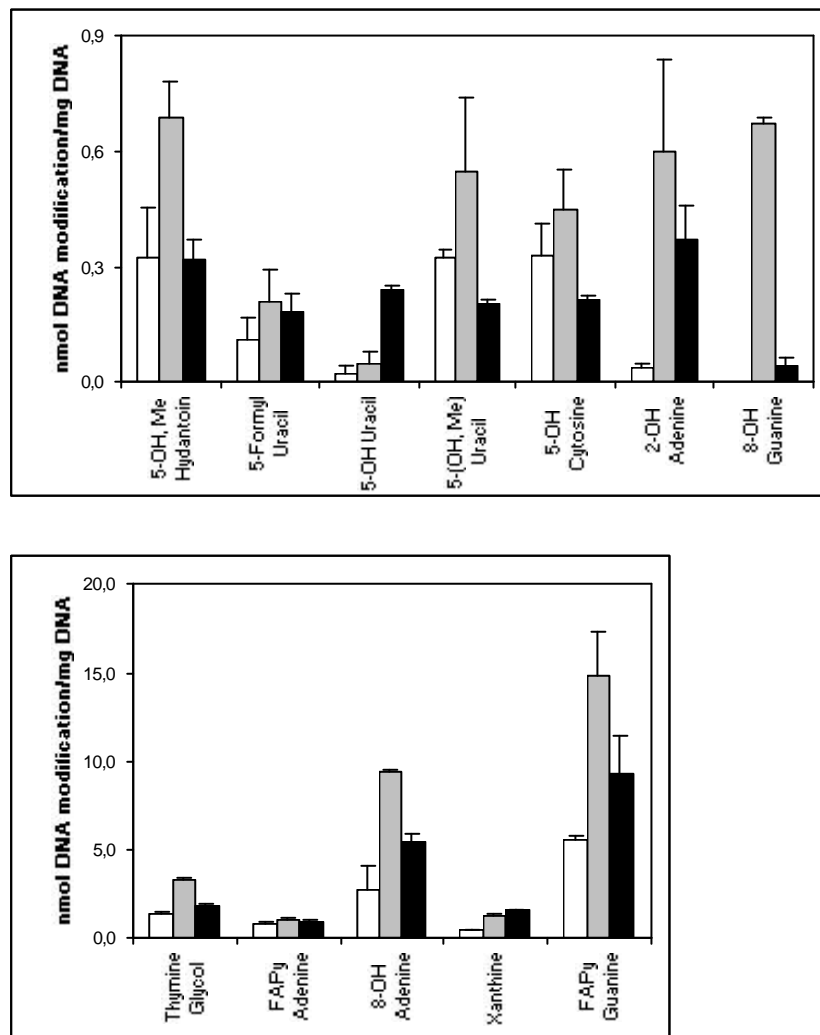


Figure 2. GC-MS measured yields of modified base products in DNA from *Q. suber* shoots either treated with 5% H₂O₂ for 5 h (grey) or 10 h (black) or untreated (white).

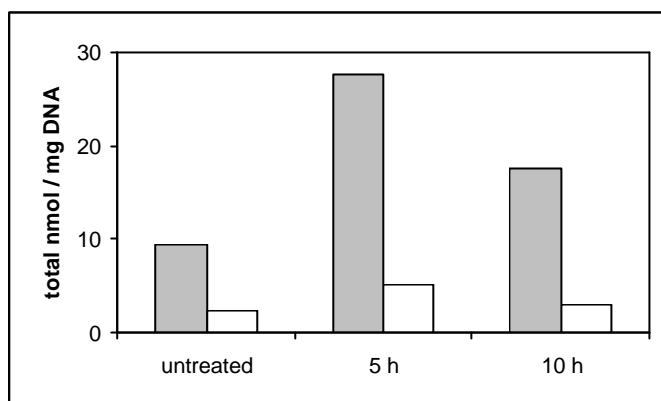


Figure 3. Total amounts of purines (grey) and pyrimidines (white) in *Q. suber* shoots either treated with 5% H₂O₂ for 5 h or 10 h or untreated.

Tissue	RE	Cleavage site	Mutant sequences	Proportion of mutant sequences ⁽¹⁾
Cork	<i>AlwI</i>	ggatc	2	1/8.5
	<i>BseDI</i>	cc gg	5	1/7.4
	<i>BseGI</i>	ggatg	-	⁽²⁾
	<i>BseLI</i>	cc gg	2	1/6
	<i>BseNI</i>	actgg	9	1/2.9
	<i>BsmFI</i>	gggac	6	1/3.3
	<i>BsmI</i>	gaatgc	2	1/6
	<i>HphI</i>	ggtga	1	1/2
	<i>ScrFI</i>	cc gg	-	⁽²⁾
Root	<i>AlwI</i>	ggatc	-	⁽²⁾
	<i>BseNI</i>	actgg	13	1/2.3
	<i>BsmI</i>	gaatgc	4	1/5.8

Table 1. Amount of cork and root tip *Qshsp17.4-CI* mRNA molecules with mutations in each RE cleavage sequence. RE cleavage sequences analysed and amount of cork and root tip *Qshsp17.4-CI* mRNA molecules with mutations in each RE site.

⁽¹⁾ Mutant sequences / total sequences.

⁽²⁾ Only wild type sequences were found.

Nucleotide position	103	158
<i>Qshsp17.4-CI</i>	5'...tttctc <u>ACTGG</u> acatct <u>GGGACC</u> catttga <u>GG</u> gctt...cctc <u>CCtcGG</u> ctcg...	
Cork	AAA T	AT T TC A
Root	GTCA	
RE	<i>BseNI</i>	<i>BsmFI</i> <i>BseLI</i> <i>BseDI</i>

244	276	402	432
tctt <u>CCAGG</u> tctg...ttga <u>GGATG</u> gtaa...caga <u>GAATGC</u> gaaggt <u>GGATC</u> a <u>GGTGA</u> aaggc...3'			
		AA	CT C
		GC T	
<i>ScrFI</i>	<i>FokI</i>	<i>BsmI</i>	<i>AlwI</i> <i>HphI</i>

Table 2. Spectra of mutations in cork and root tip *Qshsp17.4-CI* mRNA molecules. Underlined C belongs to both *BsmFI* and *BseLI* cleavage sequences.

Base substitutions	cork	root	Cork ⁽¹⁾
TA>AT	35.7 %	-	33.3%
TA>GC	-	-	-
CG>AT	14.3 %	-	22.2%
CG>GC	9.5 %	-	-
AT>GC	11.9 %	77.0 %	22.2%
CG>TA	28.6 %	23.0 %	22.2%

Table 3. Normalised percentage of each base substitution in cork and root tip *Qshsp17.4-CI* mRNA molecules. ⁽¹⁾From the 9 base substitutions found in Pla et al. (2000).

IV. DISCUSSIÓ GENERAL

IV. DISCUSSIÓ GENERAL

Aquest treball contribueix al coneixement de diferents aspectes de les sHsps-CI del fellema de la surera, especialment en relació a l'estrès oxidatiu. S'ha determinat el patró d'acumulació de sHsps-CI en diferents teixits de surera i en diferents condicions d'estrès i s'ha confirmat el caràcter multigènic de les sHsps-CI de surera. A més, una de les sHsps clonades ha permès determinar la importància d'alguns dels dominis de les sHsps-CI en relació a la protecció enfront l'estrès tèrmic i oxidatiu. En relació a l'estrès oxidatiu al qual es troben sotmeses les cèl·lules del fellema, s'ha mostrat que podria ser el causant de l'elevada taxa de mutació (la més alta que s'ha descrit en un genoma nuclear eucariota) que podria ser la desencadenant de la mort cel·lular d'aquestes cèl·lules.

Acumulació de QsHsp17.4-CI i altres sHsps-CI en fellema i diversos teixits de surera

La utilització d'anticossos policlonals anti-QsHsp14.4-CI junt amb l'elevada resolució que proporciona l'electroforesi bidimensional ha permès estudiar l'acumulació de la família de les sHsps-CI en surera. Donat l'elevat grau d'homologia entre les sHsps d'una mateixa classe, els anticossos presenten una reacció creuada dins la seva classe i no respecte altres classes (Jinn *et al.* 1993).

El patró d'acumulació de les sHsps-CI en surera és complex (Fig. 15). En condicions normals de creixement, les tiges de plàntules de surera i els embrions somàtics

immadurs i madurs, presenten un únic polipèptid a la regió de 17 kDa. En canvi, l'aplicació d'un estrès tèrmic a plàntules i embrions somàtics provoca l'acumulació, a més d'aquest polipèptid, d'una sèrie d'espècies proteiques més àcides i d'igual PM. El mateix patró es detecta en xilema, fel·lema i plàntules sotmeses a estrès hídric. Tanmateix, després del tractament amb H₂O₂ no es detecta cap sHsp-CI a la regió de 17 kDa.

La resolució per electroforesi 2D de QsHsp17.4-CI recombinant expressada en *E. coli* mostra que el polipèptid detectat en teixits control i almenys dues de les espècies proteiques àcides corresponen a QsHsp17.4-CI i modificacions posttraduccionals d'aquesta. La resta d'espècies proteiques detectades podrien ser altres modificacions posttraduccionals de QsHsp17.4-CI (que no han tingut lloc en *E. coli*) o ser sHsps codificades per altres gens. El patró de les sHsps de 17 kDa podria correspondre a un patró de fosforilació. Tot i que QsHsp17.4-CI conté seqüències diana per diverses quinases: CaMKII, CKI, CKII, GSK3, PKA i PKC (Phosphoprotein Database), assajos amb fosfatasa alcalina no han permès revertir el patró. Cap dels treballs publicats fins al moment indiquen que les sHsps-CI es regulin d'aquesta manera. L'única sHsp de planta que s'ha descrit que sigui fosforilada és ZmHsp23.8-M, una sHsp mitocondrial de blat de moro (Lund *et al.* 2001).

D'altra banda, els polipèptids que es detecten a la regió de ca. 10 kDa són totalment absents en plàntules en condicions controlades de creixement i en embrions immadurs i s'acumulen molt lleugerament després de l'aplicació d'un xoc de calor. En canvi, s'indueixen fortament per estrès oxidatiu i s'acumulen de forma constitutiva conjuntament amb QsHsp17.4-CI en fel·lema, xilema i embrions madurs. El fel·lema i el xilema són uns teixits sotmesos a un fort estrès oxidatiu endogen associat a la producció d'H₂O₂ que es dona en els processos de suberificació i lignificació, respectivament (Kolattukudy *et al.* 1984; Wojtaszek *et al.* 1997). En els embrions madurs, l'acumulació de sHsps-CI de ca. 10 kDa podria estar relacionada amb el desenvolupament dels vasos, un període de lignificació activa. L'acumulació conjunta en aquests teixits de les formes de 10 i 17 kDa es podria explicar per la situació de multiestrès a què es troben sotmeses aquestes cèl·lules.

La gran acumulació que presenten les sHsps-CI de ca. 10 kDa en el fel·lema i la inducció específica per estrès oxidatiu apunta a una possible funció protectora enfront aquest tipus d'estrès. Aquest fet es veu recolzat per l'acumulació d'aquestes espècies proteiques en xilema i per estrès tèrmic i hídric, situacions en les quals hi ha, en últim terme, una acumulació d'espècies d'oxigen reactives (Polle i Rennenberg, 1993).

En julivert Hsp17.9-CI, s'indueix per estrès oxidatiu generat amb ozó i per temperatura (Eckey-Kaltenbach *et al.* 1997). En altres classes, diverses sHsps també s'indueixen per estrès oxidatiu però cap d'elles ho fa de forma específica (Taula 1, pàg 18). L'especificitat per un tipus d'estrès també la presenta una sHsp-CII de gira-sol, que no s'indueix per temperatura però sí per estrès hídric en embrions (Carranco *et al.* 1997).

A més de les espècies proteiques descrites a les regions de ca. 10 i 17 kDa, en fel·lema també s'acumulen de forma específica diverses sHsps-CI àcides i d'un PM superior als 17 kDa (Fig. 15). Aquestes espècies podrien correspondre a alguna de les altres sHsps-CI clonades a partir d'aquest mateix teixit.

La família multigènica de les sHsps-CI en surera

El clonatge de tres noves sHsps-CI (*Qshsp10-CI*, *QshspC-CI* i *QshspD-CI*) a partir de mRNA de fel·lema, recolza la complexitat observada a nivell proteic en aquest i altres teixits de surera. També confirma que les sHsps en surera constitueixen una família multigènica que està formada almenys per quatre membres. Aquesta diversitat de sHsps-CI molt probablement reflecteixi un cert grau de divergència funcional i a nivell de regulació. En canvi, el castanyer, una planta llenyosa igual que la surera, i que té una sHsp-CI que comparteix un 95.5% d'identitat a nivell proteic amb *QsHsp17.4-CI*, anàlisis 2D i el crivellat d'una llibreria de cDNA han permès aïllar únicament una sHsp-CI (Soto *et al.* 1999).

D'entre les sHsps-CI clonades en surera, *Qshsp10-CI* codifica per la sHsp més petita descrita fins al moment. Dels 19 gens trobats en el genoma d'*Arabidopsis* que codifiquen per proteïnes relacionades amb les sHsps (Scharf *et al.* 2001) cap d'elles té un PM inferior al mínim establert per les sHsps (15 kDa) format per un domini N-terminal, un d' α -cristal·lí i una extensió C-terminal. Això apunta a què no totes les plantes tindrien sHsps de baix PM. Les úniques sHsps descrites amb un PM inferior als 15 kDa les formen la família de sHsps de 12.2 – 12.6 kDa del nemàtode *C. elegans*. La més petita, Hsp12.2, té un domini α -cristal·lí complet (83 aminoàcids) flanquejat per un domini N-terminal curt (25 aminoàcids) i una extensió C-terminal extremadament curta (2 aminoàcids) (Leroux *et al.* 1997a).

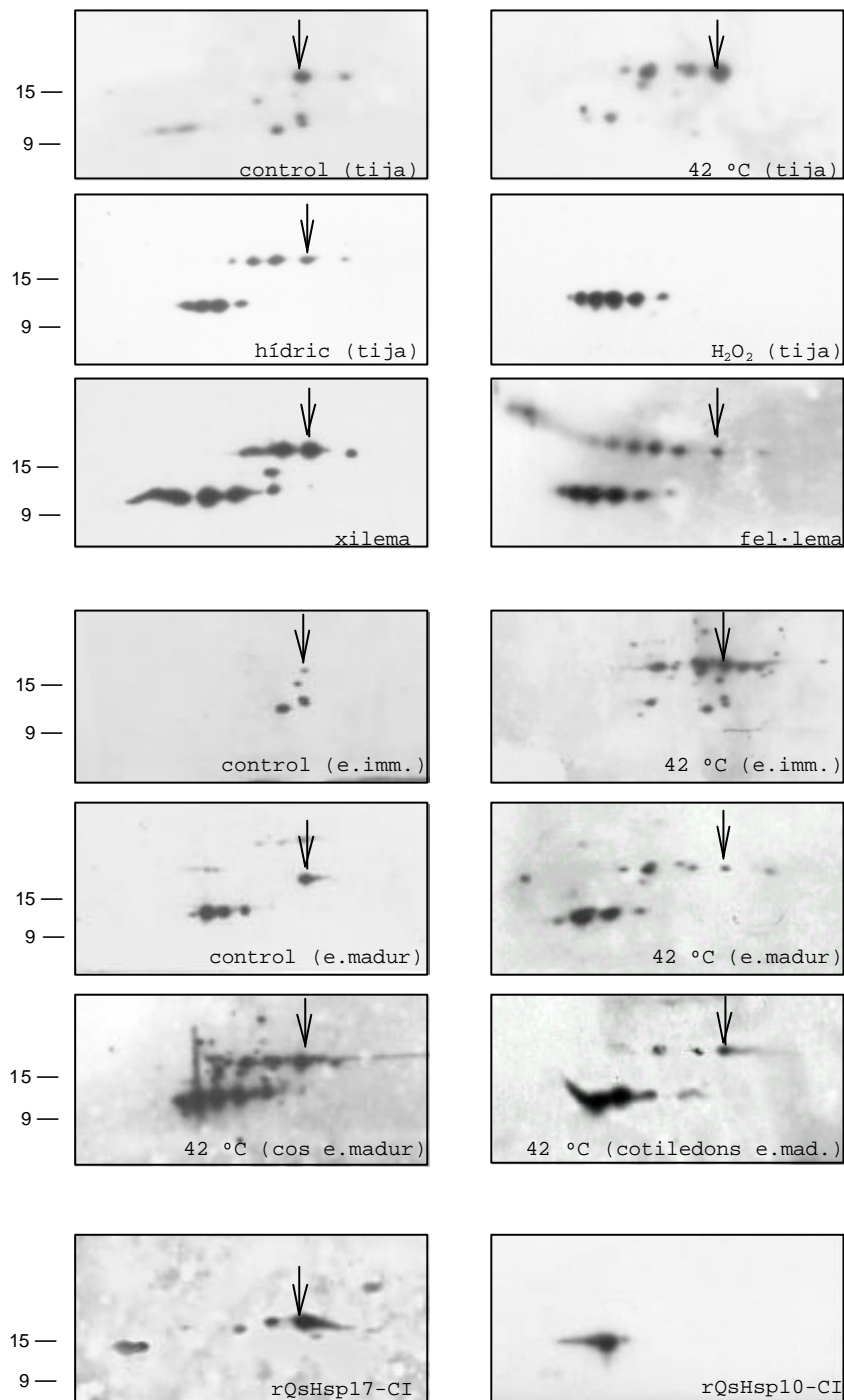


Figura 15. Immuodetecció de sHSPs-CI en gels 2D. Inclou les imatges publicades en els articles I i II i imatges que no havien estat mostrades prèviament (estrès hídric i rQsHsp10-CI). r indica proteïna recombinant; e. imm., embrió immadur; e. mad., embrió madur.

Qshsp10-CI és especialment rellevant perquè la important truncació que presenta provoca que a la proteïna que se'n deriva li manquin un 55% del domini α -cristal·lí i tota l'extensió C-terminal. És molt interessant el fet que aquesta truncació se situï just després de l'últim aminoàcid de la regió de consens II del domini α -cristal·lí, regió descrita com a lloc d'unió dels substrats desnaturalitzats (Lee *et al.* 1997).

Capacitat protectora in vivo de rQsHsp10-CI en condicions d'estrès. Importància de la regió de consens II

La sobreexpressió en *E. coli* de les proteïnes de fusió rQsHsp10-CI (que inclou la regió de consens II del domini α -cristal·lí) i rN49 (la mateixa proteïna a la qual s'ha eliminat tot el domini α -cristal·lí) ha mostrat que la proteïna recombinant rQsHsp10-CI però no rN49 augmenta la viabilitat de cèl·lules d'*E. coli* en condicions d'estrès tèrmic i, remarcablement, en condicions d'estrès oxidatiu. L'activitat xaperona *in vivo* i *in vitro* ha estat demostrada per diverses sHsps en condicions d'estrès tèrmic (Lee *et al.* 1995 i 1997; Collada *et al.* 1997; Soto *et al.* 1999; Yeh *et al.* 1997; Joe *et al.* 2000; Forreiter *et al.* 1997 i Löw *et al.* 2000) i recentment ha estat descrit que les posicions 73 a 78 de la regió de consens II de la sHsp-CI d'arròs OsHsp16.9 (que han estat eliminades a rN49) són essencials per l'activitat xaperona en condicions d'estrès tèrmic (Yeh *et al.* 2002). No obstant, rQsHsp10-CI és la primera sHsp-CI que protegeix no només enfront l'estrès tèrmic sinó també l'oxidatiu. Els resultats també mostren que la regió de consens II és essencial per la funció de rQsHsp10-CI en condicions d'estrès oxidatiu.

Correlació entre Qshsp10-CI i els polipèptids de ca. 10 kDa. Possible paper de Qshsp10-CI en fellema

Qshsp10-CI s'expressa en fellema, d'on ha estat clonada diverses vegades. A més, assajos de RT-PCR utilitzant oligonucleòtids específics mostren que la seva expressió s'indueix en resposta a l'estrès oxidatiu però no (almenys fins a nivells detectables) en resposta a la temperatura. Aquest patró apunta a una possible correlació entre el gen *Qshsp10-CI* i les sHsps-CI de ca. 10 kDa, ja que la proteïna deduida d'aquest gen tindria un PM d'aproximadament 10 kDa i, tant *Qshsp10-CI* com les sHsps-CI de ca. 10 kDa s'acumulen en el fellema i s'indueixen per estrès oxidatiu però no per temperatura.

No obstant, el grup d'espècies proteïques de ca. 10 kDa que es detecten en els gels 2D podrien estar codificades per diversos gens o correspondre a modificacions

posttraduccional. La resolució per electroforesi 2D de la proteïna de fusió rQsHsp10 mostra una única espècie proteica del tamany esperat (Fig. 15). Aquest fet indicaria que hi ha més gens al genoma de la surera que codifiquen per sHsps-CI de ca. 10 kDa però, cal tenir en compte que és una proteïna de fusió i en *E. coli* pot ser que no pateixi les mateixes modificacions posttraduccional que les cèl·lules de la planta.

La inducció específica per estrès oxidatiu, junt amb la capacitat d'augmentar la viabilitat de les cèl·lules d'*E. coli* sotmeses a aquest estrès que ha mostrat rQsHsp10-CI sembla indicar que *Qshsp10-CI* tindria un paper en el fellema de la surera en la protecció enfront l'estrès oxidatiu. Aquesta protecció podria fer-se extensiva a altres cèl·lules sotmeses directament o indirecta a estrès oxidatiu. En animals, l'expressió de sHSPs s'ha relacionat amb l'augment de la supervivència de les cèl·lules sotmeses a estrès oxidatiu i la prevenció de l'entrada en apoptosi de les cèl·lules en diferenciació (Arrigo, 1998).

Variabilitat del gen *Qshsp17.4-CI* en DNA i mRNA de fellema

L'estudi de la variabilitat del gen *Qshsp17.4-CI* mitjançant el clonatge i seqüenciació d'un elevat nombre de molècules de mRNA i DNA de la regió codificant de *Qshsp17.4-CI* ha mostrat en fellema unes taxes de mutació puntual molt elevades (mRNA 1/1784 pb i DNA 1/1520 pb) en comparació amb àpex de rel, un teixit jove i en creixement actiu (mRNA <1/12250 pb). Els valors d'hipermutació detectats en fellema són els més alts detectats en un genoma nuclear eucariota i són similars als dels virus d'RNA d'evolució ràpida (Martell *et al.* 1992; Meyerhans *et al.* 1989; Coffin 1995). Per tant, el fellema s'hauria de veure com un mosaic de cèl·lules genèticament diferents.

Unes taxes de mutació tan elevades provoquen que un terç dels trànscrips d'mRNA continguin missatges aberrants. D'aquests, una part es traduirà en proteïnes mutades ja que els canvis aminoacídics que poden provocar les mutacions són diversos (silenciosos, conservatius, no conservatius i generadors de codons stop). Aquestes mutacions, tal i com postula la teoria de l'envelliment cel·lular per acumulació de mutacions condueix a l'acumulació de danys a les cèl·lules i finalment a la mort cel·lular (Morley 1995).

Molt possiblement les taxes de mutació detectades al gen *Qshsp17.4-CI* puguin fer-se extensives a les zones codificants dels altres gens del fellema i també a altres teixits que es troben en unes condicions similars (veure més avall). Però, les

mutacions que es donen en el gen d'una proteïna amb funció xaperona podrien tenir unes conseqüències més dràstiques i accelerar el procés ja que la funció estabilitzadora que realitzen les Hsps sembla que no només es dona en condicions d'estrès sinó que també s'utilitza per tamponar proteïnes que estan lleugerament desestabilitzades a causa d'alguna mutació (Rutherford i Lindquist 1998; Queitsch *et al.* 2002). Per tant, quan els danys s'estenen a mecanismes crítics per la supervivència com les xaperones o mecanismes de reparació del DNA, es pot originar una catàstrofe concatenada. Malgrat això, en teixits limitants com el fel·lema o l'epidermis, un mecanisme de mort cel·lular mediat per hipermutació podria tenir avantatges adaptatius per la protecció de les estructures internes.

Tipus de mutacions

El tipus de mutacions que es donen en una cèl·lula poden ser fruit de diversos factors. Com que en general cada factor produeix un tipus de mutacions concretes, l'anàlisi qualitativa del tipus de mutacions que s'acumulen en un teixit pot aportar informació sobre el factor que les ha originat. En aquest treball s'han observat diferències substancials entre els espectres de mutació del fel·lema i la rel, fet que indicaria que tenen un origen diferent.

En fel·lema, la majoria de mutacions detectades en l'mRNA de *Qshsp17.4-C1* han estat relacionades amb l'estrès oxidatiu, tal i com es mostra a l'article III, utilitzant el mètode de clonatge i seqüenciació directa com a l'article IV, on s'ha aplicat un nou mètode de selecció *in vitro* de seqüències mutants. Els tres tipus de mutacions predominants en fel·lema: TA→AT, CG→TA i CG→AT, han estat relacionades amb el dany oxidatiu. El canvi TA→AT és el que predomina en bacteris sotmesos a estrès oxidatiu i el més freqüentment causat per oxidants químics (Levin i Ames, 1986; Storz *et al.* 1987). La transició CG→TA ha estat descrita en sistemes bacterians i en cèl·lules de mamífer en cultiu en resposta als radicals superòxid, l'H₂O₂, la radiació gamma i la llum solar (Ziegler *et al.* 1994; Grosovsky *et al.* 1988; Glickman *et al.* 1980; Sargentini and Smith, 1994; Moraes *et al.* 1990; Tkeshelashvili *et al.* 1991). L'oxidació de la guanina en condicions d'estrès oxidatiu genera 8OHGua, que s'aparella de forma incorrecta provocant la mutació CG→AT (Taddei *et al.* 1997).

El fel·lema és un teixit senescent, sotmès a estrès oxidatiu endogen i amb una important acumulació de proteïnes d'estrès (sHsps-C1). La supervivència d'aquestes cèl·lules en condicions d'estrès oxidatiu podria ser la causa de l'acumulació d'aquestes mutacions.

La major sensibilitat del mètode de selecció *in vitro* de seqüències mutants ha permès detectar mutacions puntuals fins i tot en les molècules d'mRNA de *QsHsp17.4-CI* en rel on, amb el mètode usat a l'article III, no es va detectar cap mutació. Això mostra que un teixit jove i en creixement actiu també està sotmès a una certa taxa de mutació. El tipus de mutació que predomina en rel és AT→GC, una transició que ha estat associada a errors en la replicació en *E. coli* (Shaaper and Dunn, 1987).

Un altre fet a destacar és el paper dels nucleòtids de l'entorn de la seqüència, que semblen tenir un paper important en la distribució de les mutacions. La meitat dels canvis de base detectats en mRNA de fel·lema i rel se situen dins o a l'entorn de motius CTGG. A més, la deleció trobada en mRNA de fel·lema es localitza en un motiu GAGAG, ja descrit anteriorment com a susceptible de deleció en trànscripats de neurones amb elevada activitat metabòlica en malalts d'Alzheimer (van Leeuwen *et al.* 1998; Bridges *et al.* 1999).

Analisi química de lesions al DNA en condicions d'estrès oxidatiu

La quantificació per GC-MS de les bases del DNA modificades químicament mostra la presència de productes d'oxidació de purines i pirimidines tant en brots de plàntules de surera en condicions normals de creixement com en els tractats amb H₂O₂ al 5% durant 5 o 10 h. Les lesions identificades són algunes de les que indueixen els radicals hidroxil (Dizdaroglu *et al.* 1991a), fet que indica la participació d'aquests radicals en el mecanisme de dany al DNA de surera per H₂O₂. En el DNA de cèl·lules de mamífer en cultiu tractades amb H₂O₂ s'han detectat uns patrons de modificació similars (Dizdaroglu *et al.* 1991a; Jaruga and Dizdaroglu, 1996).

El tractament amb H₂O₂ provoca l'acumulació de tots els productes d'oxidació de bases estudiats, especialment 8OHGua i 2OHAdé, que augmenten més de 17 vegades respecte el nivell trobat a les plàntules control. Després de 10 h de tractament en H₂O₂ els nivells quantificats depenen del tipus de lesió, 5OHUra i xantina continuen augmentant mentre que altres disminueixen fins a assolir els nivells control o inferiors. La reparació dels danys al DNA després d'un tractament amb H₂O₂ ha estat descrita en cèl·lules de mamífer de forma dependent del temps i amb una reparació més lenta de les purines que les pirimidines (Jaruga i Dizdaroglu 1996; Abalea *et al.* 1998). La disminució de les modificacions observada en brots de surera tractats amb H₂O₂ podria indicar l'activació dels sistemes de reparació en condicions d'estrès oxidatiu. És especialment remarcable el patró de 8OHGua, la

modificació que ha estat més àmpliament estudiada i es considera un marcador d'estrès oxidatiu. 8OHGua és absent en brots control i experimenta un fort augment transitori després de 5 h d'estrès oxidatiu. Posteriorment els seus nivells disminueixen. Aquesta capacitat de reparació podria ser un dels factors que permeten a les cèl·lules tolerar un cert nivell d'estrès oxidatiu.

Relació entre les modificacions i les mutacions

Les característiques premutagèniques d'algunes de les bases modificades són conegudes i això permet relacionar-les amb les mutacions seqüenciades. 2OHAdé, 5OHUra i 8OHGua són tres modificacions fortament induïdes en els brots de surera tractats amb H_2O_2 que s'han associat, en sistemes bacterians, amb l'origen de les mutacions AT→TA i CG→TA i CG→AT, respectivament (Wang *et al.* 1998). Aquestes mutacions són algunes de les que predominen en les molècules d'mRNA i DNA de *Qshsp17.4-CI* en el fel·lema.

L'estudi de les modificacions presents al DNA de brots de surera en condicions d'estrès oxidatiu s'ha utilitzat com a model per l'estudi de les lesions que produeix l' H_2O_2 . La correlació entre les modificacions quantificades i les mutacions en *Qshsp17.4-CI* de fel·lema suggereix que l'estrès oxidatiu endogen que pateixen les cèl·lules del fel·lema al llarg de la seva diferenciació i senescència, podria ser el causant de l'elevada taxa de mutació detectada. Considerant que els nivells de bases modificades són fruit d'un equilibri entre la formació i la posterior reparació, en cèl·lules senescentes com les del fel·lema, on els sistemes de reparació poden estar danyats, l'acumulació de lesions tant al DNA com a l'RNA podria ser especialment important. A més, l'acumulació de lesions no afectaria només un gen concret, sinó que tindria un abast més general en el genoma d'aquestes i altres cèl·lules que es troben en condicions similars. Per tant, es produiria una acumulació de lesions als àcids nucleics que conduirien a trànscrips aberrants i la síntesi de proteïnes alterades.

V. CONCLUSIONS

V. CONCLUSIONS

1. En surera les sHsps-CI formen una família multigènica complexa, els membres de la qual s'indueixen amb patrons diferents en plàntules i embrions somàtics per estrès tèrmic, hídric i oxidatiu. La majoria s'acumulen de forma constitutiva en teixits amb estrès oxidatiu endogen.
2. En condicions normals de creixement les plàntules i embrions somàtics de surera acumulen la isoforma principal de QsHsp17.4-CI. L'estrès tèrmic i hídric indueixen la formació d'una sèrie d'isoformes acídiques de QsHsp17.4-CI que també s'acumulen de forma constitutiva en xilema i fellema. L'estrès oxidatiu no indueix QsHsp17.4-CI.
3. L'estrès oxidatiu (H₂O₂) indueix específicament una sèrie d'espècies proteiques de ca. 10 kDa que també s'acumulen en xilema i fellema.
4. Qshsp10-CI presenta una truncació del 55% del domini α -cristal·lí i tota l'extensió C-terminal i té un PM teòric de ca. 10 kDa. S'expressa en fellema i en plàntules de surera sotmeses a estrès oxidatiu però no sotmeses a estrès tèrmic.
5. La sobreexpressió de la proteïna recombinant rQsHsp10-CI en *E. coli*, augmenta la viabilitat en condicions d'estrès tèrmic i oxidatiu. L'eliminació dels 49 aminoàcids que formen el domini α -cristal·lí parcial de QsHsp10-CI elimina aquesta acció protectora.

6. *Qshsp10-CI* podria codificar per alguna de les espècies proteiques de ca. 10 kDa que s'immunodetecten en els gels 2D.
7. En el fel·lema de la surera *Qshsp17.4-CI* presenta les taxes de mutació puntual més elevades en un genoma nuclear eucariota, similars a les descrites per quasiespècies vírals. S'han quantificat en 1/1784 pb i 1/1520 pb en mRNA i DNA, respectivament. Això implica que un terç dels mRNAs de *Qshsp17.4-CI* presentin missatges aberrants. En canvi, en mRNA d'àpex de rel jove i en creixement actiu aquesta taxa és inferior a 1/12252.
8. Els teixits senescents com el fel·lema no mantenen la integritat genètica. Els resultats recolzen la teoria mutacional de l'envelliment i mort cel·lular per catàstrofe concatenada. Els teixits senescents s'han de tractar com un mosaic de cèl·lules genèticament diferents.
9. L'anàlisi de mutacions pel mètode de selecció *in vitro* de seqüències minoritàries ha permès detectar mutacions puntuals en àpex radicular, principalment mutacions relacionades amb errors en la replicació. Això mostra que fins i tot un teixit jove en creixement actiu pot presentar un cert nivell de mutacions espontànies degut al funcionament cel·lular normal.
10. En l'espectre de mutacions del fel·lema, teixit sotmès a estrès oxidatiu endogen, hi ha un predomini de les transversions TA→AT, CG→TA i CG→AT, canvis relacionats específicament amb l'estrès oxidatiu.
11. El tractament de plàntules de surera amb H₂O₂ provoca un augment de l'acumulació al DNA de bases modificades per radicals hidroxil, que tenen propietats pre-mutagèniques.
12. Les modificacions majoritàries del DNA a conseqüència del tractament amb H₂O₂ donen lloc al mateix tipus de mutacions que s'han trobat de forma majoritària en mRNA i DNA de fel·lema, de manera que l'estrès oxidatiu endogen d'aquest teixit podria ser causant de l'elevada variabilitat de *Qshsp17.4-CI* en fel·lema.

VI. BIBLIOGRAFIA

VI. BIBLIOGRAFIA

- Abalea V, Cillard J, Dubos MP, Anger JP, Cillard P, Morel I.** (1998) Iron-induced oxidative DNA damage and its repair in primary rat hepatocyte culture. *Carcinogenesis*. 19:1053-1059.
- Alamillo J, Almoguera C, Bartels D i 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, 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., Coca, M.A. i Jordano, J.** (1993) Tissue-specific expression of sunflower heat shock proteins in response to water stress. *Plant J*. 4:947-958.
- Amanuma K, Takeda H, Amanuma H, Aoki Y** (2000) Transgenic zebrafish for detecting mutations caused by compounds in aquatic environments. *Nature Biotechnol*. 18:62-65
- Anensen H, Provan F, Lian AT, Reinertsen SH, Ueno Y, Matsuda A, Seeberg E, Bjelland S** (2001) Mutations induced by 5-formyl-2'-deoxyuridine in *Escherichia coli* include base substitutions that can arise from mispairs of 5-formyluracil with guanine, cytosine and thymine. *Mutat Res*. 486(12):147-154.
- Arnheim N, Cortopassi G** (1992) Deleterious mitochondrial DNA mutations accumulate in aging human tissues. *Mutat Res*. 275(3-6):157-167.
- Arrigo, A.P.** (1998) Small stress proteins: chaperones that act as regulators of intracellular redox state and programmed cell death. *Biol. Chem*. 379:19-26.
- Ausbel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K** (1994) Current protocols in molecular biology. John Wiley & sons editors, New York.
- Banzet, N., Richaud, C., Deveaux, Y., Kazmaier, J., Gagnon, J., i Triantaphylides C.** (1998) Accumulation of small heat shock proteins, including mitochondrial Hsp22, induced by oxidative stress and adaptive response in tomato cells. *Plant J*. 13, 519-527.
- Beissinger M, Buchner J** (1998) How chaperones fold proteins. *Biol Chem*. 379: 245-259
- Bouchard RA** (1990) Characterization of expressed meiotic prophase repeat transcript clones of *Lilium*: meiosis-specific expression, relatedness, and affinities to small heat shock protein genes. *Genome* 33:68-79.
- Bradford, M.M.** (1976) A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem*. 72:248-254
- Bridges BA** (1999) Dirty transcripts from clean DNA. *Science*. 284: 62-63

- Cabot B, Martell M, Esteban JI, Sauleda S, Otero T, Esteban R, Guàrdia J, Gómez J.** (2000) Nucleotide and amino acid complexity of Hepatitis C virus quasispecies in serum and liver. *J Virol.* 74(2):805-811.
- Cabot B i Gómez J.** (2002) High-resolution structure of the sequence space of hepatitis c viral quasispecies in an internal genomic region. En preparació.
- Carranco, R., Almoguera, C. i Jordano, J.** (1997) A plant small heat shock protein gene expressed during zygotic embryogenesis but not inducible by heat stress. *J. Biol. Chem.* 272:27470-27475.
- Coca MA, 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 MA, Almoguera C, Thomas TL, 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(4):863-876.
- Coffin JM.** (1995) HIV population dynamics in vivo: implications for genetic variation, pathogenesis, and therapy. *Science.* 267:483-489.
- Collada, C., Gómez, L., Casado, R. i 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.
- Cooper PK, Nospikel T, Clarkson SG, Leadon SA.** (1997) Defective transcription-coupled repair of oxidative base damage in Cockayne Syndrome patients from XP group G. *Science.* 275:990-993.
- Crawford, D.R. i Davies, K.J.A.** (1994) Adaptive response and oxidative stress. *Environ. Health Persp.* 102 (Suppl. 10), 25-28.
- Das KP, Petrash JM, Surewicz WK** (1996) Conformational properties of substrate proteins bound to a molecular chaperone alpha-crystallin. *J Biol Chem.* 271: 10449-10452.
- de Jong WW, Caspers GJ, Leunissen JA.** (1998) Genealogy of the alpha-crystallin--small heat-shock protein superfamily. *Int J Biol Macromol.* 22(3-4):151-162.
- DeRocher, A.E., Helm, K.W., Lauzon, L.M. i Vierling, E.** (1991) Expression of a conserved family of cytoplasmic low molecular weight heat shock proteins during heat stress and recovery. *Plant Physiol.* 96:1038-1047.
- Dietrich PS; Bouchard RA, Silva Casey E, Sinibaldi RM.** (1991) *Plant Physiol.* 96:1268-1276.
- Dizdaroglu M, Nackerdien Z, Chao BC, Gajewski E, Rao G** (1991a) Chemical nature of *in vivo* DNA base damage in hydrogen peroxide-treated mammalian cells. *Arch Biochem Biophys.* 285(2):388-390.
- Dizdaroglu M, Rao G, Halliwell B, Gajewski E.** (1991b) Damage to the DNA bases in mammalian chromatin by hydrogen peroxide in the presence of ferric and cupric ions. *Arch Biochem Biophys.* 285:317-324.
- Domingo E.** (1994) *Virus en evolución.* Eudema S.A., Madrid.
- Dure III, L., Crouch, M., Herada, J., Ho, T.H.D., Mundy, J., Quatrano, R., Thomas, T. i Sung, Z.R.** (1989) Common amino acid domains among the LEA proteins of higher plants. *Plant Mol. Biol.* 12:475-486.
- Dycaico MJ,** Provost GS, Kretz PL, Ransom SL, Moores JC, Short JM. (1994) The use of shuttle vectors for mutation analysis in transgenic mice and rats. *Mutat Res.* 307(2):461-78
- Eckey-Kaltenbach H, Kiefer E, Grosskopf E, Ernst D, Sandermann Jr. H.** (1997) Differential transcript induction of parsley pathogenesis-related proteins and of a small heat shock protein by ozone and heat shock. *Plant Mol. Biol.* 33:343-350.
- 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(21):14867-74
- Esteve JM, Mompo J, Garcia de la asunción J, Sastre J, Asensi M, Boix J, Vina JR, Vina J, Pallardo FV** (1999) *FASEB J.* 13(9):1055-1064.

- Evans D, van der Kleij A, Sonnemans M, Burbach JP, van Leeuwen FW** (1994) Frameshift mutations at two hot spots in vasopresin transcripts in postmitotic neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:6059-6063.
- Evans PJ, Gallesi D, Mathieu C, Hernandez MJ, de Felipe M, Halliwell B, Puppo A** (1999) Oxidative stress occurs during soybean nodule senescence. *Planta* 208:73-79.
- 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* 12:2171-2181.
- Freeman, BA, Crapo JD.** (1982) Biology of disease. free radicals and tissue injury. *Lab Invest.* 47:412-426.
- Fujikawa K, Kamiya H, Kasai H** (1998) The mutations induced by oxidatively damaged nucleotides, 5-formyl-dUTP and 5-hydroxy-dCTP, in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* 26:4582-4587.
- Glickman BW, Rietveld K, Aaron CS.** (1980) Gamma-Ray induced mutational spectrum in the *lacI* gene of *Escherichia coli*: comparison of induced and spontaneous spectra at the molecular level. *Mutat Res.* 69:1-12.
- Groenen PJ, Merck KB, de Jong WW, Bloemendal H.** (1994) Structure and modifications of the junior chaperone alpha-crystallin. From lens transparency to molecular pathology. *Eur J Biochem* 225(1):1-19.
- Grosovsky AJ, de Boer JG, de Jong PJ, Drobetsky EA, Glickman BW.** (1988) Base substitutions, frameshifts, and small deletions constitute ionizing radiation-induced point mutations in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 85:185-188.
- Györgyey J, Gartner A, Németh K, Magyar Z, Hirt H, Heberle-Bors E, Dudits D.** (1991) Alfalfa heat shock genes are differentially expressed during somatic embryogenesis. *Plant Mol Biol.* 16:999-1007.
- Harrington, H.M. i Alm, D.M.** (1988) Interaction of heat and salt shock in cultured tobacco cells. *Plant Physiol.* 88:618-625.
- Hernández, L.D. i Vierling, E.** (1993). Expression of low molecular weight heat shock proteins under field conditions. *Plant Physiol.* 101:1209-1216.
- Hernández M, Pla M, Esteve T, Prat S, Ferrando A** (2002) Characterization of the 3'-transgene integration site in maize MON810 and validation of a specific detection and quantification PCR system. *Transgenic Research* (en premsa).
- Horwitz J** (2000) The function of alpha-crystallin in vision. *Semin Cell Devel. Biol.* 11: 53-60
- Ingraham J, Bartels D** (1996) The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 47:377-403.
- Inoue N, Emi T, Yamane Y, Kashino Y, Koike H, Satoh K.** (2000) Effects of high-temperature treatments on a thermophilic cyanobacterium *Synechococcus vulcanus*. *Plant Cell Physiol.* 41:515-22.
- Jaruga P, Dizdaroglu M.** (1996) Repair of products of oxidative DNA base damage in human cells. *Nucleic Acids Res.* 24:1389-1394.
- Jinn TL, Wu SH, Yeh CH, Hsieh MH, Yeh YC, Chen YM, Lin CY** (1993) Immunological kinship of class I low molecular weight heat shock proteins and thermostabilization of soluble proteins *in vivo* among plants. *Plant Cell Physiol.* 34(7): 1055-1062.
- Joe MK, Park SM, Lee YS, Hwang DS, Hong CB** (2000) High temperature stress resistance of *Escherichia coli* induced by a tobacco class I low molecular weight heat-shock protein. *Mol Cells.* 10: 519-524.
- Kamiya H, Miura H, Murata -Kamiya N, Ishikawa H, Sakaguchi T, Inoue H, Sasaki T, Masutani C, Hanaoka F, Nishimura S, Ohtsuka E** (1995) 8-Hydroxyadenine (7,8-dihidro-8-oxoadenine) induces misincorporation in *in vitro* DNA synthesis and mutations in NIH 3T3 cells. *Nucleic Acids Res.* 23(15):2893-2899.
- Kamiya H, Murata-Kamiya N, Karino N, Ueno Y, Matsuda A, Kasai H** (2002) Induction of T→G and T→A transversions by 5-formyluracil in mammalian cells. *Mutat Res.* 513:213-222.

- Kaukinen KH, Tranbarger TJ, Santosh M.** (1996) Post-germination-induced and hormonally dependent expression of low-molecular-weight heat shock protein genes in *Douglas fir*. *Plant Mol. Biol.* 30:1115-1128.
- Kim KK, Kim R, Kim SH** (1998) Crystal structure of a small heat-shock protein. *Nature.* 394: 595-599.
- Kirschner M, Winkelhaus S, Thierfelder JM, Nover L.** (2000) Transient expression and heat-stress-induced co-aggregation of endogenous and heterologous small heat-stress proteins in tobacco protoplasts. *Plant J.* 24(3):397-411.
- Kolattukudy PE, Podila GK, Roberts E, Dickman MD** (1984) Gene expression resulting from early signals in plant-pathogen interaction. *Can. J. Bot.* 62, 2918-2933.
- Kovalchuk I, Kovalchuk O, Hohn B** (2000) Genome-wide variation of the somatic mutation frequency in transgenic plants. *EMBO J.* 19(17):4431-4438.
- Kreutzer DA, Essigmann JM.** (1998) Oxidized, deaminated cytosines are a source of C>T transitions in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95(7):3578-82.
- Krishna P, Felsheim RF, Larkin JC, Das A.** (1992) *Plant Physiol.* 100:1772-1779.
- Kruse E, Liu Z, Kloppstech K.** (1993) Expression of heat shock proteins during development of barley. *Plant Mol Biol.* 23:111-122.
- Lawrence SD, Cline K, Moore GA.** (1997) Chromoplast development in ripening tomato fruit: identification of cDNAs for chromoplast-targeted proteins and characterization of a cDNA encoding a plastid-localized low-molecular-weight heat shock protein. *Plant Mol Biol.* 104:445-452.
- Lee GJ, Vierling E.** (2000) A small heat shock protein cooperates with heat shock protein 70 systems to reactivate a heat-denatured protein. *Plant Physiol.* 122:189-197.
- Lee GJ, Pokala N, Vierling E.** (1995) Structure and in vitro molecular chaperone activity of cytosolic small heat shock proteins from pea. *J. Biol. Chem.* 270:10432-10438
- Lee GJ, Roseman AM, Saibil HR, 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.
- Leroux MR, Ma BJ, Batelier G, Melki R, Candido EP** (1997a) Unique structural features of a novel class of small heat shock proteins. *J Biol Chem* 272: 12847-12853.
- Leroux MR, Melki R, Gordon B, Batelier G, Candido EP** (1997b) Structure-function studies on small heat shock protein oligomeric assembly and interaction with unfolded polypeptides. *J Biol Chem.* 272: 24646-24656.
- Levin DE, Ames BN.** (1986) Classifying mutagens as to their specificity in causing the six possible transitions and transversions: a simple analysis using the Salmonella mutagenicity assay. *Environ Mutagen.* 8(1):9-28.
- Lewin B** (1997) *Genes VI.* Oxford University Press, Oxford, NY.
- Lindahl T i Wood RD** (1999) Quality control by DNA repair. *Science* 286:1897-1905.
- Lipinski LJ, Hoehr N, Mazur SJ, Dianov GL, Sentürker S.** (1999) Repair of oxidative DNA base lesions induced by fluorescent light is defective in xeroderma pigmentosum group A cells. *Nucleic Acids Res.* 27:3153-3158.
- Liu YG, Mitsukawa N, Oosumi T, Whittier RF.** (1995) Efficient isolation and mapping of *Arabidopsis thaliana* T-DNA insert junctions by thermal asymmetric interlaced PCR. *Plant J* 8:457-63.
- Löw D, Brändle K, Nover L, Forreiter C** (2000) Cytosolic heat-stress proteins Hsp17.7 class I and Hsp17.3 class II of tomato act as molecular chaperones *in vivo*. *Planta.* 211: 575-582.
- Lund AA, Rhoads DM, Lund AL, Cerny RL, Elthon TE.** (2001) In vivo modifications of the maize mitochondrial small heat stress protein, Hsp22. *J Biol Chem.* 276:29924-29929.
- MacRae TH.** (2000) Structure and function of small heat shock/alpha-crystallin proteins: established concepts and emerging ideas. *Cell Mol Life Sci.* 57: 899-913.
- Martell M, Esteban JI, Quer J, Genescà J, Weiner A, Esteban R, Guardia J, Gómez J.** (1992) Hepatitis C virus (HCV) circulates as a population of different but closely related genomes: quasispecies nature of HCV genome distribution. *J Virol.* 66:3225-3229.

- McCallum CM, Comai L, Greene EA, Henikoff S.** (2000) Target screening for induced mutations. *Nature Biotechnol.* 18:455-457.
- Medina-Escobar N, Cárdenas J, Muñoz-Blanco J, Caballero JL** (1998) Cloning and molecular characterization of a strawberry fruit ripening-related cDNA corresponding a mRNA for a low-molecular-weight heat-shock protein. *Plant Mol Biol.* 36:33-42.
- Meyerhans A, Cheynier R, Albert J, Seth M, Kwok S, Sninsky J, Morfeld-Malson L, Asjö B, Wain Hobson S.** (1989) Temporal fluctuations in HIV quasispecies in vivo are not reflected by sequential HIV isolates. *Cell.* 58:901-910.
- Moore JM.** (2002) No end to nonsense. *Science.* 298:370-371.
- Moraes EC, Keyse SM, Tyrrell RM** (1990) Mutagenesis by hydrogen peroxide treatment of mammalian cells: a molecular analysis. *Carcinogenesis* 11(2):283-293.
- Morange M, Favet N, Loones MT, Manuel M, Mezger V, Michel E, Rallu M, Sage J.** (1998) Heat Shock genes and development. In *Stress of Life : From molecules to man*, P. Csermely ed., *Annals of the New York Academy of Sciences* 851, 117-122.
- Morley AA.** (1995) The somatic mutation theory of ageing. *Mutation Res* 338:19-23.
- Mörner CT.** (1894) Untersuchung der proteinsubstanzen in den leichtbrechenden medien des auges. *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.* 18: 61-106.
- Narberhaus F** (2002) Alpha-crystallin-type heat shock proteins: socializing minichaperones in the context of a multichaperone network. *Microbiol Mol Biol Rev* 66(1):64-93.
- Ninio J.** (1991) Connections between translation, transcription and replication error-rates. *Biochimie* 73:1517-1523.
- Noctor G, Foyer C** (1998) Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annu. Rev. Plant physiol. Plant mol. Biol.* 49:249-279.
- Nover, L.** (1991) Heat shock response. *Boca Raton: CRC Press Inc.*
- Nover. L. i Scharf, K.D.** (1997) Heat stress proteins and transcription factors. *Cell Mol Life Sci.* 53(1):80-103.
- Nover L, Bharti K, Döring P, Mishra SK, Ganguli A, Scharf KD.** (2001) Arabidopsis and the heat stress transcription factor world: how many heat stress transcription factors do we need? *Cell Stress Chaperones* 6:177-189.
- Ono T, Negishi K, Hayatsu H.** (1995) Spectra of superoxide-induced mutations in the *lacI* gene of a wild type and a mutM strain of *Escherichia coli* K-12. *Mutation Res.* 326:175-183.
- Ozawa T.** (1995) Mitochondrial mutations associated with aging and degenerative diseases. *Exp Gerontol.* 30(3-4):269-290.
- Pennisi E** (1998) How the genome readies itself for evolution. *Science* 281:1131-1134
- Pitto, L., Lo Schiario, F., Giuliano, G. i Terzi, M.** (1983) Analysis of the heat shock protein during somatic embryogenesis of carrot. *Plant Mol. Biol.* 2:231-237.
- Pla M, Jofré A, Martell M, Molinas M, Gómez J** (2000) Large accumulation of mRNA and DNA point modifications in a plant senescent tissue. *FEBS Letters* 472: 14-16
- Pla M, Huguet G, Verdaguer D, Ruigderrajols P, Llompert B, Nadal A, Molinas M.** (1998) Stress proteins co-expressed in suberized and lignified cells and in apical meristems. *Plant Sci.* 139:49-57.
- Polle A. & Rennenberg H.** (1993) Significance of antioxidants in plant adaptation to environmental stress. In: *Plant adaptation to environmental stress* (eds L. Fowden, F.T. Mansfield & J. Stoddard), pp. 263-273. Chapman & Hall, London.
- Puigderrajols P, Fernández-Guijarro B, Toribio M, Molinas M.** (1996) Origin and early development of secondary embryos in *Quercus suber* L. *Int J Plant Sci.* 157:674-684.
- Puigderrajols P, Jofré A, Mir G, Pla M, Verdaguer D, Huguet G, Molinas M** (2002) Temporal and spatial distribution patterns of developmental and stress-induced small heat shock proteins in cork oak somatic embryos. *J Exp Bot.* 53(373):1445-1452
- Queitsch C, Sangster T, Lindquist S** (2002) Hsp90 as a capacitor of phenotypic variation. *Nature* 417:618-624

- Rajaraman K, Raman B, Ramakrishna T, Rao CM** (2001) Interaction of human recombinant alphaA- and alphaB-crystallins with early and late unfolding intermediates of citrate synthase on its thermal denaturation. *FEBS Lett.* 497: 118-23.
- Romberger JA, Hejnowicz Z, Hill JF.** (1993) Plant structure, function and development. New York: Springer Verlag, pp. 347-458.
- Rutherford S, Lindquist S** (1998) Hsp90 as a capacitor for morphological evolution. *Nature* 396:336-342.
- 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.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T** (1989) Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sargentini NJ, Smith KC** (1994) DNA sequence analysis of γ -radiation (anoxic)-induced and spontaneous *lacI_d* mutations in *Escherichia coli* K-12. *Mutation Res* 309:147-163.
- Schaaper RM, Danforth BN, Glickman BW** (1986) Mechanisms of spontaneous mutagenesis: an analysis of the spectrum of spontaneous mutation in the *Escherichia coli lacI* gene. *J Mol Biol* 189:273-284
- Schaaper RM, Dunn RL, Glickman BW** (1987) Mechanisms of ultraviolet-induced mutation. Mutational spectra in the *Escherichia coli lacI* gene for a wild type and an excision-repair-deficient strain. *J Mol Biol* 198:187-202
- Scharf KD, Siddique M, Vierling E** (2001) The expanding family of Arabidopsis thaliana small heat shock proteins and a new family of proteins containing α -crystallin domains (Acid proteins). *Cell Stress Chap* 6(3):225-337
- Sharma KK, Kumar GS, Murphy AS, Kester KJ** (1998) Identification of 1,1'-Bi(4-anilino)naphthalene-5,5'-disulfonic acid binding sequences in α -crystallin. *J Biol Chem* 273:15474-15478.
- Smirnoff N.** (1998) Plant resistance to environmental stress. *Current Opinion In Biotechnology* 9, 214-219.
- Smulders RHPH, Carver JA, Lindner RA, van Boekel MA, Bloemendal H, de Jong WW** (1996) Immobilization of the C-terminal extension of bovine alphaA-crystallin reduces chaperone-like activity. *J Biol Chem.* 271: 29060-29066.
- Soto A, Allona I, Collada C, Guevara M, Casado R, Rodriguez-Cerezo E, Aragoncillo C, Gómez L.** (1999) Heterologous expression of a plant small heat shock protein enhances *Escherichia coli* viability under heat and cold stress. *Plant Physiol.* 120:521-528.
- Stapleton AE** (1992) Ultraviolet radiation and plants: burning questions. *Plant Cell* 4:1353-1358
- Storz G, Christman MF, Sies, H, Ames BN.** (1987) Spontaneous mutagenesis and oxidative damage to DNA in *Salmonella typhimurium*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 84:8917-8921
- Sun W, Bernard B, van de Cotte B, van Montagu M, Verbruggen N.** (2001) At-Hsp17.6A, encoding a small heat-shock protein in Arabidopsis, can enhance osmotolerance upon overexpression. *Plant J.* 27:407-415.
- Sun W, van Montagu M, Verbruggen N.** (2002) Small heat shock proteins and stress tolerance in plants. *Biochim Biophys Acta.* 1577:1-9.
- Taddei F, Hayakawa H, Bouton MF, Cirinesi AM, Matic I, Sekiguchi M, Radman M** (1997) Counteraction by mutT protein of transcriptional errors caused by oxidative damage. *Science* 278: 128-130.
- Tkeshelashvili LK, McBride T, Spence K, Loeb LA.** (1991) Mutation spectrum of copper-induced DNA damage. *J Biol Chem.* 266:6401-6406.
- Torok Z, Goloubinoff P, Horvath I, Tsvetkova NM, Glatz A, Balogh G, Varvasovszki V, Los DA, Vierling E, Crowe JH, Vigh L.** (2001) Synechocystis Hsp17 is an amphitropic protein that stabilizes heat-stressed membranes and binds denatured proteins for subsequent chaperone-mediated refolding. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98(6):3098-103

- Tranbarger TJ, Misra S.** (1996) Structure and expression of a developmentally regulated cDNA encoding a cysteine protease (pseudotzain) from Douglas fir. *Gene* 172:221-226
- Treweek TM, Lindner RA, Mariani M, Carver JA** (2000) The small heat-shock chaperone protein, alpha-crystallin, does not recognize stable molten globule states of cytosolic proteins. *Biochim Biophys Acta.* 1481: 175-88
- Ukaji N, Kuwabara C, Takezawa D, Arakawa K, Yoshida S, Fujikawa S.** (1999) Accumulation of small heat-shock protein homologs in the endoplasmic reticulum of cortical parenchyma cells in mulberry in association with seasonal cold acclimation. *Plant Physiol.* 120: 481-489.
- van Berkel J, Salamini F, Gebhardt C.** (1994) Transcripts accumulating during cold storage of potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers are sequence related to stress-responsive genes. *Plant Physiol.* 104: 445-452.
- van Leeuwen FW, Burbach PH, Hol EM** (1998) Frameshift mutants of β -Amyloid precursor protein and Ubiquitin-B in Alzheimer's and Down patients. *TINS* 21: 331-335
- van Montfort RL, Basha E, Friedrich KL, Slingsby C, Vierling E** (2001) Crystal structure and assembly of a eukaryotic small heat shock protein. *Nat Struct Biol.* 8: 1025-30
- Veinger L, Diamant S, Buchner J, Goloubinoff P.** (1998) *J.Biol.Chem* 273, 11032-11037.
- Viswanathan A, You HJ, Doetsch PW** (1999) Phenotypic change caused by transcriptional bypass of uracil in nondividing cells. *Science* 284: 159-162.
- Vonarx EJ, Mitchell HL, Karthikeyan R, Chatterjee I, Kunz BA** (1998) DNA repair in higher plants. *Mutat Res.* 400: 187-200
- Walter CA, Grabowski DT, Stree KA, Conrad CC, Richardson A** (1997) Analysis and modulation of DNA repair in aging. *Mech. Ageing Dev.* 98: 203-222
- Wang YJ, Ho YS, Lo MJ, Lin JK.** (1995) Oxidative modification on DNA bases in rat liver and lung during chemical carcinogenesis and aging. *Chemico-Biol Interact.* 94: 135-145.
- Waters, E.R., Lee G.J. i Vierling E.** The molecular evolution of smHsp in plants. (1996) *J. Exp. Bot.* 47:325-338
- 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.
- Wehmeyer N, Hernández LD, Finkelstein RR, Vierling E.** (1996) Synthesis of small heat-shock proteins is part of the developmental program of late seed maturation. *Plant Physiol.* 112(2): 747-57.
- Whetten R, Sederoff R.** (1995) Lignin Biosynthesis. *Plant Cell.* 7: 1001-1013.
- Wojtaszek P** (1997) Oxydative burst: an early plant response to pathogen infection. *Biochem J.* 322: 681-692
- Wollgiehn, R. i Neumann, D.** (1995) Stress response of tomato cell cultures to toxic metals and heat shock: differences and similarities. *J. Plant Physiol.* 146: 736-742.
- Wood ML, Dizdaroglu M, Gajewski E, Essigman JM.** (1990) Mechanistic studies of ionizing radiation and oxidative mutagenesis: genetic effects of single 8-hydroxiguanine (7-hidro-8-oxoguanine) residue inserted at a unique site in a viral genome. *Biochemistry* 29: 7024-7032.
- Wu C.** (1995) Heat shock transcription factors: structure and regulation. *Ann Rev Cell Dev Biol* 11: 441-469.
- Xiong L, Schumaker KS, Zhu JK.** (2002) Cell signaling during cold, drought, and salt stress. *Plant Cell. suplement* S165-S183.
- Yeh CH, Chang PF, Yeh KW, Lin WC, Chen YM, Lin CY** (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
- Yeh CH, Chen YM, Lin CY** (2002) Functional regions of rice heat shock protein Oshsp16.9, required for conferring thermotolerance in *Escherichia coli*. *Plant Physiology* 128: 661-668

- Zarsky V, Garrido D, Eller N, Tupy O, Vicente F, Schöffl F, Herbele-Bors E.** (1995) The expression of a small heat shock gene is activated during induction of tobacco pollen embryogenesis by starvation. *Plant Cell Environ.* 18:139-147.
- Ziegler A, Jonason AS, Leffell DJ, Simon JA, Sharma HW, Kimmelman J, Remington L, Jacks T, Brash DE.** (1994) Sunburn and p53 in the onset of skin cancer. *Nature* 372:773-776.
- zur Nieden, U., Neumann, D., Bucka, A. i Nover, L.** (1995) Tissue-specific expression of heat-stress proteins during embryo development. *Planta.* 196:530-538.

VII. ANNEX

VII.1. Comparació del patró d'expressió en fulles d'*Arabidopsis* salvatge *Col-0* i el mutant amb senescència prematura *rcd1* mitjançant *microarrays*.

En la resposta a l'estrès oxidatiu hi ha implicat un elevat número de gens. Aquest treball de tesi s'ha centrat en l'estudi d'una sola família multigènica, les sHsps-C1. Però, com que per les seves característiques, el fel·lema de la surera és un model molt apropiat per l'estudi de la resposta a l'estrès oxidatiu, seria molt interessant utilitzar-lo per estudiar altres gens relacionats amb l'estrès oxidatiu.

Els *microarrays* constitueixen una tècnica que permet l'anàlisi simultània de l'expressió d'un elevat número de gens. Com que actualment no es disposa de cap *array* de surera s'ha realitzat una aproximació utilitzant com a model un mutant d'*Arabidopsis thaliana* especialment sensible a l'estrès oxidatiu el qual s'ha comparat amb la planta salvatge. En un futur, els gens seleccionats com a implicats en la resistència a l'estrès oxidatiu podran ser estudiats en surera. Aquest treball es va realitzar al departament de *Plant physiology and molecular biology* de la *University of Turku*, sota la direcció del Dr. Jaakko Kangasjärvi.

Com que l'anàlisi de *microarrays* és una tècnica nova i un dels objectius de l'estada va ser aprendre-la, es presenta una descripció detallada de la metodologia.

Arabidopsis rcd1 (*radical-induced cell death 1*) és un mutant sensible a l'estrès oxidatiu provocat per l'ozó i l'ió superòxid extracel·lular. En resposta a aquests estressos i fruit de la producció de ROS, es formen lesions a les fulles. Aquestes lesions, conseqüència de la mort cel·lular, també són induïdes per l'etilè i el salicilat i reprimides per l'àcid jasmònic (Overmeyer *et al.* 2000). A més, el mutant *rcd1* presenta una senescència prematura que molt possiblement estaria relacionada amb la sensibilitat a l'estrès oxidatiu que manifesta ja que la senescència és un procés lligat a un elevat estrès oxidatiu (Thomson *et al.* 1987).

L'objectiu d'aquest treball ha estat comparar el patró d'expressió d'*Arabidopsis* salvatges (Columbia-0) i *Arabidopsis rcd1* per identificar, mitjançant *microarrays*, els gens amb una expressió diferencial, principalment els que ja havien estat relacionats amb l'estrès oxidatiu i la senescència.

L'anàlisi amb *microarrays*: metodologia

Els *microarrays* és una tècnica relativament nova que permet comparar simultàniament un elevat nombre de gens. En conseqüència, els resultats experimentals generen una quantitat enorme de dades que requereix una anàlisi complexa. Els resultats obtinguts en aquest treball s'estan analitzant en col·laboració amb el grup del Dr. Kangasjärvi. En aquesta memòria es presenta la metodologia utilitzada i els resultats preliminars obtinguts. Posteriorment seran publicats en un article sobre la caracterització del mutant *rcd1* d'*Arabidopsis*. A la Fig. 1 es mostra un esquema del protocol.

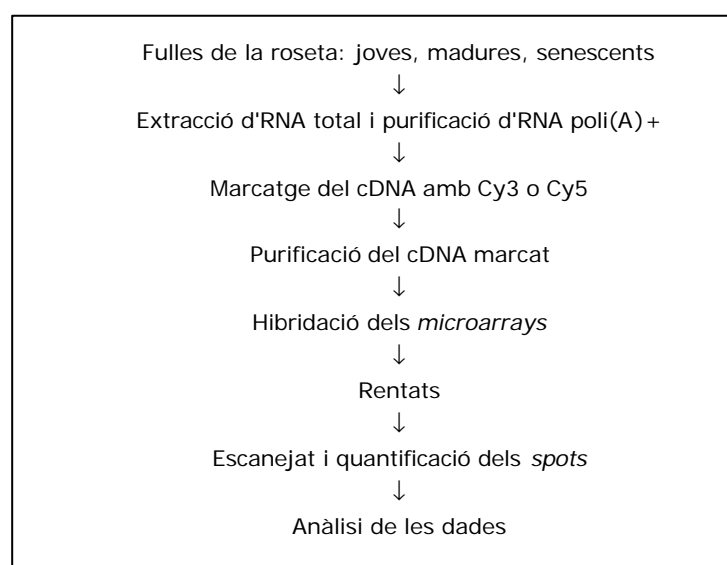


Figura 1. Esquema del protocol seguit.

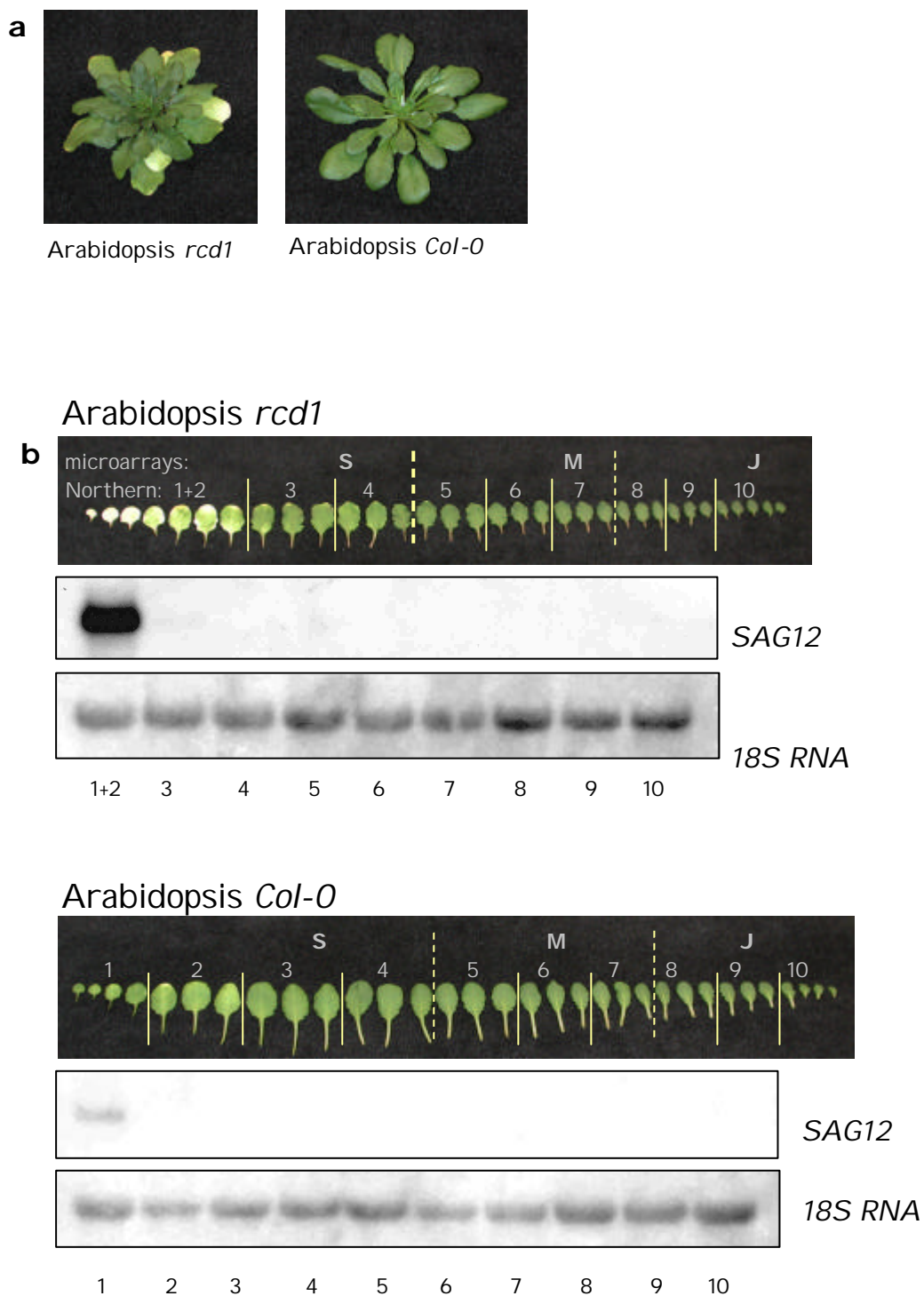


Figura 2. Roseta basal d'*Arabidopsis Col-0* i *rcd1* (a). Fulles de la roseta basal disposades de senescents a joves (grups número 1 a 10, respectivament) i corresponent Northern blot hibridat amb els gens *SAG12* i *18S RNA*. També s'indica l'agrupació de fulles que es va fer pels microarrays: senescents, S; madures, M; joves, J (b).

Les plantes d'Arabidopsis. Les llavors d'Arabidopsis salvatge (*Col-0*) i el mutant *rcd1* (obtingut per mutagènesi amb Etil metasulfonat (EMS) d'*Arabidopsis thaliana* ecotip Columbia (*Col-0*) (Overmeyer *et al.* 2000)) van créixer durant 8-10 setmanes en condicions controlades en una cambra de cultiu (8/16 h dia/nit, 23 °C). Per obtenir dues rèpliques biològiques, es van fer créixer Arabidopsis en les mateixes condicions però en cambres de cultiu diferents (anomenades plantes 1 i plantes 2). S'han comparat en tots els casos plantes de la mateixa edat.

Les fulles es van classificar en 3 grups: joves, madures i senescents. Tal i com es pot veure a la Fig. 2, fulles de la mateixa edat de les plantes salvatges i del mutant *rcd1* presenten un fenotip clarament diferent. Mentre que en el mutant *rcd1* el grup de fulles senescents presenten l'engrogiment típic de l'estadi de senescència, les fulles de les plantes salvatges encara són verdes. A partir d'aquests grups de fulles es va extreure l'RNA total amb el mètode del TRIzol (TRIzol Reagent; Invitrogen) i l'RNA poli(A)⁺ es va purificar amb boletes magnètiques que porten unit poli(T) (GenoPrep mRNA Beads; Genovision) (veure apartats 3.2.1 i 3.2.2 del material i mètodes).

Marcatge del cDNA. Es van sintetitzar cDNAs per transcripció reversa de l'mRNA utilitzant com a encebador oligod(T) i es van marcar per incorporació dels nucleòtids fluorescents Cy3-dUTP (representat amb color verd a les imatges) o Cy5-dUTP (representat amb color vermell). Es va utilitzar el kit *CyScribe First-Strand cDNA Labeling kit* (Amersham Pharmacia Biotech). Per cada grup de fulles es van marcar els cDNAs d'Arabidopsis salvatge amb un dels fluorocroms i els cDNAs d'*rcd1* amb l'altre. Es van realitzar dues rèpliques biològiques i un solapament de colors (*dye swap*). El solapament de colors és un marcatge revers, si en una de les reaccions es marquen les plantes salvatges amb Cy5 i les mutants amb Cy3, es realitza un altre marcatge de les plantes salvatges amb Cy3 i les mutants amb Cy5 (Taula 1). En principi aquests dos marcatges haurien de ser totalment complementaris però a la pràctica no ho són perquè hi ha diferents eficiències de marcatge. Les dades obtingudes del solapament de colors s'utilitzen en la normalització.

	Cy3	Cy5	
plantes 1	<i>rcd1</i>	col-0	MARCATGE 1
plantes 2	<i>rcd1</i>	col-0	MARCATGE 2
plantes 2	col-0	<i>rcd1</i>	MARCATGE 3 (<i>dye swap</i>)

Taula 1. Marcatges de les dues rèpliques biològiques (plantes 1 i plantes 2) i solapament de colors.

Purificació del cDNA. Un cop sintetitzat el cDNA és necessari eliminar el motlle d'mRNA per permetre la posterior hibridació al *microarray* i minimitzar la hibridació

amb l'mRNA complementari. També és important eliminar els nucleòtids Cy3-dUTP i Cy5-dUTP que no han estat incorporats per minimitzar el soroll de fons. Aquesta eliminació es realitza amb un tractament d'hidròlisi alcalina (5.6 µl of 1M NaOH, 65 °C for 15 min) i una neutralització (12.5 µl of 1M Tris-HCl pH 7.5) seguits d'una purificació i concentració per columna Centricon-30 (Amicon). Un cop el cDNA marcat és eluït de la columna es quantifica mitjançant espectrofotometria, Cy3 a 550 nm i Cy5 a 650 nm i es guarda a -20 °C i a la foscor fins al moment de la hibridació.

Preparació dels *microarrays*. Els *microarrays* de DNA utilitzats no són comercials sinó que han estat preparats pel grup de la Dra. Eva Mari Aro (*Plant Physiology and Molecular Biology*, Universitat de Turku). Es basen en el set de clons GEM1 (IncyteGenomics, USA) que conté 7942 elements, 5203 dels quals codifiquen per proteïnes de funció desconeguda, i representen gens de rel, roseta i inflorescència d'*Arabidopsis*. La col·lecció original va ser amplificada per l'estació robòtica TECAN, es van purificar els plasmidis en plaques de 96 pous (Promega) i es van comprovar els inserts per PCR i gels d'agarosa. Els productes de PCR es van netejar amb el kit *Montagne* (Millipore) amb format placa de 96 pous i van ser aplicats (*spotted*) per triplicat en portaobjectes de vidre polilisinat i fixats per crosslinking amb llum UV (90 mJ/cm²). Els 7942 elements estan repartits en 3 portaobjectes. Per eliminar salts residuals al portaobjectes i prebloquejar-los, van ser tractats amb anhídric succínic.

Hibridació. Per cada grup de fulles (joves, exteses i senescents), es van marcar els cDNAs com indica a la Taula a1 obtenint-se 3 rèpliques per cadascun d'ells (marcatge 1, marcatge 2 i marcatge 3).

Es van aplicar 25 µl de solució d'hibridació a cada portaobjectes que contenien: 10 pmol de cDNA-Cy3 i 10 pmol de cDNA-Cy5, 3.8µl de 20x SSC, 0.8 µl de 10% SDS i 0.5 µl de Denhardt's. La barreja es desnaturalitza a 98 °C durant 2 min, es porta a temperatura ambient i s'afegeixen 1.3 µl of DIG-blocking buffer (Roche). S'aplica la solució al *microarray*, es tapa amb un cobreobjectes i es posa cada portaobjectes en una cambra d'hibridació de *microarrays* (Corning Incorporated, NY) que conté un paper de filtre humit amb 3x SSC i es segella per evitar l'evaporació durant la incubació. S'incuba a 65 °C durant 12-14 h.

Rentats. Finalment es realitzen els següents rentats a temperatura ambient: 0.5x SSC, 0.1% SDS 15 min, 0.5x SSC, 0.01% SDS 5 min, 0.5x SSC, 0.01% SDS 1 min, 0.06x SSC 1 min, 0.06x SSC 1 min. S'acaba amb una centrifugació de 2 min a 1000 rpm per eliminar l'exés de líquid.

Adquisició de les dades i anàlisi. Els portaobjectes van ser escanejats amb l'escàner *GSI Lumonics Scan Array 4000* (GSI Lumonics, Packard BioChip

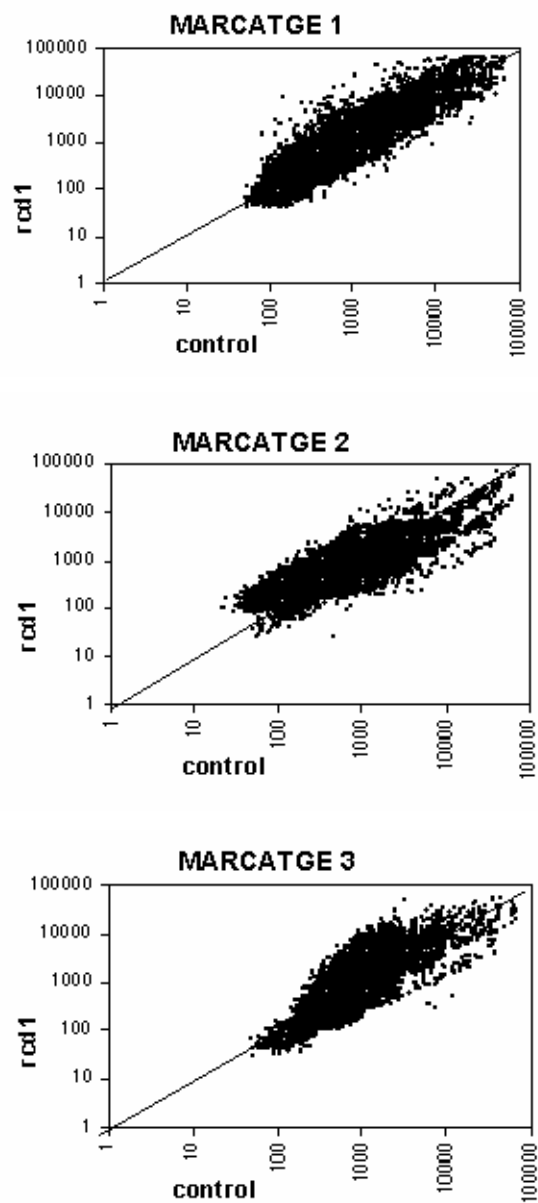


Figura 3. Representació en gràfiques de dispersió de punts del patró d'expressió (logaritme de la intensitat) de les fulles senescents d'*Arabidopsis* col-0 (control) i el mutant *rcd1* després de la hibridació dels cDNAs marcats en microarrays. Cada gràfica conté les dades dels 7942 ESTs totals, representats per triplicat a cada *microarray*.

Technologies) prenent les imatges de cada fluorocrom per separat i a una resolució de 10 µm. La quantificació de la intensitat de la senyal es va realitzar amb *QuanArray software* (GSI Lumonics, Packard BioChip Technologies).

L'anàlisi amb microarrays: anàlisi dels resultats

La distribució dels canvis en el patró d'expressió dels 7942 ESTs d'*Arabidopsis* analitzats en fulles senescents es pot veure a la Fig. 3. Els punts corresponents als gens que s'expressen igual en *Arabidopsis col-0* i *rcd1* són els majoritaris i es distribueixen a l'entorn de l'eix central. Sense una prèvia normalització el marcatge 1 és el que presenta una distribució de les dades més centrada al llarg de l'eix diagonal, els marcatges 2 i 3, en canvi, són més esbiaixats i abans de procedir amb l'anàlisi cal una normalització de les dades.

A continuació es presenta una anàlisi preliminar del marcatge 1. Cal tenir en compte que aquesta anàlisi només inclou una rèplica. Després de la normalització de les dades i l'anàlisi conjunta de les tres rèpliques s'obtindran uns resultats més fiables.

En l'anàlisi dels gens que mostren una expressió diferencial a *rcd1* respecte *col-0* només s'ha considerat que representen canvis significatius en l'expressió gènica aquells que varien 2.2 o més vegades. Diversos autors han utilitzat diferents valors llindar, en alguns *microarrays*, valors de 1.5 han representat canvis significatius (Swidzinski *et al.* 2002). Tot i això, com més gran és el valor llindar menys possibilitats hi ha de, degut a la metodologia, considerar diferencials gens que en realitat es mantenen constants. L'anàlisi de les dades mostra diferències en l'expressió gènica d'*Arabidopsis* salvatge i el mutant *rcd1*. Aquest últim presenta la inducció de 137 gens i la repressió de 142. Dins els gens induïts, un 5% corresponen a ESTs que no són homòlegs amb cap gen dels bancs de dades, un 41% corresponen a gens que codifiquen per proteïnes de funció desconeguda i el 54% restant són gens amb funcions més o menys conegudes. En els gens reprimits aquests percentatges són del 8.5%, 25.5% i 66%, respectivament.

Dels gens induïts a *Arabidopsis rcd1* que tenen una funció coneguda, alguns se sap que estan relacionats amb l'estrès oxidatiu, la protecció enfront l'estrès o les vies de transducció del senyal. Per altres, en canvi, és difícil determinar quin paper poden tenir en el procés de senescència i l'estrès oxidatiu associat (Taula 2). A continuació es descriuen alguns dels gens induïts, especialment els relacionats amb l'estrès oxidatiu:

Relacionats amb l'estrès oxidatiu (Buchanan-Wollaston 1997, Bleecker *et al.* 1988, Kohler *et al.* 1999, Mussig *et al.* 2000, Torres *et al.* 2002):

- Glicolat oxidasa - *like protein*. Es troba en els peroxisomes i participa en el cicle del glioxilat catalitzant l'oxidació del glicolat a glioxilat.
- Peroxidasa *prxr2*. Enzim generador de ROS. L'activitat peroxidasa ja havia estat associada amb la senescència de les fulles d'*Arabidopsis*. S'utilitza com a marcador d'estrès oxidatiu.
- Alcohol deshidrogenasa. Catalitza l'oxidació d'etanol a acetaldehid. També ha estat clonada en el nostre laboratori a partir de fel.lema de surera (no mostrat).
- 12-oxofitodienoat reductasa (OPR). Enzim implicat en la via de síntesi del jasmonat. És induïda per àcid jasmònic, brassinosteroids i diferents estímuls com la llum UV o les ferides.
- 1-aminociclopropà-1-carboxilat oxidasa (ACC oxidasa). Enzim que forma part de la ruta de síntesi de l'etilè, un inductor de la senescència.
- *Respiratory burst oxidase protein* (Atrboh). Aquesta família de proteïnes té un domini d'unió a Ca^{2+} i es creu que podrien estar relacionades amb la regulació de l'activitat de la NADPH oxidasa. Necessàries per la producció de ROS en la interacció amb patògens.

Proteïnes que podrien formar part de les vies de transducció del senyal:

- RING zinc finger protein
- zinc finger protein Zat12
- bZIP transcription factor
- receptor-like protein kinase, ERECTA
- calmodulin-binding protein
- regulatory subunit of protein kinase CK2
- myb-related protein

Proteïnes d'estrès:

- chaperonin similar to chaperonin subunit 6a (zeta)
- chaperone GrpE-like protein
- pEARLI 1
- putative small heat shock protein. Aquesta sHsp presenta un 68% d'homologia amb *Qshsp17.4-C1* i un 66% amb *Qshsp10-C1*.

Cal tenir en compte que els *microarrays* utilitzats probablement no contenen totes les sHsps del genoma d'*Arabidopsis* ni tots els gens que s'indueixen per estrès oxidatiu. Els *microarrays* utilitzats inclouen gens de rel, roseta i inflorescència d'*Arabidopsis* en condicions normals de creixement. La hibridació en *microarrays* fets a partir de plantes estressades oxidativament segurament aportarien més informació.

Un altre dels gens fortament induïts a *rcd1* és el *SAG12* (*Senescence Associated Gene-12*). *SAG12* codifica per una cisteïn-proteasa que presenta una expressió molt específica en teixits senescents i s'utilitza com a marcador d'aquest procés (Noh *et al.* 1999). Per confirmar la seva inducció en les fulles d'*Arabidopsis* salvatges i *rcd1* es va realitzar un *Northern blot* que, d'acord amb els resultats obtinguts amb els *microarrays*, mostra que en fulles de la mateixa edat de plantes d'*Arabidopsis* salvatge i *rcd1*, aquestes últimes presenten una major expressió de *SAG12* (Fig. 2b). Aquest fet confirma a nivell molecular la senescència prematura observada a *rcd1*.

Gens induïts a *rcd1* que presenten homologia amb gens de funció coneguda

>At4g18360-68296.m01900 F28J12.20 glycolate oxidase- like protein (S)-2-hydroxy-acid oxidase
 >At4g37520-68296.m04152 F19F18.10 F6G17.9 peroxidase, prxr2
 >At4g35290-68296.m03900 F23E12.150 putative protein putative ligand-gated ion channel protein
 >At1g62800-68300.m06155 F23N19.17 aspartate aminotransferase nearly identical to aspartate aminotransferase, cytoplasmic isozyme 2
 >At4g15910-68296.m01633 FCAALL.235 drought-induced protein like
 >At2g47130-68297.m05033 F14M4.4 putative alcohol dehydrogenase
 >At1g17990-68300.m01927 T10F20.3 F2H15.21 putative 12-oxophytodienoate reductase
 >At5g49360-68299.m04729 K7J8.3 K21P3.26 xylosidase
 >At1g63840-68300.m06270 T12P18.14 putative RING zinc finger protein Pfam HMM hit: zinc finger
 >At2g02390-68297.m00144 T16F16.18 putative glutathione S-transferase
 >At1g52190-68300.m05128 F9I5.4 peptide transporter, putative similar to peptide transporter PTR2-B
 >At5g45890-68299.m04328 K15I22.9 senescence-specific cysteine protease SAG12
 >At2g36790-68297.m03855 F13K3.19 putative glucosyl transferase
 >At5g65110-68299.m06538 MQN23.4 acyl-CoA oxidase
 >At2g42790-68297.m04526 F7D19.21 putative citrate synthase
 >At5g43450-68299.m04058 MWF20.16 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase
 >At5g02450-68299.m00156 T22P11.40 T1E22.6 60S ribosomal protein - like 60S ribosomal protein L36
 >At3g08590-68298.m00861 F17O14.6 putative 2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase
 >At1g42990-68300.m04296 F13A115 bZIP transcription factor
 >At5g16570-68299.m01721 MTG13.1 MQK4.25 Expressed protein
 >At5g20250-68299.m02126 F5O24.140 seed imbibition protein
 >At3g01280-68298.m00032 T22N4.9 T4P13.23 putative porin similar to outer mitochondrial membrane porin
 >At5g58070-68299.m05731 K21L19.9 outer membrane lipoprotein.
 >At2g36460-68297.m03821 F1O11.9 putative fructose bisphosphate aldolase;
 >At3g26520-68298.m02921 MFE16.17 gamma tonoplast intrinsic protein
 >At4g12470-68296.m01255 T1P17.60 pEARLI 1-like protein *Arabidopsis thaliana* pEARLI 1
 >At3g44320-68298.m04079 T10D17.110 nitrilase 3
 >At3g57520-68298.m05506 T8H10.120 imbibition protein homolog
 >At1g63220-68300.m06202 F9N12.16 putative elicitor-responsive gene
 >At3g16480-68298.m01807 T2O4.13 MDC8.11 putative mitochondrial processing peptidase alpha subunit
 >At3g04120-68298.m00382 T6K12.26 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase C subunit (GapC)
 >At4g30530-68296.m03316 F17I23.130 putative protein component of aniline dioxygenase (GMP synthase like protein)
 >At2g37450-68297.m03922 F3G5.24 nodulin-like protein
 >At3g59990-68298.m05769 F24G16.260 putative protein ETHIONINE AMINOPEPTIDASE 2
 >At4g23600-68296.m02494 F9D16.70 tyrosine transaminase
 >At2g01630-68297.m00066 T8O11.20 putative beta-1,3-glucanase
 >At2g33590-68297.m03510 F4P9.36 putative cinnamoyl-CoA reductase
 >At2g26330-68297.m02690 T1D16.3 putative receptor-like protein kinase, ERECTA
 >At5g47820-68299.m04554 MCA23.16 kinesin-like protein
 >At2g18750-68297.m01832 MSF3.13 putative calmodulin-binding protein
 >At1g61420-68300.m06000 T1F9.9 receptor kinase
 >At1g17100-68300.m01797 F20D23.21 F6I1.4 SOUL-like protein
 >At1g79990-68300.m08132 F19K16.4 F18B13.7 putative coatomer protein complex, subunit beta 2
 >At3g53920-68298.m05110 F5K20.220 sigma factor SigC
 >At2g22930-68297.m02312 T20K9.14 putative flavonol 3-O-glucosyltransferase
 >At3g27240-68298.m03006 K17E12.6 cytochrome c
 >At5g47910-68299.m04563 MCA23.25 respiratory burst oxidase protein
 >At1g08750-68300.m00838 F22O13.24 putative GPI-anchor transamidase
 >At4g05210-68296.m00603 C17L7.130 C6L9.7 putative protein LpxD gene
 >At3g60250-68298.m05803 F27H5.40 regulatory subunit of protein kinase CK2
 >At3g02530-68298.m00203 F16B3.16 putative chaperonin similar to chaperonin subunit 6a (zeta)
 >At5g55200-68299.m05402 MCO15.15 chaperone GrpE-like
 >At1g09500-68300.m00912 F14J9.16 putative cinnamyl alcohol dehydrogenase
 >At5g25250-68299.m02579 F21J6.108 nodulin - like protein nodulin
 >At2g32150-68297.m03351 F22D22.10 putative hydrolase
 >At3g13580-68298.m01459 K20M4.2 ribosomal protein, putative similar to 60S ribosomal protein L7
 >At5g59820-68299.m05932 MMN10.11 zinc finger protein Zat12
 >At1g72330-68300.m07275 T10D10.20 putative alanine aminotransferase
 >At5g43440-68299.m04057 MWF20.15 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase
 >At3g62420-68298.m06048 T12C14.120 bZIP transcription factor-like protein
 >At3g53990-68298.m05117 F5K20.290 hypothetical protein ER6 protein

>At4g27280-68296.m02940 M4I22.90 putative protein centrin
 >At1g72920-68300.m07336 F3N23.12 virus resistance protein
 >At3g18080-68298.m01986 MRC8.20 beta-glucosidase
 >At3g30775-68298.m06181 MIF6.33 F11I2.11 proline oxidase, mitochondrial precursor (osmotic stress-induced proline dehydrogenase)
 >At1g72910-68300.m07335 F3N23.11 disease resistance protein
 >At5g45890-68299.m04328 K15I22.9 senescence-specific cysteine protease SAG12
 >At2g47000-68297.m05020 F14M4.17 putative ABC transporter related to multi drug resistance proteins and P-glycoproteins
 >At5g19550-68299.m02052 T20D1.70 aspartate aminotransferase Asp2
 >At1g72900-68300.m07334 F3N23.10 virus resistance protein
 >At3g55620-68298.m05298 F11I6.30 eukaryotic translation initiation factor 6 (EIF-6) - like
 >At5g67300-68299.m06794 K8K14.2 K3G17.6 myb-related protein
 >At2g29500-68297.m03049 F16P2.12 putative small heat shock protein

Gens reprimits a *rcd1* que presenten homologia amb gens de funció coneguda

>At1g75040-68300.m07586 F9E10.11 thaumatin-like protein
 >At4g32980-68296.m03613 F26P21.100 homeobox gene ATH1
 >At1g03310-68300.m00268 F15K9.9 putative isoamylase
 >At5g62670-68299.m06253 MRG21.9 plasma membrane proton ATPase-like
 >At3g44630-68298.m04112 T18B22.30 disease resistance protein
 >At1g75820-68300.m07668 T4O12.5 receptor kinase (CLV1)
 >At3g16370-68298.m01783 T2O4.2 MYA6.18 putative APG similar to anter-specific proline-rich protein APG precursor
 >At3g11170-68298.m01167 F11B9.10 F9F8.4 omega-3 fatty acid desaturase,
 >At2g38540-68297.m04046 T6A23.26 putative nonspecific lipid-transfer protein
 >At3g16470-68298.m01805 T2O4.6 MDC8.10 putative lectin
 >At3g28270-68298.m03125 MZF16.5 At14a protein family
 >At1g32060-68300.m03437 T12O21.4 phosphoribulokinase precursor
 >At4g26530-68296.m02858 M3E9.40 T15N24.9 fructose-bisphosphate aldolase - like protein
 >At5g05170-68299.m00504 K2A11.4 cellulose synthase catalytic subunit
 >At1g09340-68300.m00895 T31J12.6 putative RNA-binding protein
 >At4g17090-68296.m01763 FCAALL.5 putative beta-amylase
 >At5g62350-68299.m06217 MMI9.21 ripening-related protein - like
 >At1g19570-68300.m02109 F14P1.9 F18O14.33 GSH-dependent dehydroascorbate reductase 1
 >At1g09340-68300.m00895 T31J12.6 putative RNA-binding protein
 >At1g73540-68300.m07406 T9L24.30 similar to diphosphoinositol polyphosphate phosphohydrolase
 >At2g26080-68297.m02665 T19L18.11 putative glycine dehydrogenase
 >At3g62410-68298.m06047 T12C14.110 CP12 protein precursor-like protein
 >At5g42800-68299.m03983 MJB21.18 dihydroflavonol 4-reductase
 >At4g23810-68296.m02516 T32A16.2 F9D16.280 putative protein AR411
 >At1g35140-68300.m03806 T32G9.32 phosphate-induced (phi-1) protein
 >At3g16420-68298.m01795 T2O4.12 MDC8.7 putative lectin
 >At3g57530-68298.m05507 T8H10.130 calcium-dependent protein kinase
 >At1g27730-68300.m02957 T22C5.18 salt-tolerance zinc finger protein identical
 >At2g18050-68297.m01754 T27K22.8 histone H1
 >At1g74470-68300.m07509 F1M20.15 geranylgeranyl reductase
 >At3g62030-68298.m06008 T17J13.1 F21F14.200 peptidylprolyl isomerase ROC4
 >At5g17220-68299.m01788 MKP11.22 glutathione S-transferase-like protein
 >At1g60950-68300.m05950 T7P1.9 ferredoxin precursor
 >At2g41430-68297.m04374 T26J13.2 F13H10.2 ERD15 protein
 >At1g11310-68300.m01115 T28P6.4 Mlo protein
 >At3g57150-68298.m05467 F24I3.230 putative protein DYSKERIN (NUCLEOLAR PROTEIN NAP57)
 >At2g24820-68297.m02519 F27C12.26 putative Rieske iron-sulfur protein
 >At2g17700-68297.m01710 T17A5.2 putative protein kinase
 >At3g04590-68298.m00431 F7O18.6 putative DNA-binding protein
 >At1g30120-68300.m03209 T2H7.8 pyruvate dehydrogenase E1 beta subunit
 >At3g04230-68298.m00393 T6K12.15 putative 40S ribosomal protein S16
 >At4g00720-68296.m00085 F6N23.11 Shaggy related protein kinase tetha
 >At1g23480-68300.m02561 F28C11.11 F5O8.4 putative glucosyltransferase
 >At2g28670-68297.m02963 T8O18.4 putative disease resistance response protein
 >At1g22840-68300.m02478 F19G10.20 putative cytochrome C
 >At3g13570-68298.m01458 K2O4M.1 serine/arginine-rich protein
 >At2g22990-68297.m02323 T20K9.18 F21P24.5 putative serine carboxypeptidase I
 >At5g57630-68299.m05676 MUA2.22 SNF1 related protein kinase-like protein
 >At5g27640-68299.m02832 T1G16.2 F15A18.100 TRANSLATION INITIATION FACTOR 3 SUBUNIT 9-like protein
 >At2g21380-68297.m02149 F3K23.14 putative kinesin heavy chain
 >At1g32100-68300.m03442 F3C3.10 pinoresinol-laricresinol reductase
 >At4g21580-68296.m02253 F17L22.40 F18E5.200 putative NADPH quinone oxidoreductase
 >At5g20490-68299.m02150 F7C8.80 myosin-like protein
 >At1g74920-68300.m07566 F25A4.11 F9E10.23 putative betaine aldehyde dehydrogenase
 >At5g56940-68299.m05599 MHM17.5 30S ribosomal protein S16
 >At2g19480-68297.m01922 F3P11.8 putative nucleosome assembly protein
 >At1g68570-68300.m06811 F24J5.19 peptide transporter
 >At4g36020-68296.m03992 T19K4.150 glycine-rich protein
 >At2g17450-68297.m01680 F5J6.22 MJB20.1 putative RING zinc finger protein
 >At4g34050-68296.m03738 F28A23.190 coffeoyl-CoA O-methyltransferase - like protein
 >At2g19830-68297.m01958 F6F22.14 copia-like retroelement pol polyprotein
 >At4g24280-68296.m02568 T22A6.110 hsp 70-like protein heat shock 70 protein
 >At4g14570-68296.m01487 FCAALL.258 acylaminoacyl-peptidase like protein
 >At1g48850-68300.m04741 T24P22.3 putative chorismate synthase
 >At3g54690-68298.m05191 T5N23.50 sugar-phosphate isomerase - like protein
 >At4g26570-68296.m02866 T15N24.20 calcineurin B-like protein 3
 >At2g39330-68297.m04129 T16B24.3 putative myrosinase-binding protein
 >At4g17030-68296.m01757 FCAALL.341 allergen like protein
 >At3g62110-68298.m06017 T17J13.70 putative protein polygalacturonase
 >At3g57260-68298.m05479 F28O9.110 beta-1,3-glucanase 2 (BG2) (PR-2)
 >At4g27520-68296.m02975 T29A15.10 F27G19.3 putative protein ENOD20
 >At5g25610-68299.m02623 T14C9.150 dehydration-induced protein RD22
 >At5g59320-68299.m05875 MNC17.10 nonspecific lipid-transfer protein precursor - like
 >At3g26570-68298.m02927 MFE16.9 phosphate transporter
 >At1g80530-68300.m08202 T21F11.14 T21F11.14 similar to nodulin-like protein

>At1g04040-68300.m00339 F21M11.2 unknown protein Similar to acid phosphatase
 >At1g67360-68300.m06665 F1N21.18 putative stress related protein
 >At3g12120-68298.m01288 T21B14.6 omega-6 fatty acid desaturase, endoplasmic reticulum (FAD2)
 >At3g23000-68298.m02536 MXC7.3 SNF1 related protein kinase (ATSRPK1)
 >At4g23400-68296.m02472 F16G20.100 water channel- like protein
 >At1g70890-68300.m07106 F15H11.12 putative major latex protein (MLP149)
 >At1g35720-68300.m03884 F14D7.2 Ca²⁺-dependent membrane-binding protein annexin
 >At1g50010-68300.m04869 F2J10.11 putative tubulin alpha-2/alpha-4 chain
 >At1g55670-68300.m05538 F20N2.33 putative photosystem I subunit V precursor
 >At1g42970-68300.m04294 F13A11.3 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
 >At3g61490-68298.m05936 F2A19.90 putative protein polygalacturonase
 >At1g28330-68300.m03034 F3H9.1 dormancy-associated protein
 >At1g10630-68300.m01034 F20B24.7 putative ADP-ribosylation factor
 >At3g14420-68298.m01561 MOA2.2 putative glycolate oxidase
 >At5g38420-68299.m03479 MXI10.14 ribulose biphosphate carboxylase small chain 2b precursor

Taula 2. Gens induïts i reprimits a *rcd1* que presenten homologia amb gens de funció coneguda.

Referències:

- Buchanan-Wollaston V.** (1997) The molecular biology of leaf senescence. *J Exp Bot.* 48:181-199.
- Kohler SA, Menotti E, Kuhn LC.** (1999) Molecular cloning of mouse glycolate oxidase. High evolutionary conservation and presence of an iron-responsive element-like sequence in the mRNA. *J Biol Chem.* 274:2401-2407
- Mussig C, Biesgen C, Lisso J, Uwer U, Weiler EW, Altmann T.** (2000). A novel stress-inducible 12-oxophytodienoate reductase from *Arabidopsis thaliana* provides a potential link between Brassinosteroid-action and Jasmonic-acid synthesis. *J Plant Physiol.* **157**:143-152.
- Noh YS, Amansino RM.** (1999) Identification of a promoter region responsible for the senescence-specific expression of *SAG12*. *Plant Mol Biol.* 41: 181-194.
- Bleecker AB, Estelle MA, Somerville C, Kende H.** (1988) Insensitivity to ethylene conferred by a dominant mutation in *Arabidopsis thaliana*. *Science.* 241:1086-1089.
- Overmeyer K, Tuominen H, Kettunen R, Betz C, Langebartels C, Sandermann H, Kangasjärvi J.** (2000) Ozone-sensitive *Arabidopsis rcd1* mutant reveals opposite roles for ethylene and jasmonate signaling pathways in regulating superoxide-dependent cell death. *Plant Cell.* 12: 1849-1862.
- Swidzinski JA, Sweetlove LJ, Leaver CJ.** (2002) A custom microarray analysis of gene expression during programmed cell death in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 30: 431-446.
- Thompson JE, Legge RL, Barber RF.** (1987) The role of free radicals in senescence and wounding. *New Phytol.* 105:317-344.
- Torres MA, Onouchi H, Hamada S, Machida C, Hammond-Kosack KE, Jones JD.** (1998) Six *Arabidopsis thaliana* homologues of the human respiratory burst oxidase (gp91phox). *Plant J.* 14:365-370

VII.2. (Article V) Expression of low molecular weight heat-shock proteins (sHsps) and total antioxidant activity in the Mediterranean woody *Quercus ilex* L. in relation to seasonal and diurnal changes in physiological parameters.

En l'article que es presenta a continuació s'han analitzat els canvis en els paràmetres fisiològics de fulles joves i velles i brots d'alzina (*Quercus ilex*), en condicions de clima mediterrani, en relació a l'acumulació de sHsps-CI i l'activitat antioxidant total (TAA). Per aprofundir en l'estudi de l'acumulació de sHsps-CI es va utilitzar la immunodetecció en electroforesis 2D, una tècnica prèviament desenvolupada per teixits de surera (articles I i II). Diversos treballs han mostrat que les sHsps-CI de diferents plantes tenen un elevat grau d'homologia i els anticossos presenten una reacció creuada entre les diferents espècies (DeRocher *et al.* 1991, Almoguera *et al.* 1993, Jinn *et al.* 1993). Donada aquesta reacció creuada, s'ha pogut utilitzar l'anticòs anti-QsHsp14.4-CI per immunodetectar sHsps-CI en *Q. ilex*.

(i) Expression of low molecular weight heat-shock proteins (sHsps) and total antioxidant activity in the Mediterranean woody *Quercus ilex* L. in relation to seasonal and diurnal changes in physiological parameters.

sHsps, TAA and physiological state in *Quercus ilex*

(ii)

Dolors Verdaguer^a,
Xavier Aranda^b,
Anna Jofré^c,
Bouchra El Omari^b,
Marisa Molinas^c,
Isabel Fleck^b

(iii)

^a Àrea de Fisiologia Vegetal, Departament de Ciències Ambientals, Facultat de Ciències, Universitat de Girona, Campus de Montilivi, Girona E17071, Spain.

^b.Unitat de Fisiologia Vegetal, Departament de Biologia Vegetal, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Diagonal 645, E.08028 Barcelona, Spain.

^c.Àrea de Biologia Cel.lular, Departament de Biologia, Facultat de Ciències, Universitat de Girona, Campus de Montilivi, Girona E17071, Spain.

(iv)

Dolors Verdaguer^a,
Àrea de Fisiologia Vegetal, Departament de Ciències Ambientals, Facultat de Ciències,
Universitat de Girona, Campus de Montilivi 17071, Girona, Spain.
dolors.verdaguer@udg.es

Abstract

Seasonal and diurnal changes in physiological parameters in relation to the accumulation of low molecular weight proteins (sHsps) and total antioxidant activity (TAA) were characterized in young and old leaves and stems of *Quercus ilex* in Mediterranean conditions. In summer, leaves showed a higher accumulation of sHsps and TAA. There was no recorded effect of leaf ontogeny, sampling day or day time, although the leaves were physiologically recovered in the afternoon. Leaves and stems showed a much higher contribution of hydrophilic than lipophilic antioxidants to TAA. High summer light intensities and temperatures and restricted water availability can be related to an increase in reactive oxygen species that activate protective mechanisms. TAA in stems followed the same pattern as in leaves. By contrast, both environmental conditions and ontogeny could be governed stem sHsps accumulation. In young stems, sHsps was expressed only in summer conditions, whereas old stems showed sHsps accumulation throughout the seasons. This could be attributed to a higher quantity of lignified and suberized cells in old stems than in young ones. In 2D immunodetection for leaves and stems, two sets of immunospots in the 17 and 10 kDa regions were observed. In stems, immunospots in the 10 kDa region increased from winter to summer.

Keyword index

antioxidant compounds, field conditions, holm oak, oxidative stress, physiological state, sHsp

Introduction

In plants, the display of a general adaptation syndrome (GAS) has been described in relation to those plants exposed to wide seasonal and/or diurnal changes of environmental conditions. The GAS refers to the response of the plant to the time of exposure and intensity of the stress (Leshem *et al.* 1998). At first, the plant detects the stressor decreasing the basal state of resistance and dying if the stress is intense. If it survives, the plant enters a resistance or acclimation stage in which stress-coping strategies are activated and a steady state level of tolerance is reached. Lastly, if the plant is exposed to the stressor for a long period and, eventually, its adaptation capability exhausted, it dies. Many environmental stress agents exert at least part of their effect by causing oxidative damage (Polle & Rennenberg 1993, 1994; Smirnoff 1998; Shigeoka *et al.* 2002). According to Leshem *et al.* (1998) the induction of free radical scavengers and/or other antioxidant substances and the synthesis of heat shock proteins (Hsps), are supposed to be important factors entailed in the coping mechanisms of plants under GAS. In the present study we investigate whether an increase in the antioxidant activity and/or the induction of small heat shock proteins (sHsps) are activated in a Mediterranean oak tree showing GAS. Under Mediterranean climate, evergreens repeatedly face important environmental constraints in their life-span and cope with large diurnal oscillations that govern daily changes in physiological processes.

In plants, several enzymatic and non-enzymatic mechanisms with complimentary and interdependent strategies are involved in the antioxidant defence system. (Polle & Rennenberg 1994). Some antioxidant compounds are hydrophilic scavengers, such as ascorbic acid and glutathione; others are lipophilic substances, such as carotenoids and α -tocopherol, which are found in the membrane bilayer. On the other hand, small heat shock proteins (sHsps) are low molecular weight chaperones (15-30 kDa) involved in maintaining cell function and cell survival under stress (Vierling 1991; Parsell & Lindquist 1994). In plants, the sHsps are mass-synthesized in response to heat and other environmental stresses, including oxidative ones (Waters, Lee & Vierling 1996; Pla *et al.* 1998); and to certain development cues, such as embryo development (e.g. Wehmeyer & Vierling 2000; Puigderrajols *et al.* 2002) and seed maturation (Hernandez & Vierling 1993). However, at present, little is known about the synthesis of sHsps in plants under field conditions and in relation to antioxidant activity. In fact, sHsps field studies are limited to a few crop-annual herbaceous species (Burke *et al.* 1985 for *Gossypium hirsutum* L.; Kimpel & Key 1985 for *Glycine max* L.; Hernandez & Vierling 1993 for *Medicago sativa* and Nguyen *et al.* 1994 for *Triticum aestivum*). Only recently, Stout & Al-Niemi (2002), have described the accumulation of sHsps in a herbaceous species encountered in geothermal areas (*Dichanthelium lanuginosum*).

Here, we analyse the antioxidant activity and the sHsps expression in a field growing holm oak, *Quercus ilex* L., in different seasonal and daily weather conditions. The holm oak is a Mediterranean sclerophyllous broadleaved evergreen, well characterized at a physiological level (Fleck *et al.* 1998, 2000). The Mediterranean climate is characterized by a summer stress period due to low precipitation, high temperatures and irradiance and high vapour pressure deficit and by a winter stress period as a result of low temperatures and intense light. Total, lipophilic and hydrophilic, antioxidant activity and cytosolic Class I sHsps accumulation are analyzed in holm oak leaves and stems with regard to the organ ontogeny and the physiological state of the plant.

Abbreviations used:

A, net photosynthesis; ABTS⁺, 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid); *E*, transpiration; *g*, stomatal conductance; *F*, fluorescence intensity at any point; *F_o*, minimum fluorescence yield in dark-adapted state; *F_m*, maximum fluorescence yield in dark-adapted state; *F'_m*, maximum fluorescence yield in light-adapted state; *F_v/F_m*, potential quantum yield of PSII (equivalent to $(F_m - F_o)/F_m$); F/F'_m , photochemical PSII efficiency (equivalent to $(F'_m - F)/F'_m$); HAA; hydrophilic antioxidant activity; LAA, lipophilic antioxidant activity; *NPQ*, non-photochemical quenching (equivalent to $(F_m - F'_m)/F'_m$); *PAR*, photosynthetically active radiation; *TAA*, total antioxidant activity; *VPD*, vapor pressure deficit; *T*, temperature.

Material and methods

Plant material and site description

Plant material was collected in the field, during the period 1998-2000 in a holm oak stand with a sparse herbaceous layer. The stand is located in Vilassar de Dalt in the littoral mountains near Barcelona, northeast Spain (41°20'N, 1°55'E; alt. 100.m). The climate at this site is typically Mediterranean with cold winters, cool wet springs and autumns and hot dry summers. Climatological data were recorded at the Vilassar meteorological station located 3 km from the study site (Table 1). During the samplings, leaf and air temperature, PAR and VPD were directly measured at the collection site (Table 2). The days on which measurements were taken and samples were harvested can be considered, according to Table 1, as representative of summer, spring and winter days at the study site.

For measurements and sampling, three healthy mature trees about 2.30 m in height and a main stem of 20 cm in diameter at breast height, were selected. Representative twigs from the outside of the canopy were randomly chosen from each tree. In the selected twigs, young and old leaves (YL, OL) and young and old stems

(YS, OS) were distinguished and sampled for analysis. We considered young leaves to be those that were fully expanded and soft, showing a green colour on the upper side, from pale to dark, while the lower side was covered by a fine layer of hairs. Old leaves were coriaceous with the upper side deep-dark green and the lower side covered by white hairs. Old leaves (from 8 to over 12 months old) were from sprouts of the previous growth period except in the winter, when they were from the last growth period. We considered young stems to be those that were still green and hairy and old stems those brown coloured and woody.

Measurements and samplings were conducted in midsummer, late spring and mid-winter (22-23 July 1998, 8-9 June 1999, 8-9 February 2000, respectively). Data were recorded and samples were taken in the morning (8-9 am), midday (2 -3 pm) and afternoon (7 - 8 pm, summer only). Harvested samples were immediately frozen in liquid nitrogen at the collection site and stored at -80°C until use.

Gas exchange and chlorophyll fluorescence measurements

Net photosynthesis (A), transpiration (E) and stomatal conductance (g) were determined on 8-10 attached leaves for age, tree and sampling time with a portable Li-6200 (Li-Cor, Inc., Lincoln, NE, USA) device using standard methods. Each replicate was carried out in 20-40 s. Gas-exchange parameters were expressed on a projected leaf area basis. Leaf images were obtained with an Epson GT5000 scanner and then processed using image analyzer software supplied by the Technical-Scientific Service of the University of Barcelona, in order to estimate leaf area.

The components of chlorophyll fluorescence were quantified on the same leaves as for gas-exchange measurements with a portable modulated fluorometer MiniPam Photosynthesis Yield Analyzer (Walz, Effeltrich, Germany). The instrument was equipped with a leaf-clip holder (2030-B; Walz) including a micro-quantum sensor to monitor PAR and a thermocouple to measure temperature on lower leaf surfaces (Bilger *et al.* 1995). The fibre optics axis forms a 60° angle with leaf plane, avoiding shading of the sample when external actinic illumination is applied. After clamping the leaf-clip holder onto the leaf, the actual fluorescence, F, was monitored to ascertain that it was stable (weak measuring beam). The maximum fluorescence yield F'_m , was measured during a 0.8s saturating flash at 6000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and exposure to natural illumination. The fraction of absorbed light utilised in electron transport is given by PSII photochemical efficiency, $\Phi F / F'_m$ (Genty *et al.* 1989).

After these measurements, the leaves were wrapped in aluminium foil to obtain dark-adapted fluorescence values: F_o , F_m and, F_v / F_m (potential quantum yield of PS II). The adaptation time was at least 20 minutes. The non-photochemical quenching coefficient (NPQ) given by $(F_m - F'_m) / F'_m$ was calculated. The data were corrected for changes in measuring light intensity caused by temperature changes of the Mini Pam. Correction was calculated by monitoring the fluorescence signal of a standard provided with the instrument.

Antioxidant Activity

After leaf gas-exchange and chlorophyll fluorescence measurements, the samples (either leaves or stems) were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until the assay of the total antioxidant activity (TAA) according to Arnao *et al.* (2001a). The method used is based on the capacity of biological samples to scavenge the antioxidant 2,2'-axino-bis-(3-ethylbenzthiazoline-6sulfonic acid) radical cation (ABTS^{·+}) compared with a standard antioxidant (ascorbic acid or trolox: (±)-6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid) in a dose-response curve. Leaf extraction on 0.2 g fresh weight was performed according to Arnao *et al.* 2001b. This method enables separation of lipophilic antioxidant activity (LAA) from hydrophilic antioxidant activity (HAA). Therefore, the relative contribution of both LAA and HAA antioxidant systems to the TAA can be evaluated. Data were expressed as moles of trolox or ascorbic acid.g.fresh weight. Trolox and ascorbic acid have the same antioxidant activity (Arnao *et al.* 2001a).

Protein extraction, electrophoresis and immunoblotting

The samples were homogenised in liquid nitrogen and suspended in 56 mM Na₂CO₃, 56 mM DTT, 2% (v/v) SDS, 12% (w/v) sucrose, 2 mM EDTA for one dimensional electrophoresis or in 9M urea, 2% (v/v) Triton x 100, 130 mM DTT, 2 % (v/v) Pharmalyte 3-10 (Amersham Pharmacia Biotech), and 2 % (v/v) PVP for two dimensional electrophoresis. Protein concentrations were determined according to Bradford (1976). One-dimensional SDS-PAGE was performed with a Mini-Protean II apparatus (Bio-Rad) using a 12 % (w/v) resolving gel and a 3 % (w/v) stacking gel. Proteins were transferred onto PVDF membranes (Millipore) and incubated with antisera. Bound antibodies were detected using goat anti-rabbit IgG peroxidase conjugated (GAR-Po, Nordic Immunology) and a chemiluminiscent system (BM Chemiluminescence Western Blotting Substrate, Boehringer Mannheim). Two-dimensional electrophoresis was performed with a Multiphor II (Amersham Pharmacia Biotech) according to the manufacturer's instructions, using an Immobiline DryStrip pH 3-10 L for IEF and ExcelGel SDS gradient 8-18% and ExcelGel SDS buffer strips for SDS-PAGE. The proteins were transferred onto PVDF membranes (Millipore) and treated as above.

Immunoblotting of sHsps was performed using polyclonal antibodies raised against cork oak (*Quercus suber*) recombinant QsHsp17.4-CI protein (Pla *et al.* 1998). We found out that QsHsp17.4-CI antiserum reacts strongly with immunorelated class I cytoplasmic sHsps of *Quercus* family (unpublished data).

Statistical analyses

Statistical analyses were conducted by multifactor ANOVA using SPSS for Windows (Versions 9.01, SPSS Inc.). The main effects and interactions were tested, against appropriate error terms, for tree, age (young vs. old leaves), season, day and time of

measurement. For parameters sensitive to variations in light, *PAR* was used as a covariate. The number of replicates is indicated in the table or the figure legends. It is not always easy to show the differences between parameters after the statistical tests in the figures. We therefore describe them in the "Results" section.

Results

Gas exchange and photochemistry

Leaf gas exchange and photochemistry parameters were significantly different depending on the season and time of the day. However, the effects of leaf ontogeny (old vs young) and of sampling day within the season were not significant. Therefore, results are given pooling together data from young and old leaves and from the two samplings in each season (Table 3.).

In summer days, leaf photosynthesis rates (*A*) measured either in the morning or at midday hours were higher than in the other seasons, whereas reduced stomatal conductance (*g*) was found. In these hours high VPD and leaf temperature accounted for the elevated transpiration rate (*E*). Also, high irradiance (*PAR*) led to a high electron transport rate and a low photochemical PSII efficiency ($\Phi F/F'_m$). Leaf chlorophyll fluorescence analysis evidenced that photoprotection mechanisms in front of excessive *PAR* were effective, since potential quantum yield (F_v/F_m) values did not differ with respect to the other seasons. Dissipation of excessive light energy as heat, expressed as non-photochemical quenching (*NPQ*), was in fact highest in the summer and at midday. In the afternoon, leaves showed low photosynthesis and electron transport rates due to low irradiance. Moreover, low VPD and leaf temperature would explain the low transpiration rates obtained. So, leaves measured at afternoon recovered physiologically, as evidenced by the increase in stomatal conductance and the high photochemical PSII efficiency ($\Phi F/F'_m$).

In spring *PAR*, VPD and air temperature values were between those in summer and winter, but surprisingly, stomatal conductance was lower than that measured in winter or also in the summer, when transpiration rates were much elevated than in spring. These could account, for the very low photosynthetic and fluorescence parameters rates encountered in the two days of June that measures were taken.

In winter, a similar photosynthesis rate that in summer was achieved in spite of low *PAR*, attributable to an increased stomatal conductance. Moreover, high $\Phi F/F'_m$ and low *NPQ* values at morning and midday indicate a reduced participation of photoprotective mechanisms.

Leaf antioxidant activity and sHsps accumulation

Leaf total antioxidant activity (TAA) showed seasonal variations, being daily or leaf ontogeny effect not significant (Fig 1A, 2A). TAA measured in leaves harvested during the summer was 50% higher than in those harvested in spring or winter. Moreover, in both young and old leaves, TAA contribution of hydrophilic antioxidants was approximately 94%, whereas the lipophilic antioxidants only represented about the 6%.

On the other hand, leaf accumulation of sHsps showed also a defined seasonal pattern and, no differences between young and old leaves could be appreciated when were compared (Fig. 3). Leaves collected in summer showed the high sHsps accumulation, whereas, in leaves from spring and winter samplings, no protein or extremely low levels were detected by the antiserum (Fig. 3A). Moreover, the immunobands at different day hours did not show any appreciable difference, either in young or old summer leaves although, leaves sampled at the afternoon were physiologically recovered from stress, as shown by F_v/F_m values (Table 3; Fig. 3B).

Because the QsHsp17.4-CI antiserum reacts with different class I sHsps and the signal observed could represent more than one specific subset of these proteins, young and old summer leaf extracts were separated on two-dimensional electrophoresis gels (2D) and analyzed by Western blotting. Results showed that in both young and old summer leaves two subsets of proteins, one at the 17 kDa region and another at c. 10 kDa, were showed (Fig. 3C). At the 17 kDa region, 4-6 protein species were observed, although only a single protein specie stand out. This main immunospot matched up with the main immunospot of the recombinant QsHsp17.4-CI (Fig. 3C). In the ca. 10 KDa region, the polyclonal antibodies detected a set of 4 protein species (Fig. 3C).

Stem antioxidant activity and sHsps accumulation

Stem TAA showed, as in leaf extracts, seasonal variations, but there was not effect of diurnal variation or stem ontogeny (Fig 1B, 2B). Moreover, TAA content, showed also a much higher contribution of hydrophilic (94%) than lipophilic antioxidants (6%).

Two factors seem to influence the accumulation pattern of sHsps in stems: the weather conditions and the stem development stage. In summer, when environmental parameters measured reached stressful values (Table 2), old and young stems showed a high level of sHsps expression (Fig. 4). However, in spring and winter, while no protein or extremely low level of sHsps was detected in young stems, old stems showed a high sHsps accumulation (Fig. 4A). Furthermore, in young and old summer harvested stems, and also in spring and winter old stems, no significant changes in the immunobands intensity were observed at different day hours and in the two consecutive days analyzed (Fig 4B).

In stems 2-D immunodetection a set of 4-6 protein species was induced at the 17 kDa region and the main spot match up with the main spot of the recombinant QsHsp17.4-CI (Fig. 4C). At the Mr 10 kDa region four protein species accumulated in old winter stems and six in spring (old) and in summer (old and young) stems.

Interestingly, the accumulation of ca. 10 kDa protein was highest in summer harvested stems, and lower in spring and winter. In summer, the c. 10 kDa protein species accumulated in greater amounts than those at the 17 kDa region.

Discussion

GAS response in the Mediterranean holm oak implies antioxidant compounds and sHsps

Results support the participation of antioxidant substances and sHsps in the GAS response of trees growing under Mediterranean climate. The holm oak activates different physiological and molecular mechanisms to cope with the stressful conditions encountered in the hot, dry summer periods. In fact, holm oak leaves collected on summer days showed high values of TAA and cytoplasmic sHsps accumulation and an increase in NPQ in comparison with spring and winter leaves. NPQ is indicative of thermal energy dissipation and related to the de-epoxidative state of xanthophyll cycle compounds (Demming-Adams & Adams 1992). Under high light intensity and leaf temperatures of up to 38°C and high VPD, restricted water availability induced stomatal closure, limited photosynthesis and led to a decline in photochemical PSII efficiency. In such environmental conditions, light absorption highly exceeds that required for photosynthetic assimilation and probably gives rise to an over concentration of reactive oxygen species (ROS) (Elstner 1991; Foyer, Lelandais & Kunert 1994). Moreover, the effect of high temperatures and irradiance and the subsequent enhancement of many metabolic processes including mitochondrial and plasma membrane-linked electron transport systems should also increase ROS production (Shigeoka *et al.* 2002). An increase in ROS concentration may result in oxidative damage and so the protective mechanisms, antioxidant substances and sHsps among them must be activated (Downs, Ryan & Heckathorn 1999). A high antioxidant capacity was described in mature leaves of *Fagus sylvatica* collected in summer and it was also attributable to a protective measure for coping with high temperatures and exposure to elevated ozone concentrations (Polle & Morawe 1995).

Large circadian fluctuations in temperature, irradiance and VPD, like those recorded in the present study, are typical of the Mediterranean climate. Mediterranean plants are transiently subjected to heat, water and light stress during the peak day hours but recover in the late afternoon. Nevertheless, results show that throughout the two consecutive days monitored in summer, leaves and stems maintain a high level of sHsps and TAA, even in day hours when the temperature drops to ca. 24°C and the plants were physiologically recovered. The persistence of the sHsps in the absence of severe temperature stress could be explained by a high sHsps stability. In fact, the half-life of a pea cytoplasmic sHsp was estimated at 37.7 ± 8 h (DeRocher *et*

al. 1991) and that of a chloroplastic Hsp21 at 52 ± 12 h (Chen *et al.* 1990). DeRocher *et al.* (1991) suggested that sHsps may persist for several days, either to repair cell damage due to the HS, or to increase cell thermotolerance. The high levels of sHsps detected in *Q. ilex* during the two consecutive days could therefore also be attributed to a new synthesis. It should be interesting to analyze changes in sHsps and mRNAs in response to circadian fluctuations, particularly because there is very little information available for sHsps (see the revision by Rensing & Monnerjahn 1996).

Antioxidant activity in stems and leaves

In summer, TAA in leaves and stems was much higher than in winter and spring. In fact, TAA values increased by about 50% in leaves and about 32% in stems. In leaves, ROS production is mainly associated with an intense chloroplast metabolism (Elstner 1991) whereas in stems, it is more likely to be associated with oxidative stress generated by lignification and suberization (Gross 1980). Results showed that in holm oak, the relative contribution to TAA by hydrophilic antioxidants was always about 16 times greater than that of lipophilic antioxidants. In this species, ascorbate is the most abundant hydrophilic antioxidant, as shown by García-Plazaola, Artetxe & Becerril (1999). On the other hand, β -carotene and the components of the xanthophyll cycle (zeaxanthin+ antheraxanthin, violaxanthin) are the major lipophilic TAA components, as reported by El Omari *et al.* (2002) in samples obtained from the same trees and collected at the same time as those used in our study.

Furthermore, the relative importance of hydrophilic versus lipophilic components to the TAA could be related to their different mechanisms of action. Hydrophilic components act directly, reducing activated oxygen species or other protective components. Thus they need to be regenerated and to be effective should be present in large quantities. By contrast, lipophilic antioxidants such as carotenoids prevent the formation of activated oxygen by competing for the energy leaked from the photosystems without a concomitant loss of the molecule.

sHsps accumulation and regulation signals

The fact that at certain times sHsps are present in stems but absent from leaves suggests that, in addition to environmental signals, endogenous signals could also account for regulation. Moreover, whereas no sHsps could be detected in young stems in winter and spring, old stems showed high levels of sHsps accumulation. The major difference between young and old stems lies in the intensity of the secondary growth, shown by a greater amount of lignified and suberized tissues. Lignin and suberin deposition involve the synthesis of phenolic precursors and their polymerization by cell-wall laccases, a process that generates free radicals and endogenous oxidative stress (Inzé & Von Montagu 1995; Whetten, MacKay & Sederoff 1998). It has been shown that suberized and lignified cells constitutively express sHPs (Pla *et al.* 1998) and that recombinant cells expressing cork oak QsHsp10-CI show enhanced cell

viability under temperature and also oxidative stress (Jofré, Molinas & Pla, submitted). On the other hand, the massive expression of sHsps in leaves and young stems in the hot summer period could be induced by environmental factors. In short, in the field-growing holm oak, sHsps accumulation is not restricted to environmental stress responses but also includes some developmental cues.

Expression of different sHsps in leaves and stems

As shown by 2D immunodetection patterns, in the holm oak, the anti-QsHsp17.4-Cl antibody recognized two sets of immunospots in the 17 and ca. 10 kDa regions, respectively. Similar 2D patterns were previously detected in cork oak endogenous oxidatively-stressed cork and wood tissues and also in mature somatic embryos and plantlets (Puigderrajols et al. 2002; (Jofré, Molinas & Pla, submitted). Polypeptides in the 17 kDa region were induced by heat stress, whereas polypeptides in the 10 kDa region were specifically induced by oxidative stress (Puigderrajols et al. 2002; Jofré, Molinas & Pla submitted). In the holm oak, stems and leaves accumulate similar amounts of the 17 kDa protein species throughout the year. However, the protein species around the ca. 10 kDa region increase from winter to summer. While only four immunospots were distinguished in winter, six more intense immunospots were detected in spring and summer. The high expression of 10 kDa polypeptides in summer is probably related to an increase in ROS concentration enhanced by environmental and physiological conditions. In leaves, the very high TAA in comparison with stems could explain why the accumulation of ca.10 kDa protein species is lower.

Acknowledgments

This research was supported by funds from DGICYT PB98-1198-C02-01, DGES PB96-0450-A and from Generalitat de Catalunya 1997 SGR00240,1999 SGR0020 and 1999 SGR00167. We thank the Servei de Meteorologia, Departament de Medi Ambient, of the Generalitat de Catalunya for the climatological data.

References

- Arnao M.B., Cano A., Alcolea J.F. & Acosta M. (2001a) The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. *Food Chemistry* **73**, 239-244.
- Arnao M.B., Cano A. & Acosta M. (2001b) Estimation of free radical-quenching activity of leaf pigment extracts. *Phytochemistry Analysis* **12**, 138-143

- Bilger W., Schreiber U. & Bock M. (1995). Determination of the quantum efficiency of photosystem II and non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence in the field. *Oecologia* 102,425-432.
- Bradford M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Annals of Biochemistry* **72**, 248-254.
- Burke J.J., Hatfield J.L., Kelin R. & Mullet J.E. (1985) Accumulation of heat shock proteins in field-grown cotton. *Plant Physiology* **78**, 394-398.
- Chen Q., Lauzon L.M., DeRocher A.E. & Vierling E. (1990) Accumulation, stability, and localization of a major chloroplast heat-shock protein. *Journal of Cell Biology* **110**, 1873-1883.
- Demmig-Adams B. & Adams III W.W. (1992) Photoprotection and other responses of plants to high light stress. *Annual Review Plant Physiology Plant Molecular Biology* 4,599-626.
- DeRocher A. E., Helm K.W., Lauzon L.M. & Vierling E. (1991). Expression of a conserved family of cytoplasmic low molecular weight heat shock proteins during heat stress and recovery. *Plant Physiology* **96**, 1038-1047.
- Downs C.A., Ryan S.L. & Heckathorn S.A. (1999) The chloroplast small heat-shock protein: Evidence for a general role in protecting photosystem II against oxidative stress and photoinhibition. *Journal of Plant Physiology* 4, 477-485.
- El Omari B., Fleck I., Aranda X., Abadía A., Cano A & Arnao M.B. (2002) Total antioxidant activity in *Quercus ilex* resprouts after fire. *Plant Physiology and Biochemistry* (in press)
- Elstner E.F. (1991) Mechanisms of oxygen activation in different compartments of plant cells. In: Active oxygen/oxidative stress and plant metabolism. (eds. E.J. Pell & K.L. Steffen), pp. 13-25. American Society of Plant Physiology. Rockville, M.D.
- Fleck I., Aranda X., El Omari B., Permanyer J., Abadía A. & Hogan K.P. (2000) Light energy dissipation in *Quercus ilex* resprouts after fire. *Australian Journal of Plant Physiology* **27**, 129-137.
- Fleck I., Hogan K.P., Illorens L., Abadía A. & Aranda X. (1998) Photosynthesis and photoprotection in *Quercus ilex* resprouts after fire. *Tree Physiology* **18**, 607-614.
- Foyer D.H., Lelandais M. & Kunert K.J. (1994) Photooxidative stress in plants. *Plant Physiology* **92**, 696-717.
- García-Plazaola J.I., Artetxe U. & Becerril J.M. (1999) Diurnal changes in antioxidant and carotenoid composition in the Mediterranean sclerophyll tree *Quercus ilex* (L) during winter. *Plant Science* **143**, 125-133.
- Gross G.G. (1980) The biochemistry of lignification. *Advanced Botanical Research* **8**, 25-63.
- Hernandez L.D. & Vierling E. (1993) Expression of low molecular weight heat-shock proteins under field conditions. *Plant Physiology* **101**, 1209-1216.
- Inzé D. & Van Montagu M. (1995) Oxidative stress in plants. *Current Opinion in Biotechnology* **6**, 153-158.
- Jofré A, Molinas M. & Pla M. A 10kDa class I sHsp protects *Escherichia coli* from oxidative and high temperature stress. (submitted)
- Kimpel J.A. & Key J.L. (1985) Presence of heat shock mRNAs in field grown soybeans. *Plant Physiology* **79**, 672-678.
- Leshem Y., Kuiper P.J.C., Erdei L., Lurie S. & Perl-Treves R. (1998) Do selye's mammalian "GAS" concept and "co-stress" response exist in plants? *Annals of the New York Academy of Sciences* **851**, 199-208
- Martínez-Ferri E., Balaguer L., Valladares F., Chico J.M. & Manrique E. (2000) Energy dissipation in drought avoiding and drought tolerant tree species at midday during the Mediterranean summer. *Tree Physiology* 20: 131-138.

- Nguyen H.T., Joshi C.P., Klueva N., Weng J., Hendershot K.L. & Blum A. (1994) The heat-shock response and expression of heat-shock proteins in wheat under diurnal heat stress and field conditions. *Australian Journal of Plant Physiology* **21**, 857-867.
- Parsell D.A. & Lindquist S. (1994) Heat shock proteins and stress tolerance. In: The biology of heat shock proteins and molecular chaperones (eds R.I. Morimoto, A. Tissières & C. Georgopoulos), pp. 457-494. Cold Spring Harbor Laboratory press, New York.
- Pla M., Huguet G., Verdaguer D., Puigderrajols P., Llompert B., Nadal A. & Molinas M. (1998) Stress proteins co-expressed in suberized and lignified cells and in apical meristems. *Plant Science* **139**, 49-57.
- Polle A. & Morawe B. (1995) Seasonal changes of the antioxidative systems in foliar buds and leaves of field-grown beech trees (*Fagus sylvatica*, L.) in a stressful climate. *Botanica Acta* **108**, 314-320.
- Polle A. & Rennenberg H. (1994) Photooxidative stress in trees. In: Photooxidative stresses in plants: causes and amelioration (eds C. Foyer & P. Mullineaux), pp. 199-218. CRC Press, Inc., Boca Raton.
- Polle A. & Rennenberg H. (1993) Significance of antioxidants in plant adaptation to environmental stress. In: Plant adaptation to environmental stress (eds L. Fowden, F.T. Mansfield & J. Stoddard), pp. 263-273. Chapman & Hall, London.
- Puigderrajols P., Jofré A., Mir G., Pla M., Verdaguer D., Huguet G. & Molinas M. (2002) Developmentally and stress-induced small heat shock proteins in cork oak somatic embryos. *Journal of Experimental Botany* **53**, 1445-1452.
- Rensing L. & Monnerjahn C. (1996) Heat shock proteins and circadian rhythms. *Chronobiology international* **13**, 239-250.
- Shigeoka S., Ishikawa T., Tamoi M., Miyagawa Y., Takeda T., Yabuta Y. & Yoshimura K. (2002) Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. *Journal of Experimental Botany* **53**, 1305-1319.
- Smirnov N. (1998) Plant resistance to environmental stress. *Current Opinion In Biotechnology* **9**, 214-219.
- Stout R.G. & Al-Niemi T.S. (2002) Heat-tolerant flowering plants of active geothermal areas in Yellowstone National Park. *Annals of Botany* **90**, 259-267.
- Vierling E. (1991) The role of heat shock proteins in plants. *Annual Review Plant Physiology Plant Molecular Biology* **42**, 579-620.
- Waters E.R., Lee G.J. & Vierling E. (1996) Evolution, structure and function of the small heat shock proteins in plants. *Journal of Experimental Botany* **47**, 325-338.
- Wehmeyer N. & Vierling E. (2000) The expression of small heat shock proteins in seeds respond to discrete developmental signals and suggests a general protective role in desiccation tolerance. *Plant Physiology* **112**, 747-757.
- Whetten RW, MacKay JJ y Sederoff RR (1998). Recent advances in understanding lignin biosynthesis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **49**: 585-609.

Table 1. Climatological data from the meteorological station nearest to the study site for one month before the days that samples and measurements were taken.

	Summer (98) 22.VI-21.VII	Spring (99) 8.V-7.VI	Winter (00) 8.I-7.II
Mean daily maximum Vapour pressure deficit (KPa)	1.8	1.3	0.8
Maximum absolute Vapour pressure deficit (KPa)	3.0	2.2	1.5
Mean daily minimum Vapour pressure deficit (KPa)	0.2	0.2	0.1
Minimum absolute Vapour pressure deficit (KPa)	0.0	0.0	0.0
Mean daily maximum temperature (°C)	28.7	24.6	14.7
Maximum absolute temperature (°C)	31.5	33.3	19.2
Mean daily minimum temperature (°C)	20.9	16.4	6.2
Minimum absolute temperature (°C)	18.9	14.1	2.4

Table 2. Climatological data during the measurements and samplings in two (A, B) summer, spring and winter days and, leaf temperature, at the study site. Values represent the mean \pm S.E. for n = 12.

Sampling time	day hour	PAR ($\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)		VPD (kPa)		T air ($^{\circ}\text{C}$)		T leaf ($^{\circ}\text{C}$)	
		A	B	A	B	A	B	A	B
22-23 Jul (summer 98)	8-9 am	1493 \pm 31	989 \pm 230	3.5 \pm 0.08	2.7 \pm 0.19	32.6 \pm 0.3	30.5 \pm 1.1	35.6 \pm 0.3	32.2 \pm 0.1
	2-3 pm	1528 \pm 60	1554 \pm 46	3.2 \pm 0.09	4.9 \pm 0.18	32.7 \pm 0.4	37.7 \pm 0.3	36.3 \pm 0.3	41.7 \pm 0.3
	7-8 pm	74 \pm 5	62 \pm 7	1.6 \pm 0.03	1.6 \pm 0.07	24.2 \pm 0.1	24.3 \pm 0.1	24.1 \pm 0.1	24.1 \pm 0.3
8-9June (spring99)	8-9 am	814 \pm 39	876 \pm 69	2.1 \pm 0.06	2.0 \pm 0.03	25.2 \pm 0.3	25.2 \pm 0.13	27.2 \pm 0.4	26.9 \pm 0.3
	2-3 pm	278 \pm 20	757 \pm 155	1.3 \pm 0.02	1.8 \pm 0.09	20.2 \pm 0.12	23.0 \pm 0.6	20.2 \pm 0.2	24.5 \pm 1.2
8-9February	8-9 am	215 \pm 36	158 \pm 28	1.0 \pm 0.02	0.9 \pm 0.04	14.1 \pm 0.1	14.7 \pm 0.3	13.9 \pm 0.2	14.2 \pm 0.3

(winter00)	2-3 pm	194 ± 9	96±9	1.3 ± 0.03	1.5±0.03	17.2 ± 0.1	15.8±0.1	17.1± 0.2	15.3±0.1
------------	--------	---------	------	------------	----------	------------	----------	-----------	----------

Table 3. Seasonal and daily variations of gas-exchange and chlorophyll fluorescence parameters of *Q. ilex* leaves at the study site. Number of replicates were 8- 10 leaves per age, tree and sampling time. Data on old and young leaves and of the two measured days values were pooled together, as differences were statistically not significant. Values are means \pm S.E.

Sampling time	Day hour	A ($\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)	E ($\text{mmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)	g ($\text{mmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)	? F/F'm	Fv/Fm	Electron transport ($\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)	NPQ
22-23 July (summer 98)	8-9 am	4.4 \pm 1.4	2.7 \pm 0.3	60.0 \pm 9.5	0.34 \pm 0.03	0.77 \pm 0.01	142.9 \pm 17.5	1.68 \pm 0.20
	2-3 pm	5.0 \pm 1.0	2.7 \pm 0.5	64.9 \pm 13.5	0.13 \pm 0.01	0.76 \pm 0.01	157.9 \pm 10.8	2.94 \pm 0.16
	7-8 pm	1.0 \pm 0.6	0.1 \pm 0.0	107.8 \pm 16.4	0.73 \pm 0.01	0.78 \pm 0.01	13.4 \pm 1.2	0.15 \pm 0.03
8-9 June (spring99)	8-9 am	2.5 \pm 0.2	0.9 \pm 0.1	39.3 \pm 2.2	0.35 \pm 0.02	0.74 \pm 0.01	52.1 \pm 3.0	1.18 \pm 0.10
	2-3 pm	2.2 \pm 0.2	0.7 \pm 0.1	56.3 \pm 11.0	0.73 \pm 0.01	0.75 \pm 0.00	26.3 \pm 2.2	0.54 \pm 0.07

8- 9February (winter00)	8-9 am	4.3 ± 0.4	1.4 ± 0.1	194.1 ± 18.1	0.57 ± 0.03	0.79 ± 0.01	28.42 ± 2.1	0.85 ± 0.14
	2-3 pm	3.8 ± 0.2	2.2 ± 0.2	336.7 ± 83.1	0.60 ± 0.03	0.75 ± 0.03	24.64 ± 2.4	0.86 ± 0.26

Figure 1. Relative contribution of lipophilic and hydrophilic fractions to the total antioxidant activity (TAA) of leaves (A) and stems (B) of *Quercus ilex* plants throughout the year. OL: old leaves, YL: young leaves, OS: old stems and YS: young stems (n=6-9).

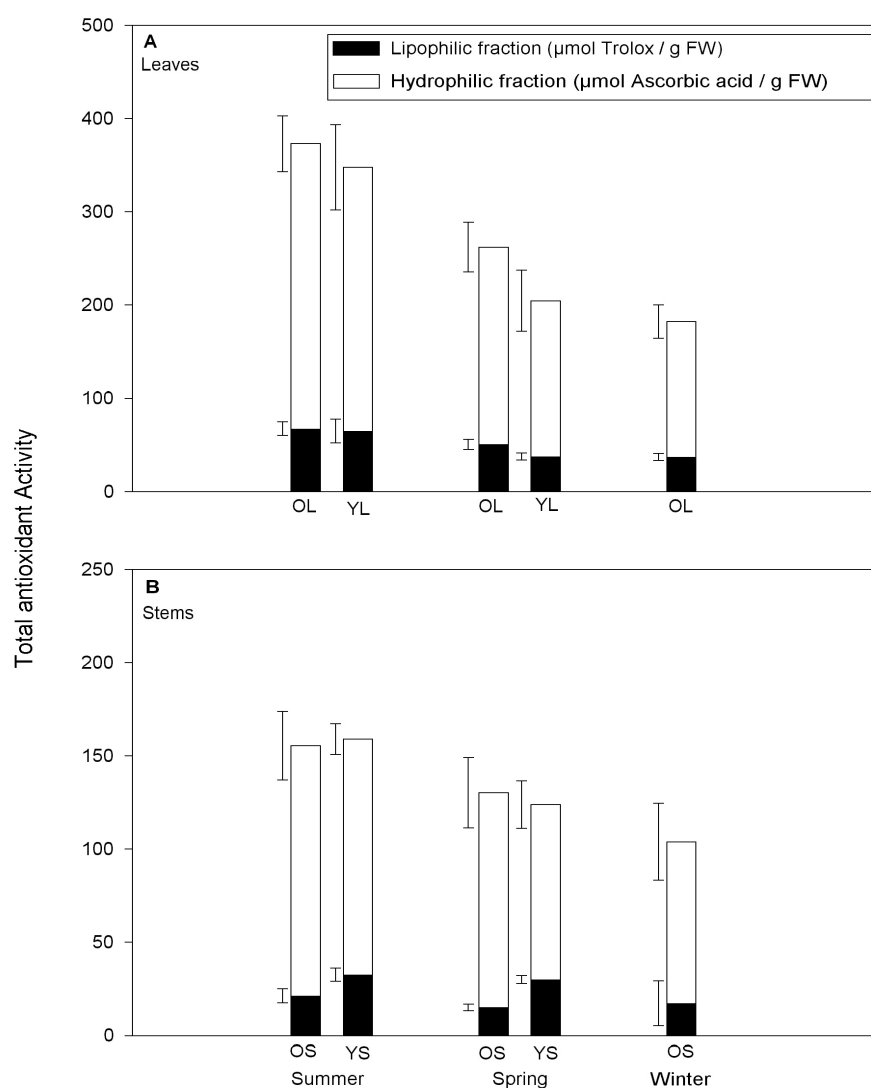


Figure 2. Daily relative contribution of lipophilic and hydrophilic fractions to the total antioxidant activity (TAA) of leaves (A) and stems (B) of *Quercus ilex* plants in the summer. OL: old leaves, YL: young leaves, OS: old stems and YS: young stems (n=3).

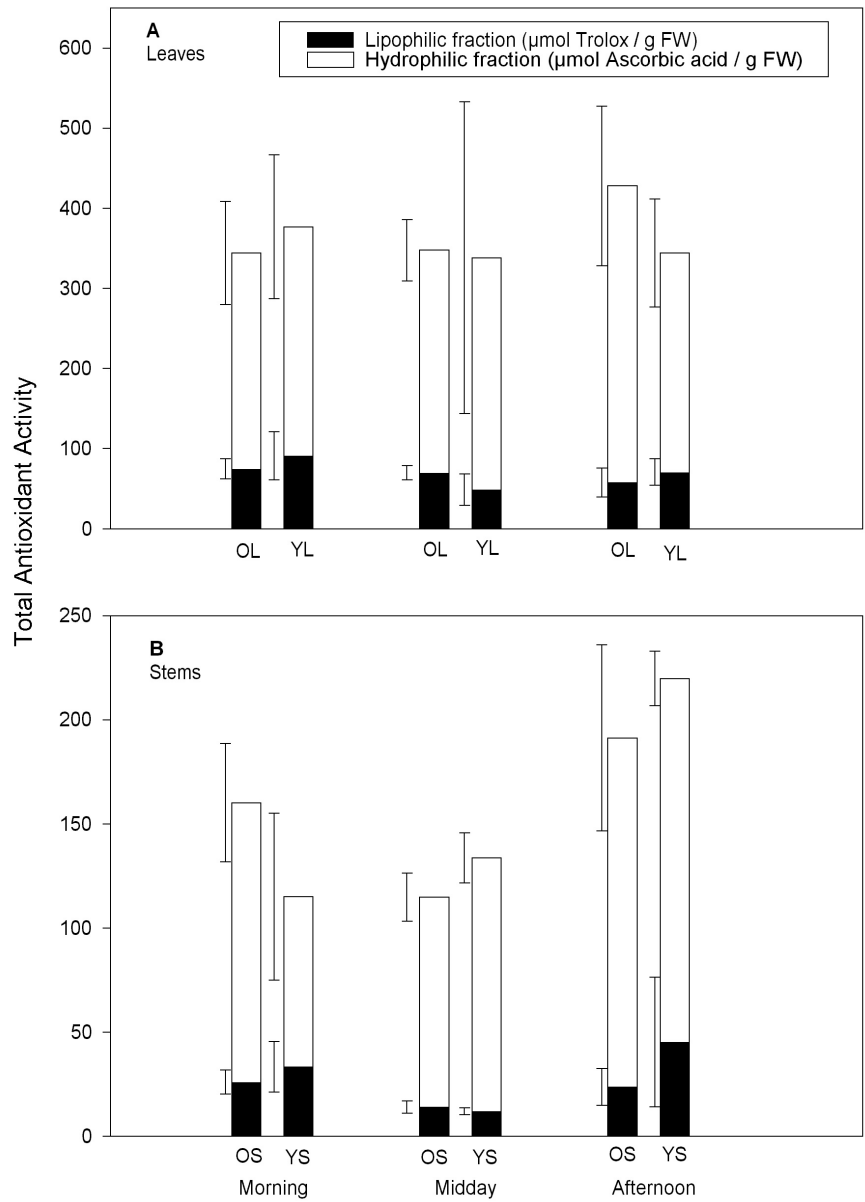


Figure 3

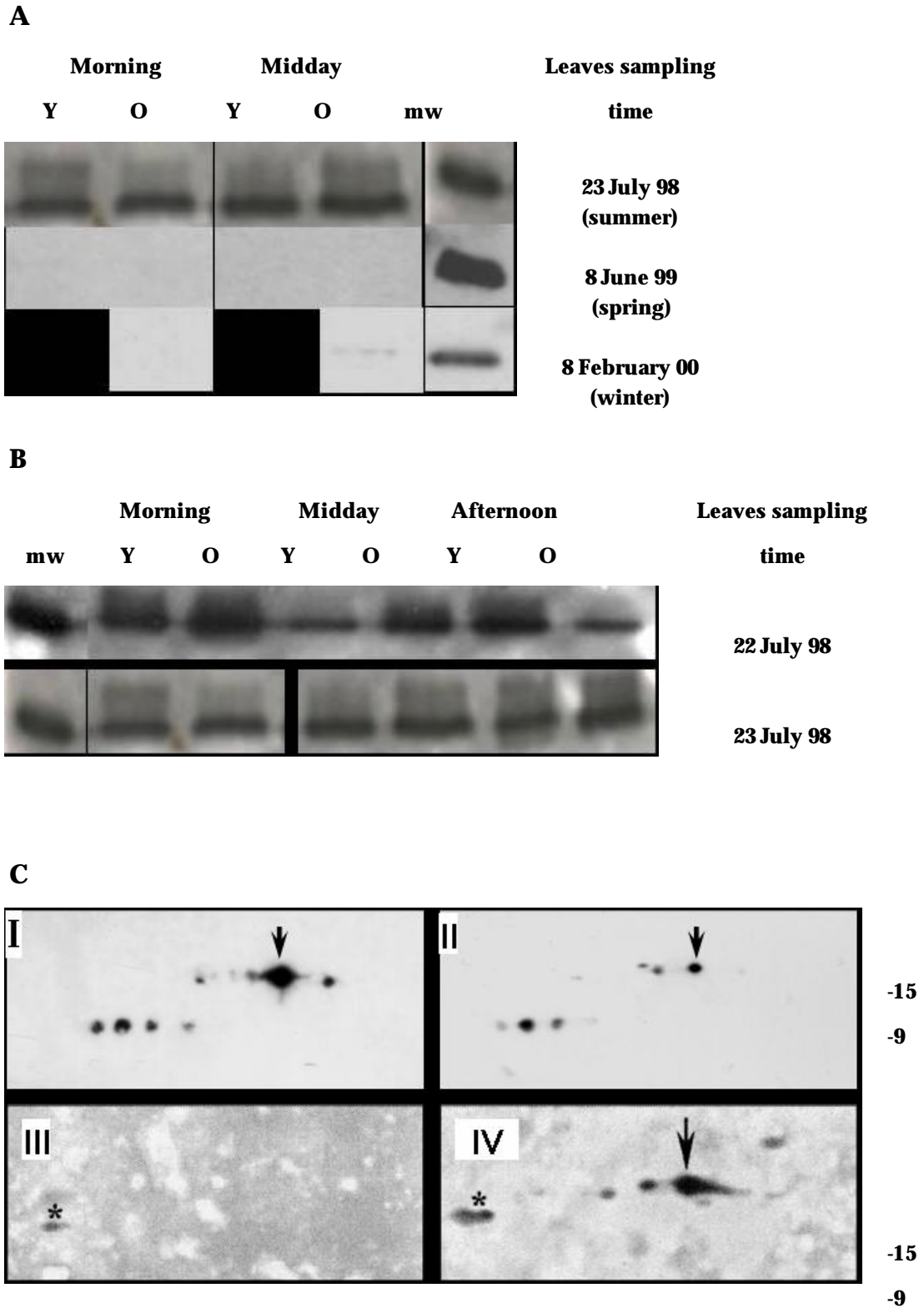
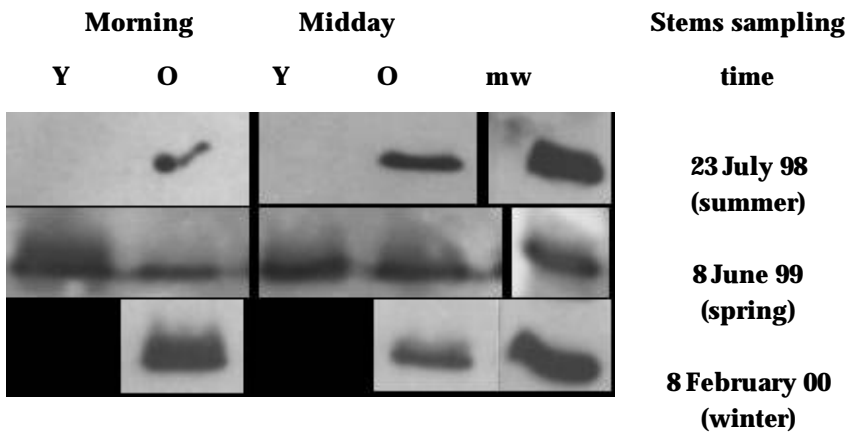
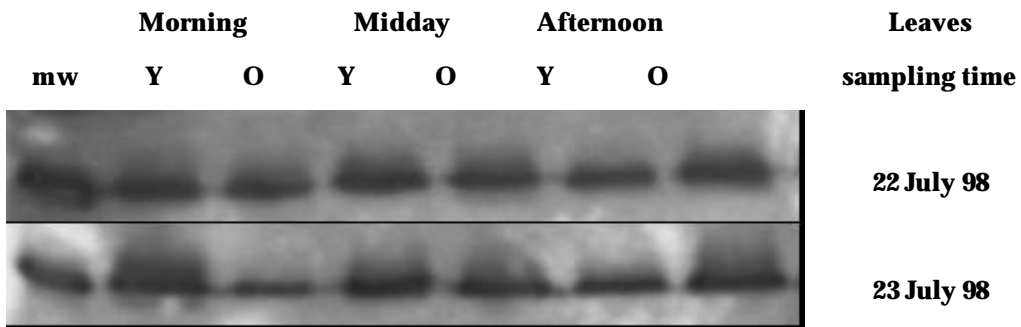


Figure 4

A



B



C

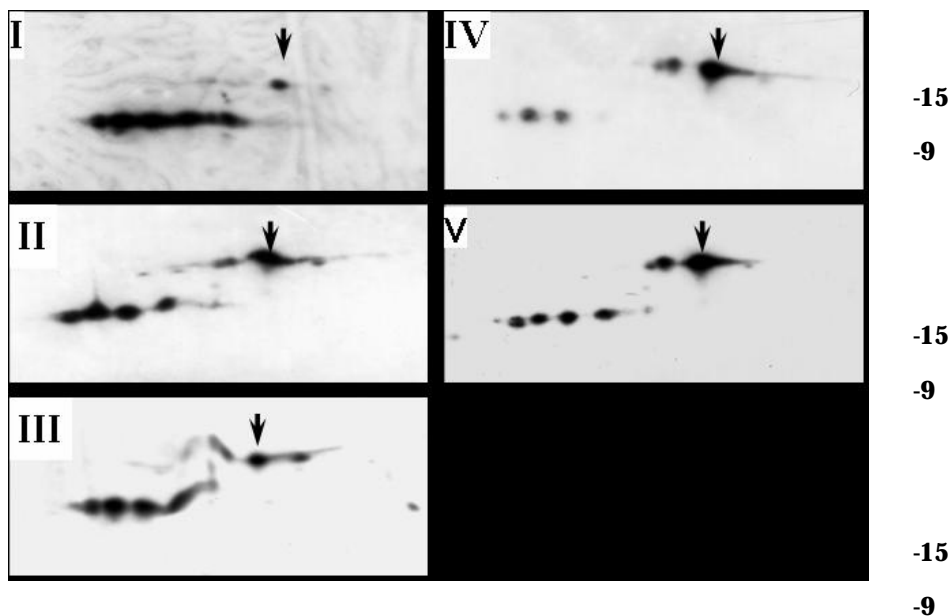


Figure 3. Expression of sHsp in holm oak leaves. Western blots were probed with anti-Hsp17 polyclonal antibodies. (A) sHsp accumulation in old and young leaves sampled in different seasons and, (B) times of day. Total protein extracts (15 μ g) were resolved by one-dimensional gel electrophoresis and immunoblotting. Only the Hsp17 region is shown. Recombinant Qs_Hsp17 expressed in *E. coli* was used as a marker. (C) Two-dimensional electrophoresis of leaf protein extracts. 200 μ g of total protein extracts were loaded. (I, II) Leaves harvested on a summer day at midday, (I) young and (II) old leaves. (III, IV) *E. coli* cells transformed with a plasmid containing (III) or not containing (IV) recombinant Qs_hsp 17. The acidic end of the gels (pH 3) is on the left, with the basic end (pH 10) on the right. The position of the molecular weight markers corresponding to 15 and 9 kDa is indicated. The arrows indicate the 17 kDa polypeptide accumulated during maturation. The asterisks indicate an *E. coli* specific protein that reacted with the anti-Qs_Hsp17 antibody.

Figure 4. Expression of sHsp in holm oak stems. Western blots were probed with anti-Hsp17 polyclonal antibodies. (A) sHsp accumulation in old and young stems sampled at different seasons and, (B) times of day. Total protein extracts (15 μ g) were resolved by one-dimensional gel electrophoresis and immunoblotting. Only the Hsp17 region is shown. Recombinant Qs_Hsp17 expressed in *E. coli* was used as a marker. (C) Two-dimensional electrophoresis of stem protein extracts. 200 μ g of total protein extracts

were loaded. (I, II, III) stems harvested in a summer day in the morning (I), at midday (II) and in the afternoon (III); (I and II) young stems, (III) old stems. (IV) Old stems collected on a winter day. (V) Old stems collected on a spring day. The acidic end of the gels (pH 3) is on the left, with the basic end (pH 10) on the right. The position of the molecular weight markers corresponding to 15 and 9 kDa is indicated. The arrows indicate the 17 kDa polypeptide accumulated during maturation. The asterisks indicate an *E. coli* specific protein that reacted with anti-Qs_Hsp17 antibody.

AGRAÏMENTS

Finalment, voldria donar les gràcies a totes les persones que d'una manera o altre han estat al meu costat durant tot aquest temps.

A la Dra. Maria Pla per la seva direcció, per introduir-me en la biologia molecular, per treure temps d'allà on calgui i, sobretot, pel seu entusiasme.

A la Dra. Marisa Molinas per l'oportunitat que m'ha donat de realitzar aquesta tesi, l'accessibilitat, la llibertat i la confiança dipositada en mi.

A la Gemma Huguet, en Pere Puigderrajols, la Gisela Mir, en Lluís Salvà, la Mercè Figueras, la Gemma Pascual (per compartir estrès) i la Dolors Verdaguer, l'amistat, les xerrades, els ànims, els bons moments i per fer millors els no tan bons.

Al Dr. Jordi Gómez la col·laboració interessantíssima que hem tingut, per posar a la nostra disposició el que ha calgut i les converses bilingües. A la Dra. Maria Martell les seqüències. A la Bea Cabot el mètode amb tots els consells inclosos. A l'Anna Nadal les passejades de seqüències amunt i avall i xerrades a peu de via.

Al Dr. Jaakko Kangasjärvi de la *University of Turku* l'oportunitat que m'ha donat de conèixer un país nou, el descobriment dels *microarrays* i el sol de mitjanit. A tota la gent de *Plant physiology and molecular biology* (especialment la Yagut, la Renu, l'Isamu, en Dominic i en Shahid) les bones estones i l'ajuda en el laboratori.

Al Dr. Matt Whiteman de la *National University of Singapore* les anàlisis de bases modificades i les converses virtuals.

A la Dra. Isabel Fleck i la unitat de Fisiologia Vegetal per la col·laboració en l'article V.

A les coffee girls (la Gisela, en Lluís, l'Elena, la Judit, la Sílvia, la Glòria, la Goretti, en Pep, la Noe, la Noemí, la Marta, la Marga, en Xevi... i noves incorporacions) per totes les bones estones que hem passat, pels "cafès", els sopars, les farres... tot!

A la gent del passadís, sense oblidar-me de ningú, gràcies per aportar el vostre granet de sorra (en alguns casos gran con una pedra).

I un agraïment molt especial pels meus pares i a tots els de casa per animar-me, apoiar-me, i per tantes altres coses, encara que no entengueu massa què faig.

I a en Jordi gràcies per estar al meu costat en tot moment.