



Universitat de Girona

# LES SHSPS EN SURERA: ESTUDIS DE FUNCIONALITAT

Lluís SALVÀ VILA

ISBN: 84-689-2577-2  
Dipòsit legal: GI-631-2005



**Universitat de Girona**

Facultat de Ciències  
Departament de Biologia

**LES sHSPs EN SURERA: ESTUDIS DE  
FUNCIONALITAT**

LLUÍS SALVÀ VILA

Girona, desembre de 2004



**Universitat de Girona**

Facultat de Ciències  
Departament de Biologia

## **LES sHSPs EN SURERA: ESTUDIS DE FUNCIONALITAT**

Memòria presentada per LLUÍS SALVÀ VILA, 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 doctor 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. MERCÈ FIGUERAS.

Vist i plau de,

Dra. Mercè Figueras  
Directora de tesi

Lluís Salvà  
Autor

*carpe diem...*

*A l'Anna i en Miquel*

## ABREVIATURES

<sup>14</sup> C	Carboni radioactiu
Amp	Ampicilina
BA	Benzil alcohol
cDNA	DNA complementari
cfu	Unitat formadora de colònia
CI	Cardiolipina
C-terminal	Carboxi terminal
desA	Desaturases
dNTPs	Mescla dels desoxiribonucleòtids dATP, dTTP, dGTP i dCTP
DPH	1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriè
DTT	Ditiotreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Àcid etilendiaminotetraacètic
GAR-Po	Anticòs de cabra contra la regió constant de les immunoglobulines de conill
GFP	Proteïna verd fluorescent
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Aigua oxigenada
HSF	Factor de xoc de calor
Hsp	Proteïna de xoc de calor
IPTG	Isopropil-β-D-tiogalactopiranosid
Kan	Kanamicina
kDa	Kilodalton
LB	Medi de creixement bacterià "Luria Broth"
mRNA	RNA missatger
NPN	1-N-fenilnaftilamina
N-terminal	Amino terminal
PCR	Reacció en cadena de la polimerasa
PE	Fosfatidiletanolamina
PG	Fosfatidilglicerol
PM	Pes molecular
Regió CI	Regió consens I del domini α-cristal·lí
Regió CII	Regió consens II del domini α-cristal·lí
SDS-PAGE	Gel de poliacrilamida en tampó desnaturitzant
sHsp	Proteïna de xoc de calor de baix pes molecular
sHsp-CI	Proteïna de xoc de calor de baix pes molecular citoplasmàtica de classe I
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletildiamida
TRIS	Hidroximetilaminometà
UV	Radiació ultraviolada

**RESUM**

Aquesta tesi es centra en la caracterització funcional d'una proteïna de xoc de calor de baix pes molecular (*Small Heat Shock Protein – sHSP*) de classe I de surera pel que fa a la seva capacitat per protegir les cèl·lules de l'estrès i per estabilitzar les membranes. Les sHsps són proteïnes que s'expressen en condicions d'estrès cel·lular. Encara que certs aspectes funcionals de les sHsps són ben coneguts, el nostre treball aporta informacions noves sobre el paper de les diferents regions de la proteïna, especialment de la regió N-terminal.

L'objectiu concret d'aquest treball és determinar la funció termoprotectora de QsHsp17.4-CI, una sHsp de classe I oobtinguda a partir de les cèl·lules de fel·lema d'alzina surera, en un model bacterià i analitzar la importància de les diferents regions de la proteïna en aquesta funció. Amb aquesta finalitat s'han dissenyat dues proteïnes parcials derivades de QsHsp17.4-CI: una a la que li falta la regió N-terminal (C105) i una altra amb pràcticament tot el domini  $\alpha$ -cristal·lí delectonat (N61), i una tercera, derivada de QsHs10-CI, a la que li falta la meitat del domini  $\alpha$ -cristal·lí (Hsp10). També s'estudia la possible capacitat estabilitzadora de membranes i la capacitat de modificar l'expressió d'altres Hsps quan s'expressa de forma heteròloga.

Els nostres resultats demostren que l'expressió de QsHsp17.4-CI protegeix a les cèl·lules d'*E.coli* de l'estrès tèrmic alhora que la regió N-terminal i la regió consens II del domini  $\alpha$ -cristal·lí són imprescindibles per aquesta funció de protecció.

En relació a un possible paper en les membranes, els estudis de localització subcel·lular mostren que QsHsp17.4-CI colocalitza amb la fracció membranes i que la regió N-terminal de la proteïna és responsable d'aquesta colocalització. No s'ha pogut demostrar, però, que la localització amb la membrana estigui associada a un efecte protector d'aquesta: en cap cas la sobreexpressió de les proteïnes modifica la composició d'àcids grassos i només N61, que no té acció termoprotectora, altera l'estat fisico-químic de la membrana.

En estudis d'expressió *de novo* en *E.coli* s'ha observat que, a diferència de les altres proteïnes heteròlogues, N61 activa l'expressió de la majoria de Hsps d'*E.coli* fent pensar en una possible relació entre l'estat físic de la membrana i l'activació de la resposta a l'estrès.

En resum, en aquest treball hem provat la capacitat protectora de QsHsp17.4 i aportem noves dades sobre la importància de la regió N-terminal i la regió consens II del domini  $\alpha$ -cristal·lí en aquesta funció. Per altra banda, es suggereix que QsHsp17.4 podria interaccionar amb la membrana d'*E.coli* i que la regió N-terminal seria imprescindible per aquesta interacció. Finalment hem determinat que les proteïnes que provoquen variacions en l'estat de fluïdesa de la membrana poden activar la resposta al xoc de calor per part de la cèl·lula bacteriana.

**RESUMEN**



Esta tesis se centra en la caracterización funcional de una proteína de choque de calor de bajo peso molecular (*Small Heat Shock Protein – sHSP*) de clase I de alcornoque corchero en lo que se refiere a la capacidad de proteger las células del estrés y a estabilizar las membranas. Las sHsps son proteínas que se expresan en condiciones de estrés celular. Aunque algunos aspectos funcionales de las sHsps son conocidos, nuestro trabajo aporta nuevas informaciones sobre el papel de las distintas regiones de la proteína, en especial de la región N-terminal.

El objetivo concreto de este trabajo es determinar la función termoprotectora de QsHsp17.4-CI en un modelo bacteriano y analizar la importancia de las distintas regiones de la proteína en dicha función. Con esta finalidad se han diseñado dos proteínas parciales derivadas de QsHsp17.4-CI: una a la que le falta la región N-terminal (C105) y otra con prácticamente todo el dominio  $\alpha$ -cristalino delecionado (N61) y una tercera, derivada de QsHsp10-CI, a la que les falta la mitad del dominio  $\alpha$ -cristalino (Hsp10). También se estudia la posible capacidad estabilizadora de membranas y la capacidad de modificar la expresión de otras Hsps cuando se expresa de forma heteróloga.

Nuestros resultados demuestran que la expresión de QsHsp17.4-CI protege las células de *E.coli* del estrés térmico así como que la región N-terminal y la región consensus II del dominio  $\alpha$ -cristalino son imprescindibles para la función de protección.

En relación a un posible papel en las membranas, estudios de localización subcelular muestran que QsHsp17.4-CI colocaliza con la fracción membranosa y que la región N-terminal es necesaria para dicha colocalización. Sin embargo, no se ha podido demostrar que la localización en la membrana esté asociada a un efecto protector de ésta: en ningún caso la sobreexpresión de las proteínas modifica la composición de ácidos grasos y solamente N61, que no tiene acción termoprotectora, altera el estado físico-químico de la membrana.

En estudios de expresión *de novo* en *E.coli* se observa que, a diferencia de las demás proteínas heterólogas, N61 activa la expresión de la mayoría de Hsps de *E.coli* sugiriendo una posible relación entre el estado físico de la membrana y la activación de la respuesta al estrés.

En resumen, en este trabajo hemos probado la capacidad protectora de QsHsp17.4-CI y aportamos nuevos resultados sobre la importancia de la región N-terminal y la región consensus II del dominio  $\alpha$ -cristalino en esta función. Por otro lado, se sugiere que QsHsp17.4-CI podría interactuar con la membrana de *E.coli* y que la región N-terminal sería imprescindible para dicha interacción. Finalmente, hemos determinado que las proteínas que provocan variaciones en el estado de fluidez de la membrana pueden activar la respuesta de choque de calor por parte de la célula bacteriana.

## **SUMMARY**

This thesis is focused in the functional studies of a Small Heat Shock Protein (sHsp). sHsps are expressed under stress conditions. Although some functional aspects of these proteins are known, our work aport new data about the role of the different protein regions, especially the N-terminal region.

The aim of this work is to demonstrate a thermotolerance effect of QsHsp17.4-CI in bacterial cells and to analyze the importance of the protein regions in this function. To achieve this objective two deletion mutants derived from QsHsp17.4-CI were designed: a protein lacking the N-terminal region (C105) and a protein where the entire  $\alpha$ -crystallin domain is missing (N61) and a third mutant, derived from QsHsp10-CI, that bears half of the  $\alpha$ -crystallin domain (Hsp10). To better understand the functional mechanism of sHsps we study the membrane stabilizing capacity of QsHsp17.4-CI as well as its capacity to modify other Hsps expression.

Our results demonstrate that the expression of QsHsp17.4-CI protects *E.coli* cells from a heat shock and that the N-terminal region and the consensus region II of the  $\alpha$ -crystallin domain are necessary for this protective function.

Related to a possible role in membranes, location studies suggest that QsHsp17.4-CI colocalizes with cell membrane fraction and that N-terminal region is important for this location. However, no relation between membrane localization and a protective effect has been demonstrated: Protein overexpression does not modify membrane fatty acid composition and only N61, which has no thermoprotection, changes membrane physical state.

Studies of *E.coli de novo* synthesis show that, unlike the other recombinant proteins, the overexpression of N61 activates the expression of almost all *E.coli* Hsps suggesting a possible relation between membrane physical state and the activation of the heat shock response.

As summary, in this work we have demonstrated the thermoprotective capacity of QsHsp17.4-CI and we contribute with new data about the importance of N-terminal region and consensus region II of  $\alpha$ -crystallin domain for this function. On the other hand, we suggest the possibility that QsHsp17.4-CI interacts with membrane and that N-terminal region is important for this interaction. Lastly, we have observed how changes in membranes fluidity state can activate heat shock response in bacterial cells.

## ÍNDEX TEMÀTIC

## **0 .- PRESENTACIÓ**

## **I .- INTRODUCCIÓ**

### **I.1.- Les sHsps**

- Resposta al xoc de calor
- sHsps a les plantes
- L'expressió de les sHsps

### **I.2.- Estructura i funció molecular de les sHsps**

- Plegament
- Caràcter de xaperones moleculars

## **II .- OBJECTIUS**

- Antecedents
- Objectius generals i concrets
- Organització de la memòria

## **III.- RESULTATS**

### **III.1.- Obtenció de les construccions moleculars**

- Construccions amb el vector d'expressió pGFPuv
- Construccions amb el vector d'expressió pET29a

### **III.2.- Estudi de la funció protectora de l'estrès *in vivo***

- Acció protectora de QsHsp17.4-CI enfront de l'estrès tèrmic
- Regions implicades en la resistència a l'estrès

### **III.3.- Estudi de la funció estabilitzadora de les membranes**

- Estudi de la localització subcel·lular
- Estudis d'estabilització de membranes

### **III.4.- Estudi de la capacitat de modificar l'expressió gènica**

- Efecte de les proteïnes heteròlogues en condicions normals
- Efecte de les proteïnes heteròlogues en condicions d'estrès

## **IV.- DISCUSSIÓ GENERAL I CONCLUSIONS**

## **V.- MATERIAL I MÈTODES (protocols)**

## **VI.- BIBLIOGRAFIA**

## **VII.- ÍNDEX GENERAL**

# ÍNDEX

---

<b><u>PRESENTACIÓ</u></b> .....	<b>1</b>
<b><u>I. INTRODUCCIÓ</u></b> .....	<b>3</b>
I.1 – Les proteïnes de xoc de calor de baix pes molecular (sHsp)	7
1.1 – Resposta al xoc de calor	7
1.2 – sHsps a les plantes	9
Aspectes generals	
Classificació	
1.3 – Expressió de les sHsps	11
Inducció per estrès	
Inducció en processos clau del desenvolupament	
I.2 – Estructura i funció molecular de les sHsps	14
2.1 – Regions de les sHsps	14
Regió N-terminal	
Domini $\alpha$ -cristal·lí	
Regió C-terminal	
2.2 – Plegament de les sHsps	16
Monòmer	
Dímer	
Oligòmer	
2.3 – Caràcter de xaperones moleculars	21
La funció xaperona	
Mecanismes d'unió a substrat	
<b><u>II. OBJECTIUS</u></b> .....	<b>25</b>
II.1 – Antecedents	29
II.2 – Objectius	31
II.3 – Organització de la memòria	34
<b><u>III. RESULTATS</u></b> .....	<b>35</b>
III.1 – Obtenció de les construccions moleculars	37
Introducció	39
1.1 – Construccions amb el vector pGFPuv	40
1.1.1 – Amplificació, clonació i lligació dels inserts	
1.1.2 – Transformació i expressió de les proteïnes: HSPF, HSPN, GFP	
1.1.3 – Concentració de la proteïna de fusió per columna hidrofòbica	

1.2 – Construccions amb el vector pET29	51
1.2.1 – Amplificació, clonació i lligació dels inserts	
1.2.2 – Transformació i expressió de les proteïnes: HSP17,C105,N61 i HSP10	
Resum i cloenda	60
III.2 – Estudi de funcionalitat <i>in vivo</i> en <i>E.coli</i>	63
Introducció	65
2.1 – Acció protectora de QsHsp17.4-CI enfront l'estrès tèrmic	67
2.2 – Regions implicades en la resistència a l'estrès	71
III.3 – Possible paper de les sHsps en l'estabilització de membranes	73
Introducció	75
3.1 – Estudi de la localització subcel·lular	78
3.2 – Estudis d'estabilització de membrana	82
A) Efectes de la proteïna recombinant sobre la composició lipídica	
B) Efectes sobre l'estat de rigidesa de la membrana a 37°C	
C) Cinètica de fluidització en resposta a un gradient tèrmic	
III.4 –Capacitat per modificar l'expressió d'altres Hsps en <i>E.coli</i>	97
Introducció	99
4.1 – Efecte de les proteïnes heteròlogues sobre la síntesi de Hsps d' <i>E.coli</i> en condicions normals de creixement	102
4.2 – Efecte de les proteïnes heteròlogues sobre la síntesi de Hsps d' <i>E.coli</i> enfront un gradient tèrmic	108
<b>IV. <u>DISCUSSIÓ GENERAL I CONCLUSIONS</u>.....</b>	<b>113</b>
<b>V. <u>MATERIAL I MÈTODES</u>.....</b>	<b>123</b>
V.1 – Equipament utilitzat	125
V.2 – Material biològic	126
V.3 – Mètodes microbiològics	127
3.1 - Medis de cultiu	127
3.2 - Manteniment de les soques bacterianes	128
V.4 – Mètodes generals de DNA recombinant	129
4.1 – Vectors d'expressió bacterians	129
4.1.1 – pGFPuv	
4.1.2 – pET29a	
4.2 – Clonacions en el vector pGFPuv	132

4.2.1 – Minipreparacions de DNA plasmídic	
4.2.2 – Obtenció dels inserts per PCR	
4.2.2.1 – Disseny dels encebadors	
4.2.2.2 – Reacció d'amplificació (PCR)	
4.2.2.3 – Purificació per columna	
4.2.3– Digestió amb enzims de restricció	
4.2.4 – Purificació de banda en gel d'agarosa	
4.2.5 – Reacció de lligació	
4.3 - Clonacions en el vector pET29a	136
4.3.1 – Minipreparacions de DNA plasmídic	
4.3.2 – Obtenció dels inserts per PCR	
4.3.2.1– Disseny dels encebadors	
4.3.3 – Digestió amb enzims de restricció	
4.3.4 – Purificació de banda en gel d'agarosa	
4.3.5 – Reacció de lligació	
4.4 - Transformació de cèl·lules competents	138
4.4.1 – Obtenció de cèl·lules competents	
4.4.2 – Transformació de cèl·lules d' <i>E.coli</i>	
4.5 - Seqüenciació del DNA	139
4.5.1 – Reacció de seqüenciació	
4.5.2 – Precipitació del DNA	
4.5.3 – Resuspensió del DNA	
V.5 - Expressió de la proteïna recombinant	141
5.1 - Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE)	142
5.2 – Electrotransferència	143
5.3 - Detecció immunològica	143
V.6 - Assajos de viabilitat <i>in vivo</i>	144
6.1 - Assajos amb rHsp17 expressada a partir de pGFPuv	144
6.2 - Assajos amb rHsp10, rHsp17 i els mutants C105 i N61	145
V.7 - Localització subcel·lular	146
7.1 - Creixement del cultiu	146
7.2 - Lisi i fraccionament cel·lular	147
V.8 - Efectes de les proteïnes recombinants en la membrana bacteriana	148
8.1 - Anàlisi de la composició lipídica	148
8.1.1 - Creixement del cultiu	
8.1.2 - Extracció dels àcids grassos	
8.2 - Rigidesa de la membrana	148
8.2.1 - Creixement del cultiu	
8.2.2 - Mesures de rigidesa	
8.3 - Estudis de permeabilitat de la membrana externa	149
8.3.1 - Creixement del cultiu	
8.3.2 - Mesures fluorimètriques	
V.9 - Síntesi proteica <i>de novo</i> en condicions d'estrès	150
9.1 - Creixement del cultiu	151
9.2 - Mesures de radioactivitat	151
<b>VI. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>153</b>



---

## PRESENTACIÓ

Aquest treball forma part d'un projecte més ampli en el qual s'estudien diversos gens expressats en les cèl·lules del fel·lema d'alzina surera que estan implicats en la resistència a l'estrès. S'ha partit d'una llibreria de cDNA de fel·lema en procés de suberificació activa en la qual s'ha identificat, entre d'altres, el gen d'una proteïna de xoc de calor de baix pes molecular de classe I anomenada QsHsp17.4-CI. Les sHsps representen un dels mecanismes bàsics de la resposta cel·lular adaptativa a l'estrès de les plantes, s'acumulen en grans quantitats i en general, tenen funció de xaperones moleculars protegint proteïnes desnaturalitzades evitant-ne la precipitació.

El treball objecte d'aquesta memòria consisteix en estudiar la capacitat de QsHsp17.4-CI de conferir tolerància a l'estrès i interaccionar amb les membranes mitjançant l'expressió heteròloga en un model bacterià així com analitzar el paper dels diferents dominis en la funció. QsHsp17.4-CI és una proteïna representativa de les sHsps de classe I de planta i les dades de funcionalitat *in vivo* i del paper dels diferents dominis que s'obtinguin serveixen de model per aprofundir en el coneixement de les sHsps.

### ***El fel·lema de surera i el possible paper de les proteïnes d'estrès***

La biologia de la surera és interessant per les importants adaptacions al clima mediterrani que presenta (Caritat et al 2000), per la seva capacitat de viure en sòls molt pobres amb contingut elevat de Fe i Mn (Robert et al. 1996; Caritat et al. 1996) i

molt especialment per les característiques del seu fel·lema que li confereix la capacitat única de produir suro.

El fel·lema és un teixit limitant extern que protegeix les plantes amb creixement secundari. És un teixit senescent format per l'acumulació de cèl·lules suberificades derivades del fel·lògen. Forma la capa externa de la peridermis que substitueix a l'epidermis. Durant el procés de diferenciació, les cèl·lules del fel·lema estan sotmeses a un fort estrès metabòlic, principalment estrès oxidatiu, degut a la generació d'espècies d'oxigen reactives per part de les lacases i peroxidases que actuen en el procés de suberització (Whetten i Sederoff, 1995; Wojtaszek 1997). Les cèl·lules del fel·lema, mentre s'estan diferenciant, sobreviuen en aquestes condicions d'estrès tant desfavorables. Generalment les cèl·lules del fel·lema tenen una vida curta però, un cop mortes esdevenen 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 les cèl·lules moren ràpidament (Romberger *et al.* 1993). En la surera, el fel·lògen persisteix i els diferents anells s'acumulen permetent la formació d'una escorça suberificada molt gruixuda constituint, el suro, un material que s'explota comercialment. Les cèl·lules del fel·lema de l'alzina surera creixen més, es divideixen més intensament i acumulen més capes de suberina que altres quercínies com l'alzina o el roure, amb les quals comparteix territori i s'hibrida. En cada període de creixement estacional es formen unes 60 capes de cèl·lules formades gairebé exclusivament per cèl·lules suberificades.

La nostra hipòtesi de treball és que els mecanismes de protecció de les cèl·lules del fel·lema proporcionen tolerància a les condicions d'estrès metabòlic endògen produïdes pel propi procés de suberificació per permetre el creixement i el dipòsit de suberina. Un d'aquests mecanismes podria ser la presència de proteïnes d'estrès i especialment les proteïnes de xoc de calor de baix pes molecular (sHsps), components essencials de la defensa de les cèl·lules a l'estrès.

D'entre les proteïnes d'estrès del fel·lema de *Quercus suber*, QsHsp17.4-CI és una proteïna de la família de les sHsps de classe I que s'expressa de forma massiva. Pel seu caràcter de proteïna massiva i pel fet que altres sHsps de pesos moleculars semblants tenen papers importants en la protecció de les cèl·lules enfront l'estrès en altres espècies arbòries (Soto *et al.*, 1999) pensem que QsHsp17.4-CI podria jugar un paper important en la supervivència de les cèl·lules del fel·lema.

## **INTRODUCCIÓ**

---

# I. INTRODUCCIÓ

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

- 1.1 – La resposta al xoc de calor  
*Les proteïnes de xoc de calor de baix pes molecular*
- 1.2 – Les sHsps a les plantes  
*Classificació*
- 1.3 - Expressió de les sHsps  
*Inducció per estrès*  
*Inducció en processos clau del desenvolupament*

## I.2.- Estructura i funció molecular de les sHsps.

- 2.1 – Regions de les sHsp  
*Regió N-terminal*  
*Domini  $\alpha$ -cristal·lí*  
*Extensió C-terminal*
- 2.2 – Plegament de les sHsps  
*Monòmer*  
*Dímer*  
*Oligòmer*
- 2.3 – Caràcter de xaperones moleculars  
*Funció xaperona*  
*Mecanisme d'unió a substrat*

# 1 – LES PROTEÏNES DE XOC DE CALOR DE BAIX PES MOLECULAR (sHsps).

## 1.1 – La resposta al xoc de calor

Tots els éssers estan exposats a canvis ambientals, acció de les radiacions solars, altes temperatures... que provoquen, en molts casos, estrès a nivell cel·lular. En situacions d'estrès els patrons d'expressió gènica de les cèl·lules canvien dràsticament: mentre es reprimeix l'expressió d'alguns gens, d'altres són fortament induïts. Entre els gens que s'indueixen per estrès s'hi troben les anomenades proteïnes de xoc de calor o "Heat Shock Proteins" (Hsps).

L'estudi de la resposta al xoc de calor es va iniciar amb l'observació dels canvis que es donen en els cromosomes politènics de les glàndules salivals de *Drosophila* quan són sotmeses a xoc tèrmic (Ritossa *et al.*, 1962) i va tenir un ràpid creixement quan es van descriure per primera vegada una sèrie de proteïnes induïbles per calor possiblement associades als canvis cromosòmics (Tissières *et al.*, 1974). La resposta al xoc de calor implica una reprogramació, de forma transitòria, a nivell d'expressió gènica i la síntesi de les proteïnes de xoc de calor (Schöffl *et al.*, 1998). Posteriorment s'ha vist que les proteïnes induïbles per calor també ho són per altres tipus d'estrès com la deshidratació, el fred i l'estrès oxidatiu, per exemple (Vierling *et al.*, 1991). La universalitat i conservació al llarg de l'evolució d'aquesta resposta fa pensar que les Hsps tenen un paper fonamental en la supervivència de les cèl·lules en condicions d'estrès (Jinn *et al.* 1993).

En general es considera que el paper de les Hsps és el de xaperones moleculars, molècules capaces d'unir-se a proteïnes parcialment desnaturalitzades mitjançant interaccions hidrofòbiques, evitant la formació d'agregats proteics irreversibles i permetent la seva renaturalització en un procés dependent d'ATP (Löw *et al.*, 2000; Schärf *et al.*, 2001).

En eucariotes s'han descrit diverses classes de Hsps que es classifiquen segons l'homologia i el pes molecular en dos grans grups: les proteïnes de xoc de calor d'alt pes molecular o *High molecular weight heat shock proteins* hHsps (Hsp110, Hsp90, Hsp70, Hsp60) i les proteïnes de xoc de calor de baix pes molecular o *small Heat shock proteins* (sHsps) amb pesos moleculars compresos entre 10 i 30 KDa. Si bé les diferents Hsps tenen propietats funcionals diferents, totes estan relacionades per la inducció per estrès i pel caràcter de xaperones.

Les famílies de Hsps d'alt pes molecular presenten una considerable homologia de seqüència al llarg de tota la proteïna, fins i tot entre eucariotes i procariotes (Montfort *et al.*, 2002). La família de les sHsps, en canvi, es caracteritza per una gran diversitat de seqüència compartint només un domini central anomenat domini  $\alpha$ -cristal·lí (Narberhaus *et al.*, 2002).

### **Les proteïnes de xoc de calor de baix pes molecular**

Les sHsps formen un grup de proteïnes molt divers present en gairebé tots els éssers vius. Són proteïnes de baix pes molecular (10-30kDa) que s'indueixen massivament en condicions d'estrès, arribant a representar en alguns casos més del 1% de la proteïna total de la cèl·lula. Es relacionen principalment amb la resistència a l'estrès però, també s'expressen en moments del desenvolupament en els quals es produeix estrès cel·lular (Morange 1998). Defectes en l'acumulació de sHsps s'han relacionat amb malalties com les cataractes, el Parkinson o l'Alzheimer (Horwitz 2000).

Les sHsps comparteixen un domini conservat d'uns 90 aminoàcids anomenat **domini  $\alpha$ -cristal·lí** o domini de xoc de calor (Scharf *et al.*, 2001) flanquejat per una **regió N-terminal** de longitud variable i una curta cua o **extensió C-terminal**. El domini  $\alpha$ -cristal·lí, que distingeix les sHsps d'altres petites proteïnes induïdes també per estrès tèrmic (Boston *et al.*, 1996), va ser descrit per primera vegada en les proteïnes  $\alpha$ A- i  $\alpha$ B- cristal·lines de la lent de l'ull de (Horwitz *et al.* 1999). Posteriorment, aquest domini s'ha estudiat en sHsps de bacteri, arquees i eucariotes.

## 1.2 – Les sHsps en plantes

A diferència dels animals, les plantes es caracteritzen per tenir una gran abundància i diversitat de sHsps. Aquest fet es deu segurament a la necessitat de les plantes a una ràpida adaptació a unes condicions atmosfèriques de temperatura, llum o humitat sempre canviant (Sun *et al.*, 2002). La bibliografia que informa sobre la relació entre l'acumulació de sHsps i la resistència de les plantes a l'estrès és molt abundant (Wehmeyer i Vierling, 2000).

Les sHsps són especialment importants en les plantes perquè: (i) són les proteïnes dominants en el perfil de síntesi proteica en resposta al xoc de calor (en altres eucariotes les Hsps dominants són les Hsp70); (ii) per què són proteïnes massives (determinades sHsps poden representar més d'un 1% del total de proteïna en fulla o arrel estressades, Waters *et al.*, 1996); i (iii) per la gran diversitat genètica que presenten aquestes proteïnes (les plantes tenen almenys 6 famílies de sHsps codificades en el DNA nuclear, Schärf *et al.*, 2001). L'elevat grau de diversificació de les sHsps probablement reflecteix adaptacions moleculars a condicions d'estrès úniques en plantes (Waters *et al.* 1996). S'ha de tenir en compte, però, que alguns organismes animals presenten una diversitat de sHsps més gran de la que fins ara se'ls atribuïa. En humà, per exemple, es coneixen 9 sHsps diferents (Kappé *et al.*, 2001), el genoma de *Caenorhabditis elegans* codifica per 16 sHsps (Ding i Candido, 2000) i el de *Drosophila melanogaster* per 12 (Sébastien *et al.*, 2001).

El llinatge de les sHsps de planta sembla haver evolucionat de forma independent després de la divergència entre plantes i animals (Jong *et al.*, 1998). Les diferents famílies de sHsps apareixen per duplicació gènica i divergència fa uns 150 milions d'anys, abans de la separació entre monocotiledònies i dicotiledònies. En comparació amb altres organismes, la diversificació ha estat molt ràpida. En les plantes, les forces de selecció varien en funció de la diversitat d'hàbitats, fent que tot i compartir una funció general, moltes sHsps tinguin funcions específiques (Waters *et al.*, 1995).

### **Classificació de les sHsps de planta**

En plantes s'han descrit 6 famílies multigèniques nuclears que han estat classificades en funció de la seva homologia de seqüència (principalment en la regió N-terminal i l'extensió C-terminal) i de la localització intracel·lular (Schärf *et al.*, 2001). Dues famílies, les sHsps de **classe I** i **II** respectivament, i una tercera recentment identificada com a **classe III**, que no tenen pèptid senyal per cap orgànu i es consideren citoplasmàtiques. Les altres tres famílies corresponen respectivament les sHsps que es troben al reticle endoplasmàtic, **classe ER**, als cloroplasts, **classe P**, i als mitocondris, **classe M** (Waters *et al.* 1996).

Les sHsps de classes I i II presenten una gran homologia i les diferències es concentren en les regions N- i C-terminal (Waters i Vierling *et al.*, 1999b). En *Arabidopsis thaliana* s'ha trobat una sHsp, designada com classe III, localitzada preferentment a nucli i que interacciona amb les sHsps I i II. Un membre d'aquesta classe III s'ha trobat també en tomaquera (Schärf *et al.*, 2001).

Les famílies d'sHsps organelars: classe M, classe P i classe ER, contenen els pèptids senyal de translocació a l'orgànu corresponent (Waters *et al.*, 1996). Les sHsps organelars semblen haver sorgit d'una duplicació gènica nuclear, segurament de gens de la classe I o del seu precursor (Waters i Vierling, 1999a). Aquest mecanisme evolutiu és diferent d'altres Hsps cloroplàstiques o mitocondrials com HSP70 que tenen un origen endosimbiòtic, i per tant molt més antic (Boorstein *et al.*, 1994).

L'anàlisi del genoma d'*Arabidopsis thaliana* ha revelat en aquesta planta l'existència de dinou seqüències relacionades amb les sHsps. D'aquestes, nou són citoplasmàtiques (sis de classe CI, dos de classe CII i una de classe CIII) i quatre organelars (una de classe ER, una de classe P i dues de classe M). Les altres sis són seqüències amb menor homologia que han estat anomenades com sHsp-like proteins (Scharf *et al.* 2001). El caràcter multigènic de la família de les sHsps també s'ha confirmat per la tècnica del *Southern blot* en varies espècies com, per exemple, la perera (DeRocher *et al.* 1991) o la maduixera (Medina-Escobar *et al.* 1998).



## 1.3 – Expressió de les sHsps

### Inducció per estrès

En general, en absència d'estrès, les sHsp no s'expressen ni a nivell d'mRNA ni a nivell de proteïna però en condicions d'estrès s'acumulen ràpidament i de forma proporcional a la intensitat i durada de l'estrès (Waters 1996). El patró bidimensional de les sHsps varia segons l'espècie i el teixit indicant que diferents polipèptids o isoformes intervien en diferents situacions (DeRocher *et al.* 1991; Hernández i Vierling, 1993; zur Nieden *et al.* 1995 i Wehmeyer *et al.* 1996; per *Quercus suber* vegis Puigderrajols *et al.*, 2001 i Jofré *et al.*, 2003). Un cop l'estrès ha disminuït les sHsps es mantenen força estables amb vides mitges entre 30 i 50h suggerint la possibilitat de que també siguin importants durant la recuperació de l'estrès (Waters *et al.*, 1996).

L'estrès tèrmic no és l'únic estímul que activa la transcripció dels gens de xoc de calor. Les sHsps en plantes s'indueixen 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. (Sun *et al.* 2002) (Taula 1). Un fet característic de les sHsps és la protecció creuada, és a dir, la pre-exposició 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), els metalls tòxics (Wollgiehn i Neumann 1995) i el fred (Sabehat *et al.* 1996 i 1998).

### Inducció en processos clau dels desenvolupament

La funció de les sHsps també es dona en moments claus del desenvolupament com el cicle cel·lular, la gametogènesi, la maduració dels fruits o l'embriogènesi (Nover, 1997) (taula 1).

La inducció de sHsps durant el desenvolupament ha estat descrita procarïotes, on s'ha detectat l'expressió durant l' esporul·lació (Cunningham i Spreadbury, 1998), i en eucariotes: Heikkila *et al.* (1997) van localitzar l'expressió de Hsp30 en els embrions de *Xenopus*. En *Drosophila*, Marin i Tanguay, (1996) van observar l'expressió de Hsp27 durant l'oogènesi mentre que Amin *et al.* (1991) van determinar que la expressió de Hsp27 i Hsp23 s'activava durant el desenvolupament. En *C.elegans*, Ding i Candido, (2000a – 2000b) van detectar l'acumulació de varies sHsps durant el quart estadi larvari, mentre que en mamífers Gernold *et al.* (1993) van observar com en

l'embriogènesis de rata, Hsp25 s'acumulava en diversos teixits com el cor o els músculs de l'espatlla.

També en plantes s'ha detectat l'expressió de sHsps en diferents processos de desenvolupament. 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 abans que es doni una dessecació notable de la llavor i augmenta fins arribar a un màxim en l'embrió madur (per *Q.suber* vegis Puigderrajols *et al.*, 2001). 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 les sHsps s'acumulin al llarg de l'embriogènesi, procés en el disminueix el contingut d'aigua de forma notable (Coca *et al.* 1994 i 1996) i que en teixits vegetatius diverses sHsps s'expressin en resposta a l'estrès hídric (Alamillo *et al.* 1995; per *Q.suber* vegis 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 podrien estar també implicades en la tolerància a la dessecació.

Condicions	Espècie	sHsp
Desenvolupament embrionari	<i>Heliantus annuus</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>	<i>cDNA DF4-5</i> (classe CI) (7)
	<i>Hordeum vulgare</i>	<i>HvHsp26.8-P</i> , <i>HvHsp26.9-P</i> (8)
Embriogènesi somàtica	<i>Douglas fir</i>	<i>PM18.2A</i> (classe CI) (13)
	<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>	<i>cDNA</i> 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)
	<i>Heliantus annuus</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)
Estrès osmòtic	→ <i>Quercus suber</i>	<i>QsHsp17.4-CI</i> (17)

Àcid abscísic	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>AtHsp17.4-CI</i> , <i>AtHsp17.6-CI</i> (5)
	→ <i>Quercus suber</i>	<b><i>QsHsp17.4-CI</i></b> (17)
	<i>Heliantus annuus</i>	<i>HaHsp17.6-CI</i> (1)
	<i>Craterostigma plantagineum</i>	<i>HaHsp17.6-CI</i> homòlegs (16)
GA, MeJA i auxina	<i>Douglas fir</i>	<i>HaHsp17.9-CII</i> homòlegs (16)
	→ <i>Quercus suber</i>	<i>PM18.2A</i> (classe CI) (13)
		<b><i>QsHsp17.4-CI</i></b> (17)
		<i>Hsp22</i> (classe M) (18)
Estrès oxidatiu	<i>Lycopersicon esculentum</i>	<i>Hsp17.9-CI</i> (19)
	<i>Petroselinum crispum</i>	<i>OsHsp26.6-P</i> (20)
	<i>Oryza sativa</i>	<i>AtHsp17.7-CII</i> (5)
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>CI19</i> (classe ER) (21)
Fred	<i>Solanum tuberosum</i>	<i>TOM66</i> (classe CI) (22)
	<i>Lycopersicon esculentum</i>	<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>Arabidopsis thaliana</i>	<i>AtHsp17.7-CII</i> , <i>AtHsp17.6-CIII</i> (26)
Fotoperíode	<i>Pharbitis nil</i>	<i>sHsp-1</i> (classe CII) (25)
Temperatura normal	<i>Craterostigma plantagineum</i>	<i>HaHsp17.6-CI</i> homòlegs (16)

**Taula 1.** Expressió de sHsps de *Quercus suber* en relació a les altres sHsps estudiades en condicions diferents a 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.

## I.2 – ESTRUCTURA I FUNCIO MOLECULAR DE LES sHsps

### 2.1 – Regions de les sHsps

Les sHsps són proteïnes de longitud variable i pesos moleculars que oscil·len entre 10 - 30kDa però totes presenten tres regions diferenciades: un domini  $\alpha$ -cristal·lí molt conservat, flanquejat per una regió N-terminal de longitud i seqüència variables a davant i una extensió C-terminal generalment curta o fins i tot absent a darrera.

La fig.1 mostra l'alineament de la seqüència aminoacídica de quatre sHsps de planta incloent QsHsp17.4-CI en la qual es poden observar les tres regions típiques de les sHsps de planta i l'elevat grau d'homologia.

- **Regió N-terminal:** És la regió més variable, la varietat en la seqüència i en el nombre d'aminoàcids fa difícil definir uns límits exactes entre aquesta regió i el domini  $\alpha$ -cristal·lí. Generalment, està formada per 40-50 aminoàcids però han estat descrites proteïnes amb regions N-terminals més curtes, com Hsp12.2 de *C.elegans* amb només 26 aminoàcids, i proteïnes amb regions N-terminals més llargues, com la  $\alpha$ B-cristal·lina de mamífer amb 67 aminoàcids. En aquesta regió s'hi localitza el pèptid senyal responsable del transport intracel·lular de les proteïnes al mitocondri, cloroplast o reticle endoplasmàtic. Per altra banda, Yeh *et al.* (2002) van identificar, en aquesta regió, una seqüència conservada de set aminoàcids (del 30 al 36) molt important per la funció protectora de OsHsp16.9 d'arròs.

## regió N-terminal

```

QsHsp17.4-CI      MALS-LFG-GRRSNVDFPFSLDIWDPFEG--FSAVASVPPSA-RETTAFATARI 49
OsHsp16.9-CI      MSLV-----RRSNVDFPFSLDLW-DPFDVFRSVVPATSD--NDTAAFANARI 45
TaHsp16.9-CI      MSIV-----RRSNVDFPFA-DLWADFPD-TFRSIVPAISGGGSETAAAFANARM 46
PsHsp18.1-CI      MSLIPSFFSGRRSNVDFPFSLDVWDLKDFPFSSNSSPASFP-RENPAFVSTRV 53
*:: * * ..*****: * * . *                :.:*.: :.:
              [  $\alpha 1$  ] [  $\alpha 2$  ] [  $\alpha 3$  ] ==

```

## domini $\alpha$ -cristal·lí

```

                                consensus II
QsHsp17.4-CI      DWKETPEAHIFKADLPGLKKEEVKVEVEDGNVLQISGERSKEHEEKNDKWHRVERSCGKFMRRFRLPENAKVDQVKANMENGVLTVMPK 90
OsHsp16.9-CI      DWKETPESHVFKADLPGVKKEEVKVEVEEGNVLVISGQRKEKEDKNDKWHRVERSSGQFMRRFRLPENAKVDQVKAGLENGVLTVMPK 90
TaHsp16.9-CI      DWKETPEAHVFKADLPGVKKEEVKVEVEDGNVLVVSGETRKEKEDKNDKWHRVERSSGKFVRRFRLLEDQAKVEVKAGLENGVLTVMPK 90
PsHsp18.1-CI      DWKETPEAHVFKADLPGLKKEEVKVEVEDDRVLQISGERSVEKEDKNDKWHRVERSSGKFLRRFRLPENAKMDKVKASMEGVLTVMPK 90
*****:.*:*.*** *****:.* :.*:.*: :.:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*
           $\beta 2$     $\beta 3$             $\beta 4$     $\beta 5$             $\beta 6$     $\beta 7$             $\beta 8$     $\beta 9$ 

```

## extensió C-terminal

```

QsHsp17.4-CI      EEQKKPAVKAEIISG 15
OsHsp16.9-CI      AEVKKPEVKAEIISG 15
TaHsp16.9-CI      AEVKKPEVKAIQISG 15
PsHsp18.1-CI      EEIKKAEVKSEIISG 15
* . **:*:****
           $\beta 10$ 

```

**Fig. 1.** Alineament de la seqüència aminoacídica de sHsps CI de plantes (ClustalW). Les seqüències són de QsHsp17.4-CI (AJ000691), *Oriza sativa* OsHsp16.9 (P27777), *Triticum aestivum* TaHsp16.9 (S21600) i *Pisum sativum* PsHsp18 (M33899). S'indiquen les regions consens I i II del domini  $\alpha$ -cristal·lí específiques de sHsps-CI de planta a sobre les seqüències i l'estructura secundària descrita per TaHsp16.9 (Montfort *et al.*, 2001) a sota. En negreta s'indiquen les regions d'unió a substrat descrites per PsHsp18-CI (Lee *et al.*, 1997) i en negreta i cursiva els aminoàcids essencials d'aquestes regions descrits per OsHsp16.9-CI (Yeh *et al.*, 2002).

- **Domini  $\alpha$ -cristal·lí:** És la regió més gran i conservada de la proteïna. Està formada per uns 90 aminoàcids entre els quals es diferencien dues zones altament conservades: la regió consens II i la regió consens I. La importància d'aquest domini per la funció de les sHsps ha estat descrita en diversos treballs (Narberhaus *et al.*, 2002), però el paper de les dues regions consens encara no és ben conegut. Yeh *et al.* (2002) van demostrar que la regió consens II era molt important per la funció de Hsp16.9 d'arròs. Van determinar una seqüència de sis aminoàcids (EEGNVL) i més concretament dos aminoàcids d'aquesta regió (EE) com imprescindibles per la termoprotecció de cèl·lules bacterianes *in vivo*.

- **Extensió C-terminal:** És la regió més curta de les sHsps. Generalment està formada per 10-15 aminoàcids però en alguns casos és molt més curta. És el cas de Hsp12.2 de *C.elegans* amb una extensió C-terminal formada per un sol aminoàcid o el cas de Hsp12.6 de *C.elegans* i Hsp20 de mamífer en les quals és absent. El fet que la seva absència no provoquin canvis en la funció protectora de la proteïna en cèl·lules vives fa pensar que aquesta regió té un paper poc important per la funció. Per altra banda, però, en dues sHsps del bacteri *B.japonicum*, s'ha identificat un motiu molt conservat (I-X-I) la mutació del qual empitjora l'activitat xaperona *in vitro* (Studer *et al.*, 2002).

## 2.2 – Plegament de les sHsps

El pèptid lineal amb les seves tres regions característiques (N-terminal,  $\alpha$ -cristal·lí i C-terminal) es plega formant **monòmers** tridimensionals. Una característica de les sHsps és la capacitat d'interacció dels monòmers per formar **dímers** primer i grans complexos, anomenats **oligòmers**, posteriorment. El nombre de monòmers o subunitats que formen els oligòmers és variable (entre 9 i 24) originant-se oligòmers de 200-300 kDa en plantes (Waters *et al.* 1996) i d'entre 400 i 800 kDa en les  $\alpha$ -cristal·lines i sHsps de llevats i mamífer (Groenen *et al.* 1994; Ehrnsperger *et al.* 1999; Kirschner *et al.* 2000). La formació dels oligòmers és un requisit indispensable per la funció xaperona de les sHsps. Les sHsps que, de forma natural o artificial, han perdut la capacitat de formar oligòmers, perden també la funció xaperona (Leroux *et al.*, 1997b; Kokke *et al.*, 1998; Studer *et al.*, 2002; Stromer *et al.*, 2004).

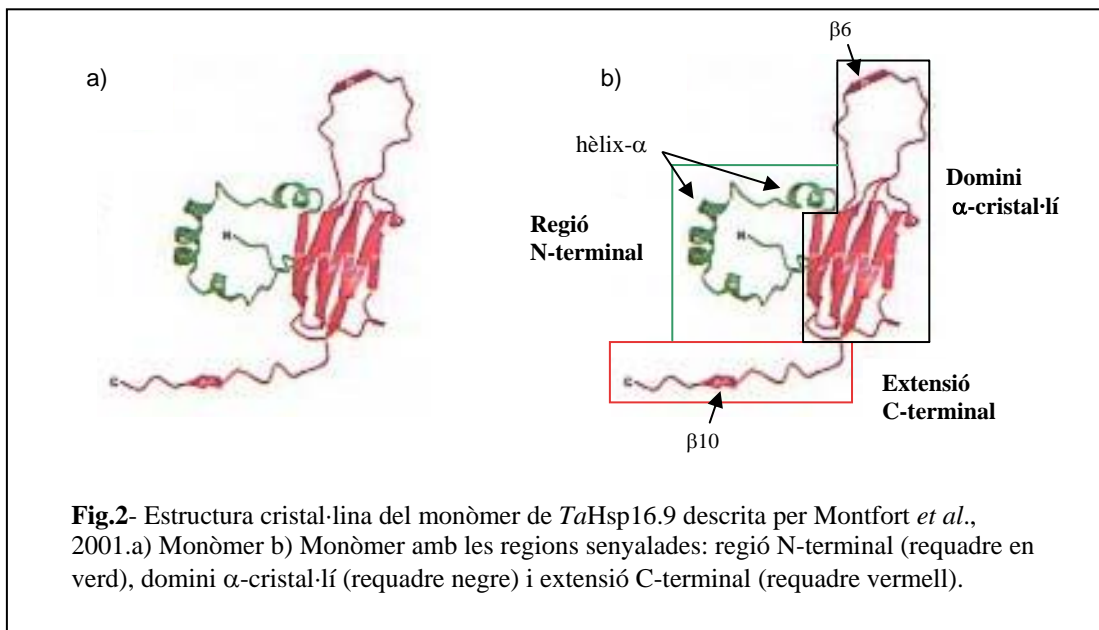
### Monòmer

La primera estructura cristal·lina d'una sHsp va ser descrita per Kim *et al.* (1998). Es tracta d'una sHsp (Hsp16.5) de *Methanococcus jannaschii* i la seva estructura va ser descrita amb una resolució de 2,9 Å. Més tard es va descriure l'estructura cristal·lina d'una sHsp eucariòtica (TaHsp16.9), una sHsp de classe I de blat (Montfort *et al.* 2001). Tot i que ambdues proteïnes presenten una similitud de seqüència força baixa (23%) el plegament del monòmer és molt similar i segurament és extrapolable a la majoria de sHsps (Fig.2).

El domini responsable de mantenir l'estructura del monòmer és el  $\alpha$ -cristal·lí, que constitueix aproximadament el 70% de la proteïna. Es plega formant nou cadenes  $\beta$

disposades en un "sandwich" de dos fulls- $\beta$  antiparal·lels ("sandwich- $\beta$ "). Les cadenes  $\beta 2$ ,  $\beta 3$ ,  $\beta 9$  i  $\beta 8$  formen un dels fulls- $\beta$  mentre que l'altre està format per les cadenes  $\beta 7$ ,  $\beta 5$  i  $\beta 4$ . Entre les cadenes  $\beta 7$  i  $\beta 5$  s'estén un gran llaç (*loop*) que conté la cadena  $\beta 6$  (Fig. 2).

La regió N-terminal forma un braç de tres hèlix- $\alpha$  unides per "random coil" i situades externament al cor de la proteïna mentre que l'extensió C-terminal forma una cua, amb una cadena- $\beta$  ( $\beta 10$ ), que també s'allunya del domini central. Aquestes dues regions no tenen un paper fonamental en l'estructura del monòmer.



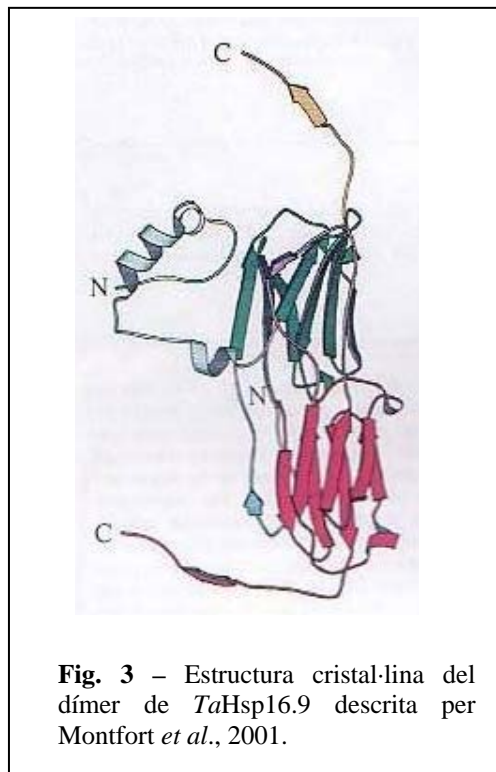
### Dímer

Per formar dímers cada monòmer interacciona amb un altre monòmer mitjançant ponts d'hidrogen, interaccions hidrofòbiques i interaccions iòniques. En aquestes interaccions intervé el domini  $\alpha$ -cristal·lí que és el responsable de mantenir l'estructura. Les interaccions més importants per la formació i estabilització del dímer són les que es donen entre els residus del llaç (o *loop*), concretament la cadena  $\beta 6$ , que s'estén des de el "sandwich- $\beta$ " d'un monòmer fins al "sandwich- $\beta$ " del monòmer veí on interacciona antiparal·lelament a  $\beta 2$  formant un full- $\beta$  de 5 cadenes (Montfort *et al.*, 2002) (Fig. 2-3).

La regió N-terminal no té un paper destacat en l'estabilització del dímer. En el cas de la sHsp descrita per Montfort *et al.* (2001), *TaHsp16.9*, el dímer presenta dos dominis N-terminals estructuralment diferents, mentre que un manté l'estructura en braç amb 3 hèlix- $\alpha$ , l'altre està totalment desordenat, no presenta cap estructura definida.

L'extensió C-terminal tampoc és molt important per mantenir l'estructura del dímer. Les dues cues C-terminals que trobem en un dímer tenen diferent orientació, la qual cosa serà discutida més avall en relació al plegament de l'oligòmer.

El dímer és la forma d'agregació bàsica més petita en que es troben les sHsps en la natura. Després de sintetitzar-se els monòmers interaccionen ràpidament per formar dímers. El dímer és l'estructura més petita intercanviable. Diferents dímers interaccionen entre si per formar oligòmers que poden dissociar-se novament en dímers. El dímer es considera la unitat realment activa d'unió al substrat. Un dels últims treballs (Stromer *et al.*, 2004) demostra que en condicions normals de creixement, Hsp26 de *S.cerevisiae*, es troba en forma d'oligòmer. En condicions d'estrès, però, aquest oligòmer es dissocia en dímers que seran els responsables de la interacció amb les proteïnes desnaturalitzades. Els dímers són doncs, l'estructura funcional de les sHsps.





### **Oligòmer**

Si bé els monòmers mostren una gran similitud en el plegament, la variabilitat pel que fa a l'estructura dels oligòmers és molt gran. El nombre de monòmers que formen l'oligòmer varia en funció de les diferents sHsp: 9 en Hsp16.3 de *Mycobacterium tuberculosis* (Chang *et al.*, 1996), 12 en el cas de PsHsp18.1 de pèsol (Lee *et al.*, 1995), 16 en el cas de Hsp25 de ratolí (Ehrnsperger *et al.*, 1999) o 24 en Hsp16.5 de *Methanococcus jannaschii* (Kim *et al.*, 1998) i Hsp26 de *S.cerevisiae* (Haslbeck *et al.*, 1999). Generalment els oligòmers estan formats per monòmers idèntics (homo-oligòmers) però en alguns casos s'ha vist que es poden formar hetero-oligòmers. S'ha observat com la  $\alpha$ A- i  $\alpha$ B-cristal·lines s'associen per formar oligòmers (de Jong *et al.*, 1998; Groenen *et al.*, 1994). La proteïna  $\alpha$ B-cristal·lina també pot formar oligòmers amb la Hsp27 humana (Kato *et al.*, 1994b; Zantema *et al.*, 1992).

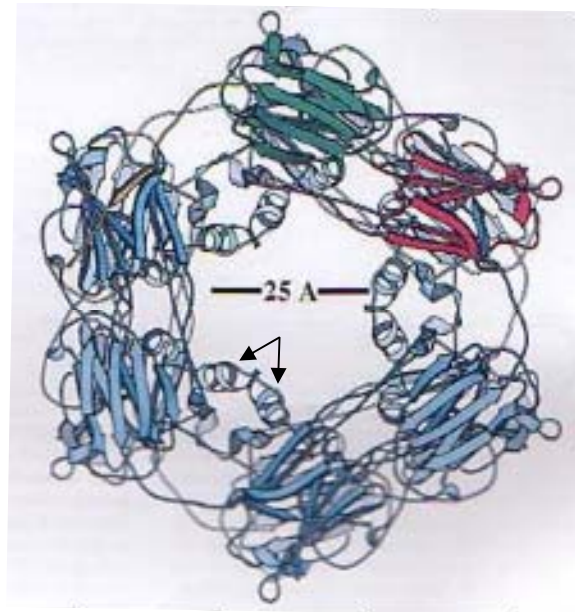
L'oligòmer és una estructura inestable, molt dinàmica i en constant equilibri amb els dímers. Un treball recent Stromer *et al.* (2004) descriu dos tipus d'associacions en la formació de l'oligòmer de Hsp26 de *S.cerevisiae*: per una banda unes interaccions estables i fortes que uneixen dos monòmers entre si per formar el dímer i per altra banda es formen unes interaccions dèbils entre els dímers, que es poden trencar amb petits canvis d'energia, per formar un oligòmer de 24 subunitats.

Aquesta elevada plasticitat ha dificultat la cristal·lització de sHsps. Les dues sHsps cristal·litzades fins el moment difereixen molt en l'estructura del seu oligòmer:

- Hsp16.5 de *Methanococcus jannaschii* (Kim *et al.*, 1998) presenta un oligòmer format per 24 monòmers o subunitats disposades amb simetria octaèdrica en un complex esfèric format pels dominis  $\alpha$ -cristal·lins i C-terminals. Els dominis N-terminals no es van veure per densitat electrònica. El complexa té forma d'anell amb una esfera interior de 65 Å de diàmetre i una esfera exterior de 120 Å.
- TaHs16.9 de llevat (Montfort *et al.*, 2001) forma un dodecàmer consistent en dos discos, cadascun d'ells amb 6 dominis  $\alpha$ -cristal·lins organitzats en un trimer de dímers. Té una cavitat interior amb un diàmetre de 25 Å mentre que el diàmetre exterior és de 95 Å. Cada dímer té una regió N-terminal desordenada i l'altra formada per 3  $\alpha$ -hèlix situada a l'interior de l'oligòmer interaccionant amb regions N-terminals d'altres monòmers (Fig. 4).

Per Montfort *et al.* (2001) la regió N-terminal és la força estabilitzadora més important de l'oligòmer. Els sis braços ordenats en  $\alpha$ -hèlix, localitzats a l'interior del complexa, interaccionen entre si i amb residus del domini  $\alpha$ -cristal·lí mantenint els dímers units i estabilitzant el complexa.

L'extensió C-terminal també té un paper en l'estabilització de l'oligòmer. La cadena  $\beta 10$  de l'extensió C-terminal d'un dímer interacciona amb les cadenes  $\beta 4$  i  $\beta 8$  del domini  $\alpha$ -cristal·lí d'un altra dímer ajudant a mantenir l'estabilitat del complexa (Fig.4). Sembla que la funció principal estaria relacionada en proporcionar solubilitat (Andley *et al.*, 1996; Leroux *et al.*, 1997; Fernando *et al.*, 2000).



**Fig. 4:** Complexa oligomèric de *TaHsp16.9* format per 12 monòmers distribuïts en dos anells formats per 3 dímers cadascun. Descrita per Montfort *et al.*, 2001. Les fletxes mostren la interacció entre la regió N-terminal del dímer d'un anell amb la d'un dímer de l'altre anell.

## 2.3 – Caràcter de xaperones moleculars

### Funció xaperona

En condicions d'estrès, les sHsps promouen la degradació de proteïnes anòmales o bé actuen com a xaperones moleculars prevenint l'agregació i promovent el replegament de les proteïnes desnaturalitzades (Parsell i Lindquist, 1993).

Quan es va trobar que Hsp70 i GroEL, dos Hsp d'alt pes molecular d'*E.coli*, tenien activitat xaperona es va pensar que també les sHsps podien tenir un paper com a xaperones moleculars. Els estudis més utilitzats per estudiar la funció xaperona de les sHsps s'han realitzat *in vitro*. Els primers assajos amb fraccionaments de cèl·lules vegetals, suggerien la possibilitat de que les sHsps podien protegir altres proteïnes de la insolubilització induïda per calor (Jinn et al., 1989).

Els progressos més importants per entendre els mecanismes moleculars de la funció xaperona s'han aconseguit utilitzant sHsps purificades i proteïnes model com a substrat. En el primer treball amb components purificats (Horwitz et al., 1992) van utilitzar la  $\alpha$ B-cristal·lina juntament amb diversos substrats. Aquesta metodologia experimental es va estendre ràpidament per estudiar la possible funció xaperona d'altres sHsps (Hsp25 de rata, Jakob et al., 1993; Hsp27 humana, Merck et al., 1993). Des d'aleshores s'ha utilitzat un gran nombre de substrats diferents com la citrat sintasa (CS) (Collada *et al.*, 1997; Buchner et al., 1998), la malat deshidrogenasa (MDH) (Chen et al., 1994), la rodonasa (Mendoza et al., 1994) o la RuBisCO (Cloney et al., 1993). Tot i que aquests substrats difereixen en estructura, grau de plegament i tendència a experimentar reaccions irreversibles durant el plegament i desplegament, en tots els casos s'ha vist que les sHsps poden actuar de xaperones. En situacions de desnaturalització per acció d'un agent químic o tèrmic, la presència de sHsps es correlaciona amb una menor inactivació de les proteïnes, amb una major solubilitat i amb un major rendiment del replegament després de l'estrès. En condicions d'estrès, les sHsps s'uneixen de forma selectiva a proteïnes parcialment desnaturalitzades, evitant la formació d'agregats i mantenint les proteïnes en un estat compatible per a què altres xaperones les renaturalitzin en un procés dependent d'ATP (Waters *et al.*, 1996; Veinger *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 2000).

L'habilitat de les sHsps per interaccionar amb proteïnes parcialment desplegades evitant la formació d'agregats ha estat confirmada en diferents tipus d'organisme com bacteris (Kim et al., 1998b; Roy et al., 1999), plantes (Collada et al., 1997; Young et al., 1999; Smykal et al., 2000), *Drosophila* (Michaud et al., 2002), *C.elegans* (Ding i Candido et al., 2000a – 2000b), *Xenopus* (Fernando i Heinkkila, 2000) o mamífers (Andley et al., 1996; Sun et al., 1997).

**Mecanisme d'unió al substrat**

Tot i que hi ha abundants treballs que correlacionen la producció i acumulació de sHsps en resposta a estressos ambientals i a situacions d'estrès cel·lular lligades al desenvolupament (Waters et al., 1996; Wehmeyer i Vierling et al., 2000) els mecanismes moleculars a través dels quals les sHsps protegeixen les cèl·lules són poc coneguts (Haslbeck i Buchner, 2002). Basha *et al.* (2004) apunten que les sHsps poden protegir funcions cel·lulars tant diverses com la transcripció, la traducció, la senyalització cel·lular i el metabolisme secundari.

La teoria més acceptada actualment és que la unió entre les proteïnes desnaturalitzades i les sHsps es dona principalment per interaccions hidrofòbiques. Lee *et al.* (1997) van estudiar la unió d'una sHsp de pesol amb una sonda hidrofòbica fluorescent (bis-ANS) per determinar els possibles llocs d'unió al substrat i van descriure dues zones d'unió amb la sonda per interaccions hidrofòbiques. La seqüència més llarga corresponia a un tros de la regió consens II, mentre que l'altra, més curta, corresponia a una zona força conservada de l'inici de la regió domini N-terminal (Fig. 1). És de destacar que no es va trobar cap zona d'unió ni en la regió consens I ni en el domini C-terminal.

Quan augmenta la temperatura les proteïnes es desnaturalitzen deixant al descobert vàries zones hidrofòbiques que són reconegudes per les sHsps (Saibil *et al.*, 2000; Montfort *et al.*, 2001; Narberhaus *et al.*, 2002; Sun *et al.*, 2002). En condicions normals de creixement, la majoria de les sHsps es troben formant oligòmers que són estructures molt dinàmiques. Els petits canvis d'energia, causats per un augment de temperatura, provoquen una reorganització de l'oligòmer fent que quedin exposades zones hidrofòbiques que permetran la unió a les proteïnes desnaturalitzades (Lee *et al.*, 1997; Shearstone i Baneyx, 1999; Török *et al.*, 2001). En alguns casos el canvi conformacional provoca una reestructuració de l'oligòmer com s'ha vist per les  $\alpha$ -cristalines A i B i per la Hsp27 humana (Bova *et al.*, 2000). En altres casos però, es dona una dissociació en dímers com en el cas de Hsp26 de llevat (Haslbeck *et al.*, 1999) o de TaHsp16.9 de blat (Montfort *et al.*, 2001). Els estudis de cristal·lografia amb TaHsp16.9 donen suport a la hipòtesi que el dímer és la unitat funcional més petita i la forma realment activa d'unió al substrat. En condicions normals (25°C), TaHsp16.9 forma un dodecàmer organitzat en dos anells de tres dímers cadascun. Quan augmenta la temperatura el dodecàmer es dissocia en dímers. En cadascun dels sis dímers queden exposades quatre zones hidrofòbiques que anteriorment estaven amagades en el complex:

- Una zona hidrofòbica en la regió N-terminal que en l'oligòmer s'uneix a la regió N-terminal d'un altre dímer.
- El motiu IXI/V de la cadena  $\beta$ 10 de l'extensió C-terminal que en el complex s'uneix a les cadenes  $\beta$ 4 i  $\beta$ 8 del domini  $\alpha$ -cristal·lí d'un altre dímer.

- A l'inici del sandwich- $\beta$  del domini  $\alpha$ -cristal·lí una zona hidrofòbica (Trp48 i Phe110) que en el complexa quedava amagada pel domini N-terminal del mateix monòmer.
- A l'extrem oposat del domini  $\alpha$ -cristal·lí queda el punt d'unió del motiu IXI/V de l'extensió C-terminal del dímer veí.

Es creu que aquestes zones hidrofòbiques que apareixen en el dímer quan l'oligòmer es dissocia degut a l'augment de temperatura són les responsables de la unió de TaHsp16.9 a les zones hidrofòbiques que queden exposades en les proteïnes que es desnaturalitzen.

Segons aquest model proposat per Montfort (2001) la unitat activa d'unió al substrat seria el dímer mentre que l'oligòmer seria un magatzem de sHsps.

## **OBJECTIUS I ORGANITZACIÓ DE LA MEMÒRIA**

---

## **II. OBJECTIUS I ORGANITZACIÓ DE LA MEMÒRIA**

**II.1 – Antecedents**

**II.2 – Objectius**

**II.3 – Organització de la memòria**

## II.1.- ANTECEDENTS

Durant l'estudi, a nivell molecular, del procés de suberificació es va obtenir una llibreria de cDNA de cèl·lules de fel·lema d'alzina surera (*Quercus suber*). Entre els mRNA extrets d'aquesta llibreria es va aïllar i seqüenciar el gen que codifica per la proteïna de xoc de calor de baix pes molecular, QsHsp17.4-CI.

- QsHsp17.4-CI: Codifica per una proteïna de 17kDa amb un 71% d'homologia amb una sHsp-CI d'*Arabidopsis thaliana*. Per la seva condició de proteïna massiva i la importància que tenen en altres espècies sHsps amb un pes molecular similar, ha estat la proteïna objecte d'estudi d'aquest treball.

Amb encebadors complementaris a regions altament conservades de les QsHsp17.4-CI es van obtenir, mitjançant RT-PCR, tres membres més de sHsps de classe I de surera.

- QsHsp10-CI: QsHsp10-CI codifica per una proteïna de xoc de calor de 10 kDa. És la sHsp més petita descrita fins ara. Es tracta d'una truncació natural a la que li falta la meitat del domini  $\alpha$ -cristal·lí i tota l'extensió C-terminal. Tot i aquesta important truncació, QsHsp10-CI és capaç de conferir tolerància a l'estrès tèrmic i sobretot a l'estrès oxidatiu (Jofré *et al.*, 2003).
- QsHspC-CI: Presenta una homologia de seqüència molt similar a la seqüència de QsHsp17.4-CI (75,3%).



- QsHspD-CI: Molt similar a QsHsp10-CI pel que fa a seqüència (90,8%) però amb un pes molecular de 17kDa.

### **Patró d'expressió**

El patró d'expressió de les sHsps de surera s'ha estudiat mitjançant dues metodologies diferents:

- a) *Immunohistoquímica i hibridacions in situ*: Els resultats demostren una acumulació de sHsps de classe I en teixit vascular i fel·lema en plàntules i en regions meristemàtiques tant en plàntules com en embrions somàtics immadurs tant a nivell de mRNA com de proteïna (Pla *et al.*, 1998).
- b) *Anàlisis per Western blot*: En surera, en general, els teixits vegetatius en absència d'estrès presenten uns nivells molt baixos de QsHsp17.4-CI. Aquesta proteïna s'indueix per estrès tèrmic, oxidatiu, hídric i tractament amb àcid absísic en teixit vegetatiu i embrió somàtic (taula 1). Aquesta acumulació es dona de forma més abundant en tija seguit d'arrel i de fulla (Llompert, 1998, Puigderrajols *et al.*, 2001). En els embrions somàtics aquesta proteïna s'acumula durant l'embriogènesi i desapareix durant la germinació (Puigderrajols *et al.*, 2001).

	control		Estrès		Estrès	Estrès	Estrès	Estrès	
	22°C	32°C	38°C	42°C	4°C	Hídric		50µM	100µM
	+	+	++	+++	+	+++	+++	+++	++
<b>Tija</b>									
<b>Arrel</b>	+	+	++	+++	+	++	++	++	++
<b>Fulla</b>		+	++	+++		++	++		
	∅				∅			∅	∅

**Taula 1:** Expressió de QsHSP17.4-CI en funció dels diferents estressos (Llompert 1998).

- ∅ - No s'ha detectat expressió  
 + - Baixa expressió  
 ++ - Expressió moderada  
 +++ - Expressió elevada

El patró bidimensional de les sHsps classe I de surera (Jofré *et al.*, 2003) evidencia la presència de polipèptids de 17kDa i de 10kDa amb diferents punts isoelèctrics. Aquests dos grups apareixen tant en cèl·lules del fel·lema com en cèl·lules del xilema.

L'estrès tèrmic indueix l'expressió dels polipèptids de 17kDa mentre que l'estrès oxidatiu indueix l'expressió dels polipèptids de 10kDa.

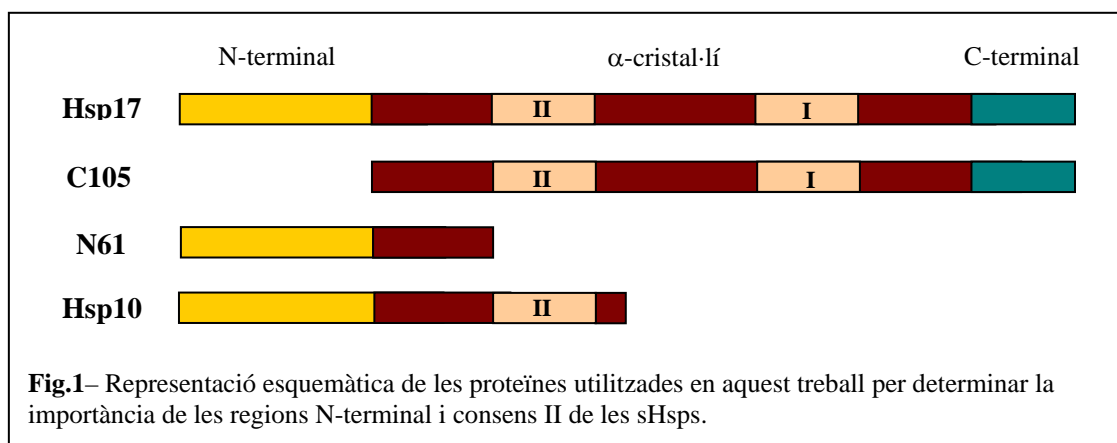
## II.2.- OBJECTIUS

L'objectiu principal d'aquest treball és:

**Estudiar la funció de QsHsp17.4-CI *in vivo* en cèl·lules bacterianes i analitzar la importància de les regions N-terminal,  $\alpha$ -cristal·lí i C-terminal en la funció de les sHsps.**

L'estudi del paper de les diferents regions de les sHsps es farà mitjançant construccions moleculars específiques. Per determinar concretament la importància de la regió N-terminal i la regió consens II del domini  $\alpha$ -cristal·lí s'han dissenyat tres construccions: dos mutants de delecció a partir de QsHsp17.4-CI (C105 i N61) i una variant de la proteïna QsHsp10-CI (Hsp10) (Fig.1):

- **C105:** conté el domini  $\alpha$ -cristal·lí i l'extensió C-terminal però li falta tota la regió N-terminal. Rep aquest nom perquè conté els últims 105 aminoàcids de QsHsp17.4-CI.
- **N61:** conté la regió N-terminal i els 12 primers aminoàcids del domini  $\alpha$ -cristal·lí. Presenta l'extrem C-terminal i gairebé tot el domini  $\alpha$ -cristal·lí, incloent les dues regions consens, deleccionats. Conté els primers 61 aminoàcids de QsHsp17.4-CI.
- **Hsp10:** Aquesta construcció està basada en la forma truncada natural QsHsp10-CI. Consta de la regió N-terminal i la porció inicial del domini  $\alpha$ -cristal·lí amb la regió consens II inclosa.



Per dur a terme els estudis de funcionalitat de QsHsp17.4-CI i del paper de les tres regions de la proteïna, s'han proposat els següents **objectius concrets**:

- 1) Estudiar la capacitat termoprotectora de QsHsp17.4-CI i de les construccions dissenyades, en cèl·lules bacterianes.
- 2) Analitzar la localització subcel·lular de QsHsp17.4-CI i les diferents construccions.
- 3) Estudiar si la sobreexpressió de QsHsp17.4-CI o de les construccions dissenyades té algun efecte en l'estabilitat de la membrana en condicions d'estrès.
- 4) Analitzar si l'expressió de les diferents proteïnes recombinants modifica l'expressió de les xaperones bacterianes.

• **Objectiu 1 : Estudiar la capacitat termoprotectora**

La capacitat protectora de QsHsp17.4-CI *in vivo* s'estudia en un model bacterià, concretament *E.coli*, degut als importants avantatges que presenta en comparació amb la utilització de protoplasts. Els estudis amb models bacterians han estat utilitzats en la bibliografia i es consideren una aproximació molt segura als estudis de funció (Yeh *et al.*, 1997; Joe *et al.*, 2000). Per realitzar aquest tipus d'anàlisi de la funció *in vivo*, **(i)** primer s'ha de clonar el gen i transformar les cèl·lules bacterianes, un procés llarg i sovint difícil, i **(ii)** un cop es disposa de cèl·lules transformades s'estudia la capacitat de supervivència en relació a cèl·lules control. En el nostre cas s'ha estudiat en relació a l'estrès tèrmic.

• **Objectiu 2 : Analitzar la localització subcel·lular**

Una de les funcions atribuïdes a la sHsps és l'estabilització de les membranes. En les cèl·lules del fel·lema és molt important mantenir l'estabilitat de les vacuòles durant un estrès tèrmic. Les cèl·lules del fel·lema tenen vacuòles plenes de tanins, un producte del metabolisme secundari molt tòxic per la cèl·lula. La desestabilització de les membranes provoca l'abocament dels tanins amb la conseqüent coagulació del citoplasma i mort cel·lular.

Donat que durant la purificació de QsHsp17.4-CI recombinant es va observar afinitat per les estructures hidrofòbiques i que s'ha especulat en diversos treballs sobre un

possible paper de les sHsps en l'estabilització de les membranes en condicions d'estrès, en aquest treball s'estudia la possible associació de QsHsp17.4-CI i les diferents proteïnes recombinants amb les membranes d'*E.coli* mitjançant assajos de fraccionament i localització subcel·lular.

**· Objectiu 3 : Estudiar la possible acció estabilitzadora**

Per tal d'entendre millor l'acció molecular/fisiològica d'aquestes proteïnes a les membranes, s'estudia la seva possible acció estabilitzadora a tres nivells:

- a) Analitzant, per cromatografia de gasos, el grau de saturació dels lípids de la membrana abans i després de l'estrès per determinar si la presència de les proteïnes recombinants modifica la composició lipídica per tal de compensar l'excés de fluïdesa de l'estrès tèrmic.
- b) Anàlisi de la rigidesa de la membrana de les cèl·lules que sobreexpressen les proteïnes recombinants a temperatura fisiològica mitjançant el marcador DPH. La rigidesa de les membranes és directament proporcional a la fluorescència emesa pel DPH.
- c) En aquelles cèl·lules que s'ha cregut oportú, s'ha estudiat l'estabilitat de la membrana sota un gradient progressiu de temperatura mitjançant la sonda fluorescent NPN. Durant l'estrès tèrmic la membrana esdevé més permeable pel que el NPN s'intercala a la membrana i emet fluorescència en aquest entorn hidrofòbic. La fluorescència del NPN indicarà per tant la permeabilitat de la membrana externa.

**· Objectiu 4 : Analitzar si l'expressió de les proteïnes recombinants modifica l'expressió d'altres xaperones bacterianes**

Amb aquest objectiu es pretén analitzar la capacitat de Hsp17, Hsp10, C105 i N61 per modificar el patró d'expressió de les principals Hsps d'*E.coli* durant l'estrès tèrmic. S'estudia la síntesi *de novo* de proteïnes a diferents temperatures mitjançant el marcatge *in vivo* amb aminoàcids marcats radioactivament.

## II.3.- ORGANITZACIÓ DE LA MEMÒRIA

Aquesta memòria s'organitza en sis apartats: Introducció, Objectius, Resultats , Discussió i conclusions, Mètodes i protocols i Bibliografia, seguits d'un Índex general.

El primer apartat (I), **Introducció**, serveix per introduir les sHSPs i el seu paper en la protecció de les plantes enfront l'estrès. Conté dos apartats principals, el primer parla de les sHsps vegetals i les seves funcions, el segon tracta de l'estructura i la funció moleculars (funció xaperona) de les sHsps.

En l'apartat II, **Objectius**, s'expliquen l'objectiu general i els objectius concrets del treball i l'organització de la memòria,

L'apartat III , **Resultats**, es presenta dividit en quatre capítols:

El primer capítol (III.1), Obtenció de les construccions moleculars, conté el disseny i l'estratègia molecular seguida per l'obtenció de les diferents construccions que s'utilitzen en aquest treball.

Els altres tres capítols responen respectivament a: (III.2) L'estudi de la funció protectora enfront de l'estrès tèrmic, (III.3) La funció estabilitzadora de les membranes i (III.4.) La capacitat de modificar l'expressió gènica.

Cada capítol estudia l'efecte de la sobreexpressió de la proteïna sencera (QsHsp17.4-CI) i el comportament dels diferents mutants de delecció. Cada capítol s'estructura en una introducció breu, uns objectius concrets i un plantejament dels diferents experiments realitzats; seguidament es descriuen els resultats, la discussió i s'extreuen les conclusions.

L'apartat IV aporta una **Discussió** i unes **Conclusions generals**.

L'apartat V correspon a la descripció dels **Mètodes i Protocols** utilitzats. Hem cregut oportú situar la metodologia en aquest punt de la memòria per no entorpir la lectura, no obstant en cada capítol de resultats i per a cada experiment s'aporten les dades necessàries per a la seva comprensió.

Segueixen la **Bibliografia** (apartat VI) i l'**Índex general** (apartat VII).

## **RESULTATS**

---

## **III.1 - OBTENCIÓ DE LES CONSTRUCCIONS MOLECULARS**

### **Introducció**

#### **III.1.1.-Construccions en el vector pGFPuv**

- 1.1.1- Amplificació, clonació i lligació dels inserts
- 1.1.2- Transformació i expressió de les proteïnes: HSPF, HSPN i GFP
- 1.1.3- Concentració de la proteïna de fusió per columna hidrofòbica

#### **III.1.2.-Construccions en el vector pET29a**

- 1.2.1- Amplificació, clonació i lligació dels inserts
- 1.2.2- Transformació i expressió de les proteïnes: Hsp17,C105,Hsp10 i N61

### **Resum i cloenda**

## Introducció

S'han utilitzat cèl·lules bacterianes d'*E.coli* com a model viu per estudiar la funcionalitat de QsHsp17.4-CI i els pèptids derivats per les avantatges de transformació i de creixement cel·lular que presenten.

Per expressar les proteïnes estudiades en cèl·lules d'*E.coli*, s'ha de clonar els gens en un vector d'expressió. Aquest és un procés llarg i en alguns casos complex, per el qual s'han dissenyat encebadors específics amb dianes de restricció a l'extrem 5' que permeten mantenir la pauta de lectura correcta i aconseguen extrems cohesius facilitant la lligació de l'insert i el vector.

En aquest treball s'ha clonat la zona codificant de QsHsp17.4-CI i dels diferents mutants de delecció dissenyats en dos vectors d'expressió bacterians: pGFPuv i pET29a.

a) **pGFPuv** (Clontech Lab. Inc. PT3055, EUA): Aquest vector porta el gen de la proteïna verd fluorescent (GFP). La presència de dianes de restricció als dos extrems del gen permet obtenir proteïnes de fusió amb GFP, la qual cosa facilita la detecció de l'expressió de la proteïna recombinant així com el seu seguiment per fluorescència.

b) **pET29a** (Novagen): Aquest vector presenta una doble regulació de l'expressió de les proteïnes recombinants fet que permet un major control. Es va utilitzar aquest vector per la clonació de QsHsp17.4-CI, dos mutants de delecció d'aquesta proteïna (C105 i N61) i la variant de la proteïna aïllada QsHsp10-CI (Hsp10).



### III.1.1.- Construccions en el vector d'expressió pGFPuv

La clonació del gen de la GFP (Prasher D.C., *et al.*, 1992) i la demostració per part de Chalfie M. *et al.*, (1994) de que la GFP pot ser expressada com a transgen plenament funcional va obrir nous camins en la investigació de cèl·lules, del desenvolupament i la biologia molecular. S'han obtingut proteïnes de fusió amb GFP en virus (Nurkiyanova K.M., *et al.*, 2000), bacteris (Chalfie M. *et al.*, 1994), llevats (Kahana J. *et al.*, 1995), plantes (Casper S. *et al.*, 1996; Epel B. *et al.*, 1996), *Drosophila* (Wang S. *et al.*, 1994) i cèl·lules de mamífer (Luding B. *et al.*, 1996; DeGiorgi F. *et al.*, 1996). La detecció de l'activitat GFP és ràpida i senzilla. L'excitació amb llum ultraviolada permet, a diferència d'altres marcadors de gens o gens "reporter", mantenir les cèl·lules vives. Per altra banda, en general, la fusió de proteïnes amb GFP no compromet el plegament tridimensional ni la funcionalitat (Prasher *et al.*, 1995).

Es va utilitzar el vector d'expressió bacterià pGFPuv per obtenir dos tipus de construccions:

- per una banda la seqüència codificant de QsHsp17.4-CI sense el codó STOP es va lligar al cDNA de la GFP obtenint-se una proteïna de fusió, o una "Heat Shock Protein" fluorescent, a la qual ens referirem com a **HSPF**.
- Per altra banda, la seqüència codificant de QsHsp17.4-CI amb el codó STOP es va clonar en el vector d'expressió pGFPuv obtenint-se una "Heat Shock Protein" que no emet fluorescència, que anomenarem **HSPN**. Aquesta proteïna servirà de control per determinar si la presència de GFP té algun efecte en el plegament o en la funcionalitat de QsHsp17.4-CI.

### 1.1.1.- Amplificació, clonació i lligació en el vector pGFPuv

#### Encebadors utilitzats

El gen de Qshsp17.4-CI va ser aïllat d'una llibreria de cDNA de cèl·lules del fel·lema de *Quercus suber* (Pla et al., 1998). El gen estava clonat inicialment en el vector pBluescript<sup>R</sup> SK +/-, de Stratagene. A partir d'aquest gen, mitjançant PCR i encebadors específics amb dianes per enzims de restricció, s'han obtingut els inserts de HSPF i HSPN. Els encebadors utilitzats redueixen al màxim la regió 5' no traduïda (5' UTR) i permeten mantenir la pauta de lectura correcta (Fig.1).

• **Construcció HSPF:** Es van utilitzar els encebadors **HS6 / HS5**.

Aquests encebadors permeten obtenir la seqüència del gen Qshsp17.4-CI sencera exceptuant l'últim triplet corresponent al codó STOP. Amb HS6 s'introdueix una diana *PstI* a la zona codificant de l'extrem N-terminal de la proteïna per tal de mantenir la pauta de lectura correcta. HS5 és complementari als últims triplets de l'extrem 3' de la seqüència codificant de Qshsp17.4-CI exceptuant el codó STOP (Fig. 1). Aquest encebador introdueix una diana *XmaI* col·locada específicament perquè el gen de la GFP entri en fase de lectura correcta i s'obtingui la proteïna de fusió Qshsp17.4-CI – GFP (Fig. 3).

• **Construcció HSPN:** Es van utilitzar els encebadors **HS6 / T7**.

Tal com s'ha descrit en el punt anterior, HS6 és complementari a la zona codificant de l'extrem N-terminal de la proteïna i introdueix una diana *PstI* per tal de mantenir la pauta de lectura correcta. Amb T7 s'amplifica el codó STOP i la regió 3' no codificant (Fig. 1). S'obté una proteïna no fusionada a GFP. La construcció resultant conté el gen de Qshsp17.4-CI amb la seqüència completa, més 11 aminoàcids del vector a l'extrem N-terminal localitzats entre la metionina inicial i la seqüència de Qshsp17.4-CI (Fig. 3).

5'  
 ...aggaattcggcactaaaactataactctaaagcttagtgcagatctctataaacaag  
 aagcaaatccaATGGCGCTCAGTCTTTTCGGTGGCCGAAGAAGCAACGTGTTTCGACCCCTT  
 TCTCACTGGACATCTGGGACCCATTTGAGGGCTTCAGTGCTGTAGCCAGCGTTCCCTCCCT  
 CGGCTCGTGAAACCACAGCTTTTGCTACAGCACGCATTGATTGGAAGGAAACCCAGAGG  
 CACATATTTTCAAGGCTGATCTTCCAGGTCTGAAGAAGGAGGAAGTGAAAGTTGAGGTTG  
 AGGATGGTAATGTGTTGCAAATAAGTGGGGAGAGGAGCAAAGAGCACGAGGAAAAGAATG  
 ATAAGTGGCACAGGGTTGAGAGGAGCTGTGGCAAGTTTATGAGGAGGTTTAGGTTGCCAG  
 AGAATGCGAAGGTGGATCAGGTGAAGGCTAATATGGAGAATGGAGTGCTCACTGTGATGG  
 TGCCTAAGGAAGAGCAGAAGAAGCCTGCGGTCAAGGCCATCGAGATCTCTGGCTAAattt  
 caagctgtttaattgtggtgctcttttgtgttctatctttgtcgtgttgaataaaaaaaaa  
 gaattgagtgccgatcagtatggcatgttttgtttgctgtgtgtgtaatgtaagaggct  
 cactgctgtatggttgacaatattgctgtgtaatggtttttgtataaataatgtgagt  
 aagtttctgtaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaactcagggggggcccggtacc<sup>2</sup>caatccgcc  
 ctatagtgagtcgtatta...<sup>3</sup>  
 T7

HS6: aactgcagtccaATGGCGCTCAGTCTT

HS5: GTTCCGGTAGCTCTAGAGACCGAGGGCCCTCTC

T7: gatatcactcagcataatgcgcgc

**Figura 1 :** Seqüència de nucleòtids del gen Qshsp17.4-CI amb els encebadors utilitzats.

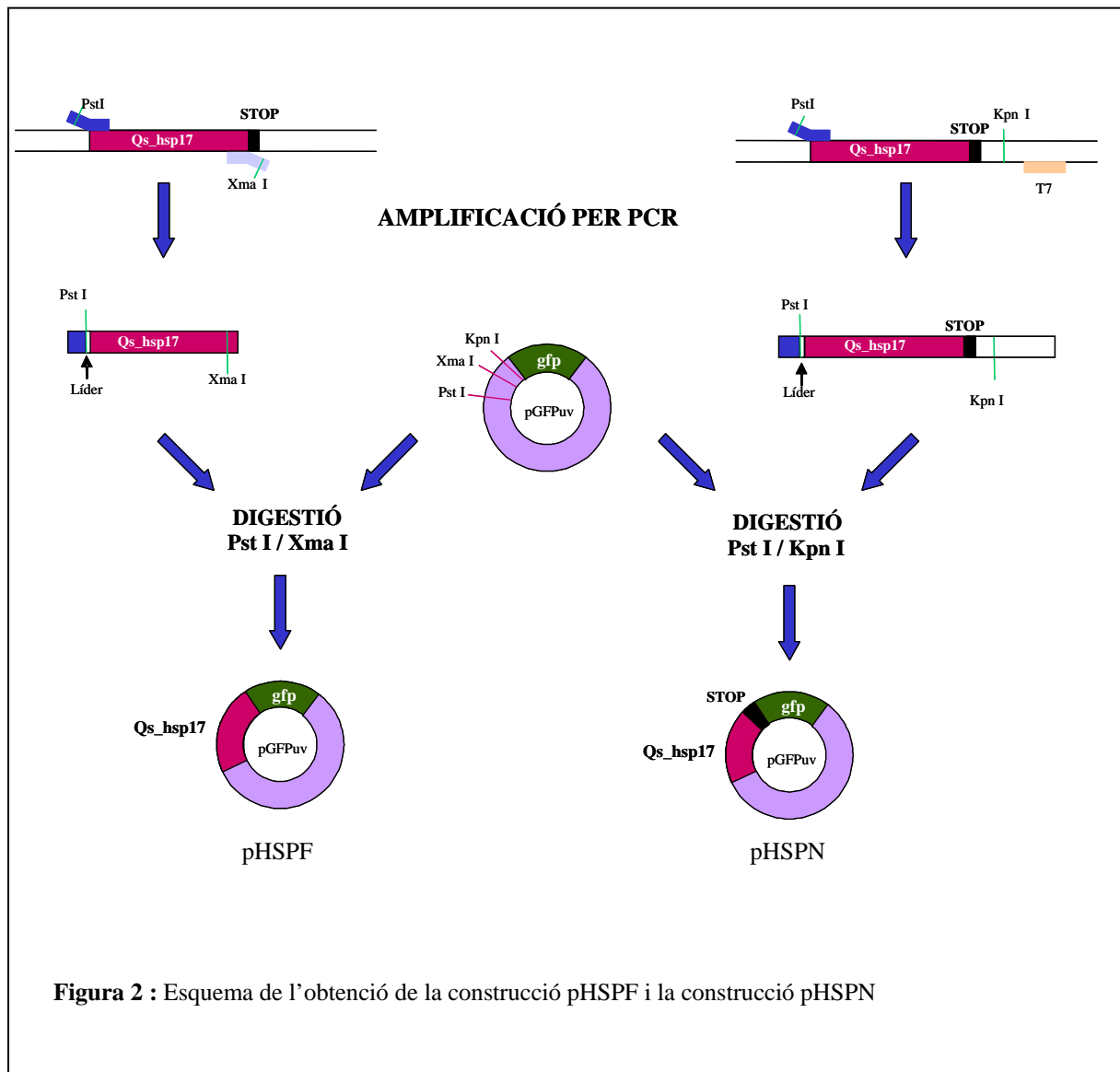
1 – Diana per l'enzim *PstI* ; 2 – Diana per l'enzim *XmaI* ; 3 – Diana per l'enzim *KpnI*.

Un cop realitzada l'amplificació per PCR es procedeix a digerir els inserts amb els enzims de restricció escollits (*PstI* i *XmaI* per HSPF / *PstI* i *KpnI* per HSPN).

### Lligació dels inserts

Després de tallar l'insert i el vector i purificar-los per gel d'agarosa, es va dur a terme la lligació (Fig. 2). Els enzims de restricció eren diferents i generaven extrems cohesius per tal d'afavorir i dirigir la lligació, evitant alhora la recircularització del vector. El

procés de lligació té per objecte l'obtenció de plàsmids circulars amb l'insert desitjat incorporat que permetin una fàcil transformació de les cèl·lules bacterianes.



**Figura 2 :** Esquema de l'obtenció de la construcció pHSFP i la construcció pHSPN

La *seqüència aminoacídica* de les dues proteïnes recombinants HSPF i HSPN es descriu en la figura 3a i 3b respectivament. Ambdues proteïnes recombinants, contenen, a més de la seqüència aminoacídica de QsHsp17.4-CI, deu aminoàcids derivats de la seqüència del vector, dos aminoàcids que corresponen a les dianes de restricció i un aminoàcid que correspon a la regió 5' transcrita no codificant (5' UTR).

## Seqüència aminoacídica de les proteïnes recombinants obtingudes

### a) HSPF: proteïna de fusió HSP17.4-GFP

**M****T****M****I****T****P****S****F****H****A****C****S****P****M****A****L****S****L****F****G****G****R****R****S****N****V****F****D****P****F****S****L****D****I****W****D****P****F****E****G****F****S****A****V****A****S****V****P****P****S****A****R****E****T****T****A****F****A****T****A****R****I****D****W****K****E****T****P****E****A**  
**H****I****F****K****A****D****L****P****G****L****K****K****E****E****V****K****V****E****V****E****D****G****N****V****L****Q****I****S****G****E****R****S****K****E****H****E****E****K****N****D****K****W****H****R****V****E****R****S****C****G****K****F****M****R****R****F****R****L****P****E****N****A****K****V****D****Q****V****K****A****N**  
**M****E****N****G****V****L****T****V****M****V****P****K****E****E****Q****K****P****A****V****K****A****I****E****I****S****G****S****R****V****P****V****E****K****M****S****K****G****M****S****K****G****E****E****L****F****T****G****V****V****P****I****L****V****E****L****D****G****D****V****N****G****H****K****F****S****V****S****G****E**  
**G****E****G****D****A****T****Y****G****K****L****T****L****K****F****I****C****T****T****G****K****L****P****V****P****W****T****L****V****T****T****F****S****Y****G****V****Q****C****F****S****R****Y****P****D****H****M****K****R****H****D****F****F****K****S****A****M****P****E****G****Y****V****Q****E****R****T****I****S****F****K****D**  
**D****G****N****Y****K****T****R****A****E****V****K****F****E****G****D****T****L****V****N****R****I****E****L****K****G****I****D****F****K****E****D****G****N****I****L****G****H****K****L****E****Y****N****Y****N****S****H****N****V****I****T****A****D****K****Q****K****N****G****I****K****A****N****F****K****I****R****H****N****I****E**  
**D****G****S****V****Q****L****A****D****H****Y****Q****Q****N****T****P****I****G****D****G****P****V****L****L****P****D****N****H****Y****L****S****T****Q****S****A****L****S****K****D****P****N****E****K****R****D****H****M****V****L****L****E****F****V****T****A****A****G****I****T****H****G****M****D****E****L****Y****K****Z**

### b) HSPN: proteïna HSP17.4

**M****T****M****I****T****P****S****F****H****A****C****S****P****M****A****L****S****L****F****G****G****R****R****S****N****V****F****D****P****F****S****L****D****I****W****D****P****F****E****G****F****S****A****V****A****S****V****P****P****S****A****R****E****T****T****A****F****A****T****A****R****I****D****W****K****E****T****P****E****A**  
**H****I****F****K****A****D****L****P****G****L****K****K****E****E****V****K****V****E****V****E****D****G****N****V****L****Q****I****S****G****E****R****S****K****E****H****E****E****K****N****D****K****W****H****R****V****E****R****S****C****G****K****F****M****R****R****F****R****L****P****E****N****A****K****V****D****Q****V****K****A****N**  
**M****E****N****G****V****L****T****V****M****V****P****K****E****E****Q****K****P****A****V****Z**

**Figura 3:** Seqüències aminoacídiques de les proteïnes HSPF i HSPN.

- Blau** – Seqüència derivada del plàsmid pGFPuv;
- Vermell** – Aminoàcids derivats de les dianes de restricció (*Pst*I / *Xma*I);
- Lila** – Seqüència del líder;
- Negre** – Seqüència de QsHsp17.4-CI;
- Verd** – Seqüència de la GFP;
- Subratllat** – Seqüència de l'encebador.

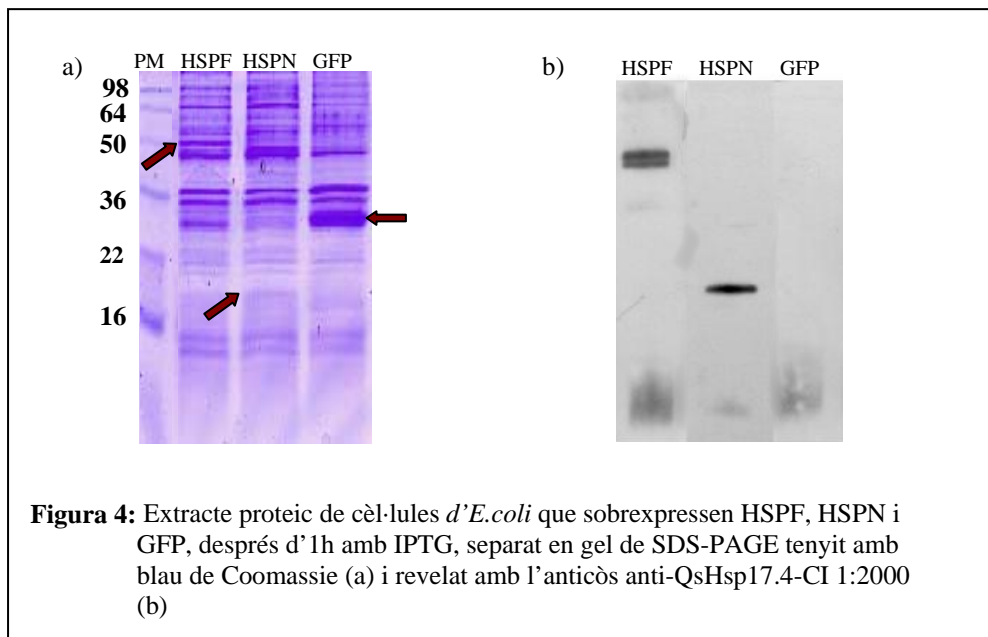
### 1.1.2.- Transformació i expressió de les proteïnes: HSPF, HSPN i GFP

Un cop clonats els inserts en el vector s'ha dut a terme la transformació de cèl·lules competents d'*E.coli*. L'objectiu de la transformació és introduir els plasmidis en les cèl·lules bacterianes perquè posteriorment aquestes expressin la proteïna recombinant. De les diferents soques d'*E.coli* assajades (DH5 $\alpha$ F', XL1Blue, BL21 i HB101) la que presenta majors nivells d'expressió de les proteïnes recombinants és BL21. Seo *et al.* (2003) van comparar la sobreexpressió de GFP en diferents soques d'*E.coli* i van determinar que les cèl·lules BL21 són les de millor expressió i millor creixement. Les cèl·lules d'*E.coli* BL21 han estat utilitzades en tots els estudis realitzats en aquest treball. L'expressió de la proteïna recombinant s'indueix amb IPTG.

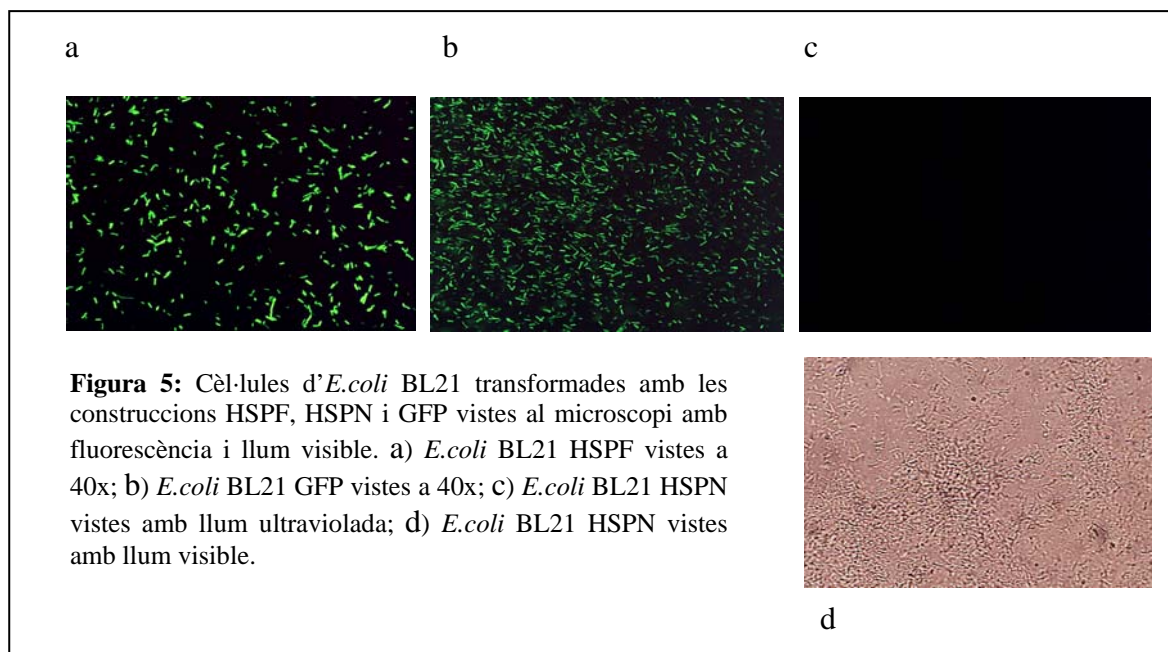
L'expressió de les proteïnes recombinants en les cèl·lules d'*E.coli* s'ha detectat utilitzant dues metodologies diferents: mitjançant gels SDS-PAGE tenyits amb blau de Coomassie o revelats per Western blot així com per microscopia de fluorescència.

- Gels de SDS-PAGE: S'han determinat els nivells d'expressió de proteïna recombinant, abans i després de la inducció amb IPTG, mitjançant gels de SDS-PAGE tenyits amb blau de Coomassie. Aquesta tècnica permet obtenir el patró proteic total de les cèl·lules i una estimació de la quantitat de proteïna heteròloga que es produeix. Com mostra la figura 4a, l'acumulació de HSPF i GFP és evident mentre que la banda de HSPN és molt tènue degut segurament a una baixa expressió i a la mala resolució de les bandes a aquesta alçada del gel. El promotor del vector pGFPuv no està completament reprimat en absència d'inductor, ja que en les cèl·lules no induïdes hi ha expressió basal, a més en les induïdes l'expressió no és molt elevada.

Per tal de confirmar l'expressió de les proteïnes recombinants HSPN i HSPF es van analitzar les mostres per Western blot amb un anticòs policlonal anti-QsHsp17.4-C1 (Fig.4b). Les mostres van ser diluïdes 50 vegades per eliminar així el soroll de fons. Tal i com s'observa en la figura 4b hi ha una clara expressió tant de HSPF com de HSPN mentre que no hi ha cap tipus de marcatge en el carril de GFP. Aquest és un mètode més sensible que la tinció amb blau de Coomassie tot i que no és tant quantitatiu. Aquest fet fa que detectem amb la mateixa intensitat la banda de HSPN que la de HSPF.



- Detecció de l'expressió in vivo: L'expressió de la proteïna de fusió HSPF i de GFP es pot detectar de forma ràpida i senzilla il·luminant els cultius amb llum ultraviolada (470nm). Els bacteris que expressen la GFP emeten fluorescència. Aquest procediment facilita la selecció dels positius després de la transformació i permet comprovar que la proteïna s'està expressant en el bacteri (Fig. 5).





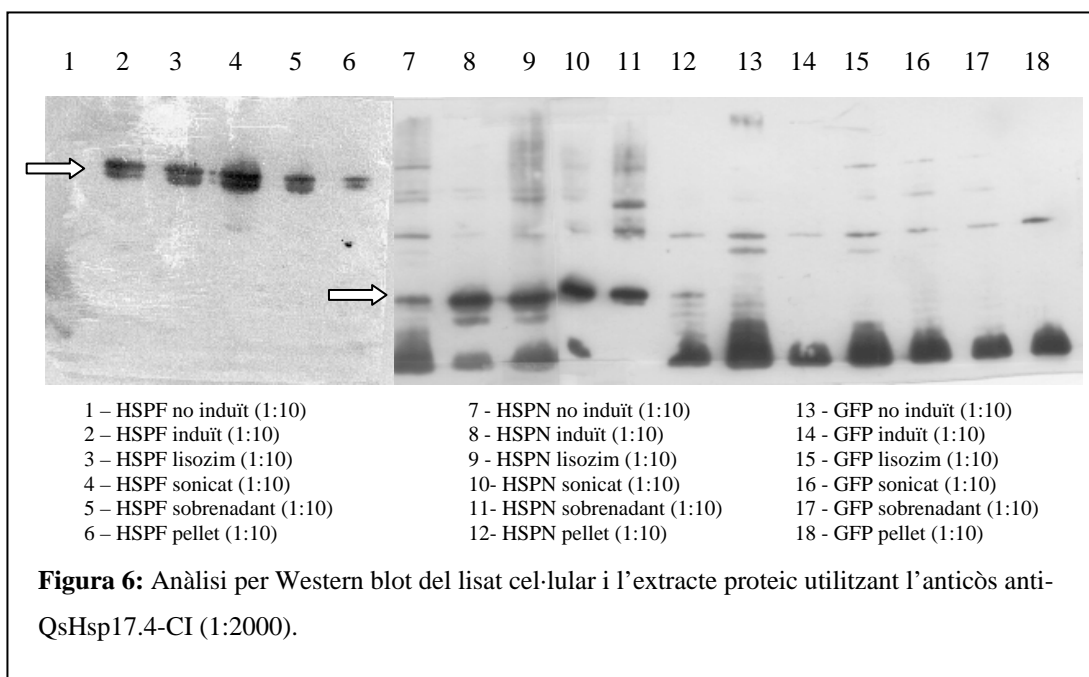
### 1.1.3 – Concentració de la proteïna de fusió per columna hidrofòbica

La GFP conté molts aminoàcids hidrofòbics. Aquesta característica permet la purificació de GFP mitjançant columnes hidrofòbiques d'alta afinitat (Hydrophobic Interaction Chromatography, HIC, BioRad). L'avantatge d'utilitzar les columnes hidrofòbiques per purificar la proteïna de fusió és que la fluorescència de la GFP permet fer un seguiment a temps real de tot el procés de purificació i al mateix temps purificar la proteïna de fusió.

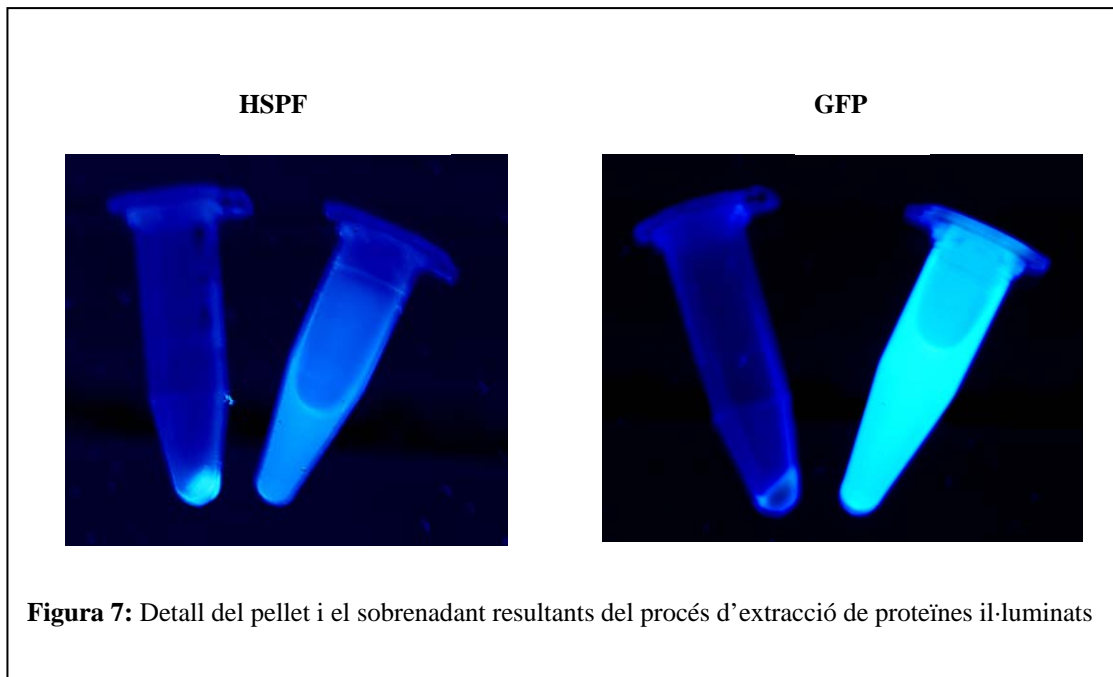
La purificació de la proteïna de fusió per columna hidrofòbica necessita de dues etapes: l'extracció de la proteïna i la separació per columna.

- Extracció proteica: En aquesta primera etapa es procedeix a la lisi cel·lular i a la posterior extracció de la fracció proteica. Per controlar l'estabilitat de les proteïnes heteròlogues al llarg del procés, s'analitzen diverses al·lòquies per Western blot. Després d'una centrifugació, al final del procés d'extracció, s'obté un sobrenadant que es passarà posteriorment per la columna.

Per l'extracció es van utilitzar cèl·lules que sobreexpressaven GFP, la proteïna de fusió HSPF i la proteïna lliure HSPN. Tal i com es pot observar en la figura 6, les proteïnes HSPF i HSPN es mantenen estables durant tot el procés d'extracció. Al final del procés d'extracció, es separa, per centrifugació, la fracció soluble de la fracció insoluble que conté les restes cel·lulars. En la figura 6 es pot observar com tant la proteïna de fusió com HSPF i la proteïna lliure HSPN estan presents en el sobrenadant i en el pellet.



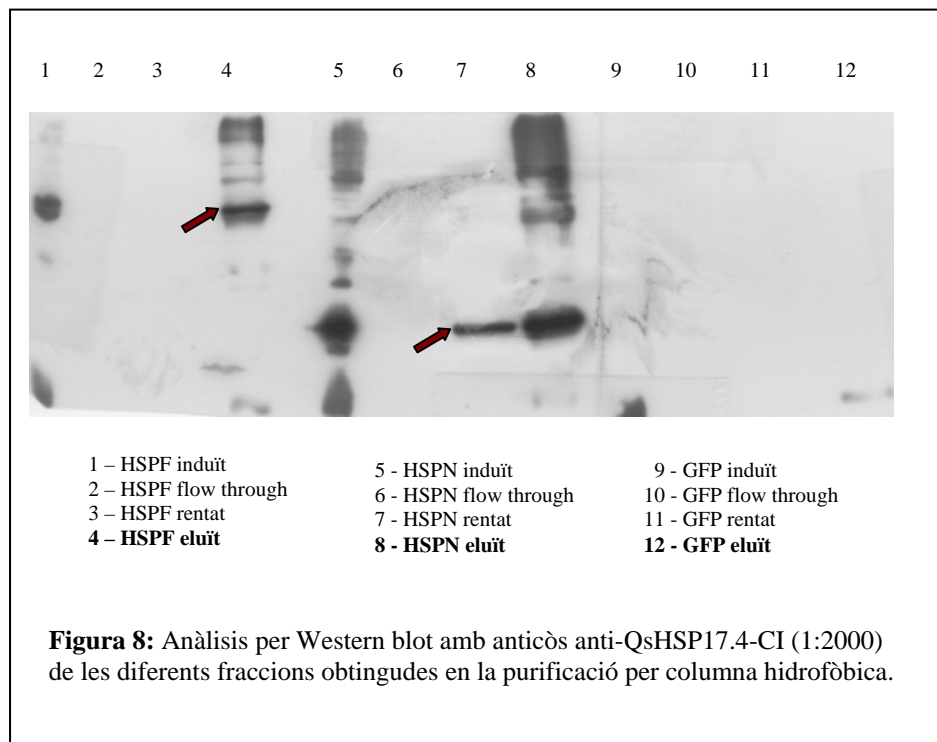
En la figura 7 es mostren detalls del pellet i el sobrenadant obtinguts al final del procés d'extracció de les cèl·lules que sobreexpressen GFP i HSPF. Les mostres que expressen la proteïna de fusió HSPF presenten fluorescència majoritàriament en el pellet, és a dir, la fracció insoluble que conté restes cel·lulars, membranes i cossos d'inclusió. En canvi, les cèl·lules que expressen GFP no fusionada, tota la proteïna extreta està en el sobrenadant, el pellet no és fluorescent.



**Figura 7:** Detall del pellet i el sobrenadant resultants del procés d'extracció de proteïnes il·luminats

- Separació per hidrofobicitat: Els extractes proteics de les cèl·lules que sobreexpressaven GFP, HSPF i HSPN van ser passats per la columna hidrofòbica i es van recollir tres fraccions. En una primera, anomenada "**flow through**", s'obtenen les proteïnes que tenen un grau d'hidrofobicitat més baix, en la segona fracció o **rentat** es recullen les proteïnes amb graus d'hidrofobicitat intermitjos. En aquesta fracció esperem trobar la majoria de les proteïnes extretes *d'E.coli*. Per últim, en la fracció que anomenem **eluit**, recollim les proteïnes més hidrofòbiques. En les cèl·lules *d'E.coli* hi ha varies proteïnes que són molt hidrofòbiques de manera que el pas per aquesta columna no és estrictament una purificació, ja que la fracció obtinguda no és pura, no obstant permet concentrar la proteïna.

La figura 8 mostra un Western blot de les diferents fraccions que s'obtenen de la columna. La proteïna de fusió HSPF queda retinguda totalment en la columna i només s'observa en l'eluit. En canvi, la proteïna HSPN es localitza parcialment en el rentat i parcialment en l'eluit de la columna.



El resultat de la separació per columna hidrofòbica posa en evidència el caràcter hidrofòbic de la proteïna HSPN. No esperàvem que aquesta proteïna quedés retinguda en la columna, esperàvem trobar-la en el rentat, juntament amb la majoria de les altres proteïnes del bacteri. No obstant, bona part d'aquesta proteïna queda unida a la columna obtenint una gran banda en l'eluït de la columna on trobem les proteïnes hidrofòbiques. Aquest fet, juntament amb la major presència de HSPF respecte GFP en el pellet corresponent a les restes cel·lulars apunten a una possible interacció d'aquesta proteïna amb les membranes cel·lulars.

### III.1.2.- Construccions en el vector d'expressió pET29a

El vector d'expressió pET29a consta d'un sistema de doble regulació de l'expressió de les proteïnes recombinants. Aquest sistema evita l'expressió basal en absència d'IPTG i activa de forma notable l'expressió quan afegim IPTG al cultiu cel·lular. Els gens insertats estan controlats pel promotor T7 al qual s'uneix la RNA polimerasa del bacteriòfag T7. Les cèl·lules BL21 usades per l'expressió de les proteïnes recombinants contenen, en el seu genoma, una còpia del gen de la RNA polimerasa de T7 sota control del promotor LacUV5 regulable per IPTG. L'IPTG actua sobre el promotor T7 i el promotor de la RNA polimerasa, pel que actua a dos nivells i permet una millor regulació de la transcripció així com també uns majors nivells d'expressió.

Aquest vector presenta, entre la metionina inicial i la regió dissenyada per la clonació ("Multiple Cloning Site") la seqüència d'un pèptid de 15 aminoàcids anomenat S-tag. Totes les proteïnes recombinants obtingudes portaran aquest pèptid a l'extrem N-terminal (Fig.9).

Met. S-Tag

**ATG**AAAGAAACCGCTGCTGCTAAATTCGAACGCCAGCACATGGACAGCCAGATCTGGGTACCCTGGTGC  
CACGCGGTTCCATGGCTGATATC**GGATCCGAATTC**GAGCTCCGTCGACAAGCAAGCGGCCGCA**CTCGAG**  
BamHI EcoRI XhoI

**Fig. 9** – Regió de clonació de pET29a. En vermell les dianes de restricció utilitzades per la clonació dels diferents inserts.

En aquest vector pET29a s'han realitzat quatre construccions, tres a partir de la seqüència de QsHsp17.4-CI (Hsp17, C105 i N61) i una quarta que s'ha clonat a partir de la seqüència de QsHsp10-CI (Hsp10).

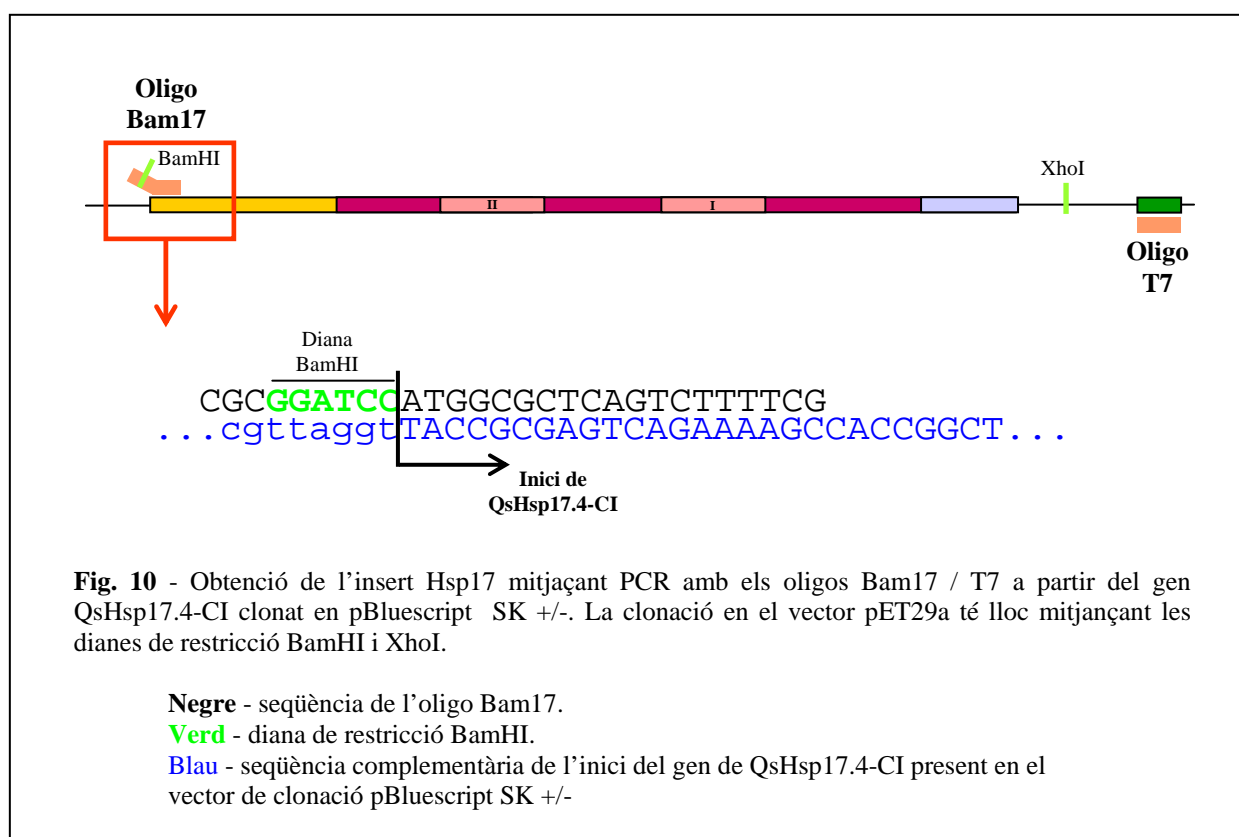
### 1.2.1.- Amplificació, clonació i lligació en el vector pET29a

#### Encebadors per cadascuna de les construccions (HSPF i HSPN).

Per dur a terme l'amplificació, s'han dissenyat uns encebadors específics per a cada construcció que introdueixen la diana de restricció adequada per generar extrems compatibles amb el vector, dirigir la clonació i mantenir la pauta de lectura correcta en cada cas.

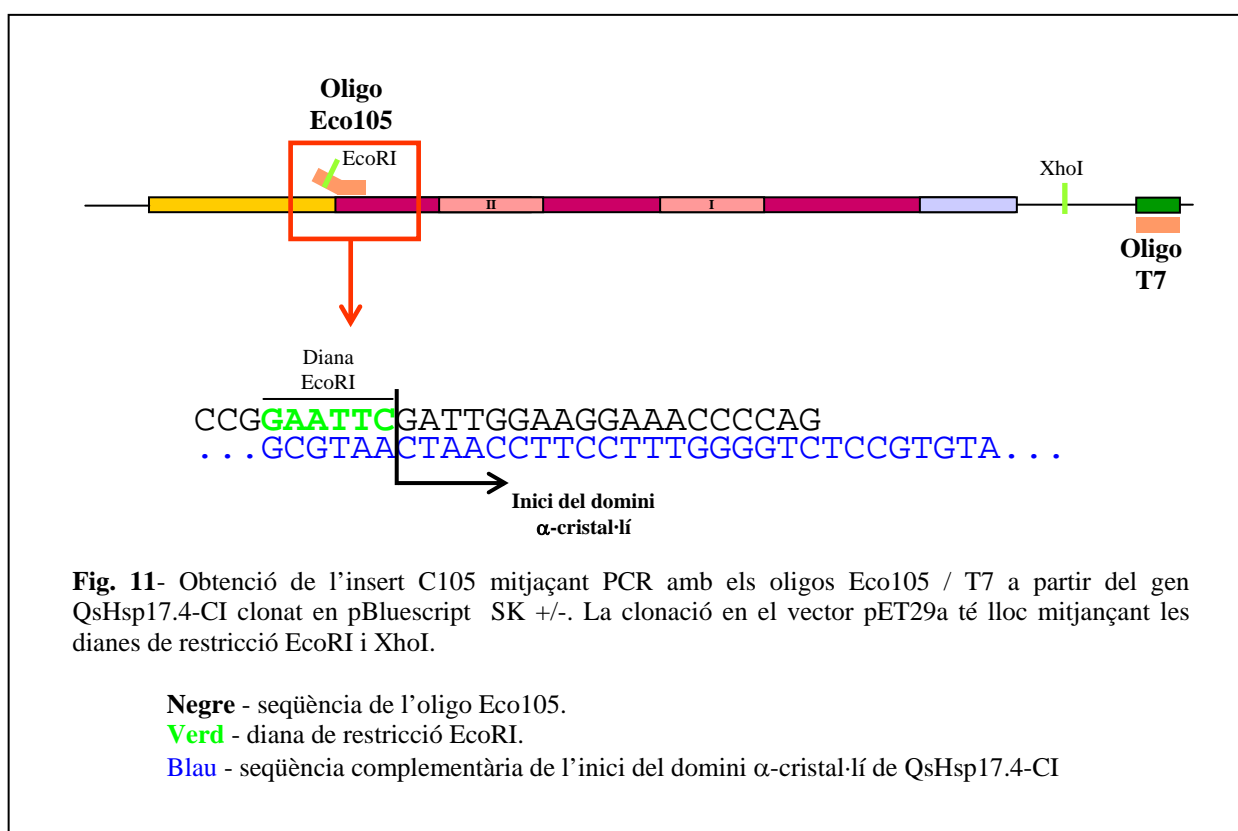
#### • **Construcció Hsp17:** Es van utilitzar els encebadors **Bam17/T7**.

En aquest cas es va clonar el gen que codifica per la proteïna QsHsp17.4-CI, del primer a l'últim nucleòtid. Es va utilitzar l'encebador Bam17, complementari a l'inici de la zona codificant de QsHsp17.4-CI i amb la diana de restricció BamHI a l'extrem 5' per mantenir la pauta de lectura correcta. L'encebador utilitzat a 3' és complementari a la seqüència del promotor T7 del vector pBluescript SK+/- que es troba més enllà del codó STOP de la proteïna. Entre aquest codó STOP i la seqüència T7 trobem una diana de restricció (XhoI) que va ser utilitzada, juntament amb la de BamHI, per la clonació de l'insert Hsp17 en el vector d'expressió pET29a (Fig. 10).



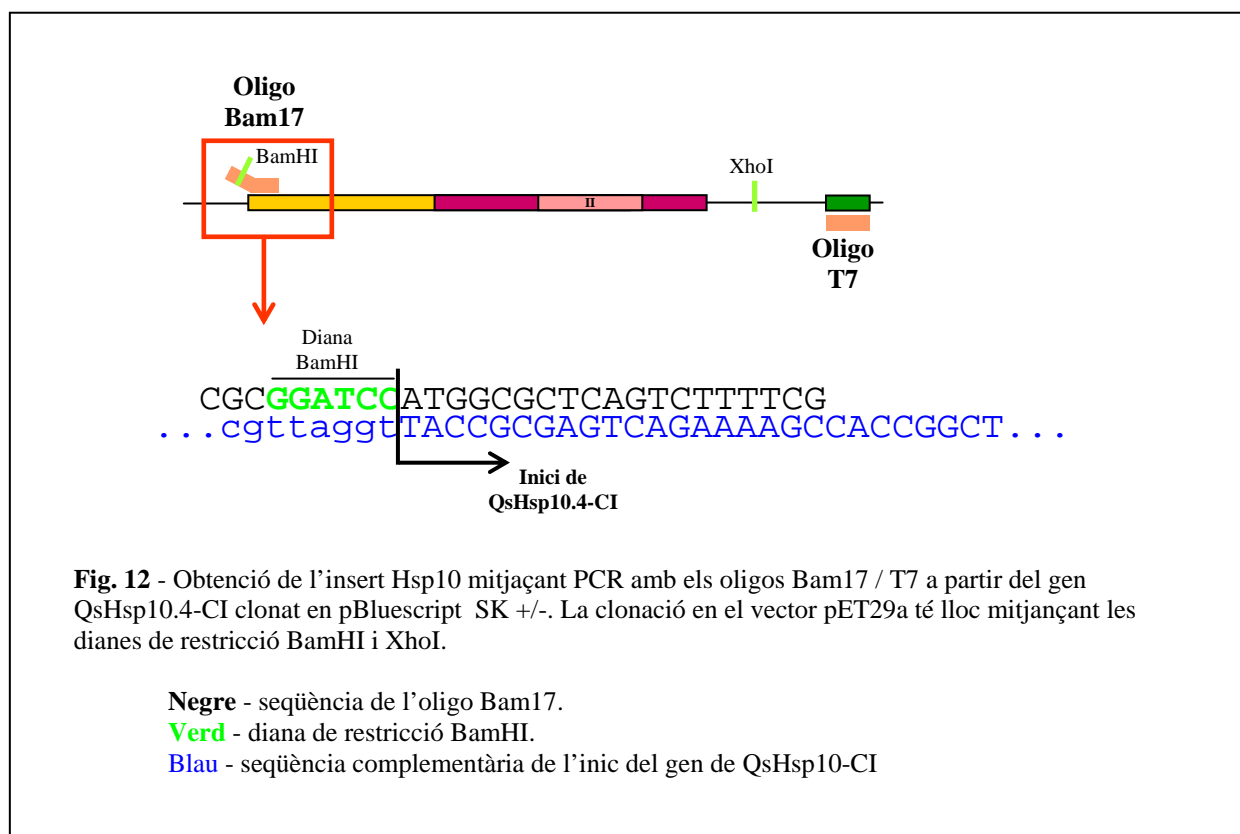
• **Construcció C105:** Es van utilitzar els encebadors **Eco105/T7**.

Per amplificar la seqüència de C105, que té l'extrem N-terminal delectat, es va utilitzar l'encebador Eco105, complementari a l'inici del domini  $\alpha$ -cristal·lí de QsHsp17.4-CI. Trobem, a l'extrem 5' de l'encebador, una diana de restricció EcoRI. Com en el cas anterior, a l'extrem 3' es va utilitzar un encebador complementari a la seqüència T7 i es van utilitzar les dianes de restricció EcoRI i XhoI per la clonació de l'insert C105 en el vector d'expressió pET29a (fig 11).



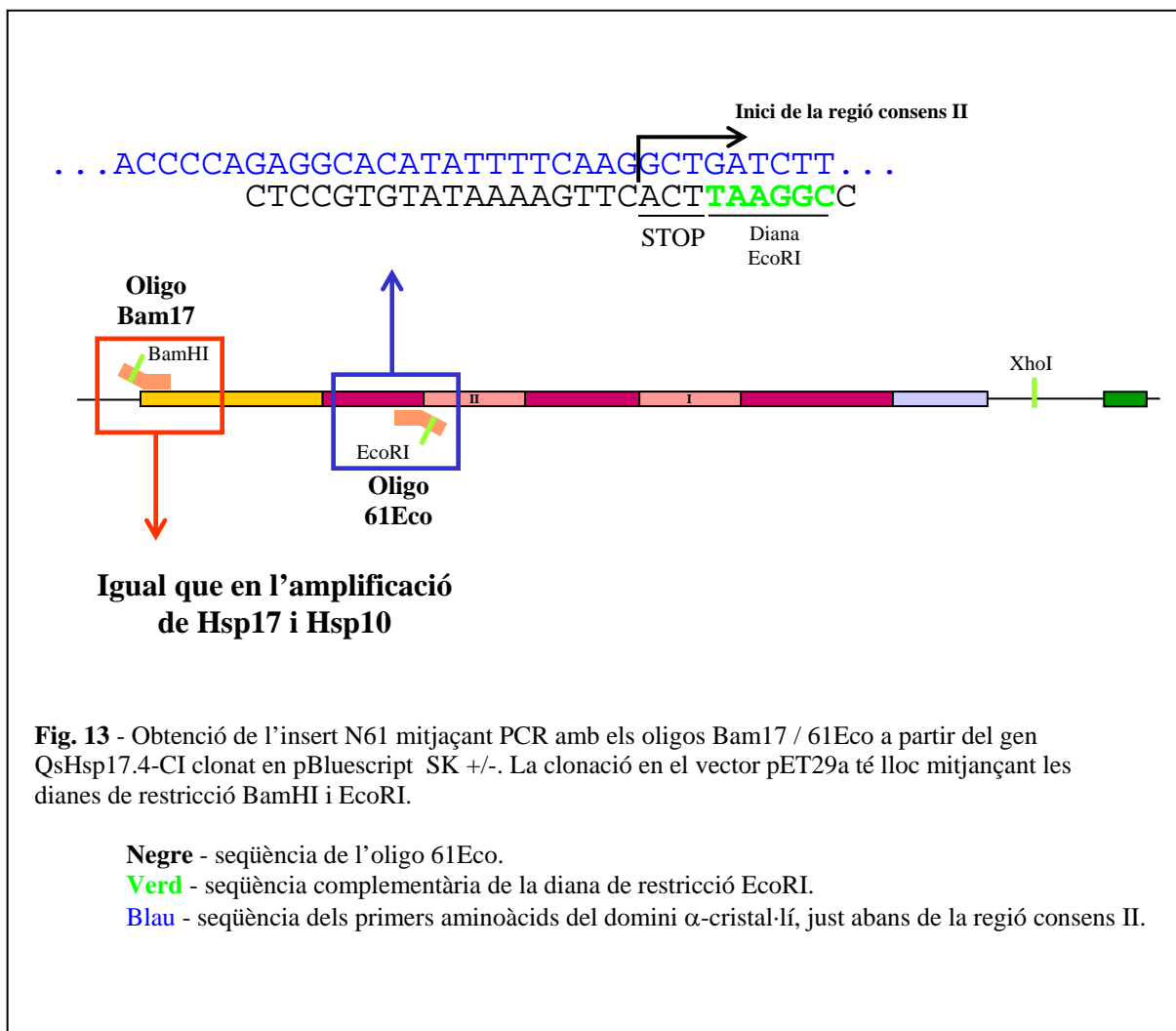
- **Construcció Hsp10:** Es van utilitzar els encebadors **Bam17/T7**.

L'amplificació de la seqüència del gen de QsHsp10-CI, localitzat inicialment en el vector de clonació pBluescript SK +/-, s'ha realitzat amb els mateixos encebadors utilitzats per l'amplificació de QsHsp17.4-CI. Donat que la seqüència de l'extrem 5' dels dos gens és idèntica s'ha pogut utilitzar el mateix encebador (Bam17). A l'extrem 3' s'ha utilitzat l'encebador T7. Per la clonació de l'insert Hsp10 en el vector d'expressió pET29a, s'han utilitzat les dianes de restricció BamHI i XhoI (Fig.12).



• **Construcció N61:** Es van utilitzar els encebadors **Bam17/61Eco**.

Per obtenir l'insert N61 s'ha clonat tota la regió N-terminal i els primers 12 aminoàcids del domini  $\alpha$ -cristal·lí de QsHsp17.4-CI. A l'extrem 5', al igual que amb les construccions Hsp17 i Hsp10, es va utilitzar l'encebador Bam17. A l'extrem 3' es va utilitzar l'encebador 61Eco, complementari a la seqüència anterior a la regió consens II del domini  $\alpha$ -cristal·lí de QsHsp17.4-CI. L'extrem 3' de l'encebador 61Eco porta incorporada la diana de restricció EcoRI a més d'un codó STOP per aturar la transcripció (Fig.13).





Cadascun dels inserts clonats en el vector d'expressió pET29a ha estat transformat en cèl·lules d'E.coli BL21. La seqüència aminoacídica de les diferents proteïnes obtingudes es mostra en la figura 14. Vegis que les proteïnes recombinants expressades pel bacteri tenen, a l'extrem N-terminal, un petit pèptid de 15 aminoàcids anomenat S-Tag.

### Seqüència aminoacídica de les proteïnes recombinants obtingudes

#### Hsp17:

MKETAAAKFERQHMDSPDLGTLVPRGSMADIGSMALSFLGGRRSNVDFPFSLDIWDPFEGFSAVA  
SVPPSARETTAFATARIDWKETPEAHIFKADLPGLKKEEVKVEVEDGNVLQISGERSKEHEEKND  
KWHRVERSCGKFMRRFRLPENAKVDQVKANMENGVLTVMPKKEEQKKPAVZ

#### C105:

MKETAAAKFERQHMDSPDLGTLVPRGSMADIGSEFDWKETPEAHIFKADLPGLKKEEVKVEVEDG  
NVLQISGERSKEHEEKNDKWHRVERSCGKFMRRFRLPENAKVDQVKANMENGVLTVMPKKEEQKK  
PAVZ

#### Hsp10:

MKETAAAKFERQHMDSPDLGTLVPRGSMADIGSMSLVPNFFNRRSNVDFPFSLDIWDPFEGFPPL  
SSHSNFPSETSSFAAAKLDWKETPNAHVADVPGQKKEEVKVEIEDRRVLQISGERSQDZ

#### N61:

MKETAAAKFERQHMDSPDLGTLVPRGSMADIGSMALSFLGGRRSNVDFPFSLDIWDPFEGFSAVA  
SVPPSARETTAFATARIDWKETPEAHIFKZ

**Fig. 14** - Seqüència aminoacídica de les proteïnes recombinants Hsp17, C105, Hsp10 i N61.

Blau - Seqüència del vector pET29a.

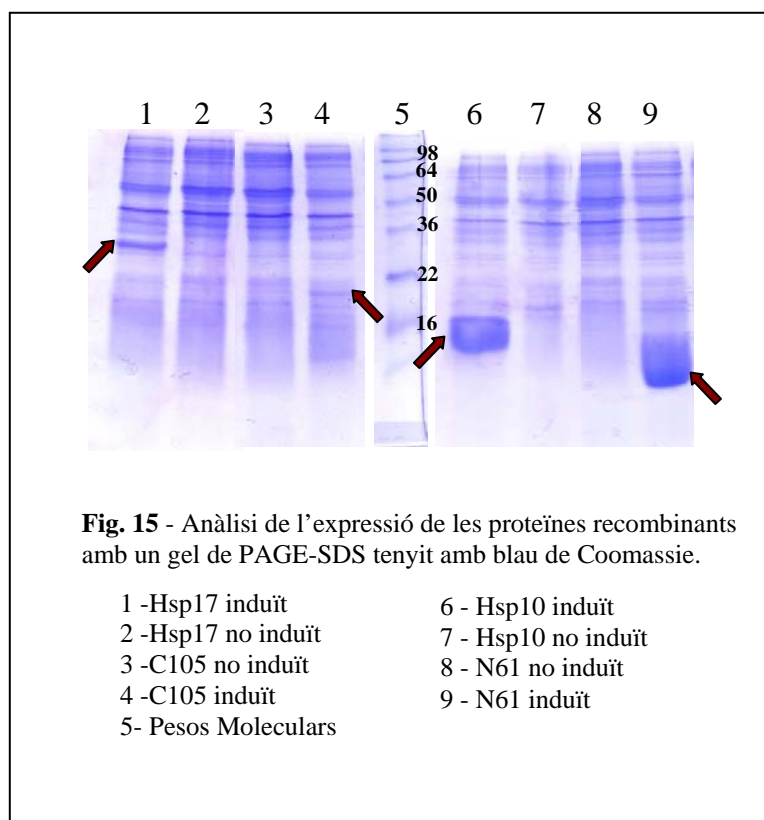
Vermell - Diances de restricció (BamHI / EcoRI).

Negre - Seqüència de Qs\_Hsp17.4-CI, Qs\_Hsp10.4-CI i dels mutants C105 i N61.

- Pèptid S-Tag.

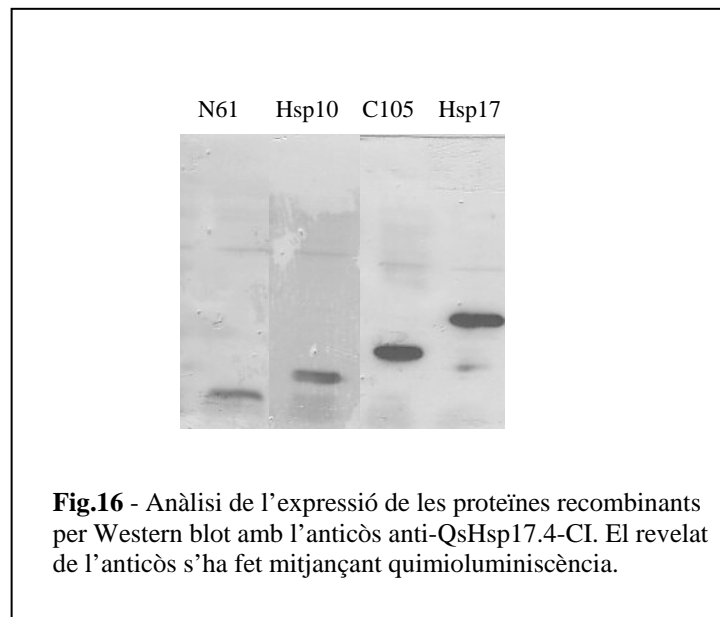
### 1.1.2.- Transformació i expressió de les proteïnes: HSP17, C105, Hsp10 i N61.

L'expressió de les proteïnes recombinants s'ha analitzat mitjançant un gel SDS-PAGE tenyit amb Blau de Coomassie. La utilització del vector d'expressió pET29a ens ha permès un millor control de l'expressió de les proteïnes recombinants així com uns nivells d'expressió prou elevats com per detectar la proteïna recombinant en gels tenyits amb blau de Coomassie (Fig. 15).



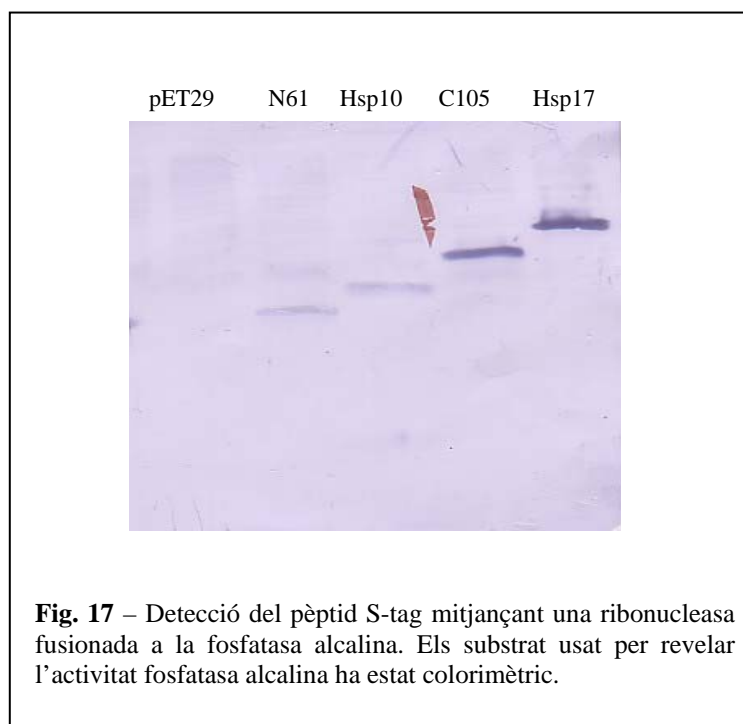
La figura 15 mostra que amb aquest vector s'obté un bon control de l'expressió amb expressió de les proteïnes recombinants només quan induïm les cèl·lules amb IPTG. El nivell d'expressió és força elevat per totes les mostres (com a mínim 1µg de proteïna en 25µl de cultiu). L'expressió de Hsp10 i N61 és molt elevada.

Per confirmar que les bandes que apareixen corresponen a les proteïnes recombinants es va analitzar l'expressió mitjançant Western blot amb l'anticòs policlonal anti-QsHsp17.4-CI (Fig.16).



Es detecten amb claredat les bandes corresponents a les diferents proteïnes recombinants (Hsp17, C105, Hsp10 i N61). No obstant, les bandes que anteriorment presentaven uns majors nivells d'expressió (Hsp10 i N61) són les que presenten ara una menor expressió. Per tal de determinar si aquestes diferències de marcatge són degudes a un menor nombre d'epítops en el cas de les proteïnes més petites es van revelar les proteïnes recombinants aprofitant el pèptid S-tag, present a l'extrem N-terminal. El pèptid S-tag reconeix, per un sistema basat en una interacció específica i d'alta afinitat, la proteïna S, una ribonucleasa a la que li falten precisament els 15 aminoàcids corresponents al pèptid S-tag. Aquesta ribonucleasa S està fusionada a una fosfatasa alcalina que en presència de NBT/BCIP forma un precipitat lila.

Tal com es pot veure en la figura 17, l'expressió de Hsp10 i N61 es manté més baixa que la de Hsp17 i C105, fet que descarta un efecte de l'anticòs.



## Resum i cloenda

El treball d'enginyeria molecular ha permès disposar de soques bacterianes amb capacitat per expressar Hsp17 i els mutants Hsp10, 105 i N61 quan són induïdes amb IPTG.

- Bacteris transformats amb pGFPuv:

- i) Cèl·lules **HSPN**: cèl·lules *d'E.coli* BL21 que expressen la proteïna recombinant de QsHsp17.4-CI.
- ii) Cèl·lules **HSPF**: cèl·lules *d'E.coli* BL21 que expressen la proteïna recombinant de QsHsp17.4-CI fusionada amb GFP.
- iii) Cèl·lules **GFP**: cèl·lules *d'E.coli* BL21 que expressen GFP. Ens serviran de control.

La utilització del vector pGFPuv permet seguir per fluorescència les cèl·lules que sobreexpressen la proteïna de fusió HSPF i detectar amb facilitat la seva expressió. La interacció amb GFP ens ha permès també concentrar la proteïna de fusió mitjançant una columna hidrofòbica. L'inconvenient, però, de la utilització del vector d'expressió GFP és que en les cèl·lules no induïdes amb IPTG hi ha expressió basal de la proteïna recombinant i, a més, quan s'afegeix IPTG els nivells d'expressió de les proteïnes recombinants són poc elevats i es detecten amb dificultats en un gel SDS-PAGE tenyit amb blau de Coomassie.

Els assajos de concentració de la proteïna de fusió per columna hidrofòbica han mostrat dues característiques destacables de HSPN: Per una banda s'ha observat com, després del procés d'extracció, la proteïna de fusió HSPF es localitza majoritàriament en el pellet, juntament amb les restes cel·lulars. Per altra banda, HSPN, que no està fusionada a GFP, queda retinuda en una columna hidrofòbica especialment dissenyada per retenir les proteïnes més hidrofòbiques, entre les quals trobaríem GFP.

- Bacteris transformats amb pET29:

- i) Cèl·lules **HSP17**: cèl·lules *d'E.coli* BL21 que expressen Qs\_Hsp17.4
- ii) Cèl·lules **C105**: cèl·lules *d'E.coli* BL21 que expressen el mutant C105
- iii) Cèl·lules **HSP10**: cèl·lules *d'E.coli* BL21 que expressen QHsp10-CI
- iii) Cèl·lules **N61**: cèl·lules *d'E.coli* BL21 que expressen el mutant N61

## Regió N-terminal

```

QsHsp17.4-CI      MALSLFGGRRSNVDFPFLDIWDPFEG--FSAVASVPPSA-RETTAFATARI 49
QsHsp10.4-CI     MALSLFGGRRSNVDFPFLDIWDPFEG--FPPLSSHNSFP-SETSSFAAKL 49
C105              -----
N61              MALSLFGGRRSNVDFPFLDIWDPFEG--FSAVASVPPSA-RETTAFATARI 49
OsHsp16.9-CI     MSLV-----RRSNVDFPFLDLW-DPFDVFRSVVPATSD--NDTAAFANARI 45
TaHsp16.9-CI     MSIV-----RRSNVDFPFA-DLWADPFDF-TFRSIVPAISGGGSETAAFANARM 46
PsHsp18.1-CI     MSLIPSFSGRRSNVDFPFLDVWDPLKDFPFSNSSPSASFP-RENPAFVSTRV 53
                  *:: * * .*****: * * . * :..:*. :::
                  [  $\alpha 1$  ] [  $\alpha 2$  ] [  $\alpha 3$  ] ==
    
```

## Domini $\alpha$ -crystal·lí

```

                                consensus II                                consensus I
QsHsp17.4-CI      DWKETPEAHIFKADLPGKKKEEVKVEVEDGNVLQISGERSKEHEEKNDKWHRVERSCGKFMRRFRLPENAKVDQVKANMENGVLTVMPK 90
QsHsp10.4-CI     DWKETPNAHVAF-ADVPGQKKEEVKVEIEDRRVLQISGERSQD----- 41
C105              DWKETPEAHIFKADLPGKKKEEVKVEVEDGNVLQISGERSKEHEEKNDKWHRVERSCGKFMRRFRLPENAKVDQVKANMENGVLTVMPK 90
N61              DWKETPEAHIFK----- 12
OsHsp16.9-CI     DWKETPESHVFKADLPGVKKKEEVKVEVEEGNVLVISGQRSKEKEDKNDKWHRVERSSGQFMRRFRLPENAKVDQVKAGLENGVLTVTPK 90
TaHsp16.9-CI     DWKETPEAHVFKADLPGVKKKEEVKVEVEDGNLVVSGERTKEKEDKNDKWHRVERSSGKFVRRFRLLEDKVEEVKAGLENGVLTVTPK 90
PsHsp18.1-CI     DWKETPEAHVFKADLPGKKKEEVKVEVEDRVLQISGERSVEKEDKNDKWHRVERSSGKFLRRFRLPENAKMDKVKASMEGVLTVTPK 90
                  *****:.*.*.*.* *****:.* ** :*:*: :*:***:*****.*:*:***** :*:*:*** :***** **
                   $\beta 2$   $\beta 3$   $\beta 4$   $\beta 5$   $\beta 6$   $\beta 7$   $\beta 8$   $\beta 9$ 
    
```

## Extensió C-terminal

```

QsHsp17.4-CI      EEQKKPAVKAIEISG- 15
QsHsp10.4-CI     -----
C105              EEQKKPAVKAIEISG- 15
N61              -----
OsHsp16.9-CI     AEVKKPEVKAIEISG- 15
TaHsp16.9-CI     AEVKKPEVKAIQISG- 15
PsHsp18.1-CI     EEIKKAEVKSIEISG- 15
                  * . **:*:***
                   $\beta 10$ 
    
```

L'avantatge més important que presenta la utilització d'aquest vector és el doble control de l'expressió de les proteïnes recombinants que evita fugites del promotor. No hi ha expressió de proteïnes recombinants en absència d'IPTG, en canvi, la seva expressió és elevada quan afegim IPTG al medi.

## **III.2. ESTUDIS DE FUNCIONALITAT *IN VIVO* EN *E.coli***

### **Introducció**

**III.2.1- Acció protectora de QsHsp17.4-CI enfront l'estrès tèrmic**

**III.2.2- Regions implicades en la resistència a l'estrès**

## Introducció

Els primers estudis de la funció protectora de les sHsps *in vivo* es van realitzar en models heteròlegs expressant proteïnes recombinants en procariotes. Un dels primers a utilitzar aquesta metodologia van ser Yeh *et al.* (1997) que van sobreexpressar la proteïna de fusió glutatió S-transferasa/Hsp16.9 d'arròs en cèl·lules d'*E.coli*. Aquests autors, després de sotmetre els cultius de cèl·lules transformades a un estrès tèrmic van constatar un augment en la supervivència de les cèl·lules que expressaven la proteïna de fusió. La mateixa metodologia va ser utilitzada per Soto *et al.* (1999) per estudiar la funcionalitat *in vivo* d'una sHsp de classe I de castanyer (CsHsp17.5). Van observar que la sobreexpressió de CsHsp17.5 en *E.coli* es correlaciona amb una major supervivència de les cèl·lules bacterianes enfront un estrès tèrmic i un estrès per fred. Joe *et al.* (2000) van sobreexpressar una sHsp de tabac (TLHS1) en cèl·lules d'*E.coli*. En aquest cas es tractava d'una sHsp de classe I fusionada a una cua de sis histidines. Després d'un estrès tèrmic d'elevada intensitat les cèl·lules que expressaven la proteïna recombinant H<sub>6</sub>TLHS1 sobreviuen tres mil vegades més que les cèl·lules que no expressaven la proteïna. Ramakrishna *et al.*(2003) van sobreexpressar el gen d'una sHsps de tomaquera (*vis1*), que s'expressa durant la maduració del fruit, en cèl·lules d'*E.coli* les quals van sotmetre a un estrès tèrmic. Van constatar que en condicions d'estrès tèrmic, la proteïna recombinant *vis1* tenia funció protectora enfront l'estrès tèrmic.

La capacitat de protecció de les sHsps també s'ha demostrat en sistemes vegetals. Forretier *et al.* (1997) i Löw *et al.* (2000) van expressar dues sHsps de tomaquera en protoplasts d'*Arabidopsis thaliana* que expressaven la luciferasa. La luciferasa és una proteïna que s'inactiva ràpidament al augmentar la temperatura. Aquests autors, però,



van observar que l'expressió de les sHsps permetia mantenir l'activitat lucifereasa en condicions d'estrès de calor. Per altra banda, Malik *et al.*(1999) van modificar l'expressió d'una sHsp de pastanaga (Dchsp17.7) tant per sobreexpressió com per inhibició de la transcripció del gen. Les plantes amb nivells alts de DcHsp17.7 presentaven una major termotolerància a l'estrès tèrmic en relació a les plantes que no expressen la proteïna. El mateix sistema es va fer servir per estudiar l'activitat d'AtHsp17.7 en *Arabidopsis thaliana*. Curiosament la sobreexpressió d'aquesta proteïna va demostrar un increment de la tolerància a l'estrès hídric i l'estrès salí però no a l'estrès tèrmic (Sun *et al.*, 2001).

En el nostre cas hem volgut estudiar el comportament de QsHsp17.4-CI davant l'estrès tèrmic. En treballs anteriors, el nostre laboratori havia determinat que QsHsp17.4-CI s'indueix en teixits vegetals com a resposta a l'estrès tèrmic així com l'estrès oxidatiu o l'estrès hídric. En aquest treball s'estudia la funció de QsHsp17.4-CI i més concretament en aquest capítol, la capacitat d'aquesta proteïna per protegir les cèl·lules d'*E.coli* de l'estrès tèrmic. Per altra banda, també en treballs anteriors del nostre laboratori s'ha demostrat que QsHsp10-CI, amb una similitud de seqüència molt elevada amb QsHsp17.4-CI però amb un codó STOP entre la regió consens II i la regió consens I del domini  $\alpha$ -cristal·lí, és capaç de protegir les cèl·lules d'*E.coli* tant de l'estrès oxidatiu com de l'estrès tèrmic. Per aquest motiu hem pensat que seria interessant determinar el paper de les diferents regions de les sHsps mitjançant l'estudi de la capacitat de protecció enfront l'estrès de diferents mutants de delecció construïts a partir de QsHsp17.4-CI.

Els resultats d'aquest capítol s'agrupen en dos apartats:

### **1. Acció protectora de QsHsp17.4-CI enfront l'estrès tèrmic.**

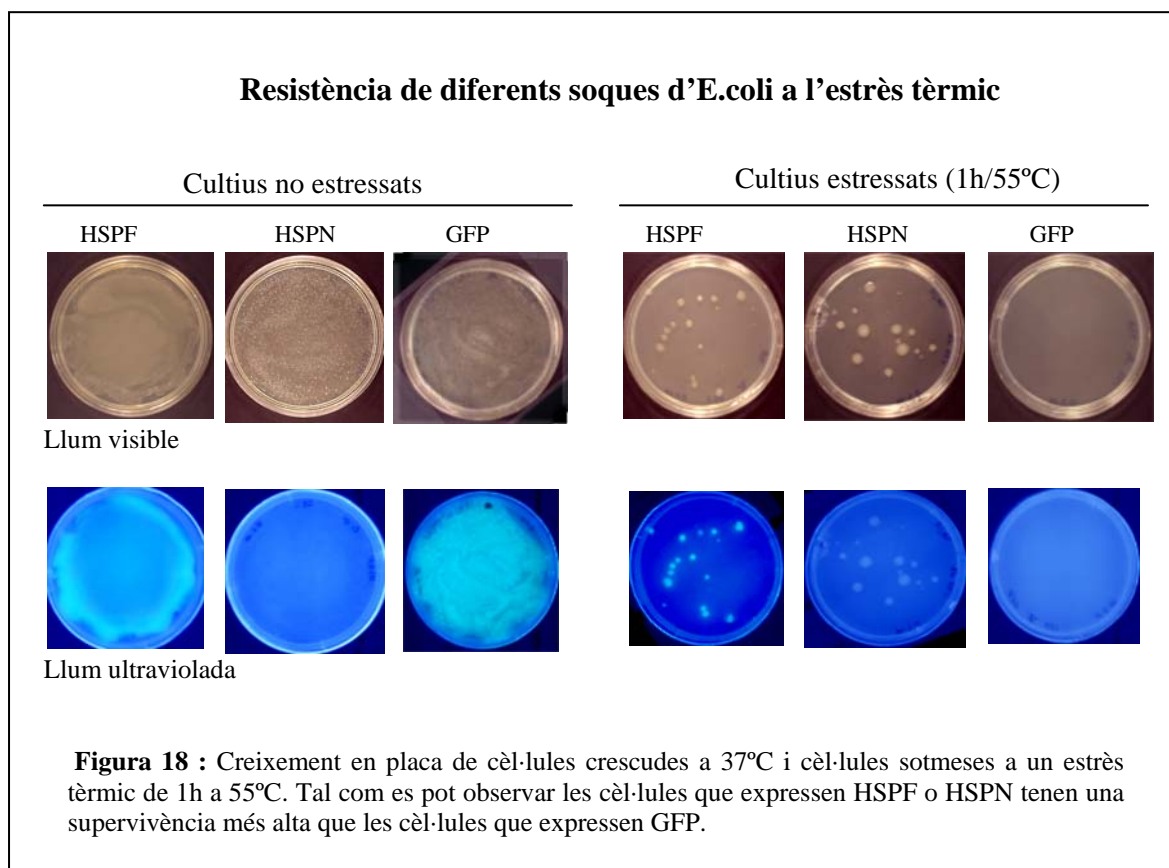
S'han realitzat assajos de protecció *in vivo* de QsHsp17.4-CI recombinant enfront l'estrès tèrmic en un sistema heteròleg. Per aquests assajos s'han utilitzat cèl·lules d'*E.coli* transformades amb el vector d'expressió pGFPuv que sobreexpressen HSPF, HSN i GFP.

### **2. Regions implicades en la resistència a l'estrès.**

Per altra banda, s'ha estudiat el paper de les diferents regions de la proteïna en aquesta funció de protecció. Per realitzar aquests estudis s'han utilitzat cèl·lules d'*E.coli* transformades amb el vector d'expressió pET29a que sobreexpressen Hsp17, Hsp10 i els dos mutants de delecció C105 i N61.

## 2.1- Acció protectora de QsHsp17.4-CI enfront de l'estrès tèrmic

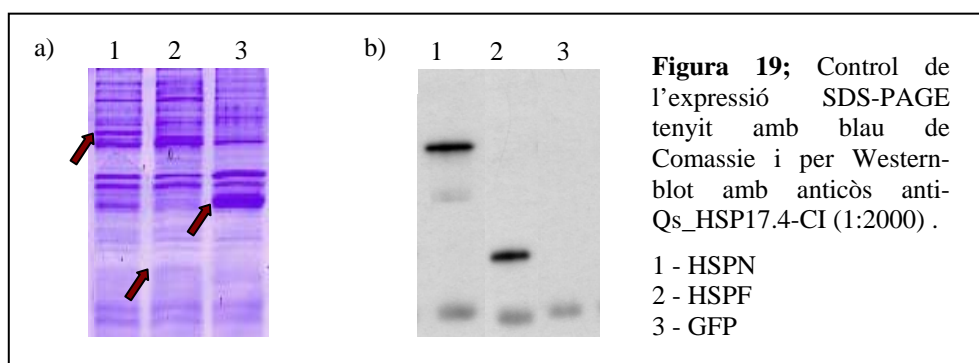
Per determinar si QsHsp17.4-CI presenta una funció protectora enfront un estrès tèrmic es van sotmetre a elevades temperatures cèl·lules d'*E.coli* transformades amb HSPF, HSPN i GFP. Els diferents cultius cel·lulars van ser sotmesos a un estrès tèrmic de 55°C durant 1h. Els cultius estressats es van sembrar en placa i es van incubar tota la nit a 37°C. La viabilitat dels tres tipus cel·lulars estudiats es va determinar contant el nombre d'unitats formadores de colònies en cada placa. Inicialment es van utilitzar diferents temps i temperatures fins determinar que l'estrès de 1h a 55°C era el més apropiat per el posterior recompte de colònies. (Fig.18).



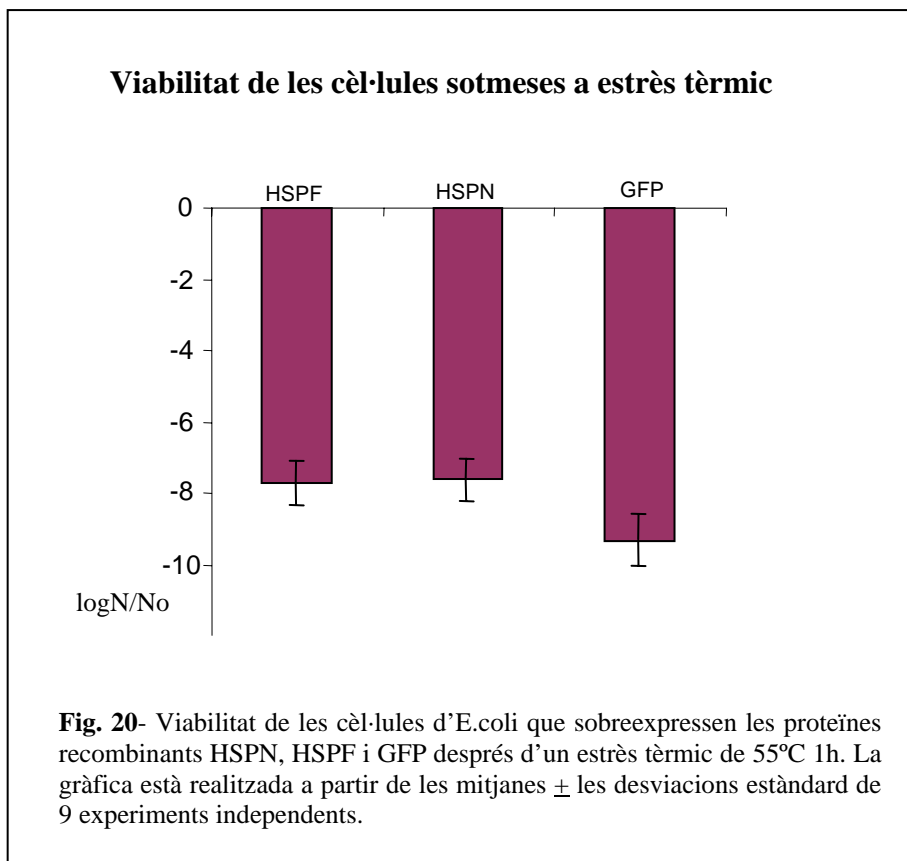
La figura 18 mostra com les cèl·lules que sobreexpressen HSPF, HSPN i GFP presenten el mateix creixement confluent quan són incubades a temperatura normal de creixement (37°C). En canvi, després de sotmetre les cèl·lules a un estrès tèrmic de 1h a 55°C les cèl·lules que sobreexpressen la QsHsp17.4-CI recombinant, ja sigui de forma lliure

(HSPN) o fusionada a GFP (HSPF) presenten una supervivència més elevada que les cèl·lules que expressen GFP. Aquest fet ens demostra que QsHsp17.4-CI és capaç de protegir les cèl·lules d'*E.coli* d'un estrès tèrmic. Tal com podem observar en la figura 20, no s'han detectat diferències en el nivell de supervivència entre HSPN i HSPF tot i que HSPN presenti uns nivells d'expressió més baixos que HSPF (Fig. 4a). És interessant observar que la proteïna de fusió manté la fluorescència de GFP tant en les cèl·lules no estressades com en les cèl·lules estressades després de recuperar-se tota la nit a 37°C. Es demostra doncs, que la fusió entre QsHsp17.4-CI i GFP no altera la funcionalitat de cap de les dues proteïnes.

Els nivells d'expressió de les proteïnes recombinants es van controlar en cada experiment mitjançant gels de SDS-PAGE tenyits amb blau de Coomassie i revelats per Western blot. En la figura 19 es mostren els gels corresponents a l'experiment de la figura 18.



Aquests resultats s'han confirmat amb 9 experiments independents representats en la figura 20.



Aquesta gràfica (Fig.20) representa la viabilitat de les cèl·lules d'E.coli després de sotmetre cadascuna de les tres soques estudiades a un estrès tèrmic. S'ha realitzat a partir del recompte en placa de les unitats formadores de colònia (cfu) abans i després de l'estrès. Les dades es presenten com la relació entre el nombre de colònies finals respecte les inicials. De cada relació hem fet el logaritme en base 10 per tal de poder representar les dades amb claredat.

$$\text{Log} \frac{\text{Nombre final}}{\text{Nombre inicial}}$$

Utilitzant el test t-student s'ha determinat que els resultats obtinguts per les cèl·lules que expressen la proteïna QsHsp17.4-CI recombinant, tant HSPN com HSPF, són significativament diferents als de les cèl·lules que expressen GFP ( $p < 0,01$ ). No hi ha diferències significatives entre les cèl·lules que expressen HSPN i les cèl·lules que expressen HSPF ( $p = 0,8323$ ).

Els resultats demostren que QsHsp17.4-CI, igual com QsHsp10-CI, confereix protecció enfront l'estrès tèrmic a les cèl·lules *d'E.coli*. Aquests resultats corroboren els obtinguts en diversos treballs en els quals la sobreexpressió d'una sHsp vegetal protegeix les cèl·lules *d'E.coli* de l'estrès tèrmic (Yeh *et al.*, 1997; Soto *et al.*, 1999; Joe *et al.*, 2000; Ramakrishna *et al.*, 2003).

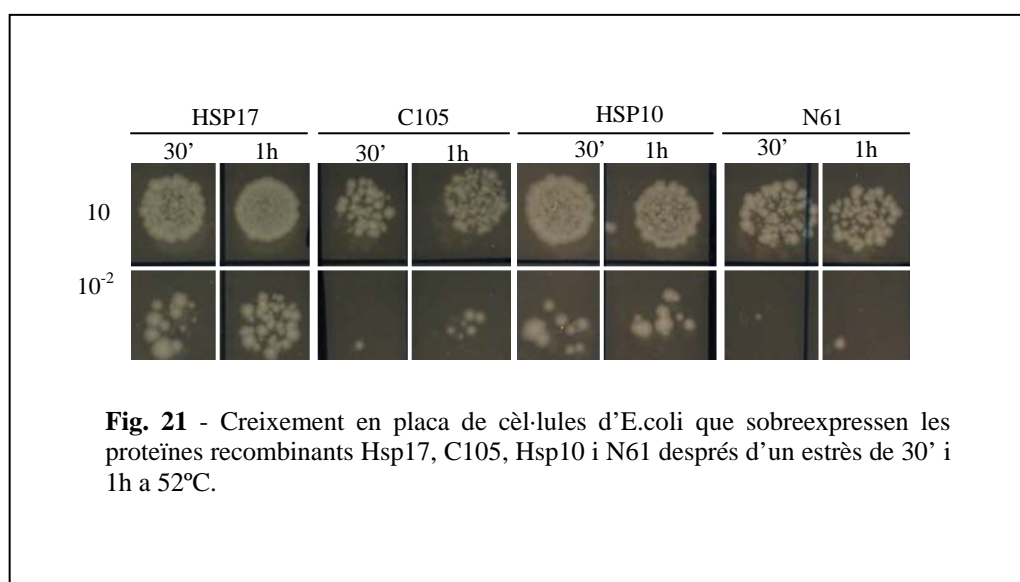
Per altra banda, el fet de no observar diferències significatives en la supervivència davant l'estrès entre les cèl·lules que sobreexpressen HSPN i les que sobreexpressen HSPF indica que la fusió amb GFP no interfereix amb la funcionalitat de QsHsp17.4-CI. La fusió no altera tampoc els nivells de fluorescència de GFP fet que confirma la possibilitat d'utilitzar GFP com a proteïna marcador per les sHsps.

## 2.2- Regions implicades en la resistència a l'estrès

El domini  $\alpha$ -cristal·lí és essencial per la funció de les sHsps però el paper de les regions consens I i II presents en aquest domini no és del tot conegut així com el paper de la regió N-terminal i C-terminal. El fet que QsHsp10-CI protegeixi les cèl·lules de l'estrès tèrmic demostra que la regió consens I i la regió C-terminal són prescindibles per aquesta funció. En aquest capítol es pretén determinar el paper de la regió N-terminal i la regió consens II en la termoprotecció de QsHsp17.4-CI.

Per determinar la importància de les regions de les sHsps-CI en la termoprotecció, s'han utilitzat cèl·lules d'*E.coli* transformades amb el vector d'expressió pET29a que sobreexpressen Hsp17, els mutants C105 i N61 i cèl·lules que sobreexpressen Hsp10. Després de fer créixer les cèl·lules i induir l'expressió de les proteïnes recombinants amb IPTG, s'ha aplicat un estrès tèrmic de 30 minuts i d'1 hora a 52°C. Seguidament s'ha sembrat una gota (5µl) de cultiu en una placa que s'ha incubat tota la nit a 37°C.

Els resultats (Fig.21) mostren que les cèl·lules que presenten un major creixement després de ser sotmeses a un estrès tèrmic són les cèl·lules que sobreexpressen Hsp17 i Hsp10 mentre que les cèl·lules que expressen els dos mutants presenten menors nivells de supervivència.



La figura 21 mostra que les cèl·lules que sobreexpressen Hsp10 presenten una major supervivència que les cèl·lules que sobreexpressen C105 i N61 però menor que les

cèl·lules com Hsp17. Aquest resultat confirma l'obtingut per Jofré *et al.* (2003) que ja van observar com la sobreexpressió d'aquesta proteïna conferia tolerància a l'estrès tèrmic i sobretot oxidatiu en cèl·lules d'*E.coli*. El fet que l'expressió de Hsp10 proporcioni termotolerància a les cèl·lules d'*E.coli* ens indica que la regió N-terminal i la regió consens II del domini  $\alpha$ -cristal·lí són suficients per mantenir la funcionalitat de les sHsps.

Els baixos nivells de supervivència que es detecten, en canvi, en les cèl·lules que expressen C105 i N61 evidencien que tant la regió N-terminal com la regió consens II del domini  $\alpha$ -cristal·lí són necessàries per mantenir la capacitat protectora de la proteïna. Aquests resultats corroboren els obtinguts per Yeh *et al.* (2002) que demostren que la delecció de 7 aminoàcids de la regió N-terminal així com la mutació puntual d'un dels aminoàcids 73 o 74 (dos Glu) de la regió consens II del domini  $\alpha$ -cristal·lí d'una sHsp de classe I d'arròs (OsHsp16.9) provoca la pèrdua de la capacitat de protecció de la proteïna.

Aquests resultats es podrien explicar pels dos factors més importants que intervenen a l'hora de determinar la funció d'una sHsp: Per una banda és important que la regió d'unió a les proteïnes desnaturalitzades es mantingui intacta. Hi ha estudis que demostren que la interacció entre les sHsps i el substrat es dona per interaccions hidrofòbiques (Lee *et al.*, 1997). Tècniques de cross-linking amb el marcador hidrofòbic Bis-ANS demostren que residus de la regió consens II són els responsables de la unió sHsp-substrat (Sharma *et al.*, 2000). Yeh *et al.* (2002) identifica dos aminoàcids de la regió consens II com els responsables de la unió de la proteïna amb el substrat.

Per altra banda, s'ha descrit en diversos treballs que per la funció xaperona de les sHsps és imprescindible la formació del complexe oligomèric (Kokke *et al.*, 2001; Yeh *et al.*, 2002; Studer *et al.*, 2002; Stromer *et al.*, 2004). Aquests treballs demostren que si no es forma l'oligòmer la proteïna no té funció protectora ni *in vitro* ni *in vivo*. La regió N-terminal és imprescindible per la formació del complexe oligomèric (Montfort *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 1998). Stromer *et al.* (2004) demostren que la delecció de la regió N-terminal d'una sHsp de llevat permet la formació de dímers però impedeix l'organització de l'oligòmer. La delecció de la regió N-terminal va associada també a una pèrdua de la funció xaperona *in vitro*. Kokke *et al.* (2001) observen que la regió N-terminal és vital per la formació de l'oligòmer, mentre que l'extensió C-terminal és prescindible i que la formació del complexe és necessària però no suficient per la funció xaperona de les sHsps. Studer *et al.* (2002) veuen com la delecció dels nou primers aminoàcids de la regió N-terminal provoca la pèrdua de la capacitat d'oligomerització i de la funció.

Segons aquests resultats, doncs, la regió N-terminal és imprescindible però no suficient per la funció termoprotectora de les sHsps, necessita, com a mínim de la presència de la regió consens II tot i que presenta una major eficàcia quan la proteïna està tota sencera.

### **III.3. POSSIBLE PAPER DE les sHsps-CI EN L'ESTABILITZACIÓ DE MEMBRANES**

#### **Introducció**

#### **III.3.1- Estudi de la localització subcel·lular**

#### **III.3.2- Estudis d'estabilització de membrana**

- A) Efectes de la proteïna recombinant sobre la composició lipídica.
- B) Efectes sobre l'estat de rigidesa de la membrana a 37°C.
- C) Cinètica de fluidització en resposta a un gradient tèrmic.



## Introducció

La possibilitat d'una acció protectora de les sHsps-CI a nivell de les membranes és molt important. Moltes cèl·lules vegetals, entre elles les cèl·lules del fel·lema, es caracteritzen per la gran abundància de tanins a l'interior de la vacuola. Pel seu caràcter fortament reductor, els tanins són altament tòxics per al citoplasma. Mentre el tonoplast es manté intacte els tanins romanen aïllats a l'interior de la vacuola, però si es produeix un trencament els tanins s'aboquen al citoplasma i es produeix la coagulació irreversible de les proteïnes i la mort de la cèl·lula. De fet, en l'alzina surera, es pot observar la importància de la integritat del tonoplast per la supervivència cel·lular. Després de la lleva del suro, les cèl·lules situades en la part més externa del floema secundari, que queden exposades a un fort estrès en el moment de la lleva, moren pel vessament dels tanins i el fel·lema adquireix ràpidament una tonalitat vermellova progressivament més fosca per l'oxidació dels tanins. En la zona més protegida situada uns 2 o 3 mm per sota en posició adaxial, s'observa com la vacuòla es fragmenta en petites vacuòles, mantenint la integritat de la membrana, i la cèl·lula es desdiferencia per formar el nou fel·lògen.

Si bé les sHsps no presenten pèptids senyal d'unió a membranes ni dominis transmembrana s'han descrit en la literatura diverses sHsps associades a membranes en diferents organismes: en bacteri, Jobin *et al.* (1997) van descriure una sHsp, Lo18, associada perifèricament a la membrana de *Leuconostoc*; en llevat, Sales *et al.* (2000) van detectar la presència en la part externa de la membrana de Hsp12. En planta, s'han descrit diverses sHsps associades sempre a les membranes del cloroplast (Glaczinski *et al.*, 1998; Downs *et al.*, 1999; Heckathron *et al.*, 2002); en mamífer, Cobb i Petrash

(2000) van observar com la  $\alpha$ -cristal·lina humana interacciona amb la membrana de les cèl·lules del cristal·lí en la formació de cataractes.

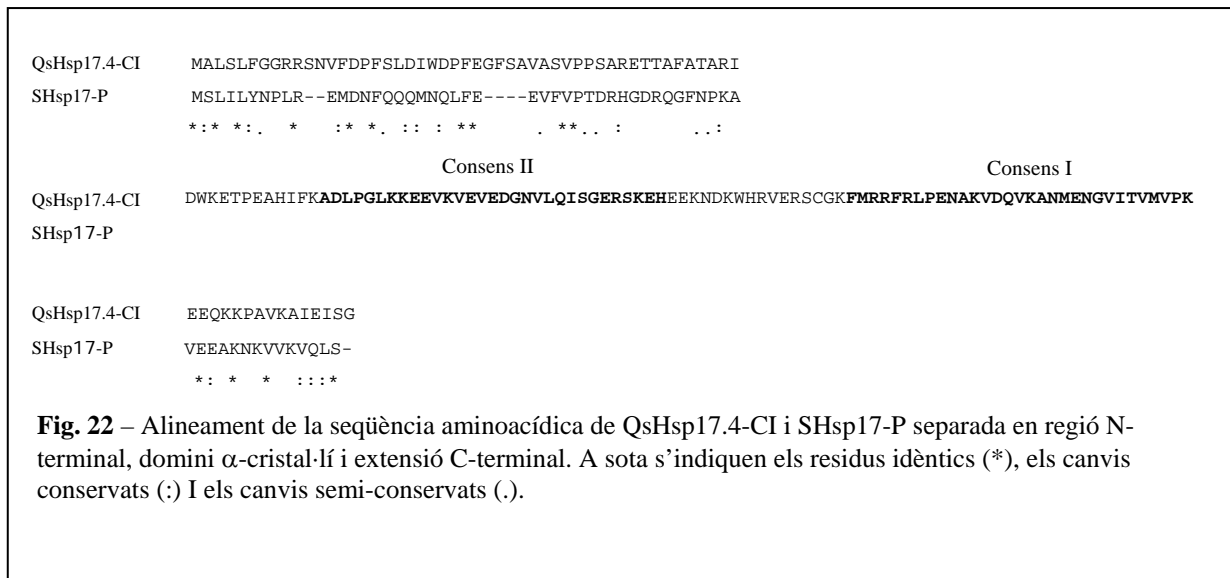
Algunes d'aquestes sHsps s'han relacionat amb la protecció de les membranes enfront de l'estrès. Així per exemple, Sales *et al.* (2000), en experiments realitzats *in vitro* a partir de liposomes sintètics, van observar que Hsp12 protegia els liposomes de la dessecació. Els mateixos autors, en experiments de creixement cel·lular en presència d'etanol van observar que la soca salvatge mantenia la integritat de la membrana a concentracions d'etanol més elevades que la soca amb el gen d'hsp12 deleccionat.

Heckathron *et al.* (2002) van localitzar una sHsp cloroplàstica (Hsp25) d'*Agrostis stolonifera* en les membranes del tilacoide. Estudis de funcionalitat del fotosistema II en condicions d'estrès tèrmic en plantes que expressen o no Hsp25 demostren que en les plantes que expressen la proteïna la funcionalitat del fotosistema II es manté a temperatures més elevades que en aquelles que no l'expressen.

Hórvath *et al.* (1998) van localitzar una sHsp cloroplàstica de *Synechocystis* (SHsp17-P) en la membrana tilacoidal i van demostrar que l'estat físic de la membrana controla la transcripció d'aquesta proteïna. En condicions d'estrès la membrana és més fluïda s'activa la síntesi de SHsp17-P. Quan la membrana d'aquestes cèl·lules es fluiditza artificialment amb benzil alcohol (BA) provocant una situació similar a un estrès tèrmic, també s'activa la síntesi de SHsp17-P. Més tard, aquest mateix grup va demostrar que SHsp17-P es capaç d'estabilitzar els lípids de membrana en condicions d'estrès (Török *et al.*, 2001). Experiments *in vitro* amb vesícules formades a partir de lípids de *Synechocystis* mostren com SHsp17-P té més afinitat per les vesícules amb una major fluïdesa estabilitzant-les i fent augmentar la rigidesa. Comparant la viabilitat cel·lular *in vivo* de soques salvatges i soques amb el gen Shsp17-P deleccionat aquests autors observen que SHsp17-P té dues funcions: per una banda interacciona amb proteïnes del citoplasma parcialment desnaturalitzades i per l'altra estabilitza els lípids de membrana dels tilacoides.

A partir de les consideracions anteriors es planteja la possibilitat que l'acció sobre les membranes formi part de la funció protectora general de les sHsps. Així, a més d'actuar de xaperona molecular evitant la formació d'agregats irreversibles, podrien actuar a nivell de membrana a través de l'acció sobre diferents mecanismes d'estabilització. Esdevé important provar aquesta hipòtesi amb altres sHsps especialment les que no es localitzen en organel·ls com les sHsps-CI i CII de planta. En el nostre cas, el fet de tenir QsHsp17.4-CI i els seus mutants clonats en un sistema d'expressió heteròloga en *E. coli* i disposar de la metodologia experimental per l'aplicació de l'estrès ofereix oportunitat per investigar la possible acció protectora de membranes amb experiments *in vivo*. La sHsp més ben estudiada en relació a la protecció de membranes és SHsp17-P. Aquesta sHsp presenta una homologia de seqüència del 52,6% amb QsHsp17.4-CI. Les

diferències principals es troben en la regió N-terminal amb una similitud del 41,8% mentre que la regió més semblant és el domini  $\alpha$ -cristal·lí amb un 60,0% (Fig.22). La comparació entre ambdues serà important, sobretot pel que fa al domini N-terminal.



Aquest capítol es divideix en dues parts:

- a) Una primera part en la que s'estudia la localització subcel·lular de les proteïnes Hsp17, Hsp10 i dels mutants de delecció C105 i N61 mitjançant tècniques de fraccionament i immunolocalització per Western blot.
- b) Una segona part en la que s'analitzen diversos paràmetres per determinar una possible acció estabilitzadora de QsHsp17-CI i dels mutants. De manera concreta s'analitza per una banda (i) el grau de saturació dels lípids en condicions normals i d'estrès tèrmic mitjançant tècniques cromatogràfiques; i, per l'altra, (ii) la rigidesa de la membrana a temperatura normal de creixement i (iii) la cinètica de fluidització enfront d'un gradient tèrmic.

### 3.1 – Estudi de la localització subcel·lular

Durant la purificació de la proteïna recombinant QsHsp17.4-GFP es van fer dues observacions interessants. Per una banda, en el procés d'extracció, mentre GFP es manté en la fracció soluble, la proteïna recombinant QsHsp17.4-GFP (anomenada HSPF) precipita amb la fracció membranosa. Per altra banda, de manera no esperada, vam constatar que QsHsp17.4-CI recombinant, no fusionada amb GFP (anomenada HSPN) quedava parcialment retinguda en la columna hidrofòbica (vegis pàgina 48). Aquests dos fets suggereixen una certa afinitat de QsHsp17.4-CI per les estructures hidrofòbiques i per tant una possible capacitat d'interacció amb membranes.

Per determinar si una proteïna és capaç d'unir-se a la membrana una metodologia habitual és analitzar la seva localització durant el fraccionament subcel·lular. Aquest mètode, consistent en homogenització de les cèl·lules, fraccionament de l'homogenat per centrifugació i reconeixement per Western blot, ha estat utilitzat per diversos autors per determinar la localització de diverses sHsps (Jobin *et al.*, 1997; Hórvath *et al.*, 1998; Heckathorn *et al.*, 2002). Per altra banda, una metodologia alternativa consisteix en la immunolocalització al microscopi electrònic. Les tècniques immunocitoquímiques s'han aplicat a l'estudi de les sHsps de soja (Jinn *et al.*, 1997) i de CsHsp17.5 de castanyer (Soto *et al.*, 1999) sense que en cap dels dos casos es detectés localització de les proteïnes a la membrana. Però, com assenyalen Wehmeyer i Vierling (2000), l'elevat soroll de fons del marcatge podria dificultar l'observació

En el nostre cas aplicarem la tècnica del fraccionament cel·lular i Western blot per estudiar la localització subcel·lular de les proteïnes recombinants Hsp17, Hsp10 i els mutants de delecció C105 i N61 en les cèl·lules d'*E.coli*.

#### Metodologia

Per estudiar la localització de les diferents proteïnes es van utilitzar cultius de cèl·lules d'*E.coli* transformades en fase exponencial de creixement en els quals s'induïa l'expressió de la proteïna recombinant amb IPTG. Després d'una inducció d'1h es procedia a la lisi i el fraccionament cel·lular per centrifugació. El procediment consta de tres etapes de centrifugació i separació del sobrenadant. En una primera centrifugació a 6000 rpm s'eliminen les restes cel·lulars, seguidament es realitza una segona centrifugació a 14.000 rpm (10min) amb la qual s'obté un precipitat amb els cossos d'inclusió i un segon sobrenadant. Aquest segon sobrenadant és centrifugat a 100.000 g obtenint-se un precipitat (pellet) que conté la fracció membranosa i un tercer

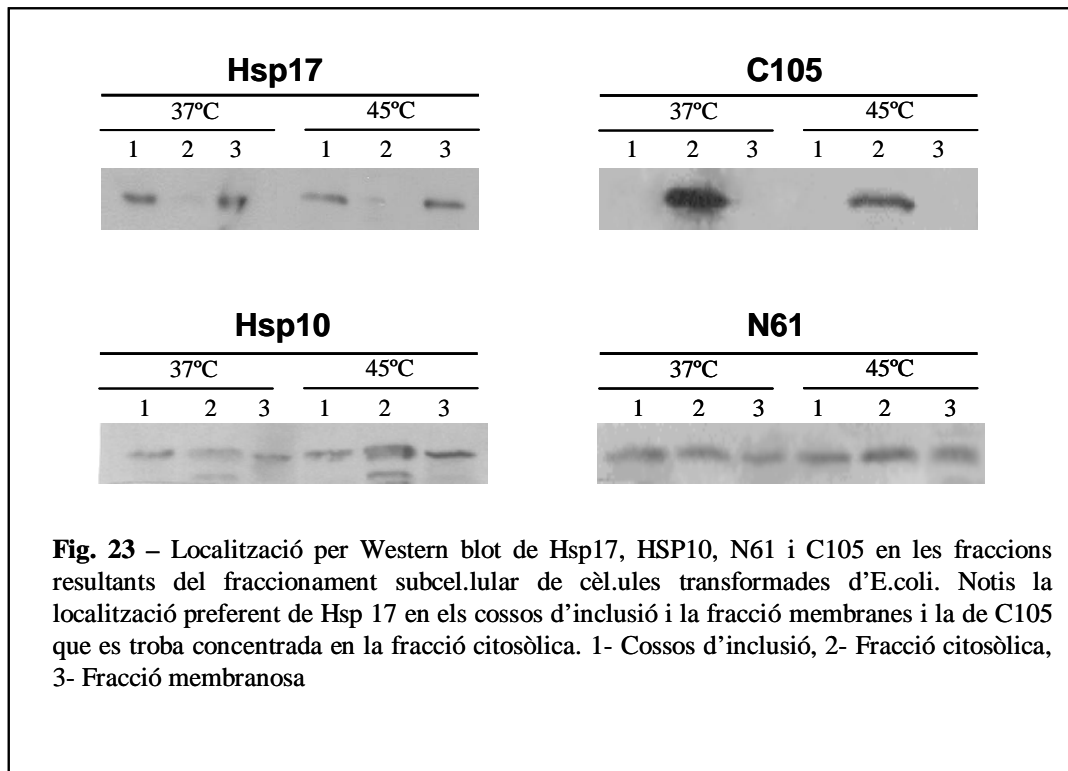
sobrenadant amb la fracció soluble o citoplasmàtica (vegis material i mètodes, pàgina 57). Les diferents fraccions van ser separades per gel SDS-PAGE i la proteïna recombinant detectada amb anticossos policlonals de conill anti-QsHsp17.4-CI. La composició proteica de les diferents fraccions també va ser comparada amb tincions de blau de Coomassie. Aquests experiments es van fer a temperatura normal (37°C) i en condicions d'estrès tèrmic (45°C / 30min).

## Resultats

Els gels corresponents a les diferents fraccions cel·lulars obtingudes a partir de lisats de cèl·lules d'*E.coli* i revelats amb l'anticòs anti-QsHsp17.4-CI, mostren una diferent localització de les proteïnes a nivell subcel·lular. La comparació dels gels tenyits amb blau de Coomassie evidencia que el patró proteic de les tres fraccions és diferent.

A la fig.23 es mostren els gels revelats per Western blot de les fraccions obtingudes a partir de cèl·lules que sobreexpressen Hsp17, Hsp10, C105 i N61 crescudes a 37°C i a 45°C. Tal com es pot veure, l'estrès tèrmic no altera la localització de cap de les proteïnes estudiades. L'experiment s'ha realitzat sis vegades i s'han obtingut sempre idèntics resultats.

- **Hsp17:** Colocalitza amb els cossos d'inclusió i amb la fracció membranosa mentre que es troba absent del citoplasma.
- **Hsp10:** La quimera Hsp10, que consta de la regió N terminal i la regió consens II, colocalitza per igual amb els cossos d'inclusió, la fracció membranosa i el citoplasma.
- **N61:** El mutant N61, format per la regió N-terminal i els primers 12 aminoàcids del domini  $\alpha$ -cristal·lí que no inclouen la regió consens II, colocalitza per igual en les tres fraccions estudiades.
- **C105:** El mutant C105, amb el domini  $\alpha$ -cristal·lí i l'extensió C-terminal sencers, es localitza exclusivament en el citoplasma, essent la seva presència nul·la tant en els cossos d'inclusió com en la membrana.



Els resultats obtinguts en relació a Hsp17 mostren que aquesta proteïna colocalitza amb la fracció membranosa i amb els cossos d'inclusió però no es detecta en el citoplasma. La presència de la proteïna en els cossos d'inclusió s'explicaria perquè és un fet comú que quan es sobreexpressa una proteïna heteròloga en grans quantitats aquesta derivi parcial o totalment cap a cossos d'inclusió (Vuillard i Freeman, 2000). La localització amb la fracció membranosa podria interpretar-se com que Hsp17 té afinitat per les membranes i per tant, és compatible amb la hipòtesi d'una acció en la protecció de les membranes en condicions fisiològiques.

Quan s'estudien els resultats del fraccionament subcel·lular de Hsp10 i N61, s'observa que ambdues proteïnes colocalitzen en les tres fraccions (cossos d'inclusió, fracció membranosa i fracció citosòlica) sense una localització preferent. La presència de Hsp10, N61 en els cossos d'inclusió s'explicaria com en el cas anterior per la seva síntesi massiva després de la inducció per IPTG. El fet que part de Hsp10 i N61, apareguin també en la fracció soluble podria explicar-se per la dificultat per part d'aquestes dues proteïnes per formar complexos oligomèrics. Mentre que Hsp17 és una sHsp sencera amb capacitat per formar oligòmers, Hsp10 i sobretot N61 poden tenir

dificultats per dimeritzar. Molt probable que N61 només estigui present en forma de monòmer.

De manera molt interessant, C105 que difereix de la proteïna salvatge Hsp17 i dels mutants Hsp10 i N61 per l'absència de la regió N-terminal, es localitza exclusivament al citoplasma. La regió N terminal sembla doncs imprescindible per la colocalització amb la fracció membranosa. La regió N terminal és molt important per la capacitat d'interaccions amfipàtiques amb lípids de membrana. Török *et al.* (2001) van detectar que SHsp17-P interacciona de forma específica amb lípids de la membrana carregats negativament. El mateix tipus d'interacció amb lípids de càrrega negativa es dona entre una proteïna relacionada amb l'estrès abiòtic (deshidrina) i les membranes (Koag *et al.* 2003).

L'elevada hidrofobicitat del domini  $\alpha$ -cristal·lí ha estat considerada en alguns casos la responsable de la interacció de les sHsps amb les membranes (Cobb & Petrash, 2000). El fet que C105 no colocalitzi amb la fracció membranosa demostra, però, que la interacció amb les membranes no es dona mitjançant el domini  $\alpha$ -cristal·lí. Els nostres resultats demostren que la possible interacció amb les membranes seria deguda a la regió N-terminal de les sHsps.

## 3.2 – Estudis d'estabilització de membrana

Les membranes, d'acord amb el model fluid de Singer i Nicholson, són estructures fluïdes en les que les molècules lipídiques i proteïques tenen una lliure difusió lateral. Els canvis ambientals provoquen canvis en l'estat físico-químic de les membranes que alteren el grau de fluïdesa: la disminució de la temperatura es correlaciona amb una disminució de la fluïdesa i l'augment de temperatura amb una major fluïdesa. Aquests canvis modifiquen propietats que són essencials pel funcionament de la cèl·lula com la permeabilitat i la resistència mecànica de la membrana. Per mantenir l'homeostasi, les cèl·lules han de mantenir uns rangs de fluïdesa de la membrana compatibles amb un bon funcionament.

Les membranes són estructures molt sensibles que s'han de protegir ràpidament durant l'estrès. Davant els canvis ambientals es desenvolupen mesures protectores com variacions en la composició lipídica o la síntesi de proteïnes de membrana. La variació en la proporció d'àcids grassos saturats i insaturats presents en la membrana és un mecanisme utilitzat per tots els organismes que permet contrarrestar els efectes que petits canvis ambientals provoquen sobre la fluïdesa de les membranes (Vigh *et al.*, 1998). La composició lipídica de la membrana no és constant, la cèl·lula és capaç d'alterar la proporció d'enllaços saturats/insaturats a la membrana en funció de les necessitats de la cèl·lula. Per compensar un augment de rigidesa degut a un estrès per fred les cèl·lules incrementen els àcids grassos insaturats i disminueixen els saturats guanyant una major fluïdesa a temperatures més baixes i viceversa, un estrès de calor provoca un increment en la proporció d'àcids grassos saturats disminuint la fluïdesa de la membrana.

El sistema més ben estudiat és el de *Synechocystis*. S'han realitzat estudis en resposta a l'estrès tèrmic tant per baixes temperatures com per temperatures elevades (Vigh *et al.* 1998).

- Quan es produeix un estrès per fred, s'observa un increment en la proporció d'àcids grassos insaturats. Es va relacionar aquest increment amb l'expressió de l'enzim desaturasa (DesA) que incorpora dobles enllaços als àcids grassos. L'augment de rigidesa que la membrana experimenta durant un estrès per fred és el responsable d'activar l'expressió de la DesA per disminuir aquesta rigidesa. El fet que l'augment de rigidesa de la membrana mitjançant la hidrogenació dels àcids grassos saturats indueixi l'expressió de DesA, indica que l'estat físico-químic de la membrana és capaç de regular la resposta a l'estrès.



· Quan augmenta la temperatura, un mecanisme molt utilitzat per la cèl·lula per mantenir l'estabilitat de la membrana és l'activació de l'expressió de diverses proteïnes de membrana. Un estudi realitzat per Hórvath *et al.* (1998) amb *Synechocystis* revela que l'estat fisico-químic de la membrana també controla l'expressió de SHsp17-P. En condicions d'estrès tèrmic, la fluidesa de la membrana augmenta i s'activa la síntesi de SHsp17-P que s'uneix a les membranes tilacoidals. En aquest estudi, Horváth *et al.* (1998) demostren que la fluidització artificial de la membrana afegint benzilalcohol al medi també activa l'expressió de Hsp17.

En estudis posteriors, Török *et al.* (2001) demostren que SHsp17-P estabilitza els lípids de membrana en condicions d'estrès mitjançant experiments *in vivo* i *in vitro*. En estudis de viabilitat *in vivo* realitzats amb una soca salvatge que expressa la proteïna SHsp17-P i una soca amb el gen Shsp17-P deleccionat constaten que, en condicions d'estrès tèrmic, SHsp17-P té dues funcions, per una banda s'uneix a proteïnes citoplasmàtiques parcialment desnaturalitzades i per altra banda protegeix les membranes tilacoidals evitant-ne l'hiperfluidització. Estudis *in vitro* utilitzant vessícules sintetitzades a partir de lípids de *Synechocystis* mostren que SHsp17-P té més afinitat per les vesícules més fluides amb les quals interacciona fent augmentar la rigidesa.

Estudis similars realitzats per Tsvetkova *et al.* (2002) amb membranes model sintetitzades *in vitro* a partir de lípids sintètics i lípids de cianobacteri demostren que la SHsp17-P i l' $\alpha$ -cristal·lina interaccionen i estabilitzen membranes aniòniques. En la interacció de les sHsps amb els lípids intervien els caps polars dels àcids grassos. La interacció provoca canvis en la zona polar dels lípids així com en la cua de carbonis hidrofòbica degut al caràcter amfipàtic de les sHsps.

En els capítols precedents d'aquesta memòria es descriuen estudis de funcionalitat *in vivo* que demostren que l'expressió heteròloga de QsHsp17.4-CI en cèl·lules d'*E.coli* protegeix aquestes cèl·lules de l'estrès tèrmic. Per determinar si en aquesta acció protectora intervé algun mecanisme de protecció de membranes s'han realitzat els següents estudis:

- A) S'ha analitzat la composició lipídica de les membranes de les cèl·lules d'*E.coli* que sobreexpressen la proteïna Hsp17 sencera i els mutants.
- B) S'ha determinat l'estat de rigidesa de membrana en cèl·lules crescudes a condicions normals de creixement.
- C) S'han estudiat els canvis de fluidesa provocats en les membranes de les cèl·lules com a conseqüència d'un estrès tèrmic.

## A) EFECTES DE L'EXPRESSION DE LA PROTEÏNA RECOMBINANT SOBRE LA COMPOSICIÓ LIPÍDICA

En aquest apartat s'utilitzen cèl·lules d'*E. coli* transformades amb el vector pET29a sense insert que serviran de referència i les cèl·lules que sobreexpressen Hsp17, Hsp10, N61 i C105 crescudes en condicions normals (37°C) i en condicions d'estrès (48°C). Es pretén determinar si l'expressió d'Hsp17 o dels pèptid derivats modifiquen la composició de la membrana en comparació amb les cèl·lules transformades amb pET29.

S'analitza, per cada soca, la proporció dels següents àcids grassos en les membranes:

Àcids grassos estudiats	Nom comú
14:0	À. Miristic
14:1	À. Miristoleic
16:0	À. Palmític
16:1	À. Palmitoleic
17 cyclo	-
18:0	À. Estearic
18:1	À. Oleic
19 cyclo	-

La metodologia utilitzada per l'estudi de la composició lipídica és complexa, requereix una instrumentació adequada per la separació i identificació els diferents àcids grassos. Es parteix de cultius cel·lulars induïts i es realitza una extracció lipídica seguint el mètode estàndard de Bligh i Dyer (1959) (Punt 8.1 de Mètodes i protocols). Aquesta extracció permet separar tots els lípids cel·lulars en una fracció anomenada **lípid total**. Dins aquesta fracció s'inclouen tant els lípids de membrana, la gran majoria, com els lípids que no formen part d'aquesta (triglicèrids i lípids lliures). Analitzem la fracció de lípid total a tres nivells diferents:

- Per cromatografia de gasos, que permet determinar la proporció dels diferents àcids grassos de la fracció de lípid total. Aquesta anàlisi, relativament ràpida i senzilla, dona una primera aproximació sobre possibles diferències de composició entre les soques.
- Per cromatografia en capa fina, que permet separar els triglicèrids i lípids lliures dels lípids de membrana. Dintre els lípids de membrana, la cromatografia en capa fina, permet separar també els tres grups principals:

les fosfatidiletanolamines (PE), que representen aproximadament un 75% dels lípids de membrana, els fosfatidilglicerol (PG), que representen un 15% i les cardiolipines (CI) que representen un 5% del total de lípids de membrana. Aquest és un anàlisi més complex i laboriós.

- Per últim, les fraccions separades per cromatografia de capa fina s'analitzen individualment per cromatografia de gasos per obtenir la proporció d'àcids grassos de cadascuna d'elles per separat.

La metodologia habitual consisteix en analitzar primer la composició d'àcids grassos de la fracció de lípids totals i només en el cas que es detectin diferències entre les soques es procedeix a l'estudi específic dels lípids de membrana.

## Resultats

L'anàlisi de la composició d'àcids grassos de la fracció de lípids totals de cinc experiments independents es pot observar en la taula 1 i estan representats en la figura 24. S'ha comprovat, mitjançant una ANOVA d'un factor que no hi ha diferències significatives en la proporció dels diferents àcids grassos presents en les membranes de les cèl·lules estudiades ni a 37°C ni a 48°C ( $F_{4,20}$ ;  $p > 0.05$ ).

### Fracció de lípids totals

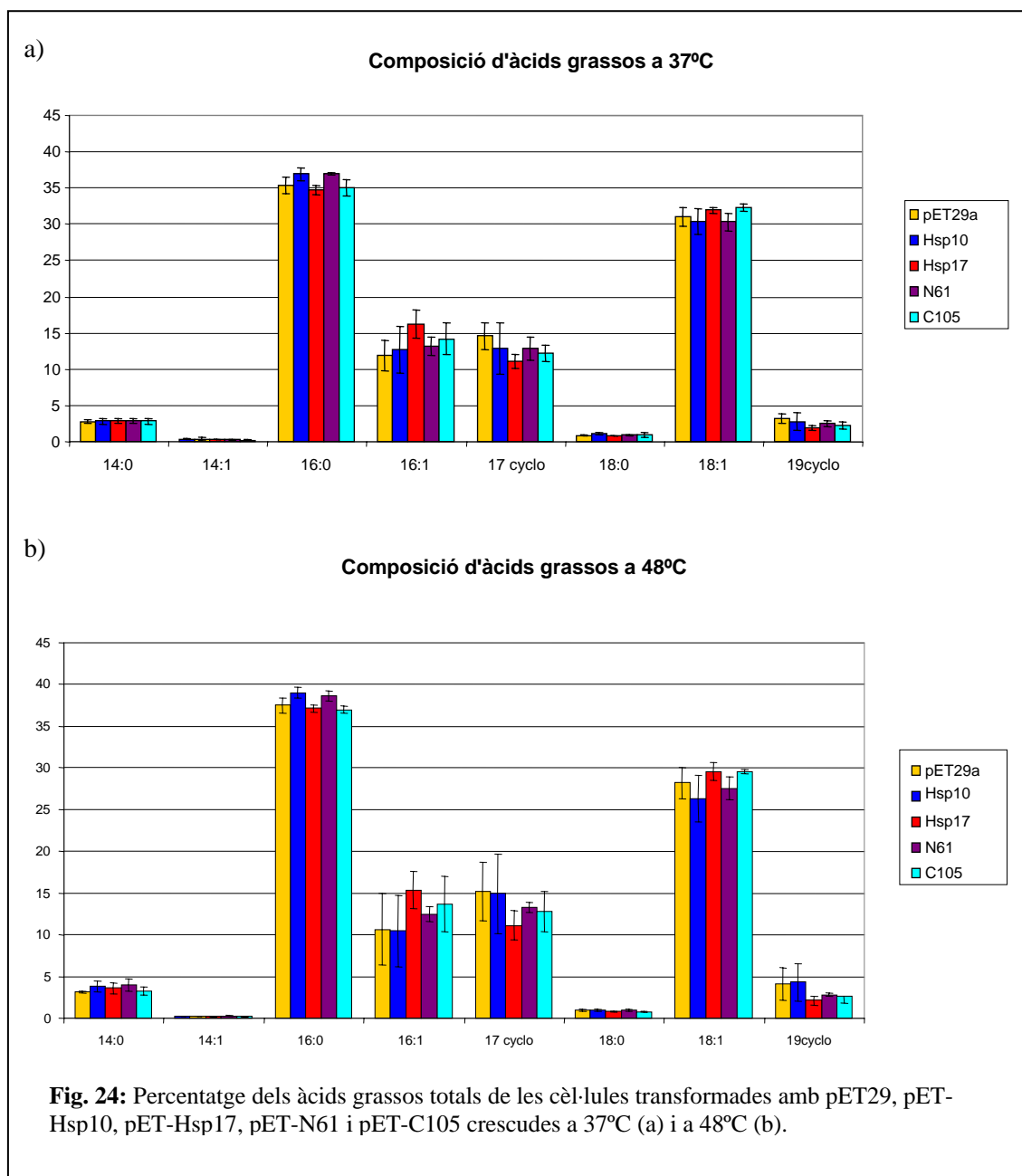
#### *Cèl·lules crescudes a 37°C*

	<b>14:0</b>	<b>14:1</b>	<b>16:0</b>	<b>16:1</b>	<b>17cyclo</b>	<b>18:0</b>	<b>18:1</b>	<b>19cyclo</b>	<b>DBI</b>
pET29a	2,8	0,3	35,3	11,8	14,5	0,9	31,0	3,2	43,1
Hsp17	2,9	0,3	34,7	16,3	11,1	0,8	31,9	1,9	48,5
C105	2,8	0,2	34,9	14,2	12,2	1,0	32,3	2,2	46,7
Hsp10	2,9	0,4	36,9	12,7	12,9	1,1	30,4	2,8	43,5
N61	2,9	0,3	37,0	13,2	12,9	0,9	30,3	2,5	43,8

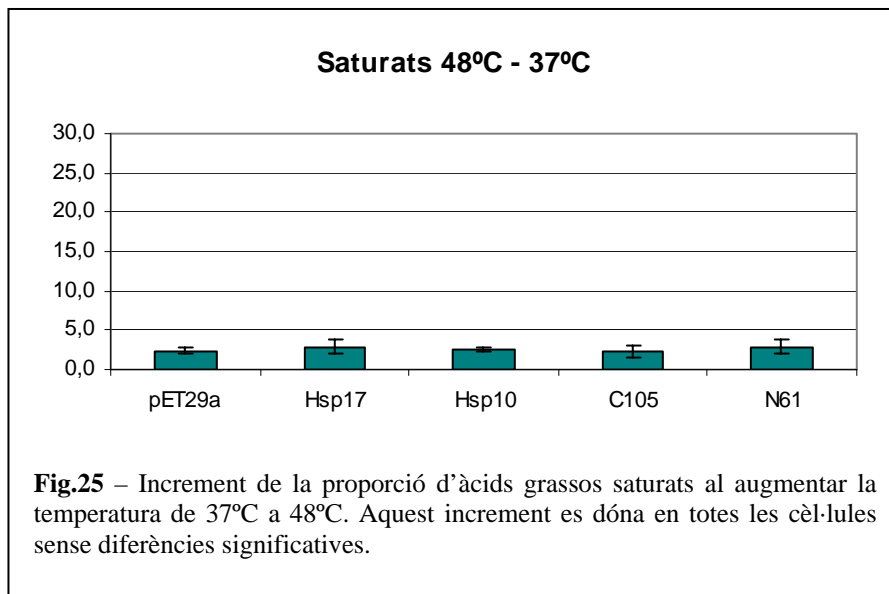
#### *Cèl·lules crescudes a 48°C*

	<b>14:0</b>	<b>14:1</b>	<b>16:0</b>	<b>16:1</b>	<b>17cyclo</b>	<b>18:0</b>	<b>18:1</b>	<b>19cyclo</b>	<b>DBI</b>
pET29a	3,2	0,2	37,5	10,6	15,2	1,0	28,2	4,1	39,0
Hsp17	3,6	0,2	37,1	15,4	11,2	0,8	29,6	2,1	45,2
C105	3,3	0,2	37,0	13,7	12,8	0,8	29,5	2,7	43,4
Hsp10	3,8	0,2	39,0	11,4	14,9	1,0	28,2	4,3	39,9
N61	4,0	0,3	38,6	12,5	13,3	1,0	27,6	2,8	40,4

**Taula 1** – Variacions en la proporció d'àcids grassos de la fracció de lípids totals (mitjanes de 5 experiments independents) de les membranes de les cèl·lules que sobreexpressen Hsp17, Hsp10, C105 i N61 crescudes a 37°C i en condicions d'estrès (48°C). El DBI ("Double Bound Index") indica la proporció d'àcids grassos amb dobles enllaços presents en la membrana i dona una idea de l'estat de rigidesa de la membrana.



En la figura 25 es representa l'increment que experimenta la proporció d'àcids grassos saturats com a conseqüència d'un estrès tèrmic. Aquest fet s'explica per la capacitat de les cèl·lules d'adaptar la composició de les membranes a les diferents condicions de temperatura. En totes les cèl·lules estudiades s'observa un increment de la proporció d'àcids grassos saturats amb la temperatura. Anàlisis estadístics (ANOVA d'un factor) demostren que no hi ha diferències significatives entre les diferents soques estudiades ( $F_{4,20}$ ;  $p > 0.05$ ).



Podem concloure doncs, que no hi ha un efecte de les proteïnes expressades sobre la composició d'àcids grassos de les membranes ja siguin proteïnes funcionals com Hsp17 i Hsp10 o pèptids no funcionals com C105 i N61.

Donat que no hi ha diferències al estudiar la composició lipídica de la fracció de lípids totals només per el primer experiment es va procedir a l'anàlisi de la proporció d'àcids grassos dels principals grups de lípids que formen les membranes. S'ha dut a terme la separació lipídica en capa fina i s'ha determinat la proporció d'àcids grassos de les fosfatidiletanolamines (PE) i dels fosfatidilglicerols (PG) que representen conjuntament el 90% dels lípids de membrana.

La taula 2 mostra la proporció de cadascun dels àcids grassos estudiats en els dos grups de fosfolípids de membrana per separat. Tal com es pot veure en la taula 2, no s'observen diferències notables en la proporció d'àcids grassos de les cèl·lules estudiades ni pel que fa les fosfatidiletanolamines (PE) ni pel que fa als fosfatidilglicerols (PG).

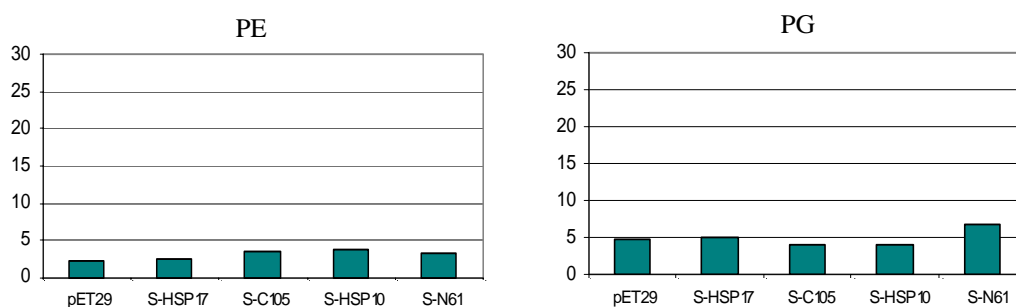
**FOSFATIDILETANOLAMINES (PE)**

		14:0	14:1	16:0	16:1	17cyclo	18:0	18:1	19cyclo	DBI
pET29a	37°C	3.6	0,5	33.6	17.8	6.4	1.0	39.8	2,1	56.7
	48°C	3.6	0,6	34.0	17.7	6.4	1.1	37.2	1,5	54.9
Hsp17	37°C	3.4	0,2	32.0	27.5	1.3	0.7	35.1	1,1	62.6
	48°C	3.2	0,7	33.5	27.2	1.6	0.6	33.8	0,5	61.0
C105	37°C	3.2	0,6	31.4	27.2	1.6	0.7	35.9	1,1	63.1
	48°C	3.5	0,4	34.2	27.0	2.1	0.7	32.5	0,9	59.5
Hsp10	37°C	2.9	0,7	30.7	23.4	2.2	0.8	39.9	0,6	63.4
	48°C	3.0	0,7	33.5	23.2	3.0	0.8	36.4	0,8	59.7
N61	37°C	3.1	0,4	32.2	21.7	4.7	0.9	37.4	2,1	59.1
	48°C	3.8	1,0	33.8	19.3	5.8	0.9	36.4	1,1	55.7

**FOSFATIDILGLICEROL (PG)**

		14:0	14:1	16:0	16:1	17cyclo	18:0	18:1	19cyclo	DBI
pET29	37°C	1.4	1,5	25.1	12.5	3.6	1.5	55.8	1,8	68.4
	48°C	0.9	1,0	30.3	14.1	3.7	1.3	49.7	1,7	63.7
S-HSP17	37°C	1.5	0,9	29.4	19.0	0.8	1.0	48.3	0,9	67.3
	48°C	1.7	0,8	36.7	18.3	1.0	1.4	43.9	0,6	62.2
S-C105	37°C	1.5	1,0	29.6	20.9	1.0	1.1	46.0	1,7	66.8
	48°C	1.4	1,0	33.6	18.6	1.2	1.0	44.1	0,7	62.7
S-HSP10	37°C	1.1	0,8	27.5	16.5	1.3	1.2	52.4	0,9	68.9
	48°C	0.8	0,4	31.0	14.3	1.8	1.4	50.7	0,9	65.0
S-N61	37°C	1.2	1,6	28.5	14.7	3.0	1.2	51.3	1,6	66.1
	48°C	1.7	1,0	34.3	14.1	3.6	1.1	45.2	1,4	59.3

**Taula 2** – Proporció d'àcids grassos dels grups de fosfolípids més abundants de les membranes de les cèl·lules que sobreexpressen Hsp17, Hsp10, C105 i N61 crescudes a 37°C i en condicions d'estrès (48°C).

**Saturats 48°C – 37°C**

**Fig.26** – Increment de la proporció d'àcids grassos saturats de les fosfatidiletanolamines (PE) i dels fosfatidilglicerols (PG) al augmentar la temperatura de 37°C a 48°C. No s'observen diferències notables entre les diferents soques estudiades.

En la figura 26 es representa l'increment d'àcids grassos saturats en les fosfatidiletanolamines i els fosfatidilglicerols quan les cèl·lules passen de 37°C a 48°C. Observem com no hi ha diferències apreciables ni per les fosfatidiletanolamines ni pels fosfatidilglicerols. Podem concloure que la similitud pel que fa a la composició lipídica observada entre les diferents soques estudiades amb la fracció de lípids totals es manté en la composició dels lípids de membrana.

Els resultats obtinguts posen de manifest que la sobreexpressió de les diferents proteïnes recombinants no alteren la composició lipídica de les membranes d'*E.coli*. El fet que totes les cèl·lules es comportin igual en relació a la composició d'àcids grassos, amb independència de la proteïna que expressen facilita els posteriors estudis sobre la capacitat estabilitzadora, doncs podem eliminar un factor de variabilitat. Sempre que es vol estudiar l'efecte estabilitzador de membrana d'una proteïna cal prèviament comprovar els canvis que l'expressió d'aquesta provoca en la composició d'àcids grassos de les membranes de la cèl·lula. En altres treballs en els que s'ha estudiat el comportament de la membrana plasmàtica durant l'estrès també s'han realitzat aquest tipus de control. Török *et al.* (2001) tampoc observen diferències en la composició lipídica de les cèl·lules salvatges de *Synechocytis* respecte les cèl·lules mutants que tenien el gen *hsp17* delectat.

## **B) ANÀLISI DE L'ESTAT DE RIGIDESA DE LA MEMBRANA A 37°C**

Tot i que l'expressió d'una proteïna heteròloga no modifiqui la composició lipídica de manera mesurable, no es pot descartar que hi hagi altres efectes que incideixin en la rigidesa de la membrana. Török *et al.* (2001) van observar que l'expressió d'Hsp17 en les cèl·lules de *Synechocytis* podia alterar l'estat de rigidesa de les membranes tot i no detectar-se variacions en la composició lipídica.

Per mesurar els canvis de rigidesa s'utilitza un mètode basat en la fluorescència d'un marcador, el 1,6-difenil-1,3,5-hexatriene o DPH, una molècula que s'intercala entre els lípids de membrana orientant-se de forma paral·lela a les cues de carbonis dels fosfolípids i que en condicions hidrofòbiques emet fluorescència. La característica principal d'aquesta molècula és la seva forma cilíndrica i la rotació sobre sí mateixa que

presenta. En medi aquós la fluorescència emesa és pràcticament nul·la però en condicions hidrofòbiques emet una major o menor fluorescència en funció de la rotació de la molècula, essent més alta quan menys rotació presenta. La rotació del DPH, quan es troba intercalat en la membrana, depèn de l'estat de rigidesa, és a dir, del grau de cohesió dels lípids de membrana. Les membranes amb més rigidesa dificulten la rotació i augmenten la fluorescència (Cehlnik *et al.*, 1973; Esko *et al.*, 1977). El DPH és un dels mètodes més utilitzats per estudiar l'estabilitat de les bicapes lipídiques (Hura, 2004) .

Utilitzant cultius en fase exponencial de creixement es va induir l'expressió de les proteïnes heteròlogues amb IPTG. Després d'ajustar tots els cultius a un  $OD_{360}=0,2$  s'afegeix el DPH (3 $\mu$ l de DPH 0,2M en 3ml de cultiu) i un cop establerts els blancs pertinents per disminuir el soroll de fons de les mostres es mesura la fluorescència emesa tal com s'explica a l'apartat 8.2 de material i mètodes (vegis material i mètodes, pàgina 60).

S'ha mesurat la fluorescència emesa pel DPH present en les membranes de les cèl·lules transformades amb el vector sense insert (pET29a) i de les diferents soques estudiades.

### Resultats

Els resultats de fluorescència mostrats en la taula 3 corresponen a cinc experiments independents.

pET29	Hsp17	Hsp10	C105	N61
0,2056	0,2148	0,2051	0,1828	0,2403
0,2093	0,1901	0,2186	0,2094	0,2693
0,1876	0,2130	0,2266	-	0,2486
0,2086	0,2089	0,2228	0,2036	0,2672
0,1938	0,2073	0,2355	0,2174	0,2520

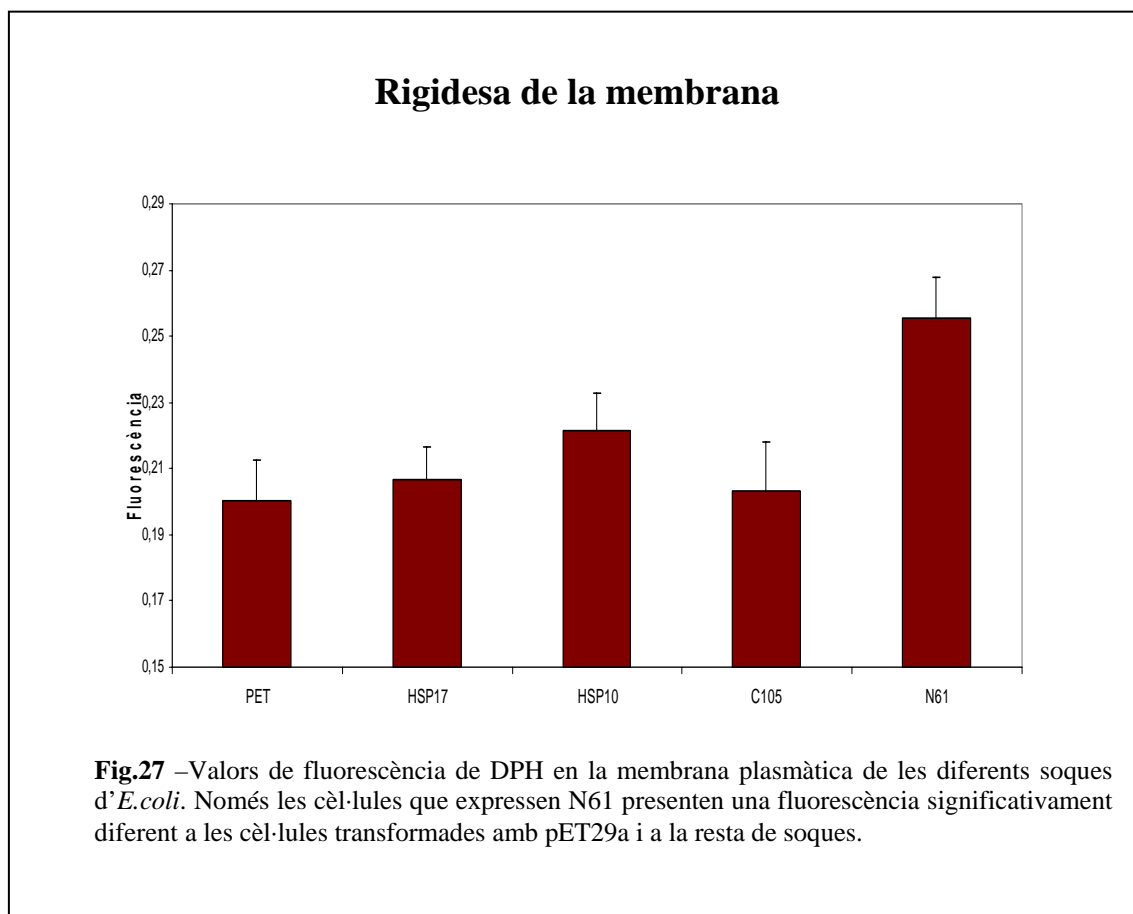
**Taula 3** – Valors de fluorescència emesos pel DPH de les cèl·lules que sobreexpressen Hsp17, Hsp10, C105 i N61 crescudes a 37°C de cinc experiments independents.

La fluorescència emesa pel DPH és directament proporcional al grau de rigidesa de les membranes de les cèl·lules estudiades. Després que una ANOVA d'un factor demostrés diferències significatives entre les mitjanes de fluorescència obtingudes ( $F_{4,22}=18,64$ ;  $p=0,000$ ) es va realitzar un test estadístic de comparacions múltiples a posteriori



utilitzant el mètode de Bonferroni. Els resultats obtinguts per les soques pET-Hsp17, pET-Hsp10 i pET-C105 no presenten diferències significatives ( $p > 0,05$ ) respecte les cèl·lules transformades amb el vector sense insert ni entre si. Només les cèl·lules que expressen N61 emeten uns valors de fluorescència significativament diferents als de les cèl·lules control ( $p < 0,005$ ).

En la figura 27 es representa la mitjana i desviació estàndard de les cinc mesures de fluïdesa emesa pel DPH localitzat en la membrana en les diferents cèl·lules transformades. Els resultats mostren que només les cèl·lules que expressen la proteïna recombinant N61 presenten una membrana significativament diferent que les cèl·lules pET29a. Les altres tres soques (Hsp17, Hsp10 i C105) presenten la mateixa rigidesa de membrana que les cèl·lules pET29a.



El resultat obtingut per les cèl·lules que sobreexpressen C105 era d'esperar donat que és un pèptid que en el fraccionament cel·lular es manté en fase soluble i no interacciona amb les membranes.

Les cèl·lules que sobreexpressen Hsp17 i Hsp10 presenten la mateixa rigidesa de membrana que les cèl·lules control.

Només les cèl·lules que expressen N61 presenten un augment significatiu de la rigidesa de membrana en condicions normals de creixement. Aquest valor de rigidesa equivaldria al que observariem per cèl·lules *d'E.coli* crescudes 8-10 graus per sota, és a dir, a 27°C o 29°C.

Aquest mutant disposa del domini N-terminal, molt important per unir els dímers entre sí i donar estabilitat a l'oligòmer (Montfort *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 1998) però té gairebé tot el domini  $\alpha$ -cristal·lí delectat. És possible que aquest fet li impedeixi formar els dímers necessaris per a la posterior oligomerització fent que proporcionalment hi hagi més molècules lliures per interaccionar amb la membrana.

L'augment de rigidesa de membrana que presenten les cèl·lules que sobreexpressen N61 suggereix que aquest mutant, consistent bàsicament en la regió N-terminal, interacciona amb les membranes. Aquest resultat és molt important i constata la importància de la regió N-terminal en la interacció amb les membranes.

Aquest augment de rigidesa de membrana observat en les cèl·lules que sobreexpressen N61 a condicions normals de creixement pot ajudar a mantenir la membrana estable quan augmenta la temperatura. Per determinar si la sobreexpressió de N61 manté estable la membrana a temperatures elevades es realitzen estudis de cinètica de fluïdització de membrana. Una major estabilització a elevades temperatures no té perquè ser un factor positiu per la cèl·lula donat que una disminució de la temperatura provocaria l'efecte contrari.

### **C) CINÈTICA DE FLUIDITZACIÓ EN RESPOSTA A UN GRADIENT TÈRMIC**

Donat que les cèl·lules que sobreexpressen N61 són les úniques que presenten modificacions de l'estat de rigidesa de membrana en condició d'estrès, els estudis de cinètica de fluïdització s'han realitzat únicament amb cèl·lules transformades amb el vector sense insert i cèl·lules que sobreexpressen Hsp17 i N61. Aquestes cèl·lules han estat sotmeses a un xoc de calor i s'ha determinat l'estat de fluïdesa de la membrana.

Per estudiar la dinàmica del procés de fluïdització a mesura que augmenta la temperatura hem utilitzat el marcador fluorescent 1-N-fenilnaftilamina (NPN). En aquest cas no s'ha pogut utilitzar el marcador DPH per problemes metodològics. Els assajos amb DPH necessiten molta estona de preparació des del moment en què es treuen les

cèl·lules d'*E.coli* del cultiu fins que es prenen les mesures de fluorescència. En aquest temps les cèl·lules d'*E.coli* són capaces de restablir les condicions normals de la membrana després de l'estrès tèrmic provocant que les mesures de fluorescència obtingudes no es corresponguin amb l'estat real de la membrana quan les cèl·lules són crescudes a una temperatura en concret. Les mesures amb el NPN, en canvi són molt més ràpides. Després d'aplicar un estrès tèrmic a les cèl·lules transformades amb pET29a i les que sobreexpressen Hsp17 i N61 afegim el NPN fins una concentració final de 5µM.

En condicions normals de creixement, el NPN es troba a fora de la cèl·lula en unes condicions aquoses que no li permeten emetre fluorescència. A baixes temperatures la fluorescència és manté molt baixa perquè les membranes no permeten l'entrada de les molècules de NPN. A mesura que augmenta la temperatura, la membrana de les cèl·lules es desestabilitza fins arribar a un punt en què és prou fluïda com perquè el NPN s'intercali entre els lípids de membrana. En aquest moment la fluorescència emesa pel NPN augmenta de forma exponencial. Com més estable sigui la membrana més alta serà la temperatura en la qual es dona l'augment de fluorescència. Mesurant la fluorescència emesa per les cèl·lules a diferents temperatures podem detectar l'estat de fluïdesa de la membrana durant un estrès tèrmic.

Aquesta tècnica però només permet determinar l'estabilitat de la membrana externa de la cèl·lula d'*E.coli*. Les molècules de NPN que es troben a l'exterior de la cèl·lula s'intercalen entre els lípids de la membrana externa o periplasmàtica quan la temperatura és prou elevada però no poden arribar a la membrana interna o plasmàtica.

## Resultats

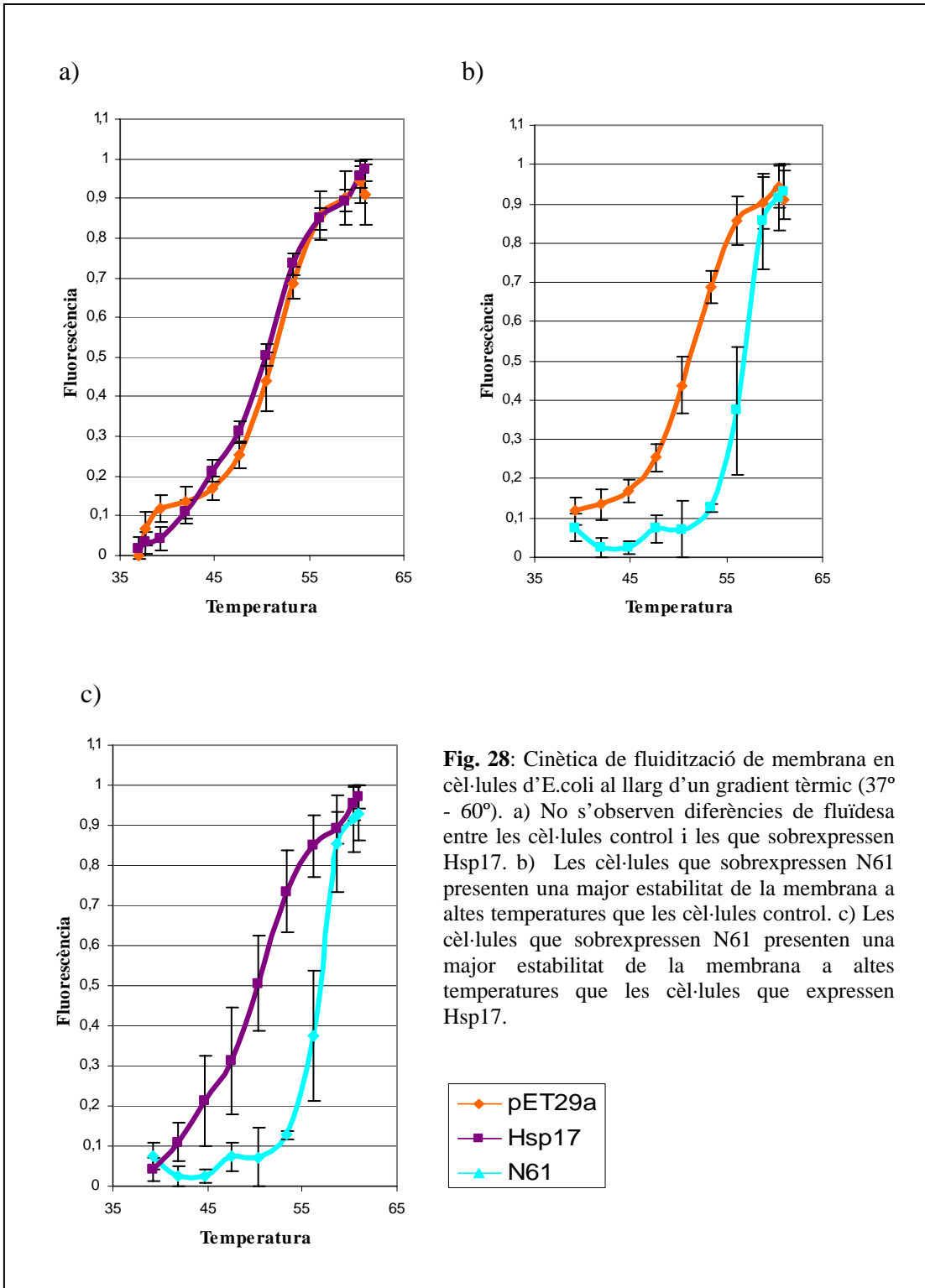
Quan les cèl·lules transformades amb el vector sense insert i les cèl·lules que sobreexpressen Hsp17 i N61 es sotmeten a un gradient de temperatura entre 37°C i 60°C s'observen variacions en l'estat de rigidesa de la membrana (Fig. 29).

En la figura 28 es pot observar com per totes les cèl·lules estudiades, a baixes temperatures, la fluorescència emesa pel NPN es manté baixa perquè la membrana manté l'estabilitat i no permet l'entrada de les molècules de NPN a la bicapa lipídica. Durant la incubació a temperatures fisiològiques, el NPN es localitza a l'exterior de les cèl·lules, és a dir, en un medi aquós de manera que no emet fluorescència. En canvi, a partir d'una certa temperatura les membranes es desestabilitzen i esdevenen prou fluïdes com per permetre l'entrada de les molècules de NPN en la bicapa lipídica augmentant així la fluorescència de forma exponencial.

En les cèl·lules transformades amb el vector sense insert (Fig. 28a i 28b) s'observa un increment de la fluïdesa de membrana a mesura que augmenta la temperatura. A partir d'una certa temperatura, que ronda els 45°C, es dona un increment important de la fluorescència emesa pel NPN que augmenta fins assolir uns nivells màxims a la màxima temperatura estudiada (60°C).

Les cèl·lules que sobreexpressen Hsp17 segueixen el mateix comportament que les cèl·lules control (Fig.28a). La desestabilització de la membrana, i en conseqüència l'augment de fluorescència, en les cèl·lules que sobreexpressen Hsp17 es dona a una temperatura molt similar a la de les cèl·lules transformades amb pET29a. La sobreexpressió de Hsp17 no retarda la fluidització de la membrana indicant que Hsp17 no estabilitza la membrana en condicions d'estrès.

En les cèl·lules que sobreexpressen N61, en canvi, s'observa que la temperatura a la qual el NPN és capaç d'intercalar-se entre els lípids de membrana és més alta que en les cèl·lules pET29a (Fig. 28b) i que en les cèl·lules que expressen Hsp17 (Fig.28c). La sobreexpressió de N61 fa que la membrana es mantingui estable a unes temperatures més elevades que en les cèl·lules transformades amb el vector sense insert i que en les cèl·lules que sobreexpressen Hsp17.



Dels resultats anteriors es dedueix que la sobreexpressió de N61 permet a les cèl·lules d'*E.coli* mantenir la membrana estable a temperatures més altes que en les cèl·lules que no expressen la proteïna.

L'augment de rigidesa que presenten les cèl·lules que sobreexpressen N61 equivaldria a cèl·lules d'*E.coli* crescudes 8 ó 10 graus per sota de la seva temperatura normal de creixement (Horváth I. comunicació personal) Aquest fet permet a les cèl·lules que acumulen N61 mantenir la membrana estable en condicions d'elevada temperatura fent que el NPN no pugui entrar en la cèl·lula fins a temperatures 8 ó 10 graus per sobre de la temperatura en què entra en les cèl·lules que no expressen N61.

Una possible explicació podria ser que la sobreexpressió d'un pèptid tant petit i amb afinitat per les membranes s'intercali de forma abundant entre els lípids de membrana provocant un augment de la rigidesa molt elevada. Semblaria doncs, que la sobreexpressió de N61 hauria de protegir les membranes d'un estrès de calor però, tal i com hem vist en el punt 2.2 de resultats, no s'observa que hi hagi una major supervivència de les cèl·lules d'*E.coli* enfront l'estrès tèrmic *in vivo*.

### **III.4.- CAPACITAT DE QsHsp17.4-CI PER MODIFICAR L'EXPRESSION D'ALTRES Hsps EN *E.coli***

#### **Introducció**

**III.4.1- Efecte de les proteïnes heteròlogues sobre la síntesi de Hsps d'*E.coli* en condicions normals de creixement**

**III.4.2- Efecte de les proteïnes heteròlogues sobre la síntesi de Hsps d'*E.coli* enfront un gradient tèrmic**

## Introducció

La resposta de les proteïnes de xoc de calor (Hsps) davant l'estrès és molt complexa. Normalment un estrès provoca una resposta per part de les cèl·lules a nivell nuclear reprimint la síntesi d'algunes proteïnes i induint l'expressió d'altres, majoritàriament proteïnes de xoc de calor (Montfort *et al.*, 2001). Tot i els nombrosos estudis realitzats, els mecanismes de detecció de l'estrès i les vies de transducció del senyal són encara desconegudes.

La majoria de les xaperones d'*E.coli* s'expressen de forma constitutiva, fet que reflecteix la seva importància en condicions normals de creixement, però totes s'indueixen fortament en condicions d'estrès tèrmic (Richmond *et al.*, 1999). Un dels mecanismes d'activació més senzills per activar la resposta d'estrès és la presència de proteïnes desnaturalitzades o proteïnes externes a la cèl·lula (Goff i Goldberg, 1985). Estudis de creixement en presència de l'aminoàcid canavalina, que no permet el correcte plegament de les proteïnes en les que està present, o tractaments de cultius bacterians en presència de puromicina, que provoca la separació prematura dels polipeptids dels ribosomes així com la sobreexpressió de proteïnes eucariotes que no es pleguen correctament en el bacteri activen la síntesi de Hsps demostrant que el nivell de proteïnes desnaturalitzades determinen el grau d'inducció de Hsps (Parsell *et al.*, 1989).

Per altra banda, en diversos treballs s'ha proposat que la membrana plasmàtica podria actuar com el primer sensor de la cèl·lula capaç de rebre l'estímul i desencadenar la resposta cel·lular (Török *et al.*, 2001; Hórvath *et al.*, 1998; Vigh *et al.*, 1998). S'ha demostrat que variacions en l'estat fisico-químic de la membrana causats per diferents agents químics (benzil alcohol o bimoclomol), amb conseqüències similars a les



provocades per un estrès tèrmic, activen la síntesi de proteïnes de xoc de calor (Török *et al.*, 2003; Hörvath *et al.*, 1998).

El fet que la membrana participi en la cadena de transducció del senyal de xoc de calor i que QsHsp17.4-CI es localitzi precisament en la membrana és un punt a favor per pensar en un possible paper regulador de la síntesi de Hsps per part d'aquesta proteïna. Diferents treballs demostren que certes Hsps bacterianes, tant en *E.coli* com en *B.subtilis*, poden regular els nivells d'expressió de les altres Hsps mitjançant la interacció amb factors activadors o repressors de la resposta a l'estrès (Schultz *et al.*, 1996; Mogk *et al.*, 1997,1998; Tomoyasu *et al.*, 1998; Lund *et al.*, 2001).

En aquest apartat del treball es pretén determinar si la sobreexpressió de proteïnes recombinants pot alterar el patró d'expressió proteic en resposta a l'estrès en les cèl·lules d'*E.coli* respecte les cèl·lules que no expressen la proteïna. Aquest estudi consta de tres etapes:

- i) En una primera etapa s'ha analitzat el patró d'expressió proteic de les cèl·lules transformades amb el vector pET29a sense insert tant en condicions normals de creixement com en condicions d'estrès.
- ii) En una segona etapa es determina si la sobreexpressió d'una proteïna recombinant pot alterar el patró d'expressió proteic de les cèl·lules d'*E.coli* en condicions normals de creixement.
- iii) Per últim s'analitza si la sobreexpressió de Hsp17, Hsp10 i els mutants C105 i N61 té algun efecte en l'expressió de les Hsps d'*E.coli* en condicions d'estrès tèrmic.

## Metodologia

La tècnica que permet analitzar les variacions en el patró d'expressió proteic consisteix en marcar els cultius cel·lulars, després d'haver induït l'expressió de la proteïna recombinant, amb aminoàcids radioactius per, posteriorment, analitzar la síntesi *de novo* de proteïnes mitjançant gels de poliàcrilamida revelats per autoradiografia.

Després d'induir l'expressió de la proteïna recombinant amb IPTG durant 1h, les cèl·lules es mantenen en un medi mínim absent d'aminoàcids (medi M9). S'afegeixen els aminoàcids marcats amb  $^{14}\text{C}$  i es procedeix a incubar els cultius en condicions normals de creixement (37°C) i en condicions d'estrès tèrmic (40, 44, 46,48 i 50°C, respectivament) durant 30 minuts. Després d'aquest temps les cèl·lules són

centrifugades a 6000rpm durant 10 min i el contingut proteic analitzat en gels de poliacrilamida revelats per autoradiografia.

Aquesta part del treball es va dur terme a l'Institut de Bioquímica i Biofísica del Centre de Recerca Biològic de Szeged (Hongria) donat que en aquest laboratori ja tenien la tècnica a punt i les infraestructures necessàries per treballar amb radioactivitat.

Per avaluar la intensitat de l'expressió s'ha utilitzat un mètode densitomètric. La intensitat de les diferents bandes corresponents a les proteïnes de xoc de calor d'*E.coli* s'ha mesurat amb un densitòmetre (Quantity One<sup>®</sup>, BioRad) i els resultats s'expressen com el percentatge d'intensitat de cada banda en relació a la totalitat del carril.

D'entre totes les proteïnes sintetitzades pel bacteri s'han analitzat sis bandes corresponents a proteïnes de xoc de calor, quatre de les quals són proteïnes de xoc de calor d'elevat pes molecular i les altres dues són de baix pes molecular.

– Hsps d'elevat pes molecular:

- **ClpB** – Banda situada en la regió de 100kDa. Aquesta proteïna es troba tant en cèl·lules eucariotes com en procariotes. En les cèl·lules eucariotes, a més d'actuar protegint a les cèl·lules de l'estrès, té un paper molt important en funcions proteolítiques de renovació de proteïnes (Turgay *et al.*, 1998). En *E.coli* aquesta funció no ha estat descrita i sembla que només intervé en la resposta termoprotectora (Parsell *et al.*, 1994).
- **HtpG** – Banda situada en la regió de 90kDa. Aquesta proteïna és l'equivalent en *E.coli* de la Hsp90 d'eucariotes. Aquesta proteïna és necessària en llevat i *D.melanogaster* però és dispensable en *E.coli* i altres bacteris (Buchner J. 1999). Segons Thomas *et al.* (2000) té activitat xaperona *in vivo* i és necessària pel correcte replegament de certes proteïnes citoplasmàtiques en cèl·lules d'*E.coli* estressades.
- **DnaK** – Banda situada en la regió de 70kDa. Es considera l'equivalent en *E.coli* de Hsp70. Juntament amb les Hsp60, DnaK és la Hsp més abundant i més ben estudiada. S'uneix a curts segments hidrofòbics de proteïnes no natives (Rüdiger *et al.*, 1997). Té activitat xaperona i actua desfent petits agregats de proteïnes desnaturalitzades.
- **GroEL** – Banda situada en la regió de 60kDa. GroEL té un paper comparable amb Hsp60 de mamífer i forma un complexa actiu amb una Hsp de 10kDa

(GroES) capaç de renaturalitzar proteïnes desnaturalitzades en un procés depenent d'ATP (Coyle *et al.*, 1999; Shtilerman *et al.*, 1999).

– Hsps de baix pes molecular:

- **IbpA/B** – Banda situada lleugerament per sobre dels 17kDa. L'expressió d'aquestes dues proteïnes ha estat mesurada conjuntament perquè tenen un pes molecular idèntic i es mouen formant una sola banda. Són les dues úniques sHsps d'*E.coli*.
- **GroES** – Banda situada sobre els 10kDa. Forma, juntament amb GroEL, el complexa GroEL/ES que forma una caixa on les proteïnes són renaturalitzades en un procés depenent d'ATP (Coyle *et al.*, 1999; Shtilerman *et al.*, 1999; Xu *et al.*, 1997).

Els resultats s'agrupen en dos apartats, dedicats respectivament: i) a determinar la influència de l'expressió de sHsps heteròlogues sobre els patrons de síntesi proteica de les cèl·lules d'*E.coli* i ii) a analitzar els canvis que l'expressió heteròloga provoca en els patrons de síntesi proteica en diferents condicions d'estrès tèrmic.

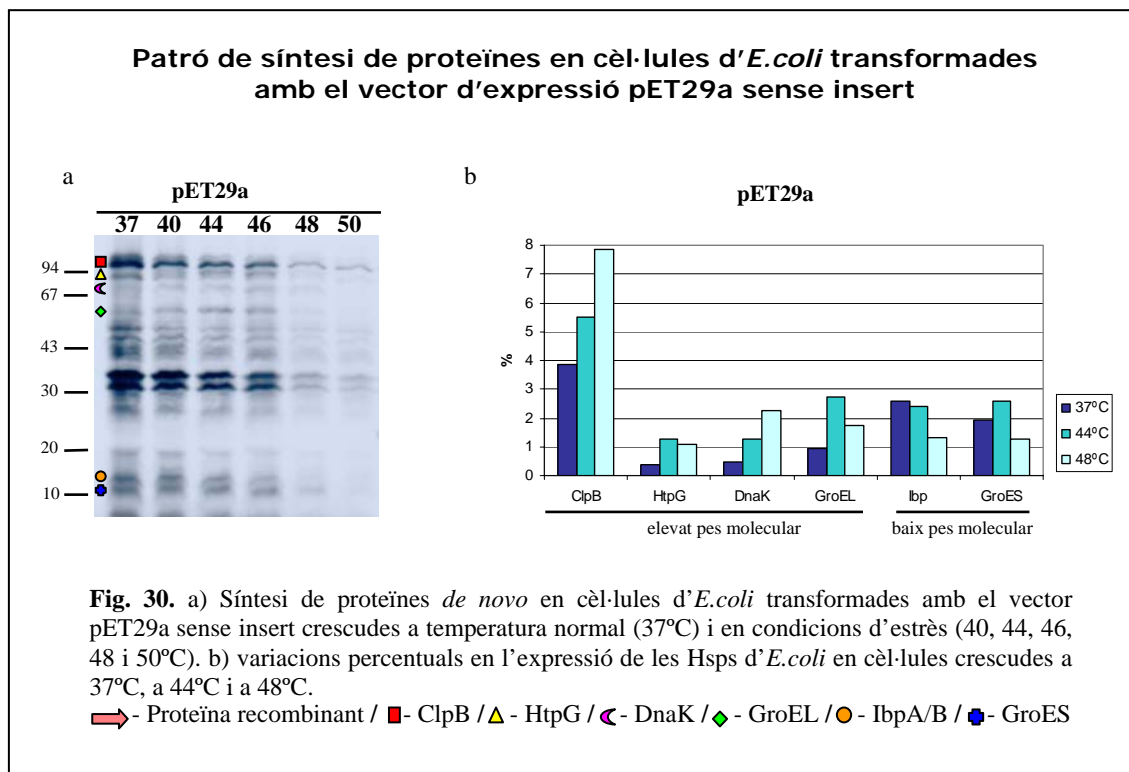
#### 4.1 – Efecte de les proteïnes recombinants sobre la síntesi de Hsps d'*E.coli* en condicions normals de creixement

##### **Resposta del bacteri**

En primer lloc s'ha analitzat el patró d'expressió de les cèl·lules transformades amb pET29a sense insert, tant en condicions normals de creixement com en condicions d'estrès, per poder comparar, posteriorment amb les cèl·lules que sobreexpressen una proteïna heteròloga.

La figura 30a mostra el gel de SDS-PAGE revelat per autoradiografia en el que es poden detectar les proteïnes sintetitzades *de novo* per les cèl·lules d'*E.coli* transformades amb el vector pET29 sense insert en condicions normals de creixement i sota diferents estressos de calor (30 min a 40, 44, 46, 48 i 50°C, respectivament). S'ha mesurat, per densitometria, la intensitat de les bandes corresponents a les principals Hsps del bacteri

respecte el total de les proteïnes expressades a tres temperatures diferents (37, 44 i 48°C). Les mesures densitomètriques (Fig. 30b) permeten comparar el nivell d'expressió d'una proteïna respecte el total de proteïnes presents en cada carril.



Tal com mostra la figura 30a i 30b, en absència d'estrès (creixement a 37°C) les cèl·lules presenten un patró de bandes complex en el qual s'han identificat les bandes corresponents a les principals proteïnes d'estrès del bacteri: ClpB, HtpG, DnaK i GroEL entre les d'alt pes molecular i IbpA/B i GroES entre les de baix pes molecular. En general observem una elevada expressió de dues bandes característiques a una alçada aproximada de 35kDa i una tercera banda intensa que correspon a ClpB. A 37°C les bandes corresponents a les altres Hsps d'*E.coli* són molt dèbils. Les mesures densitomètriques mostren que, a 37°C, el nivell d'expressió més elevat correspon a ClpB amb un valor al voltant del 4% mentre que les altres Hsps d'alt pes molecular presenten una baixa expressió amb valors entre 0,5% i 1%. Pel que fa a les sHsps (IbpA/B i GroES), els nivells d'expressió relatius d'aquestes proteïnes també són relativament alts amb valors al voltant del 2%.

Quan les cèl·lules es fan créixer a temperatures per sobre dels 37°C s'observa una disminució progressiva de la síntesi de proteïnes en funció de la temperatura. El canvi

més notable s'observa al passar de 46°C a 48°C (Fig. 30a). Quan augmenta la temperatura augmenta la proporció de Hsps en les cèl·lules d'*E.coli* passant de representar al voltant d'un 13% del total de proteïnes a 37°C a aproximadament un 18% tant a 44°C com a 48°C. La figura 30b mostra l'expressió relativa de cadascuna de les Hsps d'*E.coli* estudiades respecte el total de proteïnes expressades. Tal com passava a 37°C, en condicions d'estrès, la Hsp que presenta una expressió relativa més elevada és ClpB que augmenta de manera proporcional amb la temperatura arribant a representar al voltant del 8% en les cèl·lules crescudes a 48°C. Els nivells de HtpG es troben al voltant de l'1% tant a 44°C com a 48°C, en canvi els nivells de DnaK augmenten a mesura que augmenta la temperatura essent, a 48°C, la segona Hsp bacteriana amb un nivell d'expressió més elevat després de ClpB. Els nivells de GroEL presenten un gran increment al passar de 37°C a 44°C amb un nivell d'expressió al voltant del 3% però la seva síntesi disminueix a 48°C.

Mentre que els nivells d'expressió relatius de les Hsps d'elevat pes molecular augmenten amb la temperatura, els nivells d'expressió relatius d'IbpA/B es mantenen estables a 44°C respecte els de les cèl·lules crescudes a 37°C i disminueixen a 48°C. Els nivells d'expressió de GroES es mantenen molt similars als de GroEL tant a 44°C com a 48°C. Al igual que GroEL, l'expressió relativa de GroES, respecte el total de proteïna expressada, augmenta a 44°C i disminueix quan les cèl·lules són crescudes a 48°C.

### **Patró de síntesi proteica en les cèl·lules transformades amb Hsp17 i els mutants derivats**

En aquest apartat s'estudia el patró de síntesi *de novo* de les cèl·lules transformades que expressen una sHsp completa (Hsp17), la forma truncada natural (Hsp10) o els dos mutants de delecció N61 i C105. El patró de proteïnes sintetitzades per les cèl·lules d'*E.coli* s'estudia respectivament abans i després de la inducció de l'expressió de la proteïnes recombinant amb IPTG. L'objectiu és determinar si l'expressió heteròloga d'aquestes proteïnes modifica el patró de síntesi d'*E.coli* a 37°C.

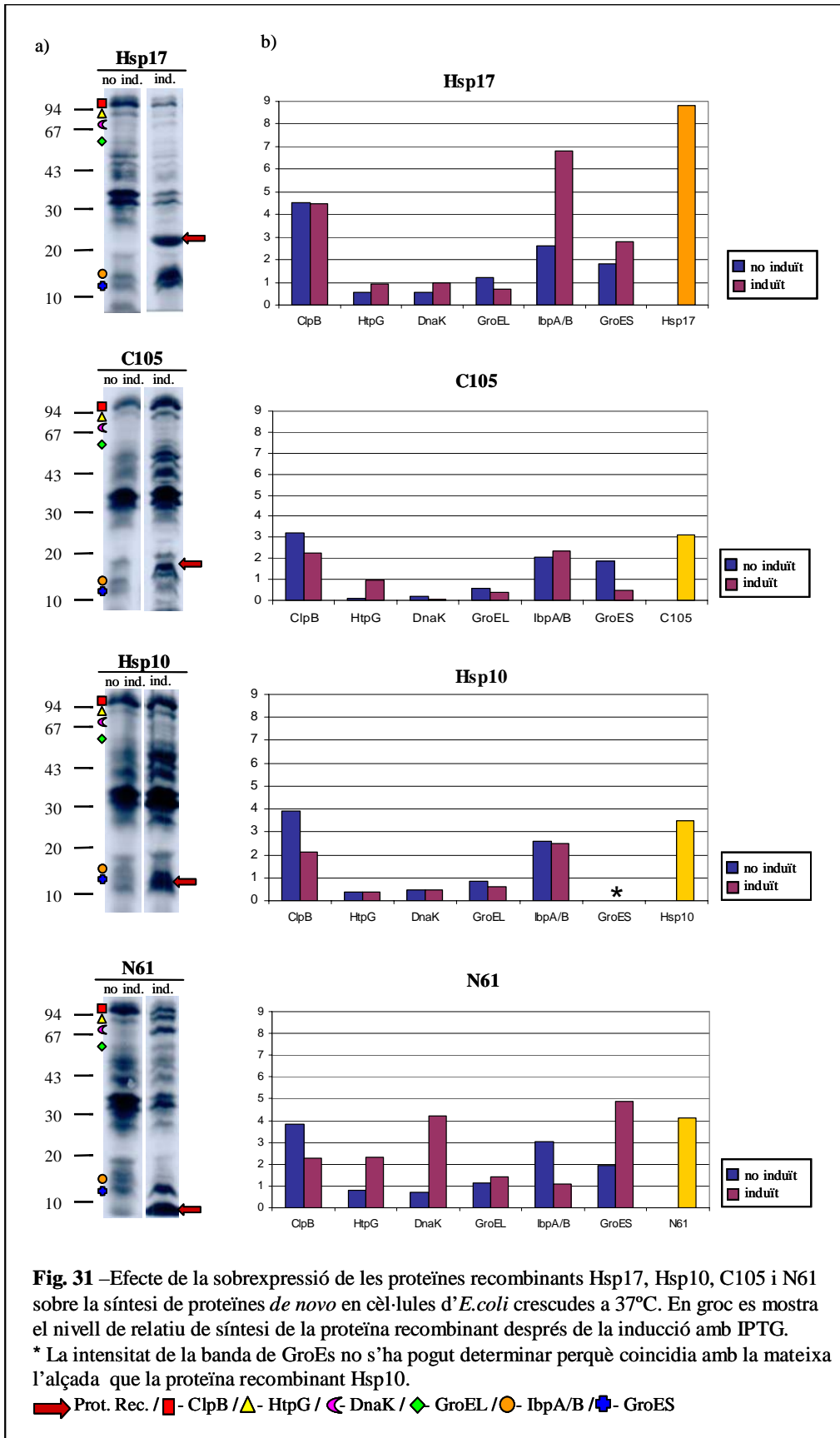
En la figura 31 es pot observar com abans de la inducció amb IPTG totes les soques presenten un patró de síntesi proteica molt similar, independentment de la construcció amb què estan transformades i que es correspon amb el patró de les cèl·lules transformades amb el vector sense insert. ClpB és, en tots els casos, la Hsp amb nivells d'expressió relatius més elevats situant-se sempre al voltant de 3-4%, mentre que les altres Hsps d'alt pes molecular (HtpG, DnaK i GroEL) presenten sempre uns nivells baixos d'expressió que rarament superen el 0,5%. Els nivells d'expressió relativa de les

Hsps de baix pes molecular (IbpA/B i GroES) són en tots els casos molt similars i sempre al voltant del 2-2,5%.

Després de la inducció amb IPTG, a 37°C totes les soques mostren la banda característica que correspon a la proteïna recombinant, però les mesures de densitometria posen en evidència que la proporció relativa de Hsp17 és més elevada (al voltant del 9%) que per la resta de proteïnes recombinants (al voltant del 3-4%). En tots els casos el patró d'expressió de les Hsps d'*E.coli* es veu modificat però de manera diferent en funció de la proteïna heteròloga expressada.

Les cèl·lules que sobreexpressen Hsp17 presenten una banda a l'alçada de les Hsps de baix pes molecular d'*E.coli* que correspon a IbpA/B amb uns valor d'expressió elevats de gairebé el 7%.

En canvi, les cèl·lules que sobreexpressen C105 o Hsp10 no presenten modificacions apreciables de les Hsps d'*E.coli* estudiades. La sobreexpressió de N61 activa de forma notable l'expressió de moltes Hsps d'alt pes molecular d'*E.coli* com el cas de DnaK, el valor d'expressió de la qual supera el 4%, així com una banda a l'alçada de les Hsps de baix pes molecular que correspon a GroES amb un valor d'expressió que s'acosta al 5%. Per altra banda, en aquestes cèl·lules el nivell d'expressió relatiu de ClpB i IbpA/B disminueix a gairebé la meitat en el cas de ClpB i a una tercera part en el cas de IbpA/B.



## Discussió

Les Hsps s'expressen de forma abundant en condicions d'estrès però en general també tenen funcions en condicions normals de creixement. A 37°C, tant les cèl·lules transformades amb el vector sense insert com les cèl·lules transformades amb les diferents construccions però sense induir la proteïna recombinant presenten el mateix patró d'expressió. En aquestes cèl·lules, ClpB i IbpA/B són les Hsps amb un nivell d'expressió relativa més alt. Aquest fet indica que aquestes proteïnes són importants per les cèl·lules en condicions normals de creixement. ClpB forma part de la família de les Clp, una família nombrosa amb una funció proteolítica important, eliminant de la cèl·lula proteïnes mal plegades o desnaturalitzades. Tot i que per ClpB no ha estat descrita aquesta capacitat proteolítica *in vitro* és l'únic membre de la família de les Clp amb activitat xaperona *in vitro* (Squires *et al.*, 1991). Per altra banda IbpA/B tenen una funció important en els cossos d'inclusió de les cèl·lules d'*E.coli*. Van ser descrites per primera vegada, no com a Hsps, sinó formant part dels cossos d'inclusió (Allen *et al.*, 1992).

La resposta de xoc de calor del bacteri és complexa. En general tant, a 44°C com a 48°C, es dona un increment en la síntesi relativa de les Hsps d'alt pes molecular respecte el total de proteïnes expressades en el bacteri, mentre que les Hsps de baix pes molecular no experimenten aquest increment. En les cèl·lules crescudes a 44°C es dona un increment important de la síntesi de GroEL passant a ser, després de ClpB, la segona Hsp amb uns nivells d'expressió més elevats respecte el total de proteïnes expressades. GroEL forma, juntament amb GroES (que presenta un nivell d'expressió relativa similar), una maquinària complexa encarregada d'unir-se a proteïnes desnaturalitzades i mitjançant forces mecàniques permetre el replegament. A 48°C, en canvi, la desnaturalització de les proteïnes és més ràpida i es formen més agregats i probablement per aquesta raó les proteïnes amb un major increment són ClpB i DnaK. En les cèl·lules d'*E.coli*, ClpB actua disgregant, juntament amb DnaK, els grans agregats proteics formats durant l'estrès (Mogk *et al.*, 1999). ClpB intervé en una primera fase en la que es disgreguen els grans agregats en petits agregats. Posteriorment en una segona fase, aquests es disgreguen en monòmers per l'acció de DnaK (Goloubinoff *et al.*, 1999; Glover *et al.*, 1998). Així doncs, quan l'estrès és suau s'indueix més l'expressió de Hsps capaces de renaturalitzar altres proteïnes (GroEL) que no pas aquelles destinades a desfer agregats com ClpB o DnaK (Goloubinoff *et al.*, 1999; Glover *et al.*, 1998).

La sobreexpressió de proteïnes heteròlogues provoca canvis en el patró de síntesi proteica de les cèl·lules d'*E.coli*. Totes les proteïnes heteròlogues s'expressen abundantment però Hsp17 ho fa de forma més abundant que la resta (aproximadament un 9% per Hsp17 i un 3-4% de les altres proteïnes recombinants). Experiments de



localització subcel·lular mostren com Hsp17 colocalitza de forma abundant amb els cossos d'inclusió. L'elevat nivell de síntesi de Hsp17 respecte la resta de proteïnes recombinants i la localització en gran proporció en els cossos d'inclusió podria explicar l'elevada inducció de les IbpA/B del bacteri, proteïnes que s'ha descrit interaccionen de forma important amb els cossos d'inclusió (Allen *et al.*, 1992). En les cèl·lules que sobreexpressen C105 o Hsp10 no s'ha detectat un efecte important sobre la resposta de les cèl·lules al xoc de calor. Per altra banda, el patró d'expressió de cèl·lules que sobreexpressen N61 presenta diferències importants. En general, s'observa un increment del nivell d'expressió de les proteïnes de xoc de calor, principalment de les Hsps d'alt pes molecular, de manera semblant a una resposta a l'estrès. L'increment del nivell d'expressió més important el detectem en DnaK, que passa de menys d'1% a 37°C a més del 4% a 44°C i en GroES, que gairebé arriba al 5%. Aquest resultat és molt interessant donat que N61 interacciona amb les membranes provocant un augment de rigidesa important, amb valors similars als que presentarien cèl·lules d'*E. coli* crescudes 8°C o 10°C per sota de la temperatura normal de creixement. Sembla que aquest augment de rigidesa de la membrana podria ser el responsable de l'activació de la resposta a l'estrès en aquestes cèl·lules, tal com descriuen diversos treballs en els quals l'estat fisico-químic de la membrana activa la resposta a l'estrès (Vigh *et al.*, 1998; Horváth *et al.*, 1998; Török *et al.*, 2001; Tsvetkova *et al.*, 2002).

#### **4.2- Efecte de les proteïnes heteròlogues sobre la síntesi de Hsps d'*E. coli* enfront un gradient tèrmic**

A continuació s'estudia el comportament en la resposta al xoc de calor de les cèl·lules que sobreexpressen les diferents proteïnes recombinants enfront un gradient de temperatures per analitzar si les modificacions del patró d'expressió observades a 37°C es mantenen al augmentar la temperatura.

La figura 32 mostra els gels de SDS-PAGE revelats per autoradiografia corresponents a cultius d'*E. coli*, que sobreexpressen les diferents proteïnes recombinants, crescuts a temperatures de 40, 44, 46, 48 i 50°C, respectivament (Fig. 32a). Per cada soca es mostra els resultats de l'anàlisi densitomètrica de les bandes corresponents a les principals proteïnes d'estrès del bacteri (ClpB, HtpG, DnaK, GroEL, IbpA/B i GroES) així com de la banda corresponent a la proteïna recombinant (Fig. 32b).

Quan s'observen a grans trets els patrons de bandes dels gels, es pot veure que, al igual que s'observava amb les cèl·lules transformades amb pET29 sense insert

(Fig30a), l'excés de temperatura inhibeix de manera general la síntesi de proteïnes. Cal tenir en compte que la intensitat del marcatge radioactiu pot variar entre els diferents experiments i, per tant, sempre ens referim al control del propi experiment que, en aquest cas, són els carrils de temperatura normal (37°C) amb i sense inducció per IPTG. En totes les soques estudiades s'observa que la síntesi de la proteïna heteròloga es manté a totes les temperatures assajades. Al igual que en les cèl·lules crescudes a 37°C, Hsp17 presenta uns nivells d'expressió relatius més elevats que la resta de proteïnes recombinants. L'abundància relativa de les diferents proteïnes heteròlogues augmenta en tots els casos, al augmentar la temperatura fins a 44°C; després es manté aproximadament igual excepte N61 que segueix augmentant fins a presentar, a 48°C, un nivell d'expressió similar al de Hsp17 (al voltant del 13%).

En relació a la resposta de xoc de calor, al augmentar la temperatura es manté el mateix patró d'expressió observat a 37°C per cadascuna de les proteïnes recombinant, si bé, l'augment de temperatura intensifica aquestes variacions.

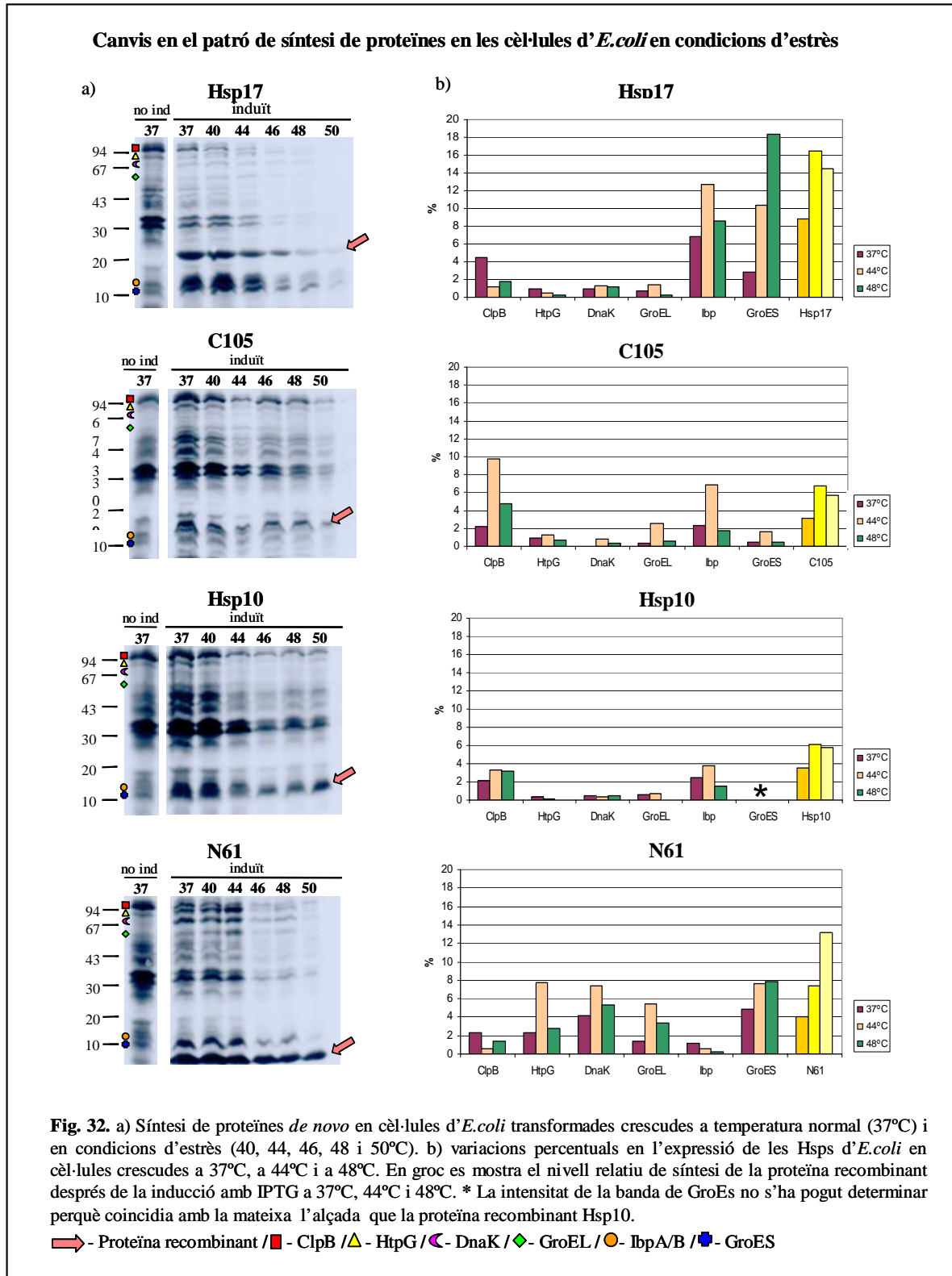
En les cèl·lules que sobreexpressen Hsp17 s'observa una gran activació de la síntesi de les Hsps de baix pes molecular d'*E.coli*, tant de IbpA/B com de GroES, a mesura que augmenta la temperatura. A 44°C, IbpA/B és la Hsp que presenta un nivell d'expressió relatiu més elevat amb valors aproximats del 12%, mentre que a 48°C, la que presenta un nivell més elevat és GroEs, amb un valor que arriba fins al 18%. En canvi, els nivells relatius de síntesi de les Hsps d'alt pes molecular es mantenen igual o fins i tot en algun cas més baixos, que en les cèl·lules crescudes a 37°C.

- La sobreexpressió de C105, en general, provoca molt pocs canvis respecte les cèl·lules transformades amb el vector pET29a sense insert. A 44°C es detecta un increment important de ClpB amb valors que arriben gairebé al 10% i un increment menys important en GroEL amb valors que superen el 2%. DnaK incrementa la seva expressió respecte les cèl·lules crescudes a 37°C però amb uns valors que no superen l'1%. Pel que fa a les Hsps de baix pes molecular, s'observa un fort increment de IbpA/B que supera el 6% mentre que nivells de GroES també augmenten respecte 37°C assolint valors al voltant del 2%. A 48°C la síntesi d'aquestes cèl·lules disminueix molt per totes les Hsps i més ClpB manté un nivells d'expressió relativament alts amb valors al voltant del 5%.

- En les cèl·lules que sobreexpressen Hsp10, al augmentar la temperatura, es reprimeix la síntesi de les Hsps del bacteri, principalment la de les Hsps d'alt pes molecular, mantenint-se a nivells similars als de les cèl·lules crescudes a 37°C.

- Les cèl·lules que sobreexpressen la proteïna recombinant N61 són les que presenten canvis més importants en el patró d'expressió proteic, seguint la mateixa tendència observada a 37°C. Quan les cèl·lules es sotmeten a condicions d'estrès tèrmic (40°C-50°C), la sobreexpressió de N61 provoca un increment relatiu de la síntesi de

totes les Hsps d'alt pes molecular amb l'única excepció de ClpB que presenta una repressió de la seva síntesi. Pel que fa a les Hsps de baix pes molecular, el nivell d'expressió relatiu de IbpA/B es reprimeix mentre que el de GroES augmenta amb la temperatura.



## Discussió

Un fet característic de totes les cèl·lules és que al augmentar la temperatura per sobre de la temperatura normal de creixement disminueix la síntesi proteica de la cèl·lula i s'activa la resposta a l'estrès. Un dels principals mecanismes de resposta a l'estrès és la síntesi de proteïnes de xoc de calor. L'òrgan sensor d'aquest canvi de temperatura i en conseqüència, responsable d'activar la resposta a l'estrès encara es desconeix. S'ha vist com en alguns casos el nivell de proteïnes desnaturalitzades en el interior de la cèl·lula pot activar la resposta (Goff i Goldberg, 1985), en altres casos en canvi, s'ha descrit que l'estat fisico-químic de la membrana és el responsable d'activar la síntesi de proteïnes de xoc de calor (Vigh *et al.*, 1998) o fins i tot s'ha observat que algunes Hsps poden regular els nivells de síntesi d'altres Hsps de la pròpia cèl·lula (Mogk *et al.*, 1997 i 1998).

En aquest estudi s'ha comparat el patró de síntesi de les principals Hsps d'*E.coli* en cèl·lules que sobreexpressen diferents proteïnes recombinants. Per una banda, s'han sobreexpressat dues sHsps recombinants que proporcionen termotolerància al bacteri: **Hsp17**, una sHsp sencera i **Hsp10**, una truncació natural a la que li falta la meitat del domini  $\alpha$ -cristal·lí, incloent la regió consens I i tota l'extensió C-terminal, mentre que per altra banda, s'han sobreexpressat dos mutants de delecció de QsHsp17.4-CI que no tenen funció termoprotectora: **C105**, al que li falta tota la regió N-terminal i **N61**, format només per la regió N-terminal i els primers 12 aminoàcids del domini  $\alpha$ -cristal·lí que no inclouen la regió consens II.

Els nostres resultats mostren que la sobreexpressió d'aquestes proteïnes recombinants provoca canvis diferents en el patró d'expressió de Hsps d'*E.coli* en funció de la proteïna expressada i que al llarg d'un gradient tèrmic s'observa que aquests canvis es fan més evidents.

L'expressió detectada per Hsp17 és més elevada que per la resta de proteïnes recombinants. Hsp17 és l'única proteïna utilitzada en aquest treball que conté senceres les tres regions típiques de les sHsps-CI de planta. Segurament té més facilitat per formar complexos oligomèrics i possiblement més grans que els de la resta de proteïnes heteròlogues expressades. Per altra banda, experiments de localització subcel·lular mostren que una proporció important de Hsp17 forma part dels cossos d'inclusió. L'elevada expressió de IbpA/B, proteïnes íntimament lligades amb els cossos d'inclusió, observada en les cèl·lules que sobreexpressen Hsp17 respon, segurament, a una major formació de cossos d'inclusió per part de Hsp17 que per part de les altres proteïnes heteròlogues. Per altra banda, però, s'ha descrit que, a diferència de les altres Hsps d'*E.coli*, la sobreexpressió del factor sigma 32 ( $\sigma^{32}$ ), el factor responsable d'activar la síntesi de les Hsps d'*E.coli*, no activa l'expressió de IbpA/B constatant l'existència de

senyals d'activació específiques per aquestes proteïnes (van Bogelen *et al.*, 1987). Podria ser que la presència de Hsp17 en la cèl·lula activés de forma indirecta l'expressió d'aquestes proteïnes o de les sHsps del bacteri. Més interessant és el fet que el nivell de les Hsps d'alt pes molecular es mantingui igual que en les cèl·lules crescudes a 37°C o fins i tot en alguns casos com ClpB o HtpG disminueixi. Aquests resultats indicarien que la resposta general de la cèl·lula al xoc de calor no canviaria respecte les cèl·lules crescudes a 37°C, és a dir, l'increment de temperatura no activa la síntesi de les Hsps. És com si aquestes cèl·lules no notessin l'augment de temperatura i es comportessin igual que a 37°C. Possiblement aquest fet sigui degut a l'acció protectora que Hsp17 té sobre aquestes cèl·lules (IV.2-resultats).

C105 és un pèptid que no presenta termoprotecció i es localitza en el citoplasma. La resposta al xoc de calor de les cèl·lules que sobreexpressen aquesta proteïna és similar a la de les cèl·lules transformades amb el vector sense insert, incrementant de forma general la síntesi de les Hsps. Seria la resposta típica de les cèl·lules d'*E.coli* a l'estrès observant-se un increment important en la síntesi de ClpB i un increment menys important de GroEL i DnaK.

Hsp10 és una proteïna molt interessant donat que té capacitat termoprotectora i únicament està formada per la regió N-terminal i la primera meitat del domini  $\alpha$ -cristal·lí. L'estudi de la resposta de les cèl·lules que expressen aquesta proteïna a l'estrès tèrmic mostra que, de la mateixa manera que passava per Hsp17, el nivell d'expressió de les diferents Hsps d'*E.coli* es manté igual que en les cèl·lules crescudes a 37°C. Al igual que Hsp17, Hsp10 protegeix les cèl·lules de l'estrès tèrmic (IV.2-resultats; Jofré *et al.*, 2003). Segurament la sobreexpressió d'aquestes proteïnes contraresti l'efecte de la temperatura sense la necessitat de sobreexpressar les Hsps del propi bacteri.

N61 activa, directa o indirectament, la síntesi de Hsps d'*E.coli* obtenint-se un patró d'expressió molt diferent al de cèl·lules transformades amb el vector sense insert. Aquest increment en l'expressió de Hsps bacterianes no es transcriu, però, amb un augment en la supervivència de les cèl·lules. Aquest resultat és molt important donat que N61 és un mutant de delecció que només difereix de Hsp10 per l'absència de la regió consens II del domini  $\alpha$ -cristal·lí, fet que constata la importància de la regió consens II, suposadament el lloc d'interacció de les sHsps amb el substrat, per la funció xaperona de les sHsps. Per altra banda, únicament N61 és capaç de modificar l'estat fisico-químic de la membrana de les cèl·lules d'*E.coli*, presentant una rigidesa de membrana molt més elevada que les cèl·lules que sobreexpressen les altres proteïnes heteròlogues. Aquest augment de rigidesa de la membrana podria ser el responsable de l'activació de la resposta a l'estrès en les cèl·lules d'*E.coli*, tal com proposen diversos treballs en els quals l'estat fisico-químic de la membrana activa la síntesi de proteïnes de xoc de calor (Vigh *et al.*, 1998; Horváth *et al.*, 1998; Török *et al.*, 2001; Tsvetkova *et al.*, 2002).

## **DISCUSSIÓ GENERAL I CONCLUSIONS**

---

## **DISCUSSIÓ GENERAL**

Aquest treball contribueix al coneixement de diferents aspectes de la funció i el mecanisme d'acció de les sHsps-CI, especialment en relació al paper de les diferents regions de la proteïna en aquesta funció.

Es demostra que QsHsp17.4-CI, una sHsp típica amb les tres regions característiques, i QsHsp10-CI, limitada a la regió N-terminal i la regió consens II del domini  $\alpha$ -cristal·lí, protegeixen les cèl·lules de l'estrès de calor, mentre que el mutant amb la regió N-terminal deleccionada (C105) i el mutant amb la regió N-terminal però sense la regió consens II (N61) no confereixen termoprotecció demostrant que la regió N-terminal i la regió consens II són imprescindibles per la funció protectora. Es demostra també que la regió N-terminal és responsable de la colocalització amb la fracció membranosa de QsHsp17.4-CI, QsHsp10-CI i del mutant N61; el mutant C105, amb la regió N-terminal deleccionada, s'obté exclusivament amb la fracció citosòlica. El fet de colocalitzar amb la fracció membrana no s'ha pogut correlacionar amb l'efecte termoprotector. La sobreexpressió de QsHsp17.4-CI i QsHsp10-CI no modifiquen la composició lipídica ni proporcionen major estabilitat en condicions d'estrès. En canvi, la sobreexpressió de N61, que no confereix termoprotecció, provoca un augment de rigidesa que augmenta l'estabilitat de membrana en condicions d'estrès tèrmic. La sobreexpressió de N61 activa la síntesi de les principals Hsps d'*E. coli* indicant que l'estat fisico-químic de la membrana és un mecanisme activador de la resposta a l'estrès.

QsHsp17.4-CI i les diferents regions de la proteïna en la termotolerància

En aquest treball s'estableix la capacitat de QsHsp17.4-CI per conferir tolerància a l'estrès en cèl·lules d'*E.coli*. Estudis de funcionalitat *in vivo* demostren que les cèl·lules que expressen la proteïna recombinant de QsHsp17.4-CI, ja sigui de forma lliure (HSPN) o fusionada a GFP (HSPF) presenten un percentatge de mort cel·lular significativament més baix que les cèl·lules GFP, que no expressen la sHsp de surera i han estat utilitzades com a control. El fet que no hi hagi diferències significatives entre la forma lliure (HSPN) i la forma fusionada (HSPF) mostra que la GFP és un bon marcador de l'expressió de proteïnes donat que no interfereix amb el plegament i la funcionalitat de QsHsp17.4-CI.

Aquests resultats corroboren els obtinguts en diversos treballs en els quals s'ha demostrat que la sobreexpressió de sHsps vegetals en cèl·lules d'*E.coli* protegeix de l'estrès tèrmic (Yeh *et al.*, 1997; Soto *et al.*, 1999; Joe *et al.*, 2000; Kitagawa *et al.*, 2000; Jofré *et al.*, 2003; Ramakrishna *et al.*, 2003). Els assajos amb els mutants de delecció realitzats en aquest treball permeten valorar la implicació de les diferents regions de QsHsp17.4-CI en la capacitat de protecció de les cèl·lules enfront l'estrès. Aquest plantejament és molt interessant donat que en el moment d'iniciar-se aquest treball existien poques dades sobre la importància de les diferents regions de les sHsps en la funció xaperona d'aquestes proteïnes *in vitro* (Kokke *et al.*, 1998; Haslbeck *et al.*, 1999) i especialment del paper de les diferents regions en la funció termoprotectora de les sHsps *in vivo*.

La sobreexpressió en *E.coli* de les diferents construccions permet obtenir informació del paper de la regió N-terminal i de la regió consens II del domini  $\alpha$ -cristal·lí. Els resultats mostren que tant Hsp17 com Hsp10 augmenten la viabilitat de les cèl·lules mentre que les cèl·lules que sobreexpressen els mutants de delecció C105 i N61 no confereixen termotolerància.

C105 està format pel domini  $\alpha$ -cristal·lí sencer i l'extensió C-terminal però la delecció de la regió N-terminal fa que aquesta proteïna perdi la capacitat de protegir. Aquest resultat corrobora l'obtingut per Yeh *et al.* (2002) que descriuen una seqüència de 6 aminoàcids de la regió N-terminal d'una sHsp d'arròs (OsHsp16.9) com imprescindible per la funció termoprotectora. La regió N-terminal de QsHsp17.4-CI, tot i no compartir la seqüència aminoacídica descrita per Yeh *et al.* (2001), és imprescindible per la funció de termoprotecció de les cèl·lules d'*E.coli*.

N61 és un pèptid molt curt (61 aminoàcids) que difereix de Hsp10 en 30 aminoàcids corresponents a la regió consens II. La delecció d'aquesta regió provoca la pèrdua de la capacitat termoprotectora demostrant la importància d'aquesta seqüència aminoacídica del domini  $\alpha$ -cristal·lí. Yeh *et al.* (2001) identifiquen dos aminoàcids



d'aquesta regió consens II (73 i 74) que són necessaris per la funció termoprotectora de OsHsp16.9 d'arròs.

D'acord amb els treballs que descriuen l'estructura cristal·lina de dues sHsps (Kim *et al.*, 1998; Montfort *et al.*, 2001) i els estudis d'activitat xaperona realitzats *in vitro* (Kokke *et al.*, 2001; Studer *et al.*, 2002; Stromer *et al.*, 2004), la regió N-terminal és imprescindible en la formació de l'oligòmer, un prerrequisit que sembla ser indispensable per la funció de les sHsps. S'ha demostrat que la regió consens II és molt important per la interacció de les sHsps al substrat tot i que recentment s'ha suggerit que alguns residus de la regió N-terminal també podrien interaccionar amb el substrat (Basha *et al.*, 2004). El nostre treball corrobora aquests estudis demostrant que la regió N-terminal i la regió consens II són imprescindibles per la funció termoprotectora de les sHsps.

#### *Acció de les proteïnes recombinants sobre les membranes*

Tot i l'absència de dominis transmembrana, diversos treballs descriuen la capacitat de diferents sHsp per interaccionar amb la membrana. L'aportació de dades en aquest sentit representa una contribució important en aquest debat.

Els nostres resultats mostren que la regió N-terminal determina la colocalització amb les membranes durant el fraccionament subcel·lular, mentre que la delecció d'aquesta regió implica una localització exclusiva en la fracció citoplasmàtica. La regió N-terminal és doncs indispensable per la colocalització de la proteïna amb les membranes. Segons Tsvetkova *et al.* (2002) la interacció entre SHsp17-P de *Synechocystis* i els lípids de membrana es dona a través del cap polar de lípids específics i de les cues de carbonis hidrofòbiques. La regió N-terminal és la part més amfipàtica de les sHsps. Mentre que el domini  $\alpha$ -cristal·lí és predominantment una estructura en fulls- $\beta$  molt hidrofòbica, la regió N-terminal està formada per elements en hèlix- $\alpha$  (Stromer *et al.*, 2004; Monfort *et al.*, 2001). Pasta *et al.* (2003) van descriure el caràcter amfipàtic de l'hèlix- $\alpha$  de la regió N-terminal establint uns aminoàcids hidrofílics en una meitat de l'hèlix i uns aminoàcids hidrofòbics en l'altra meitat. Així doncs, el caràcter amfipàtic de les hèlix- $\alpha$  de la regió N-terminal podria explicar l'afinitat de certes sHsps a la membrana.

Per analitzar el comportament de les sHsps, amb i sense regió N-terminal, en relació a la membrana *in vivo* s'han dut a terme un conjunt d'experiments encaminats a establir una possible correlació entre l'expressió de la proteïna, l'efecte termoprotector i l'estabilització de la membrana en condicions d'estrès.

L'expressió de proteïnes recombinants pot alterar per sí mateixa la saturació dels àcids grassos (Shigapova, 2003). Vigh *et al.* (1998) han descrit que davant un estrès per fred s'activa la síntesi de desaturases (DesA) encarregades d'incorporar dobles enllaços als àcids grassos saturats per augmentar l'estat de fluïdesa de la membrana. Els nostres estudis mostren que la sobreexpressió de les diferents proteïnes recombinants no modifica el grau de saturació dels lípids de membrana ni a 37°C ni a 48°C. Les membranes no manifesten canvis detectables en la proporció d'àcids grassos saturats i insaturats com a conseqüència de la sobreexpressió de les sHsps heteròlogues. En estudis similars Török *et al.* (2001), estudiant SHsp17-P de *Synechocistis*, tampoc observen diferències en la composició lipídica de les cèl·lules control respecte les cèl·lules que tenen delectat el gen Shsp17-P.

Encara que la composició lipídica no es vegi alterada, la sobreexpressió d'una proteïna recombinant pot alterar l'estat de rigidesa de la membrana tal com es demostra en el treball de Török *et al.* (2001) en el que en condicions d'estrès tèrmic, les cèl·lules que expressen Hsp17-P presenten una membrana més rígida que els mutants que no expressen aquesta proteïna.

Els nostres resultats mostren que les cèl·lules que sobreexpressen Hsp17, Hsp10 i C105 no presenten modificacions de rigidesa de membrana respecte les cèl·lules transformades amb el vector sense insert. Això demostra que l'acció protectora d'aquestes proteïnes no té relació amb canvis que afectin aquest paràmetre. En canvi, sorprenentment, la sobreexpressió de N61, que no té efecte termoprotector, provoca un increment significatiu de la rigidesa de membrana. N61 difereix de Hsp10 únicament en l'absència de la regió consens II, el fet que Hsp10 no modifiqui de forma significativa l'estat de rigidesa de la membrana fa pensar que la regió consens II intervé de forma decisiva en el plegament de Hsp10 proporcionant a la proteïna una estructura final que li impedeix influir en la rigidesa de la membrana.

Els estudis de permeabilitat de membrana en condicions d'estrès mostren que la sobreexpressió de Hsp17 no confereix una major estabilitat de membrana durant un estrès tèrmic. Aquest resultat indica que l'activitat termoprotectora de QsHsp17.4-CI no està relacionada amb un increment de l'estabilitat de les membranes. En canvi, l'augment de rigidesa de membrana que presenten les cèl·lules que expressen N61 en condicions normals de creixement es manté en condicions d'estrès ajudant a mantenir l'estabilitat de la membrana davant les altes temperatures. Tot i que N61 estabilitza les membranes enfront l'estrès tèrmic la sobreexpressió d'aquesta proteïna no proporciona termoresistència a les cèl·lules d'*E. coli* demostrant-se que el mecanisme d'acció de les sHsps és complexe i que la funció de QsHsp17.4-CI no està relacionada amb l'estabilització de la membrana.

*Efecte de les proteïnes recombinants en la resposta al xoc de calor d'E.coli*

En les cèl·lules d'*E.coli*, l'aplicació d'un estrès tèrmic activa la síntesi de proteïnes de xoc de calor (Hsps). Per analitzar comparativament la resposta del bacteri en funció de la sobreexpressió de Hsp17, Hsp10 o els mutants de delecció (N61 o C105) en relació a les cèl·lules transformades amb el vector pET29a sense insert (utilitzades com a control) s'han sotmès les cèl·lules a altes temperatures i s'ha analitzat el nivell d'expressió de les Hsps del bacteri en relació al total de proteïnes expressades.

La sobreexpressió d'una proteïna heteròloga modifica aquest patró d'expressió de les Hsps d'*E.coli*. En condicions d'estrès tèrmic, la sobreexpressió de C105 modifica els nivells d'expressió de les Hsps d'*E.coli* de forma poc notable respecte les cèl·lules control mentre que, la sobreexpressió de Hsp17, Hsp10 i N61 provoca canvis diferents en funció de la proteïna expressada.

Les cèl·lules que sobreexpressen Hsp17 presenten un nivell relatiu de proteïna recombinant més elevat que en la resta de soques estudiades. Hsp17 és l'única sHsp sencera estudiada en aquest treball que segurament forma uns complexos oligomèrics més estables i més grans que les altres proteïnes heteròlogues. La combinació d'aquests dos factors podrien provocar una major formació de cossos d'inclusió que activarien la síntesi de IbpA/B, dues proteïnes molt relacionades amb la formació d'aquestes estructures. En aquestes cèl·lules s'expressen de forma abundant IbpA/B però s'ha vist que la funció d'aquestes proteïnes no és molt important per la protecció de la cèl·lula en condicions d'estrès (Mogk *et al.*, 1999) i que la seva delecció no provoca modificacions en les cèl·lules d'*E.coli* ni en condicions fisiològiques ni en condicions d'estrès. És evident que la termoprotecció que presenten les cèl·lules que sobreexpressen Hsp17 és deguda a l'acció d'aquesta proteïna i no a la sobreexpressió de IbpA/B. Igual o més interessant que l'increment en l'expressió de IbpA/B és la disminució de l'expressió de les Hsps d'alt pes molecular. En les cèl·lules que sobreexpressen Hsp17, a diferència de les cèl·lules control, al augmentar la temperatura no augmenta la síntesi de Hsps d'alt pes molecular, mantenint-se al mateix nivell que en les cèl·lules crescudes a 37°C, com si aquestes cèl·lules no notessin l'estrès tèrmic.

El patró d'acumulació de les cèl·lules que expressen Hsp10 és similar en condicions fisiològiques i en condicions d'estrès tèrmic. Sembla que la sobreexpressió de Hsp17 o Hsp10 protegeix les cèl·lules d'*E.coli* de l'estrès tèrmic fent que no sigui necessària la síntesi de les Hsps del bacteri.

N61 és la proteïna que altera de manera més important el patró de síntesi de les Hsps d'*E.coli*. Ja a 37°C s'observa un increment important en la síntesi de la majoria de Hsps del bacteri, sobretot les d'alt pes molecular i en condicions d'estrès aquesta resposta s'intensifica. La presència d'aquesta proteïna en la cèl·lula sembla que activi la

resposta a l'estrès. N61 és un proteïna molt curta que es diferencia de la resta de proteïnes heteròlogues perquè és l'única que altera l'estat de rigidesa de la membrana de manera que les cèl·lules que sobreexpressen aquesta proteïna presenten una membrana molt més rígida que les altres soques estudiades. Segurament aquest diferent estat de rigidesa és el responsable d'activar la resposta a l'estrès augmentant la síntesi de les Hsps del bacteri. En diversos treballs s'ha descrit que l'estat físico-químic de la membrana és capaç d'activar la síntesi de Hsps (Vigh *et al.*, 1998; Horváth *et al.*, 1998).

## CONCLUSIONS

- 1 – QsHsp17.4-CI protegeix les cèl·lules d'*E.coli* enfront un estrès tèrmic.
- 2 - La regió N-terminal i la regió consens II del domini  $\alpha$ -cristal·lí són imprescindibles per la funció termoprotectora de les sHsps
  - 2.1 – QsHsp10-CI, amb un codó STOP després la regió consens II del domini  $\alpha$ -cristal·lí, presenta termoprotecció però amb menor eficàcia que QsHsp17.4-CI.
  - 2.2 – El mutant N61, amb un codó STOP abans de la regió consens II del domini  $\alpha$ -cristal·lí, no és capaç de proporcionar protecció a les cèl·lules bacterianes enfront l'estrès tèrmic.
  - 2.3 – El mutant C105, amb el domini  $\alpha$ -cristal·lí i l'extensió C-terminal sencers, no és capaç de proporcionar termotolerància a les cèl·lules d'*E.coli*.
- 3 - QsHsp17.4-CI colocalitza amb la fracció membranosa i els cossos d'inclusió mentre que es troba absent en la fracció citosòlica.
- 4 – La regió N-terminal és imprescindible per la colocalització amb la fracció membrana.
  - 4.1 – El mutant C105, amb la regió N-terminal deleccionada, es localitza exclusivament en la fracció citosòlica d'*E.coli*.
  - 4.2 – Hsp10 i el mutant N61, colocalitzen amb les membranes, els cossos d'inclusió i la fracció citosòlica.
- 5 – La capacitat termoprotectora de QsHsp17.4-CI i QsHsp10-CI a *E.coli* no es relaciona amb una major estabilitat de la membrana.
  - 5.1 – La sobreexpressió de QsHsp17.4-CI i QsHsp10-CI no altera el grau de saturació dels lípids de membrana ni afecta el seu estat de rigidesa.

6 - La sobreexpressió de N61, pèptid format per la regió N-terminal de QsHsp17.4-CI que no proporciona termoprotecció, provoca un augment en la rigidesa de membrana de les cèl·lules d'*E.coli*.

6.1 – L'increment de rigidesa de membrana en les cèl·lules que sobreexpressen N61 permet una major estabilització de la membrana durant el xoc tèrmic.

7 – La regió consens II no afecta a la distribució subcel·lular de la proteïna, si bé, la seva presència modifica l'estat fisico-químic de la membrana disminuint-ne la rigidesa tant a temperatures fisiològiques com en condicions d'estrès tèrmic.

8 – L'expressió heteròloga modifica la resposta de les cèl·lules d'*E.coli* al xoc de calor de manera diferent en funció de la proteïna expressada.

8.1 – En condicions normals de creixement (37°C), la sobreexpressió de Hsp17 i N61 es correlacionen amb un augment del nivell d'expressió de les Hsps de baix pes molecular i d'alt pes molecular respectivament. La sobreexpressió de Hsp10 i C105 no modifica el patró d'expressió de les Hsps d'*E.coli*.

8.2 – En condicions d'estrès tèrmic les cèl·lules d'*E.coli* presenten un cert augment de totes les Hsps del bacteri:

- La sobreexpressió de Hsp17 provoca una major expressió de les Hsps de baix pes molecular respecte les cèl·lules control mentre que el nivell de les d'alt pes molecular, a diferència de les cèl·lules control, no augmenta mantenint-se al mateix nivell que en les cèl·lules crescudes a 37°C.
- La sobreexpressió de Hsp10 fa que, a diferència de les cèl·lules control, el patró d'expressió de les Hsps no augmenti amb la temperatura.
- La sobreexpressió de C105 provoca un lleuger augment de ClpB i IbpA/B.
- La sobreexpressió de N61 provoca un augment de les Hsps d'*e.coli*, sobretot les d'alt pes molecular.

9 – L'augment de rigidesa de membrana que provoca la sobreexpressió de N61 podria ser la responsable, directa o indirectament, de la inducció de la síntesi de la majoria de Hsps d'*E.coli*.

## **MATERIAL i MÈTODES**

---

## V.1 – EQUIPAMENT UTILITZAT

Agitador orbital, model KS 125 bàsic, JK IKA (Alemanya)

Agitador vòrtex JK IKA (Alemanya)

Aparell d'ultrafiltració d'aigua, model Mili-Q RG, Millipore (EEUU)

Autoclau AE-75, Raypa (Espanya)

Balança model KE-120A, Salter (Japó)

Bany refrigerador model TE-8A, Techne

Cabina de flux laminar NU-201-330E, Nuair

Càmara fotogràfica model MP4<sup>+</sup>, Polaroid (EEUU)

Centrifugues model RC-5B, Sorvall (EEUU); model 2K15, Sigma (Alemanya); model 201M, Sigma (Alemanya); model SW41, Beckman (EEUU).

Congelador -80°C NU-6514E, Nuair

Cromatògraf de gasos HP 3396A, Hewlett-Packard.

Escalfador/Agitador magnètic P-Selecta Agimatic

Espectrofotòmetre CE6602, CECIL (UK)

Estufa de cultiu I-280, Raypa (Espanya) amb agitador model Unimax 2010, Heidolph (Alemanya)

Fluorímetre T-format Quanta Master QM-1, Photon Technology International (EEUU)

Font d'alimentació d'electroforesi model ST304, Apelex (França) i EPS 3500XL, PharmaciaBiotech (Suècia)

Lector de microplaques de 96 pouets ELX800, Biotek (EEUU)

Microones Moulinex FM1535E



pH-metre model 2002, Crison (Espanya)  
Seqüenciador ABI PRISM 310 (Applied Biosystems)  
Transil.luminador uV model 20M, TFX (França)  
Termociclador Personal cycler, Biometra, TDI

Els productes químics utilitzats de forma general han estat reactius de grau analític procedents de les cases: Boehringer Mannheim (Alemanya), Panreac (Espanya), Serva (Alemanya) i Sigma Chemical Co. (EUA). Els productes més específics seran detallats als apartats corresponents.

## V.2 – MATERIAL BIOLÒGIC

### • Quercus suber

Prèviament a aquest treball es va realitzar una llibreria de cDNA de fel·lema de *Quercus suber*. El cDNA sencer que codifica per Qs\_Hsp17.4 va ser clonat en el vector pBluescript SK+/-.

### • Microorganismes

En el present treball s'han emprat les soques de l'espècie *Escherichia coli* que es descriuen a continuació:

### • E.coli dH5 $\alpha$ F'

És una soca hoste de clonatge pels vectors pET i pel manteniment de plasmidis, són *recA*<sup>-</sup> i presenten una elevada eficiència de transformació i una bona producció de plasmids.

Aquesta transformació prèvia a la soca d'expressió BL21 (DE3) es realitza perquè la soca d'expressió té tendència a perdre el plasmidi i per tant les cèl·lules que perden el vector se seleccionen positivament.

### • E.coli BL21

Per la producció de les proteïnes recombinants es va transformar el plasmid en cèl·lules d'*E.coli* BL21 ( $\lambda$ DE3) amb el genotip F<sup>-</sup>*omp* Tr<sub>B</sub><sup>-</sup>m<sub>B</sub><sup>-</sup>. Les soques lisògenes  $\lambda$ DE3 presenten una còpia cromossòmica del gen de la T7 RNA polimerasa insertat en el gen

*int* prevenint, d'aquesta manera, l'escissió del fag en absència del fag helper. L'expressió del gen T7 RNA polimerasa es troba sota control del promotor lacUV5 induïble per IPTG. L'addició d'aquest potent inductor en un cultiu en creixement induirà l'expressió de la T7 RNA polimerasa que, al seu torn, activarà la transcripció del cDNA clonat.

## V.3 - MÈTODES MICROBIOLÒGICS

### 3.1 - Medis de cultiu

Pel creixement i propagació de les diferents soques bacterianes s'han emprat els medis de cultiu que es descriuen a continuació. Els medis líquids s'han conservat a temperatura ambient mentre que els medis sòlids han estat guardats a 4°C en plaques de petri. La triptona, l'extracte de llevat i l'agar han estat suministrats per Difco (Difco Laboratories, EUA) i Pronadisa (Hispanlab, Espanya).

· *Medi Luria-Bertran (LB) (Sambrook i col. 1989)*

Es tracta d'un medi ric en nutrients d'ús general en biologia molecular. Durant aquest treball s'ha emprat pel cultiu de les diferents soques bacterianes utilitzades.

**Per 1 litre de medi:**

Triptona	10g
Extracte de llevat	5g
NaCl	10g
Aigua destil·lada	1L

Per l'obtenció de medi sòlid per plaques de cultiu afegir 15g d'agar (1,5% final). En tots els casos cal ajustar el pH a 7.2 amb NaOH i posteriorment esterilitzar el cultiu amb l'autoclau a 120°C durant 20 minuts i 1 atmòsfera de pressió.

La selecció de les soques transformades amb el vector d'expressió pGFPuv es va fer utilitzant ampicilina (50mg/μl) i la selecció de les cèl·lules que contenen el vector d'expressió pET29 amb kanamicina (30mg/μl).

· *Medi mínim M9 (Sambrook i col. 1989)*

Medi absent d'aminoàcids. Utilitzat per l'estudi de la síntesi *de novo* de proteïnes afegint al medi una solució d'aminoàcids marcats radioactivament.

**Per 1 litre de medi:**

Sals M9 (x5)	200ml
MgSO <sub>4</sub> 1M	2ml
Glucosa 20%	20ml
CaCl <sub>2</sub> 1M	0,1ml
Aigua destil·lada	750ml

**Per 1L de sals M9 (x5):**

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	64g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	15g
NaCl	2,5g
NH <sub>4</sub> Cl	5g

S'esterilitza a l'autoclau durant 15 minuts a 15 lb/sq. in. en un cicle líquid. La glucosa s'esterilitza per filtració.

### 3.2 - Manteniment de les soques bacterianes

Pel manteniment a curt termini (des d'uns dies fins a dos mesos) de les soques d'*E.coli*, portadores de plasmidis o no, sembrar en plaques de petri amb el medi adequat i es guardar a 4°C en posició invertida.

Pel manteniment a llarg termini es guardar en forma de glicerinat a -80°C. El procediment a seguir per l'obtenció d'un glicerinat és el següent:

1. Inocular una colònia de la soca desitjada en 3ml de medi LB
2. Incubar a 37°C en agitació entre 12 i 18 hores
3. Agafar una alíquota de 0.850ml del cultiu i transferir-la a un tub eppendorf estèril i afegir 0.150ml d'una solució de glicerol 80% esterilitzada a l'autoclau (20% final)
4. Mesclar vigorosament el tub i desar-lo a -80°C

Per inocular un cultiu a partir d'un d'aquests stocks congelats tocar amb una nança de Kòlle, esterilitzada a la flama, la superfície del glicerinat (superficial descongelat) i realitzar una estria en medi LB sòlid. Posteriorment seleccionar una colònia i inocular en un nou medi líquid. El glicerinat es retorna ràpidament al congelador evitant que es descongeli.

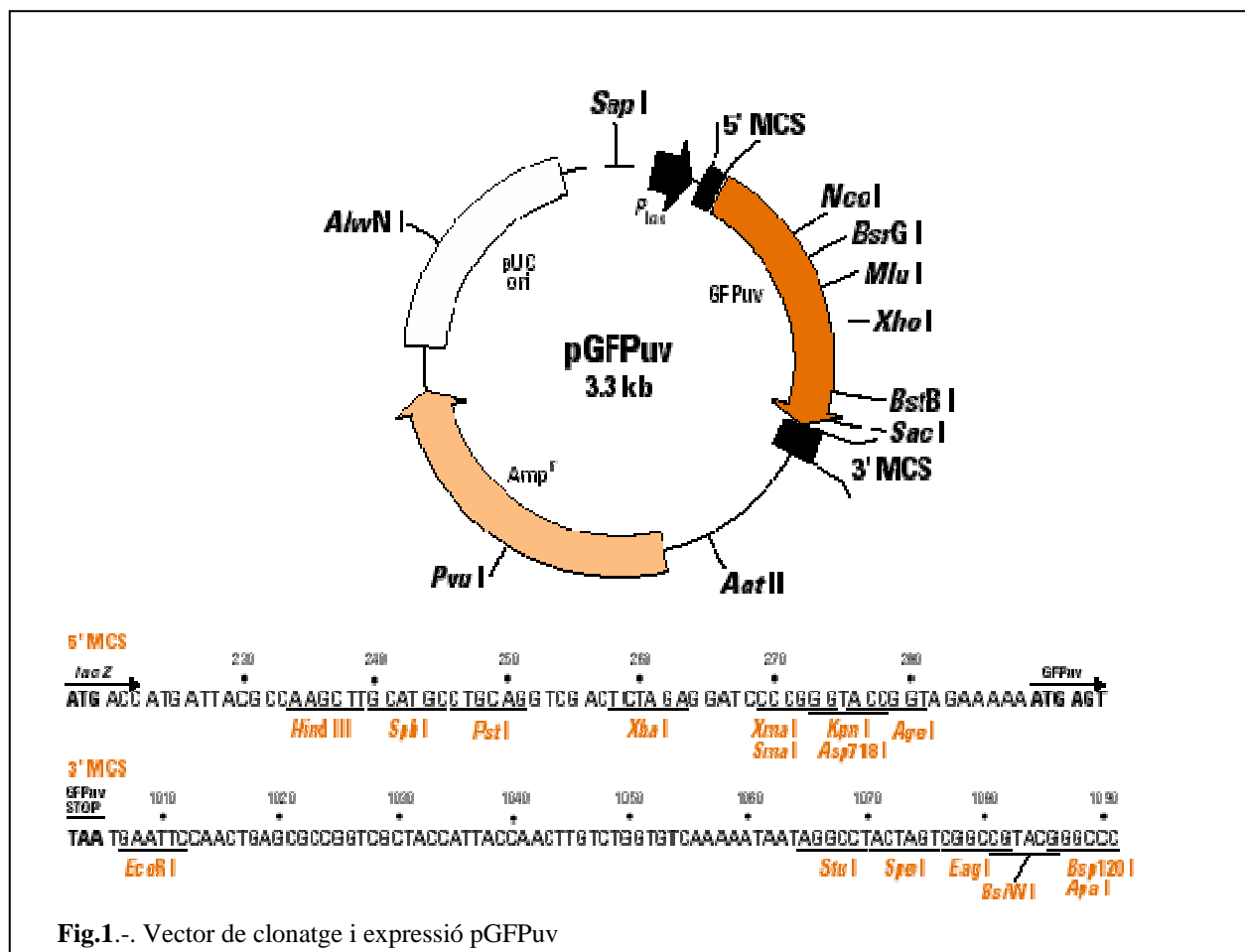
## V.4 - MÈTODES GENERALS DE DNA RECOMBINANT

### 4.1 - Vectors d'expressió bacterians

#### 4.1.1 - pGFPuv

El gen *Qs\_hsp17*, aïllat a partir de cèl·lules de fel·lema d'alzina surera, va ser clonat en el vector d'expressió bacteriana pGFPuv (Clontech Lab. Inc. PT3055, EUA) (Fig.1).

Aquest vector té 3300pb i porta la "Green Fluorescent Protein" (GFP) descrita per Cramer et al., (1996). El gen de la GFP ha estat clonat en el "Multiple Cloning Sites" (MCS) d'un derivat del pUC19, el pPD16.43 (Fire A. et al., 1990). La presència de dianes de restricció a ambdós extrems del cDNA de GFP facilita l'escissió d'aquest gen del vector i la clonació de gens a davant o darrera de la GFP i per tant la possibilitat de tenir proteïnes de fusió als dos extrems de la proteïna GFP. El gen de la GFPuv va ser inserat en el vector en fase amb el codó d'iniciació de *lacZ* del pUC19. Aquest vector té un origen de replicació que permet obtenir un elevat nombre de còpies del vector i el gen que codifica per una  $\beta$ -lactamasa que permet la selecció de les cèl·lules transformades per  $\beta$ -lactàmids com l'ampicilina.



Es va triar aquest vector d'expressió perquè la GFP és un dels millors marcadors de l'expressió i localització d'una proteïna (Prasher *et al.* 1995) ja que la seva detecció és molt senzilla, es pot realitzar a temps real en organismes vius i no necessita la introducció de cap mena de substrat o cofactor que en la majoria de casos provoquen la mort cel·lular.

#### 4.1.2 - pET29a

Per l'expressió dels gens procedents de fellema de *Quercus suber*, Qs\_Hsp10.4 i Qs\_Hsp17.4, així com de dos mutants d'aquest gen (C105 i N61) s'ha utilitzat el vector d'expressió bacterià pET29a (Fig.2).

Aquest vector té una mida de 5371pb. Conté un origen de replicació d'*E.coli*, un gen de resistència a la kanamicina, un "multiple cloning site" amb catorze possibles dianes, un promotor del tipus T7lac amb un operó *lac* i la seqüència codificant pel repressor *lac* (*lacI*), regulable per IPTG, just darrera del promotor T7. Aquest vector permet tenir una doble regulació de les proteïnes recombinants en les cèl·lules d'expressió com poden ser les E.coli BL21. Per una banda, el repressor *lacI*, s'uneix al promotor lacUV5 del genoma bacterià que controla la síntesi de la T7 RNA polimerasa mentre que per l'altra banda, s'uneix al T7lac promotor del vector pET29a evitant que la T7 RNA polimerasa pugui transcriure el gen recombinant. Aquest repressor *lacI* s'inhibeix amb la addició al medi d'IPTG. Després de l'inici de traducció del vector trobem una seqüència que codifica pel pèptid S-tag que quedarà per tant a l'extrem N-terminal de la proteïna recombinant. El vector també conté un terminador propi de la RNA polimerasa de T7, necessari per impedir que la transcripció segueixi més enllà del final del gen.



## 4.2 Clonacions en el vector d'expressió pGFPuv

El gen *Qs\_hsp17* corresponent a una proteïna de xoc de calor de baix pes va ser aïllat d'una llibreria de cDNA de cèl·lules del fel·lema de *Quercus suber* (Pla et al., 1998). El gen es trobava inicialment en el vector pBluescript<sup>R</sup> SK +/-, de Stratagene. El cDNA del gen *Qs\_Hsp17* amb i sense el codó stop va ser clonat en el vector d'expressió bacteriana pGFPuv.

### 4.2.1 – Minipreparacions de DNA plasmídic

Les minipreparacions de DNA s'han dut a terme a partir del kit comercial "Rapid plasmid Miniprep System" de Life Technologies GIBCO-BRL (EUA).

### 4.2.2 – Obtenció dels inserts per PCR

En aquestes PCRs s'ha utilitzat com a DNA motlle el gen que de *Qs\_Hsp17.4* clonat en el vector de clonació pBluescript SK +/-.

#### 4.2.2.1 – Disseny dels encebadors

El disseny dels encebadors ha estat clau per l'obtenció de les dues construccions descrites anteriorment.

· Encebadors d'HSPF :

Pst17 – complementari a l'inici de la *Qs\_Hsp17* i a un petit fragment de la regió 5' no codificant (5' UTR). A l'extrem 5' de l'encebador hi ha una diana per l'enzim de restricció *PstI* que permetrà obtenir extrems compatibles amb el vector.

Diana  
**PstI**  
 aactgcagtccaATGGCGCTCAGTCTT → Encebador Pst17  
 aggtTACCGCGAGTCAGAA (Seqüència de *Qs\_hsp17*)

17Xma – complementari a la zona codificant de l'extrem C-terminal de *Qs\_Hsp17* excepte en les dues últimes bases del codó STOP de manera que aquest no serà funcional. Al final porta incorporada una diana per l'enzim de restricció *XmaI*.

GTCAAGGCCATCGAGATCTCTGGCTAA (Final de la seqüència de Qs\_hsp17)

GTTCCGGTAGCTCTAGAGACCGAGGGCCCTCCT → Encebador 17Xma

Diana  
XmaI

#### · Encebadors d'HSPN:

Pst17 – L'encebador de l'extrem N-terminal serà el mateix que en el cas anterior

T7 – complementari al promotor T7 del vector pBluescript SK+/- situat més enllà del codó STOP de Qs\_Hsp17. Entre el final de la zona codificant de QsHsp17.4-CI i T7 hi ha una diana de restricció per l'enzim *KpnI* del vector pBluescript SK+/-.

*KpnI*

↓

QsHSP17.4-CI ←

TCT GGC TAA.....ccctatagagtctgatta

gatatacactcagcataatgctgctg → Encebador T7

#### 4.2.2.2 - Reacció d'amplificació (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. Aquesta tècnica ens ha permès obtenir els inserts desitjats que posteriorment clonarem en el vector d'expressió pGFPuv.

#### Material i solucions

BioTaq polymerase i el corresponent tampó (x10)  
MgCl<sub>2</sub> 50mM  
Barreja de dNTPs (Boehringer Mannheim) 1.25mM cadascun  
Encebadors HS6 , HS5 i T7

#### Protocol

Preparar les reaccions, carregar entre 25 i 100 pmols de DNA i incubar els tubs a les temperatures descrites.

#### Reacció (100µl)

tampó Taq	10µl
MgCl <sub>2</sub>	4.3µl
oligo HS6	23 pmol
oligo HS5	23 pmol
oligo T7	23 pmol
dNTP	16µl
Taq	0.2µl
aigua fins a	100µl



**Programa 1 (30 cicles)**

94°C 30s  
 55°C 1min  
 72°C 1min\*

\*A l'últim cicle allargar el temps d'extensió a 10 min.

**4.2.2.3 – Purificació dels fragments de PCR per columna**

Utilització de *Qiaquick PCR purification kit* (Qiagen) seguint les instruccions del fabricant.

**4.2.3 – Digestió amb enzims de restricció**

Un cop hem purificat els inserts amplificats els digerim amb els enzims de restricció adequats per poder lligar-los posteriorment al vector pGFPuv.

**Protocol****1<sup>era</sup> digestió**

DNA	40µl (2-4 g)	
H <sub>2</sub> O	3µl	
Tampó Y <sup>+</sup> 1x	4µl	
<i>Xma</i> I	3µl (1U/µl)	→ seqüència codificant per HSP-GFP

DNA	40µl (2-4 g)	
H <sub>2</sub> O	3µl	
Tampó Y <sup>+</sup> 1x	4µl	
<i>Kpn</i> I	3µl (1U/µl)	→ seqüència codificant per HSP

Incubar la mostra 2h. a 37°C  
 Aturar la reacció posant el tub 20' a 65°C

**2<sup>ona</sup> digestió**

DNA	50µl (2-4 g)	
H <sub>2</sub> O	3µl	
Tampó O <sup>+</sup>	4µl	
<i>Pst</i> I	3µl (1U/µl)	→ Els dos inserts amb el mateix enzim

Incubar la mostra 2h. a 37°C  
 Aturar la reacció posant el tub 20' a 65°C

(Els tampons i els enzims de restricció són de la casa MBI Fermentas, USA)

**4.2.4 – Purificació de banda en gel d'agarosa**

L'electroforesi horitzontal en gel d'agarosa s'ha utilitzat per separar, identificar i purificar fragments de DNA ja digerits i a punt per lligar. El gel es va realitzar a l'1% d'agarosa amb bromur d'etidi 0.1 µg/ml.

Per extreure els fragments de DNA del gel i tenir el DNA suficientment net i concentrat es va utilitzar el kit d'extracció "QIAquick Gel Extraction Kit". El DNA, carregat

negativament, s'uneix a una matriu catiònica i els contaminants es renten a través de la columna. El DNA s'elueix augmentant la força iònica del tampó.

#### 4.2.5 – Reacció de lligació

Amb la reacció de lligació obtenim plàsmids circulars amb l'insert desitjat incorporat. L'enzim T4 DNA lligasa crea enllaços fosfodiéster entre un grup fosfat de l'extrem 5' d'una molècula de DNA i un grup OH<sup>-</sup> de l'extrem 3' d'una altra molècula.

Prèviament a la lligació es va estimar la concentració de DNA en un gel d'agarosa i després tenint en compte les relacions molars que es volien mantenir entre vector i insert (1 de vector per 3 de insert) es va precipitar la quantitat d'insert i vector addients en el mateix tub per tal de minimitzar el volum de lligació.

El vector pGFPuv va ser tallat amb els mateixos enzims de restricció que els inserts originant així extrems compatibles i dirigint la lligació per tal d'obtenir un major rendiment.

Primer vam digerir amb l'enzim *PstI*, posteriorment la meitat de la mostra va ser digerida amb l'enzim *XmaI* i l'altre meitat amb l'enzim *KpnI* obtenint dos tipus de vectors, un digerit amb *PstI-XmaI* es va lligar a la zona codificant d'Hsp17 sense el codó STOP. L'altre digerit amb *PstI-KpnI* es va lligar a l'insert que codifica per la proteïna Hsp17 sencera (Per les digestions s'ha seguit el mateix protocol descrit en l'apartat 2.1.4).

##### Material i solucions per precipitar

50µl Insert (50 ng DNA)  
 50µl Vector (100 ng DNA)  
 10µl Acetat sòdic 3M  
 300µl Etanol 100%  
 1µl tRNA 10mg/µl

##### Protocol de la precipitació

Deixar la reacció 25 minuts a -20°C  
 Centrifugar durant 20 minuts a 10000 rpm  
 Abocar el sobrenadant i rentar el pellet amb etanol 70%  
 Centrifugar 10 minuts i deixar assecar el pellet completament

##### Protocol de la lligació

Ressuspendre el pellet en : 8µl H<sub>2</sub>O  
 1 µl Tampó DNA lligasa  
 1 µl DNA lligasa (1u/µl – Boehringer Mannheim)

Deixar-ho tota la nit a 15°C

### 4.3 Clonacions en el vector d'expressió pET29a

En aquest cas hem utilitzat el vector d'expressió bacterià pET29a. El que hem fet ha estat clonar dos smHsps de classe I que s'expressen en el fel·lema de *Quercus suber*: Hsp10 (Jofré et al., 2003) i Hsp17. Per tal d'estudiar el possible paper dels diferents dominis de Qs\_Hsp17 s'han clonat també dos mutants d'aquest gen: C105 i N61. A diferència del pGFPuv aquest vector no conté la proteïna verd fluorescent però, tal i com s'ha explicat en el punt 4.1.2, l'expressió de les proteïnes heteròlogues que introdueixes té una doble regulació amb l'addició de IPTG que permet controlar molt millor la seva expressió.

#### 4.3.1 – Minipreparacions de DNA plasmídic

Les minipreparacions de DNA s'han dut a terme tal i com es descriu en el punt 4.2.1

#### 4.3.2 – Obtenció dels inserts per PCR

##### 4.3.2.1 – Disseny dels encebadors

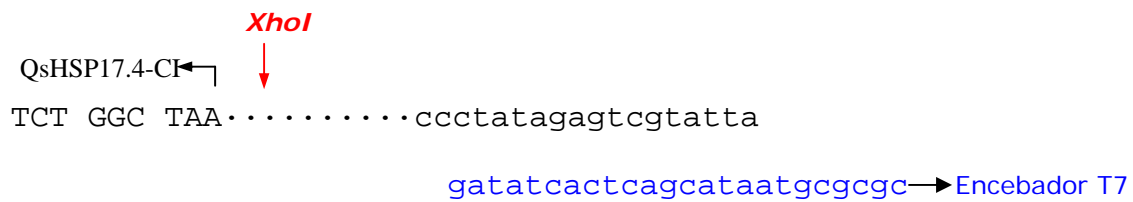
De la llibreria de cDNA obtinguda a partir de les cèl·lules de fel·lema de *Quercus suber* es van aïllar dos small heat shock proteins, Qs\_Hsp17 (Pla et al, 1998) i Qs\_Hsp10 (Jofré et al, 2003) . Qs\_Hsp10 va ser clonada per Jofré et al. (2003) en el vector d'expressió pET29a. El que hem fet nosaltres ha estat clonar en aquest vector la proteïna Qs\_Hsp17 i dos mutants d'aquesta (C105 i N61). Per aconseguir això hem dissenyat uns encebadors específics per cadascun dels 3 inserts:

· Encebadors d'Hsp17:

Bam17 – Complementari a l'inici de la Qs\_Hsp17. L'extrem 5' l'encebador inclou una diana BamHI, just davant del codó d'iniciació de la transcripció.

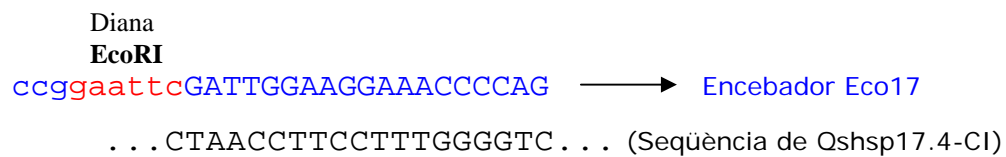
Diana  
**BamHI**  
 cgcggatccATGGCGCTCAGTCTT     $\longrightarrow$     Encebador Bam17  
 ACCGCGAGTCAGAA... (Seqüència de Qs\_hsp17)

T7 – complementari a un tros del promotor T7 situat per darrera del codó STOP de la Qs\_Hsp17. Entre l'extrem 3' de la seqüència codificant de Qs\_Hsp17 i el promotor T7 hi ha una diana de restricció per l'enzim *XhoI* del vector pBluescript SK+/-.



· Encebadors de C105:

Eco17: Complementari a l'inici del domini  $\alpha$ -cristal·lí, a partir del primer nucleòtid just després del domini N-terminal. Inclou una diana de restricció per EcoRI a l'extrem 5'.

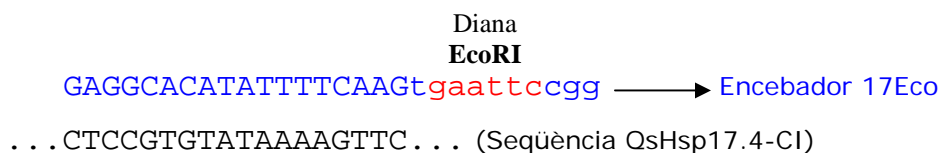


T7 – Per aquest insert l'encebador de la zona corresponent a l'extrem C-terminal de la proteïna serà el mateix que per l'insert Hsp17.

· Encebadors de N61:

Bam17 – Per aquest insert l'encebador complementari a l'extrem N-terminal de la proteïna serà el mateix que per l'insert Hsp17.

17Eco – Complementari a la seqüència anterior a la regió consens II del domini  $\alpha$ -cristal·lí. L'encebador incorpora una diana de restricció EcoRI. Aquest insert serà el més petit de tots i estarà format pel domini N-terminal i els primers 36 nucleòtids del domini  $\alpha$ -cristal·lí.



### 4.3.3 – Digestió amb enzims de restricció

Les digestions s'han dut a terme tal i com es descriu en el punt 4.2.3.

En aquest cas, però els enzims de restricció utilitzats són diferents. Els inserts que codifiquen per Qs\_Hsp10 i Qs\_Hsp17 han estat tallats amb BamHI / XhoI, el mutant C105 amb EcoRI / XhoI i el mutant N61 amb els enzims BamHI / EcoRI.

El vector també ha estat tallat amb aquestes tres parelles de enzims originant així extrems compatibles amb els de l'insert i permetent que la lligació sigui dirigida.

## 4.4 – Transformació de cèl·lules competents

La introducció de vectors plasmídics en cèl·lules *d'E.coli* es realitza mitjançant la transformació de cèl·lules competents per xoc tèrmic.

### 4.4.1 – Obtenció de cèl·lules competents

El mètode de CaCl<sub>2</sub> seguit és una variació del protocol de Cohen *et al.*, (1972) descrit per Maniatis *et al.*, (1982).

#### Material i solucions

Medi de cultiu 2xYT (1 litre):	Triptona	5g
	Extracte de llevat	10g
	NaCl	5g
	(pH 7)	

#### Protocol

Inocular 0.25 ml d'un cultiu de nit en 25 ml de medi 2xYT

Incubar a 37°C amb agitació forta fins que la D.O.<sub>600</sub> arribi a 0,45-0,55 (1,5-2 h.)

Posar el cultiu en gel durant 15-30 minuts

Posar 1ml de cultiu en dos eppendorfs estèrils prèviament refredats en gel

Centrifugar 10 segons a 12000g a 4°C

Eliminar el sobrenedant amb pipeta i ressuspensar les cèl·lules en 1ml de CaCl<sub>2</sub> 0,1 M estèril, prèviament refredat en gel. Degut a la diferència de pressió osmòtica, les cèl·lules s'inflen i es formen esferoplasts.

Ressuspensar les cèl·lules pujant i baixant suaument amb la pipeta

Mantenir en gel durant 8 minuts

Centrifugar 10 segons a 12000g a 4°C

Eliminar el sobrenadant amb una pipeta i ressuspensar les cèl·lules amb 0,1ml de la dissolució de CaCl<sub>2</sub> 0,1M freda

Mantenir les cèl·lules en gel

Fer alíquotes de 100µl i guardar-les a -80°C

#### 4.4.2 – Protocol de la transformació

La introducció de DNA en cèl·lules competents d' *E.coli* s'ha realitzat mitjançant un xoc tèrmic (Maniatis *et al.*, 1982).

##### Material i solucions

· Medi SOC (1 litre) :	Triptona	20g
	Extracte de llevat	5g
	NaCl	0.5g
	KCl 250mM	10ml

Ajustar el pH a 7.0 amb NaOH 5N

Esterilitzar la solució a l'autoclau durant 20 min a 15lb/sq

Un cop esterilitzada deixar refredar fins a 60°C i afegir 20ml d'una solució de Glucosa 1M esterilitzada per filtració

Just abans de fer servir afegir 5ml d'una solució de MgCl<sub>2</sub> 2M autoclavada

· Medi LB (1 litre):	Triptona	10g
	Extracte de llevat	5g
	NaCl	10g

Enrasar fins 1l amb H<sub>2</sub>O

Ajustar el pH a 7.5-8

##### Protocol

En 150 µl de cèl·lules competents afegir 5µl del producte de la lligació

Deixar-ho 30 minuts en gel

Aplicar un xoc tèrmic posant les mostres 90 segons a 42°C

Deixar refredar 1-2 minuts en gel

Afegir 800µl de medi SOC

Incubar a 37°C durant 45 minuts

Plaquejar 200-500µl de cultiu en plaques LB + Ampicilina

Deixar-ho tota la nit a 37°C

Fer 3-4 reestries per purificar les colònies

#### 4.5 – Seqüenciació del DNA

Els transformants considerats positius s'han confirmat per seqüenciació. S'ha utilitzat el mètode amb didesoxinucleòtids descrit per Sanger (1977). En seqüenciació automàtica s'ha utilitzat didesoxinucleòtids marcats amb 4 colorants fluorescents diferents que permeten obtenir una seqüència amb un sol tub de reacció. S'utilitzen entre 60 i 90 ng de DNA per cada reacció de seqüenciació. La mitjana de lectura és de 320 pb.

**Material i solucions**

BioTaq DNA polymerase i el corresponent tampó (10X)  
 50mM MgCl<sub>2</sub>  
 barreja de dNTPs (Boheringer Mannheim) 1.25 mM cadascun.  
 Quiaquick PCR purification kit (Quiagen)

**Protocol**

Preparar les reaccions, apartat 2.1.2.2, desnaturalitzant el DNA durant 5 min a 94°C abans d'afegir el "premix".

**Reacció (100 µl):**

DNA	2-3 µl	
tampó Taq		10 µl
encebador HS4	23 pmol	
encebador GFP1	23 pmol	
dNTPs	16 µl (200 µM cadascun)	
Taq	0.2 µl (1u)	
aigua fins 100 µl		

Purificar el producte de PCR per columna.

Quantificar el DNA mitjançant un minigel d'agarosa. Es carreguen 4 µl (esperem 20 –120 ng/4µl).

## 4.5.1 - Reacció de seqüenciació

**Material i solucions**

*DNA sequencing kit. dRhodamine terminator cycle sequencing ready reaction* (Perkin Elmer)

**Protocol**

Preparar les reaccions de PCR utilitzant el *DNA sequencing kit* i realitzar el programa 3.

**Per una reacció (10 µl):**

DNA	entre 60 i 90 ng
<i>Terminator</i>	2 µl
HS3	3.2 pmol
Aigua	fins a 10 µl

**Programa:**

92°C pausa  
 96°C 1,5 min  
 25 cicles: 96°C 30s, 50°C 15s, 60°C 4 min

## 4.5.2 - Precipitació del DNA

### Protocol

Passar els 10 µl a un eppendorf.  
Afegir 9.5 µl MgCl<sub>2</sub> 2mM i 27.5 µl etanol 96.  
Vòrtex suau  
Deixar 15 min a temperatura ambient.  
Centrifugar 20 min a 10000 rpm.  
Aspirar el sobrenedant amb una Pasteur estirada i deixar assecar 5 min.  
Guardar a la nevera i a la foscor fins que calgui resuspendre-ho.

## 4.5.3 - Ressuspensió del DNA

### Material i solucions

*Template Supression Reagent* (TSR), (Perkin Elmer)  
Tubs de seqüència de 0.5 ml i els corresponents taps (Perkin Elmer)

### Protocol

Resuspendre el DNA sec en 15 µl TSR tirant-los per sobre el sediment, no vortexar!  
10-15 min a temperatura ambient.  
Posar 3 min a 95°C.  
Deixar 5 min en gel.  
Fer un pols de centrifuga.  
Un pols de vòrtex.  
Un pols de centrifuga.  
Passar a un tub de seqüència.  
Guardar a la nevera aïllat de la llum fins el moment de seqüenciar.

## V.5 – EXPRESSIÓ DE LA PROTEÏNA RECOMBINANT

L'expressió en bacteris, de les diferents proteïnes recombinants s'ha controlat en tot moment agafant alíquotes en cada pas del procés. El contingut total de proteïna s'ha analitzat tenyint un gel de poliacrilamida-SDS amb blau de Coomassie (Maniatis 18.55 vol. 3). L'anàlisi per Western blot ens ha permès realitzar una detecció molt més sensible i específica de les sHsps.



## 5.1 – Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE)

L'electroforesi en SDS permet separar mesclades complexes de proteïnes en funció de la seva massa molecular sota l'acció d'un camp elèctric (Laemli, 1970). El SDS, un detergent aniònic, s'uneix a les proteïnes en una proporció aproximada d'1.4g de SDS per g de proteïna per eliminar les interaccions iòniques i els ponts d'hidrògen i fent desplegar la proteïna. La càrrega de la molècula de proteïna queda apantallada i el resultat és una uniformitat hidrodinàmica i una càrrega negativa proporcional al pes molecular de la proteïna. L'addició de DTT, un agent reductor, al tampó de mostres redueix els ponts disulfur de la proteïna permetent la separació de les subunitats.

### Material i solucions:

MINI-PROTEAN-II (BioRad, EEUU)

marcadors de pes molecular pretenyits BenchMark (Gibco BRL, UK)

tampó del gel separador (x4): Tris-HCl 1.3 mM pH 8.8, SDS 0.4%

tampó del gel apilador (x4): Tris-HCl 0.5 mM pH 6.8, SDS 0.4%

tampó d'elució a (x10): glicina 192 mM, Tris-HCl 25 mM pH 8.3-8.7, SDS 0.1%

solució d'acrilamida: Acrilamida 30%, N, N'-metilen-bis-acrilamida 0.8%

tampó de mostres d' SDS (x1): Tris-HCl 50 mM pH 6.8, SDS 2%, 10% glicerol i 0.1% blau de bromofenol. Afegir un 10% DTT just abans d'utilitzar.

### Protocol:

Muntar els vidres amb els separadors (0.75 mm) i comprovar amb aigua que no vessin.

Polimeritzar el gel separador (12% acrilamida)

	volum per dos gels (µl)
acrilamida	2800
tampó gel separador	1750
aigua Milli-Q	2370
persulfat amònic 10%	70
TEMED	2.8
total	7000

Afegir 200 µl d'aigua perquè formi una capa entre el gel i l'exterior i deixar polimeritzar uns 30 min.

Polimeritzar sobre el gel inferior el gel apilador (3% acrilamida) col·locant la pinta.

	volum per dos gels (µl)
acrilamida	330
tampó gel separador	500
aigua Milli-Q	1140
persulfat amònic 10%	20
TEMED	2
total	2000

Deixar polimeritzant uns 15 min.

Muntar els gels sobre el suport i posar-los a la cubeta amb el tampó d'elució. Netejar les butxaques amb tampó d'elució per treure restes d'acrilàmida.

Preparar les mostres (10,4 µg proteïna total) amb 5 µl de tampó de mostres. Si el volum és molt petit afegir aigua fins a tenir 10 µl finals.

Vortexar i bullir les mostres durant 3 min.

Carregar les mostres al gel.

Fer córrer els gels a una intensitat baixa i constant (26 mA).

## 5.2 – Electrotransferència

Consisteix en la transferència de proteïnes del gel d'electroforesi a una membrana, un suport més manejable que el gel. Un cop transferides a la membrana, les proteïnes queden immobilitzades i es detecten immunològicament. El Western blot és la suma de l'electroforesi, la transferència i la immunodetecció.

### Material i solucions:

Membranes de PVDF (Millipore, EEUU)

Mini Trans-Blot cell (BioRad, EEUU)

Paper de transferència (Schleicher & Schuell, Alemanya)

Tampó d'electrotransferència a 4°C (23 mM Glicina, 25 mM Tris, 15% metanol).

### Protocol:

Equilibració dels gels: incubar 15-20 min en tampó d'electrotransferència.

Equilibració de les membranes: un cop retallades les membranes de la mida dels gels (eliminant el gel apilador), hidratar durant 1-2 segons amb metanol 100%, incubar amb aigua durant 5 min i 10-15 min amb tampó d'electrotransferència.

Mullar els papers i les esponges i muntar el sistema de transferència amb el següent ordre a partir del pol negatiu (negre). Fent rodar una pipeta per eliminar les bombolles que puguin quedar entre els diferents components, sobretot entre el gel i la membrana:

esponja - 2 papers - gel – membrana de PVDF – 2 papers – esponja

Afegir el bloc refrigerant i connectar l'aparell a una font d'electroforesi. Mantenir un voltatge constant a 100V durant 1.5 hores.

Finalitzada la transferència es separa el gel de la membrana (els marcadors de pes molecular pretenyits serveixen per comprovar l'eficiència de la transferència).

## 5.3 – Detecció immunològica

### Material i solucions:

Anticòs policlonal de conill contra Qs\_HSP17R títol 1:2000 (Pla et al, 1998)

Anticòs contra la regió constant dels anticossos de conill conjugat amb peroxidasa (GAR-Po) (Nordic Immunology, The Netherlands)

Solució reveladora AGFA Rodinal, B&W Film Developer (AGFA, Espanya).

Solució fixadora AGFA AGEFIX B&W fixer (diluir 1/6 en aigua) (AGFA, Espanya).

Film d'autoradiografia Hyperfilm MP (AmershamPharmaciaBiotech, Suècia)

Kit de quimioluminiscència per transferència tipus western (Boehringer Mannheim, Alemanya)  
Tampó Tris/NaCl/Tween: 10 mM Tris pH 7.5, 100mM NaCl, 0.05% Tween-20  
Tampó de bloqueig: tampó Tris/NaCl/Tween amb 10% llet desnatada en pols ( o 1% BSA)

**Protocol:**

Rentar la membrana 10 min amb Tris/NaCl/Tween.

Incubar la membrana 2 h o tota la nit a temperatura ambient amb el tampó de bloqueig.

Incubar la membrana durant 1 h a temperatura ambient amb anticòs anti-Qs\_HSP17 diluït 1:4000 en tampó de bloqueig.

Rentar 4 cops la membrana, el primer de 15 min i els altres tres de 5 min amb tampó Tris/NaCl/Tween.

Incubar la membrana durant 1 hora a temperatura ambient amb GAR-Po diluït 1:4000 en tampó de bloqueig.

Preparar la solució de detecció barrejant la solució A del kit quimioluminiscent preescalfada a temperatura ambient amb la solució B en una proporció 100:1. Deixar 30 min a temperatura ambient.

Rentar 4 cops la membrana, el primer de 15 min i els altres tres de 5 min amb tampó Tris/NaCl/Tween.

A la cambra fosca, treure l'excés de tampó de la membrana col.locant-la entre paper de filtre.

Posar la membrana en una safata que conté la solució de detecció i incubar com a màxim 1 min agitant manualment.

Eliminar l'excés de solució de detecció posant la membrana entre paper de filtre i posar la membrana entre plàstic transparent.

Col.locar la membrana al cassette d'exposició amb la cara on hi ha les proteïnes (la que va estar en contacte amb el gel) cara amunt.

Col.locar un film d'autoradiografia sobre la membrana i deixar exposar el temps necessari, des de segons a mitja hora.

Revelar el film amb solució reveladora Rodinal 1:25 durant uns 30 segons passant primer el film per aigua.

Fixar amb solució fixadora. Mantenir el film a la cubeta amb fixador 03 vegades el temps que ha estat exposat. Finalment rentar amb aigua destil.lada i assecar a l'aire.

## V.6 - ASSAJOS DE VIABILITAT *in vivo*

### 6.1 – Assajos amb HSP expressada a partir de pGFPuv

Per aquests estudis de viabilitat *in vivo* de Qs\_Hsp17 s'han utilitzat les construccions obtingudes a partir del vector d'expressió pGFPuv: Hsp17, Hsp17-GFP i com a control les cèl.lules que només expressen GFP. S'ha estudiat la resistència dels diferents tipus cel.lulars enfront un estrès tèrmic.

**Material per cada experiment :**

- 3 tubs de vidre autoclavats
- 3 Monodos autoclavats
- 6 Falcons de 15ml estèrils
- 18 plaques de medi LB + Amp : 10g triptona; 5g extracte llevat; 10g NaCl; 15g Agar; Amp. 1mM
- Aprox. 400 ml de medi LB: 10g triptona; 5g extracte llevat; 10g NaCl

**Protocol:**

- **Cultiu de nit** : Posar cultius de 2 ml a 37°C
- **Cultiu de dia** : Posar 500µl de cultiu de nit en 10 ml de LB fresc  
Incubar a 37°C fins que  $Abs_{600} = 0.4$   
Aliqüota de 500µl de cultiu pel control de l'expressió  
Resuspendre en 50µl de tampó de càrrega
- **Inducció** : Afegir IPTG concentració final 1mM i ho deixem a 37°C fins que  $Abs_{600} = 0.8$   
Aliqüota de 250µl de cultiu per el control de l'expressió  
Resuspendre en 100µl de tampó de càrrega
- **Dilució** : Fins a  $Abs_{600} = 0.5$
- **Controls** : Diluir 100µl de cultiu en 10ml de medi LB ( $10^{-3}$ ).  
Agafar 10µl de la dilució anterior i els afegim en 10ml de medi LB ( $10^{-6}$ ).  
Sembrar en placa: 50µl / 100µl / 200µl
- **Estrès** : Posar les mostres 1h. a 55°C  
Sembrar 100µl en 1 placa (x3)

## 6.2 – Assajos amb rHsp10, rHsp17 i els mutants C105 i N61

En aquest cas s'han utilitzat les construccions obtingudes a partir del vector d'expressió pET29a: Hsp10, Hsp17 i els mutants C105 i N61 que ens han servit alhora com a control. S'ha estudiat la resistència dels diferents tipus cel·lulars enfront un estrès tèrmic.

**Material per cada experiment :**

- 4 tubs de vidre autoclavats
- 4 Monodos autoclavats
- 1 placa de medi LB + Kanamicina

- Aprox. 400 ml de medi LB

**Protocol:**

- El creixement de les cèl·lules, l'inducció de les diferents proteïnes recombinants i la dilució dels cultius s'ha dut a terme seguint el protocol que es descriu en l'apartat 6.1.

- **Estrès** : Posar les mostres 1h. a 52°C  
Fer dilucions seriades (desde  $10^{-1}$  fins a  $10^{-6}$ ) de les mostres després de l'estrès  
Sembrar en una placa 5µl de cada dilució

## V.7 – LOCALITZACIÓ SUBCEL·LULAR

Es va partir d'un cultiu de cèl·lules en fase exponencial de creixement induït amb IPTG. Un cop crescudes les cèl·lules d'E.coli van ser lisades i mitjançant tècniques de centrifugació i ultracentrifugació es van obtenir una sèrie de fraccions cel·lulars. En una primera centrifugació a baixa velocitat es van precipitar els cossos d'inclusió i posteriorment es va ultracentrifugar la mostra separant una fracció membranosa d'una fracció citosòlica. Les diferents fraccions obtingudes van ser carregades en un gel de poliacrilamida per tal d'estudiar-ne el contingut proteic. Es va determinar la presència de les proteïnes recombinants en les diferents fraccions per Western blot i per tincions amb Blau de Coomassie.

### 7.1 – Creixement del cultiu

**Protocol:**

- **Cultiu de nit** : Posar cultius de 2 ml a 37°C
- **Cultiu de dia** : Posar 1ml de cultiu de nit en 30ml de LB fresc  
Incubar a 37°C fins que  $Abs_{600} = 0.4$   
Aliqüota de 500µl de cultiu per el control de l'expressió  
Resuspendre en 50µl de tampó de càrrega
- **Inducció** : Afegir IPTG i ho deixem a 37°C fins que  $Abs_{600} = 0.8$   
Aliqüota de 250µl de cultiu per el control de l'expressió  
Resuspendre en 100µl de tampó de càrrega

- **Dilució** : Fins a  $Abs_{600} = 0.5$
- **Estrès** : Incubar la meitat del cultiu a 45°C durant 30 min.  
L'altra meitat servirà de control, incubar-lo a 30°C durant 30 min.

## 7.2 – Lisi i fraccionament cel·lular

### Material i solucions

50ml de tampó de lisi (50mM HEPES, 150mM KCl, 20mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM DTT)  
12g de "glass beads"  
Ultracentrifuga amb el rotor SW41 (Beckman)  
tampó de mostres (x1): Tris-HCl 50 mM pH 6.8, SDS 2%, 10% glicerol i 0.1% blau de bromofenol.  
Afegir un 10% DTT just abans d'utilitzar.

### Protocol :

Partir d'un cultiu estressat (45°C) i un control crescut a 30°C.  
Centrifugar els cultius i els resuspendre amb 1ml de tampó de lisi.  
Afegir 2,7g de "glass beads"  
Fer 1min. de vòrtex + 1min. en gel. Repetir-ho 6 vegades  
Eliminar els "glass beads" centrifugant 10 min. a 6000rpm  
Centrifugar el sobrenadant a 14.000rpm durant 10 min per fer precipitar els **coscos d'inclusió**  
Ultracentrifugar el sobrenadant a 100000g durant 1h  
En el pellet tindrem la **fracció membranosa**. Resuspendre el pellet en 30µl de tampó de mostres  
En el sobrenadant tindrem la **fracció citosòlica**. Separar-lo en 4 eppendorfs  
Afegir 4V d'acetona a cada eppendorf i deixar-ho precipitar tota la nit a -20°C  
Centrifugar a 14.000rpm durant 15 min. Eliminar l'acetona i resuspendre el pellet en 30µl de tampó de mostres

## V.8 – EFECTES DE LES PROTEÏNES RECOMBINANTS EN LA MEMBRANA BACTERIANA

### 8.1 – Anàlisi de la composició lipídica

Per tal de determinar si l'expressió de les proteïnes recombinants podia modificar la saturació dels àcids grassos de les membranes plasmàtiques es va determinar el percentatge de cadascun dels àcids grassos dels diferents lípids de membrana abans i després de l'estrès, mitjançant diferents tècniques cromatogràfiques.

#### 8.1.1 – Creixement del cultiu

Es va partir de 30ml de cultiu cel·lular crescut en les mateixes condicions que a l'apartat 7.1

#### 8.1.2 – Extracció dels àcids grassos

**Protocol:**

Partir d'un cultiu estressat (45°C) i un control crescut a 30°C.

Centrifugar-los i resuspendre el pellet en 200ml d'aigua ultrapura

Afegir 900ml d'aigua i 3,75ml de cloroform/metanol (1:2) i vortexem

Realitzar una extracció de lípids estandard d'acord amb Bligh i Dyer (Can.J.Biochem.Physiol. 1959)

Aquesta extracció està subjecte a metanolisis amb 5% de HCl en metanol a 85°C durant 2h

Amb una cromatografia de capa fina separar les tres fraccions de fosfolípids de membrana més abundants: fosfatidiletanolamines (PE), fosfatidilglicerol (PG) i les cardiolipines (CI)

Analitzar els diferents àcids grassos de cada fracció per cromatografia de gasos (HP3396A) equipat amb un detector de flama ionitzada (SP2230) i unes columnes capilars de 30cm (Supelco).

Realitzar la quantificació amb l'integrador HP3396A.

### 8.2 – Rigidesa de la membrana

Per tal de determinar si la sobreexpressió de les diferents proteïnes recombinants tenia algun efecte sobre l'estat de fluïdesa de la membrana plasmàtica es va utilitzar el 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH). Es tracta d'una molècula de forma cilíndrica capaç d'introduir-se en la membrana plasmàtica i que emet fluorescència només en condicions hidrofòbiques. A més a més, el grau de fluorescència depèn de l'estat de rigidesa de la membrana essent més elevat quan més rígida és la membrana. Aprofitant aquestes

característiques del DPH es va afegir en un cultiu cel·lular induït i es va mesurar la fluorescència emesa pels diferents tipus cel·lulars.

### **8.2.1 – Creixement del cultiu**

Es va partir d'1,5ml de cultiu cel·lular crescut en les mateixes condicions que a l'apartat 7.1 però sense aplicar cap tipus d'estrès.

### **8.2.2 – Mesures de rigidesa**

#### **Material i solucions**

Tampó PBS (Tris-buffered saline; 25mM Tris)  
1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH) 0.2M  
Fluorímetre T-format Quanta Master QM-1 (Photon Technology Internacional, Princeton, NJ)

#### **Protocol:**

Partir d'un cultiu crescut a 37°C.  
Centrifugar el cultiu a 10000rpm durant 10'  
Ajustar tots els cultius a  $OD_{360}=0.2$  amb PBS  
En un volum final de 3ml afegir 3 $\mu$ l de DPH 0.2M  
Fer les mesures de fluorescència utilitzant una longitud d'ona d'excitació de 360nm i d'emissió de 420nm.

## **8.3 – Estudis de la permeabilitat de la membrana externa**

Es va determinar l'estat físic de la membrana externa abans i durant l'estrès utilitzant com a marcador el 1-N-fenilnaftilamina (NPN). El NPN és una molècula que emet fluorescència només en condicions hidrofòbiques. A diferència del que passa amb el DPH, en condicions normals les membranes no són permeables al NPN però en condicions d'estrès les membranes esdevenen més fluïdes i permeables permetent així la entrada de les molècules de NPN que queden retingudes en la zona hidrofòbica de les membranes emetent fluorescència. Al augmentar la temperatura arriba un moment en què el NPN entra a les membranes i la fluorescència augmenta.



### 8.3.1 – Creixement del cultiu

Es van utilitzar les mateixes condicions de cultiu que les de l'apartat 7.1, l'estrès però s'aplica més endavant.

### 8.3.2 – Mesures fluorimètriques

#### Material i solucions

Tampó HEPES 5mM pH 7.4  
Termociclador T-Gradient (Biometra)  
1-N-fenilnaftilamina (NPN)  
LS50B luminiscence spectrometre (Perkin Elmer)

#### Protocol :

Partir d'un cultiu de 20ml estressat (45°C) i un control crescut a 30°C.  
Centrifugar els cultius i resuspendre'ls en tampó HEPES fins una OD<sub>600</sub> final de 6.  
Separar el cultiu en 12 eppendorfs amb 25 µl de cultiu OD<sub>600</sub> = 6 a cadascun  
Aplicar un estrès tèrmic de 30min. diferent per cadascun dels eppendorfs: 37, 37.6, 39.2, 41.9, 44.7, 47.6, 50.4, 53.3, 56.1, 58.7, 60.4, 61 °C (Termociclador T-Gradient ; Biometra)  
Després de l'estrès ajustar el volum a 700µl amb tampó HEPES i afegir NPN fins una concentració final de 5µM  
Passar la mostra a una cubeta i mesurar la fluorescència amb un fluorímetre (LS50B luminiscence spectrometre; Perkin Elmer)  
Longitud d'ona d'excitació : 350nm  
Longitud d'ona d'emissió : 420nm

## V.9– SÍNTESI PROTEICA “de novo” EN CONDICIONS D'ESTRÈS

L'expressió d'una sHsp pot modificar el patró proteic. Per tal de determinar si l'expressió de les proteïnes recombinants alterava el patró d'expressió proteic d'E.coli a condicions normals i en situació d'estrès es va fer un marcatge *in vivo* amb aminoàcids radioactius marcats amb carboni 14.

## 9.1 – Creixement del cultiu

Es van utilitzar les mateixes condicions de cultiu que les de l'apartat 7.1, l'estrès però s'aplica més endavant.

## 9.2 – Mesures de radioactivitat

### Material i solucions

Medi M9 (Sambrook *et al.*, 1989)  
Set d'aminoàcids marcats radioactivament (Amersham biosciences)  
Banys a diferents temperatures  
Tampó de mostra  
PPO al 20%

### Protocol :

Centrifugar els cultius i ressuspendre el pellet en 20ml de medi M9.  
Tornar a centrifugar i ressuspendre el pellet en 8ml de medi M9.  
Repartir 3ml d'aquest volum en 6 tubs Eppendorf (500µl a cadascun).  
Afegir 5µl d'aminoàcids marcats radioactivament.  
Incubar els tubs a 6 temperatures diferents (37, 42, 44, 46, 48 i 50°C) durant 30'.  
Centrifugar les mostres a 14000rpm durant 3' a 4°C.  
Ressuspendre el pellet en 60µl de tampó de mostra.  
Carregar les mostres en un gel de SDS-PAGE i tenyir-lo amb Blau de Coomassie tal i com es descriu en l'apartat 5.1.  
Destenyir completament en gel agitant durant 10' en àcid acètic concentrat  
Afegir l'escentillant PPO al 20% i agitar durant 1h  
Rentar el gel amb aigua i agitar-lo durant 15' en glicerol al 5%  
Assecar el gel amb paper Whatman MM3 a 80°C durant 1h  
Posar el gel en un cassette i afegir-hi el film revelador  
Deixar-lo revelant a -80°C durant 96h

**BIBLIOGRAFIA**

---

**BIBLIOGRAFIA**

- Adamska I, Kloppstech K. Evidence for the localization of the nuclear-code 22kDa heat shock protein in a subfraction of thylakoid membranes. *European J. Biochem.* 1991; 198: 375-381.
- Alamillo J, Almoguera C, Bartels D, Jordano J. Constitutive expresión of small heat shock proteins in vegetative tissues of the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. *Plant Mol Biol.* 1995; 29: 1093-1099.
- Allen SP, Polazzi JO, Gierse JK, Easton AM. Two novel heat shock genes encoding proteins produced in response to heterologous protein expression in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 1992; 174: 6938.
- Almoguera C, Coca MA, Jordano J. Tissue specific expression of sunflower heat-shock proteins in response to water stress, *Plant J.* 1993; 4:947-958.
- Almoguera C, Prieto-Dapena P, Jordano J. Dual regulation of a heat shock promoter during embryogenesis: stage-dependent role of heat shock elements. *Plant J.* 1998 Feb; 13(4):437-46.
- Amin J, Mestriil R, Voellmy R. Genes for *Drosophila* small heat shock proteins are regulated differently by ecdysterone. *Mol Cell Biol.* 1991 Dec; 11(12):5937-44.
- Andley UP, Mathur S, Griest TA, Petrash JM. Cloning, expression and chaperone-like activity of human  $\alpha$ A-crystallin. *J Biol Chem.* 1996; 271: 31973-31980.
- Banzet N, Richaud C, Deveaux Y, Kazmaier J, Gagnon J, Triantaphylides C. Accumulation of small heat shock proteins, including mitochondrial Hsp22, induced by oxidative stress and adaptive response in tomato cells. *Plant J.* 1998; 13: 519-527.
- Basha E, Lee GJ, Demeler B, Vierling E. Chaperone activity of cytosolic small heat shock proteins from wheat. *Eur. J. Biochem.* 2004; 271: 1426-1436.
- Beissinger M, Buchner J. How chaperones fold proteins. *Biol Chem.* 1998 Mar; 379(3): 245-59. Review.
- Berengian AR, Parfenova M, Mchaourab HS. Site-directed spin labelling study of subunit interaction in the  $\alpha$ -crystallin domain of small heat shock proteins: comparison of the oligomer simetry in  $\alpha$ A-crystallin, Hsp27 and Hsp16.3. *J Biol Chem.* 1999; 274: 6305-6314.
- Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 1959; 37: 911-917
- Boorstein WR, Ziegelhoffer T, Craig EA. Molecular evolution of the HSP70 multigene family. *J. Mol. Evol.* 1994; 38:1-17.
- Boston RS, Viitanen PV, Vierling E. Molecular chaperones and protein folding in plants. *Plant Mol Biol.* 1996 Oct; 32(1-2):191-222. Review.
- Bova MP, Mchaourab HS, Han Y, Fung KK. Subunit exchange of small heat shock proteins – analysis of oligomer formation of  $\alpha$ A-crystallin and Hsp27 by fluorescence resonance energy transfer and site-directed truncations. *J Biol Chem.* 2000; 275: 1035-1042.

- Bruey JM, Paul C, Fromentin A, Hilpert S, Arrigo AP, Solary E, Garrido C. Differential regulation of HSP27 oligomerization in tumor cells grown in vitro and in vivo. *Oncogene*. 2000 Oct 5;19(42):4855-63.
- Buchner J, Grallert H, Jacob U. Analysis of chaperone function using citrate synthase as nonnative substrate protein. *Methods Enzymol*. 1998;290:323-38.
- Buchner J, Schmidt M, Fuchs M, Jaenicke R, Rudolph R, Schmid FX, Kiefhaber T. GroE facilitates refolding of citrate synthase by suppressing aggregation. *Biochemistry*. 1991 Feb 12;30(6):1586-91.
- Bukau B. Regulation of the Escherichia coli heat-shock response. *Mol Microbiol*. 1993 Aug;9(4):671-80.
- Caritat A, Gutierrez E, Molinas M. Influence of weather on cork-ring width. *Tree Physiol*. 2000 Jul;20(13):893-900.
- Caritat A, Molinas M, Gutierrez E. Annual cork-ring width variability of *Quercus suber* L. in relation to temperature and precipitation (Extremadura, southwestern Spain), *Forest Ecol. Management* 85 (1996) 113–120.
- Carratu L, Franceschelli S, Pardini CL, Kobayashi GS, Horvath I, Vigh L, Maresca B. Membrane lipid perturbation modifies the set point of the temperature of heat shock response in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Apr 30;93(9):3870-5.
- Casper S i Holt C. Expression of the green fluorescent protein-encoding gene from a tobacco mosaic virus-based vector. *Gene*. 1996; 173: 69-74.
- Cehlnik ED, Cundall RB, Timmons CJ, Bowler RM. Spectroscopic Studies of *Trans*-1,6-Diphenyl-1,3,5-Hexatriene in Ordered Liquid Crystal Solution. *Proc Royal Soc London*. 1973; A: 335-387.
- Chalfie M, Tu y, Euskirchen G, Ward W, Prasher D.C. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*. 1994; 263:802-805.
- Chang ZY, Primm TP, Jakana J, Lee IH, Serysheva I, Chiu W, Gilbert HF, Quioco FA. *Mycobacterium tuberculosis* 16-kDa antigen (Hsp16.3) functions as an oligomeric structure to suppress thermal aggregation. *J Biol Chem*. 1996; 271; 7218-7223.
- Chatterjee MT, Khalawan SA, Curran BP. Alterations in cellular lipids may be responsible for the transient nature of the yeast heat shock response. *Microbiology*. 1997 Sep;143 (9):3063-8.
- Chen S, Roseman AM, Hunter AS, Wood SP, Burston SG, Ranson NA, Clarke AR, Saibil HR. Location of a folding protein and shape changes in GroEL-ES complexes imaged by cryo-electron microscopy. *Nature*. 1994; 371:261-264.
- Clark JI, Muchowski PJ. Small heat-shock proteins and their potential role in human disease. *Curr Opin Struct Biol*. 2000; 10:52-59.
- Cloney LP, Bekkaoui DR, Hemmingsen SM. Co-expression of plastid chaperonin genes and a synthetic plant Rubisco operon in *Escherichia coli*. *Plant Mol. Biol*. 1993; 1285-1290.
- Cobb BA, Petrash M. alpha-Crystallin chaperone-like activity and membrane binding in age-related cataracts. *Biochemistry*. 2000 Jan 15;41(2):483-90.
- Coca MA, Almoguera C, Jordano J. Expression of sunflower low-molecular-weight heat-shock proteins during embryogenesis and persistence after germination: localization and possible functional implications, *Plant Mol. Biol*. 1994; 25:479–492.

- 
- Coca MA, Almoguera C, Thomas TL, Jordano J. Differential regulation of small heat-shock genes in plants: análisis of a water-stressed-inducible and developmentally activated sunflower promoter. *Plant Mol Biol.* 1996; 31(4): 863-876.
  - Collada C, Gómez L, Casado R, Aragoncillo C. Purification and in vitro chaperone activity of a class I small heat shock protein abundant in recalcitrant chestnut seeds. *Plant Physiol.* 1997; 115: 71-77.
  - Coyle JE, Texter FL, Ashcroft AE, Masselos D, Robinson CV, Radford SE. GroEL accelerates the refolding of hen lysozyme without changing its folding mechanism. *Nature Struct. Biol.* 1999; 6: 683.
  - Craig EA, Gross CA. Is hsp70 the cellular thermometer? *Trends Biochem Sci.* 1991 Apr; 16(4):135-40. Review.
  - Crawford DR, Davies KJA. Adaptive response and oxidative stress. *Environ. Health Persp.* 1994; [suppl 10] 102: 25-28.
  - Cunningham AF, Spreadbury CL. Mycobacterial stationary phase induced by low oxygen tension: cell wall thickening and localization of the 16-kilodalton alpha crystallin homolog. *J Bacteriol.* 1998 Feb; 180(4):801-8.
  - DeGiorgi F, Brini M, Bastianutto C, Marsault R, Montero M, Pizzo P. Targeting aequorin and green fluorescent protein to intracellular organelles. *Gene.* 1996; 173: 113-117.
  - Derham BK, Harding JJ.  $\alpha$ -crystallin as a molecular chaperone. *Prog Retin Eye Res.* 1999; 18: 463-509.
  - DeRocher A.E., Helm K.W., Lauzon L.M. & Vierling E. Expression of a conserved family of cytoplasmic low molecular weight heat shock proteins during heat stress and recovery. *Plant Physiology* 1991; 96:1038–1047.
  - Ding L, Candido EP. Association of several small heat-shock proteins with reproductive tissues in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Biochem J.* 2000b; 351(Pt 1):13-7.
  - Ding L, Candido EP. HSP43, a small heat-shock protein localized to specific cells of the vulva and spermatheca in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Biochem J.* 2000a Jul 15; 349(Pt 2):409-12.
  - Downs CA, Jones LR, Heckathorn SA. Evidence for a novel set of small heat shock proteins that associates with mitochondria of murine PC12 cells and protects NADH:ubiquinone oxidoreductase from heat and oxidative stress. *Arch. Biochem. Biophys.* 1999; 365: 344-350.
  - Dure III L, Crouch M, Haradak J. Common amino acid sequence domains among the LEA proteins of plants, *Plant Mol. Biol.* 1989; 12:475–486.
  - Eckey-Kaltenbach H, Kiefer E, Grosskopf E, Ernst D, Sandermann Jr D. Differential transcript induction of parsley pathogenesis-related proteins and of a small heat shock protein by ozone and by heat shock, *Plant Mol. Biol.* 1997; 33: 343–350.
  - Ehrnsperger M, Hergersberg C, Wienhues U, Nichtl A, Buchner J. Stabilization of proteins and peptides in diagnostic immunological assays by the molecular chaperone Hsp25. *Anal Biochem.* 1998; 259: 218-225.
  - Ehrnsperger M, Lilie H, Gaestel M, Buchner J. The dynamics of Hsp25 quaternary structure – structure and function of different oligomeric species. *J Biol Chem.* 1999; 274: 14867- 14874.

- 
- Epel B, Padgett H, Heinlein M, Beachy R.. Plant virus movement protein dynamics probed with a GFP-protein fusion. *Gene*. 1996; 173: 75-79.
  - Esko JD, Gilmore JR, Glaser M. Use of a fluorescent probe to determine the viscosity of LM cell membranes with altered phospholipid compositions. *Biochemistry*. 1977; 16: 1881-1890.
  - Fernando P, Heikkilä JJ. Functional characterization of *Xenopus* small heat shock protein, Hsp30C: the carboxyl end is required for stability and chaperone activity. *J Biol Chem*. 2000; 5: 148-159.
  - Fire A, Kondo K, Waterston R. Vectors for low copy transformations of *C.elegans*. *Nucleic Acids Res*. 1990; 18(14): 4269-4270.
  - Forretier C, Kirschner M, Nover L. Stable transformation of an *Arabidopsis* cell suspension culture with firefly luciferase providing a cellular system for analysis of chaperone activity in vivo. *Plant Cell*. 1997; 12: 2171-2181.
  - Gernold M, Knauf U, Gaestel M, Stahl J, Kloetzel PM. Development and tissue-specific distribution of mouse small heat shock protein hsp25. *Dev Genet*. 1993; 14(2): 103-11.
  - Giardinia C, Pérez-Riba M, Lis JT. Promoter melting and TFIID complexes in *Drosophila* genes in vivo. *Genes & Dev*. 1992; 6: 2190-2200.
  - Glaczinski H, Kloppstech K. Temperature-dependent binding to the thylakoid membranes of nuclear-coded chloroplast heat-shock proteins. *Eur J Biochem*. 1988 May 2; 173(3): 579-83.
  - Glover JR, Lindquist S. Hsp104, Hsp70 and Hsp40: a novel chaperone system that rescues previously aggregated proteins. *Cell*. 1998; 94: 73.
  - Goloubinoff P, Mogk A, Peres Ben-Zvi A, Tomoyasu T, Bukau B. Sequential mechanism of solubilization and refolding of stable protein aggregates by a chaperone network. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1999; 96: 13732-13737.
  - Groenen P, Merck K, de Jong WW, Bloemendal H. Structure and modifications of the junior chaperone  $\alpha$ -crystallin from lens transparency to molecular pathology. *FEBS*. 1994; 225: 1-19.
  - Gurley WB, Key JL. Transcriptional regulation of the heat-shock response: A plant perspective. *Biochemistry*. 1991; 30: 1-12.
  - Györgyey J, Gartner A, Németh K, Magyar Z, Hirt H, Heberle-Bors E, Dudits D. Alfalfa heat shock genes are differentially expressed during somatic embryogenesis. *Plant Mol Biol*. 1991; 16: 999-1007.
  - Haley DA, Bova MP, Huang QL, Wchaourab HS, Stewart PL. Small heat-shock protein structures reveal a continuum from symmetric to variable assemblies. *J Mol Biol*. 2000; 298: 261-272.
  - Härndahl U, Sundby C. Does the chloroplast small heat shock protein protect photosystem II during heat stress *in vitro*? *Physiologia Plantarum*. 2001; 111: 273-275.
  - Harrington HM, Alm DM. Interaction of heat and salt shock in cultured tobacco cells. *Plant Physiol*. 1988; 88: 618-625.
  - Haslbeck M, Braun N, Stromer T, Richter B, Model N, Weinkauff S, Buchner J. Hsp42 is the general small heat shock protein in the cytosol of *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J*. 2004; 23: 638-649.

- 
- Haslbeck M, Buchner J. Chaperone function of sHsps. *Prog Mol Subcell Biol.* 2002; 28: 37-59. Review
  - Haslbeck M, Walke S, Stromer T, Ehrnsperger M, White HE, Chen SX, Saibil HR, Buchner J. Hsp26: a temperature-regulated chaperone. *EMBO J.* 1999; 18: 6744-6751.
  - Heckathorn SA, Ryan SL, Baylis JA, Wang D, Hamilton III EW, Cundiff L, Luthe DS. In vivo evidence from an *Agrostis stolonifera* selection genotype that chloroplast small heat shock proteins can protect photosystem II during heat stress. *Funct Plant Biol.* 2002; 29: 933-944.
  - Heikkila JJ, Ohan N, Tam Y, Ali A. Heat shock protein gene expression during *Xenopus* development. *Cell Mol Life Sci.* 1997 Jan; 53(1): 114-21.
  - Helander IM, Mattila-Sandholm T. Fluorometric assessment of Gram-negative bacterial permeabilization. *J Applied Microbiol.* 2000; 88: 213-219.
  - Helm KW, Lee GJ, Vierling E. Expression and native structure of cytosolic class II small heat shock proteins. *Plant Physiol.* 1997; 114: 1477-1485.
  - Hernandez L.D., Vierling E. Expression of low molecular weight heat-shock proteins under field conditions. *Plant Physiology* 1993; 101: 1209-1216.
  - Hitotsumatsu T, Iwaki T, Fukui M, Tateishi J. Distinctive immunohistochemical profiles of small heat shock proteins (heat shock protein 27 and alpha B-crystallin) in human brain tumors. *Cancer.* 1996; 77: 352-361.
  - Hong SW, Lee U, Vierling E. Arabidopsis hot mutants define multiple functions required for acclimation to high temperatures. *Plant Physiol.* 2003; 132(2): 757-767.
  - Horváth I, Glatz A, Varvasovszki V, Torok Z, Pali T, Balogh G, Kovacs E, Nadasdi L, Benko S, Joo F, Vigh L. Membrane physical state controls the signaling mechanism of the heat shock response in *Synechocystis* PCC 6803: identification of hsp17 as a "fluidity gene". *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Mar 31; 95(7): 3513-8.
  - Horwitz J, Bova MP, Ding LL, Haley DA, Stewart PL. Lens alpha-crystallin: function and structure. *Eye.* 1999 Jun; 13 ( Pt 3b): 403-8.
  - Horwitz J.  $\alpha$ -crystallin can function as a molecular chaperone. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1992; 89: 10449-10453.
  - Horwitz J. The function of alpha-crystallin in vision. *Semin Cell Devel. Biol.* 11: 53-60.
  - Howart CJ. Molecular responses of plants to an increased incidence of heat shock. *Plant, cell and environment.* 1991; 14: 831-841.
  - Hsu AL, Murphy CY, Kenyon C. Regulation of aging and age-related disease by DAF-16 and heat shock factor. *SCIENCE.* 2003; 300: 1142-1145.
  - Hura T. The use of fluorescence polarization to measure membrane fluidity. In: analytical methods in plant stress biology, ed.. Filek M, Biesaga-Koscielniak J, Marcinska I. The Franciszek Górski, Kraków 2004.
  - Ingram J, Bartels D. The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 1996; 47: 377-403.
  - Jacquier-Sarlin MR, Polla BS. Dual regulation of heat-shock transcription factor (HSF) activation and DNA-binding activity by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: role of thioredoxin. *Biochem J.* 1996 Aug 15; 318 ( Pt 1): 187-93.



- 
- Jakob U, Gaestel M, Engel K, Buchner J. Small heat shock proteins are molecular chaperones. *J Biol Chem.* 1993; 268:1517-1520.
  - Jinn TL, Yeh YC, Chen YM, Lin CY. Stabilization of soluble proteins in vitro by heat shock proteins-enriched ammonium sulphate fractions from soybean seedlings. *Plant Cell Physiol.* 1989; 30: 463-467.
  - Jinn TL, Chang P, Cheng YM, Key JL, Lin CY. Tissue-type-specific heat-shock response and immunolocalization of class I low-molecular-weight heat-shock proteins in soybean. *Plant Physiol.* 1997; 114(2): 429-438.
  - Jinn TL, Chen YM, Lin CY. Characterization and physiological function of class I low-molecular-mass, heat-shock protein complex in soybean. *Plant Physiol.* 1995; 108: 693-701.
  - Jinn TL, S.H. Wu, C.H. Yeh, M.H. Hsieh, Y.C. Yeh, Y.M. Chen, C.Y. Lin. Immunological kinship of class I low molecular weight heat shock proteins and thermostabilization of soluble proteins in vitro among plants. *Plant Cell Physiol.* 1993; 34:1055-1062.
  - Jobin MP, Delmas F, Garmyn D, Divies C, Guzzo J. Molecular characterization of the gene encoding an 18-kilodalton small heat shock protein associated with the membrane of *Leuconostoc oenos*. *Appl Environ Microbiol.* 1997 Feb; 63(2):609-14.
  - Joe MK, Park SM, Lee YS, Hwang DS, Hong CB. High temperature stress resistance of *Escherichia coli* induced by a tobacco class I low molecular weight heat-shock protein. *Mol Cells.* 2000; 10: 519-524.
  - Jofré A., Molinas M. & Pla M. A 10kDa class I sHsp protects *Escherichia coli* from oxidative and high temperature stress. *Planta.* 2003; 217:813-819.
  - Johnson JE, Cornell RB. Amphitropic proteins: regulation by reversible membrane interactions (review). *Mol. Membr. Biol.* 1999; 37:11-12.
  - Johnston MK, Benson P, Rodgers TM, Brodl MR. Slow Heating of barley aleurone layers to heat shock temperature preserves heat shock sensitive cellular properties. *American J Botany.* 2002; 89(3):401-409.
  - Jong WW, Caspers GJ, Leunissen J. Genealogy of the  $\alpha$ -crystallin-small heat shock protein superfamily. *Int J Biological Macromolecules.* 1998; 22:151-162.
  - Kahana J. i Silver P. pp. 9.7.22-9.7-28. in *Current protocols in molecular biology*. Ausabel F. *et al.*, (eds.). Green and Wiley, New York. 1996.
  - Kappe G, Verschuure P, Philipsen RL, Staalduinen AA, Van de Boogaart P, Boelens WC, De Jong WW. Characterization of two novel human small heat shock proteins: protein kinase-related HspB8 and testis-specific HspB9. *Biochim Biophys Acta.* 2001 Jul 30; 1520(1):1-6.
  - Kato K, Goto S, Hasegawa K, Shinohara H, Inaguma Y. Responses to heat shock of alpha B-crystallin and HSP28 in U373 MG human glioma cells. *Biochem. Biophys. Acta.* 1993; 1175:257-262.
  - Kato K, Hasegawa K, Goto S, Inaguma Y. Dissociation as a result of phosphorylation of an aggregated form the small stress protein, hsp27. *J. Biol. Chem.* 1994; 269: 11274-11278.
  - Kim KK, Kim R, Kim SH. Crystal structure of a small heat shock protein. *Nature.* 1998; 394: 595-599.

- Kirschner M, Winkelhaus S, Thierfelder JM, Nover L. Transient expression and heat-stress-induced co-aggregation of endogenous and heterologous small heat-stress proteins in tobacco protoplasts. *Plant J.* 2000; 24: 397-411.
- Kitagawa M, Matsumura Y, Tsuchido T. Small heat shock proteins, IbpA and IbpB, are involved in resistances to heat and superoxide stress in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Letters.* 2000; 184: 165-171.
- Klemenz R, Andres AC, Fröhli E, Schäfer R, Aoyama A. Expression of the murine small heat shock proteins hsp25 and alpha B-crystallin in the absence of stress. *J. Cell Biol.* 1993; 120: 639-645.
- Klemenz R, Fröhli E, Steiger RH, Schäfer R, Aoyama A. alpha B-crystallin is a small heat shock protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1991; 88: 3652-3656.
- Koag MC, Fenton RD, Wilkens S, Close TJ. The binding of maize DHN1 to lipid vesicles. Gain of structure and lipid specificity. *Plant Physiol.* 2003; 131(1): 309-316.
- Kokke BP, Leroux MR, Candido EP, Boelens WC, de Jong WW. *Caenorhabditis elegans* small heat shock proteins Hsp12.2 and Hsp12.3 form tetramers and have no chaperone-like activity. *FEBS Lett.* 1998; 433: 228-232.
- Kokke BP, Boelens WC, de Jong WW. The lack of chaperone-like activity of *Caenorhabditis elegans* Hsp12.2 cannot be restored by domain swapping with human alphaB-crystallin. *Cell Stress Chaperones.* 2001 Oct; 6(4): 360-7.
- Kovács E, Török Z, Horváth I, Vigh L. Heat stress induces association of the GroEL-analog chaperonin with thylakoid membranes in cyanobacterium, *Synechocystis* PCC 6803. *Plant Phys. Biochem.* 1994; 32: 285-293.
- Krief S, Faivre JF, Robert P, Le Douarin B, Brument-Larignon N, Lefrere I, Bouzyk MM, Anderson KM, Greller LD, Tobin FL, Souchet M, Brill A. Identification and characterization of cvHsp. A novel human small stress protein selectively expressed in cardiovascular and insulin-sensitive tissues. *J Biol Chem.* 1999 Dec 17; 274(51): 36592-600.
- Laemli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970; 227: 680-685.
- Lambert H, Charette SJ, Bernier AF, Guimond A, Landry J. HSP27 multimerization mediated by phosphorylation-sensitive intermolecular interactions at the amino terminus. *J Biol Chem.* 1999; 274: 9378-9385.
- Lang L, Miskovic D, Fernando P, Heikkila JJ. Spatial pattern of constitutive and heat shock-induced expression of the small heat shock protein gene family, Hsp30, in *Xenopus laevis* tailbud embryos. *Dev Genet.* 1999; 25(4): 365-74.
- Lee GJ, Roseman AM, Saibil HR, Vierling E. A small heat shock protein stably binds heat-denatured model substrates and can maintain a substrate in a folding competent state. *EMBO J.* 1997; 16: 659-671.
- Lee GJ, Vierling E. A small heat shock protein cooperates with heat shock protein 70 systems to reactive a heat-denatured protein. *Plant Physiol* 2000; 122: 189-197.
- Leroux MR, Ma BJ, Batalier G, Melki R, Candido EP. Unique structural features of a novel class of small heat shock proteins. *J. Biol Chem.* 1997a; 272: 12847-12853.
- Leroux MR, Melki R, Gordon B, Batelier G, Candido EP. Structure-function studies on small heat shock protein oligomeric assembly and interaction with unfolded polypeptides. *J Biol Chem.* 1997b; 272: 24646-24656.

- Linder RA, Carver JA, Ehrnsperger M, Buchner J, Esposito J, Behlke G, Lutsch G, Kotlyarov A, Gaestel M. Mouse Hsp25, a small heat shock protein – the role of its C-terminal extension in oligomerization and chaperone action. *Eur J Biochem.* 2000; 267: 1923-1932.
- Llompарт B. Patró d'acumulació d'una proteïna de xoc de calor (sHsp) en surera (*Quercus suber*). Treball de tesina realitzat en el laboratori de Biologia Cel·lular Vegetal de la Universitat de Girona. 1998
- Loh B, Grant C, Hancock RE. Use of the fluorescent probe 1-N-phenyl-naphthylamine to study the interactions of aminoglycoside antibiotics with the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial agents and Chemotherapy.* 1984; 26: 546-551.
- Loones MT, Chang Y, Morange M. The distribution of heat shock proteins in the nervous system of the unstressed mouse embryo suggests a role in neuronal and non-neuronal differentiation. *Cell Stress Chaperones.* 2000 Oct;5(4):291-305.
- Löw D, Brändle K, Nover L, Forretier C. Cytosolic heat-stress proteins Hsp17.7 class I and Hsp 17.3 class II of tomato act as molecular chaperones in vivo. *Planta.* 2000;211:575-582.
- Ludin B, Doll T, Meill R, Kaech S, Matus A.. Application of novel vectors for GFP-tagging of proteins to study microtubule-associated proteins. *Gene.* 1996; 173: 107-111.
- Lund AA, Blum PH, Bhatramakki D, Elthon TE. Heat-stress response of maize mitochondria. *Plant Physiol.* 1998; 116: 1097-1110.
- Lund AA, Rhoads DM, Lund AL, Cerny RL, Elthon TE. In vivo modifications of the maize mitochondrial small heat stress protein, HSP22. *J Biol Chem.* 2001 Aug 10;276(32):29924-9. Epub 2001 Jun 07.
- Malik MK, Slovin JP, Hwang CH, Zimmerman JL. Modified expression of a carrot small heat shock protein gene, hsp17.7, results in increased or decreased thermotolerancedouble dagger. *Plant J.* 1999; 20; 89-99.
- Marin R, Tanguay RM. Stage-specific localization of the small heat shock protein Hsp27 during oogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Chromosoma.* 1996 Sep;105(3):142-9.
- McCarty JS, Walter GC. DnaK, hsp73, and their molten globules. Two different ways heat shock proteins respond to heat. *J Biol Chem.* 1992 Mar 15;267(8):5279-85.
- Medina-Escobar N, Cárdenas J, Muñoz-Blanco J, Caballero JL. 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.* 1998; 36: 33-42.
- Mendoza JA, Horowitz PM. The chaperonin assisted and unassisted refolding of rhodanasa can be modulated by its N-terminal peptide. *J. Protein Chem.* 1994; 15-22.
- Merck KB, Groenen PJTA, Voorter CEM, de Haard-Hoekman WA, Horwitz J, Bloemendal H, de Jong WW. Structural and functional similarities of bovine  $\alpha$ -crystallin and mouse small heat shock protein – a family of chaperones. *J Biol Chem.* 1993; 268:1046-1052.
- Michaud S, Morrow G, Marchand J, Tanguay RM. *Drosophila* small heat shock proteins: cell and organelle-specific chaperones? *Prog Mol Subcell Biol.* 2002;28: 79-101. Review.
- Miernyk JA. Protein folding in the plant cell. *Plant Physiol.* 1999; 121: 695-703.
- Mogk A, Schlieker C, Friedrich KL, Schonfeld HJ, Vierling E, Bukau B. Refolding of substrates bound to small Hsps relies on a disaggregation reaction mediated most efficiently by ClpB/DnaK. *J Biol Chem.* 2003 Aug 15; 278(33): 31033-42.

- 
- Mogk A, Tomoyasu T, Goloubinoff P, Rüdiger S, Röder D, Langen H, Bukau B. Identification of thermolabile E.coli proteins: prevention and reversion of aggregation by DnaK and ClpB. *EMBO J.* 1999; 18: 6934.
  - Montfort R, Basha E, Friedrich KL, Slingsby C, Vierling E. Crystal structure and assembly of a eukaryotic small heat shock protein. *Nature structural biology.* 2001; 8(12): 1025-1030.
  - Montfort R, Slingsby C, Vierling E. Structure and function of the small heat shock protein/ $\alpha$ -crystallin family of molecular chaperones. *Advances in protein chemistry.* 2002;59:105147.
  - Morange M, Favet N, Loones MT, Manuel M, Mezger V, Michel E, Rallu M, Sage J. Heat shock genes and development. In *Stress of life: From molecules to man.* P. Csermely ed., *Annals of the New York Academy of Sciences.* 1998; 851, 117-122.
  - Nakamoto H, Suzuki N, Roy SK. Constitutive expression of a small heat-shock protein confers cellular thermotolerance and thermal protection to the photosynthetic apparatus in cyanobacteria. *FEBS Lett.* 2000 Oct 20; 483(2-3):169-74.
  - Narberhaus F. Alpha-crystallin-type heat shock proteins: socializing minichaperones in the context of a multichaperone network. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2002; 66(1): 64-93.
  - Nover L, Bharti K, Doping P, Mishra SK, Ganguli A, Scharf KD. Arabidopsis and the heat stress transcription factor world: how many heat stress transcription factors do we need? *Cell Stress Chaperones.* 2001 Jul;6(3):177-89. Review.
  - Nover L, Scharf K.D, Heat stress proteins and transcription factors, *CLMS Cell Mol. Life Sci.* 1997;53:80–103.
  - Nurkiyanova K.M, Ryabov E.V, Commandeur U, Duncan G.H, Canto T, Stewart M.G, Mayo M.A, Taliensky M.E.. Tagging potato leafroll virus with the jellyfish green fluorescent protein gene. *J. General Virology.* 2000; 81:617-626.
  - Parsell DA, Kowal AS, Singer MA, Lindquist S. Protein disaggregation mediated by heat shock protein Hsp104. *Nature.* 1994; 372:475.
  - Pasta SY, Raman B, Ramakrishna T, Rao ChM. Role of the conserved SRLFDQFFG region of the  $\alpha$ -crystallin, a small heat shock protein. Effect on oligomeric size, subunit exchange and chaperone-like activity. *J. Biol.Chem.* 2003; 278: 51159-51166.
  - Piper PW. The heat shock and ethanol stress responses of yeast exhibit extensive similarity and functional overlap. *FEMS Microbiol Lett.* 1995 Dec 15;134(2-3):121-7. Review.
  - Pitto L, Lo Schiario F, Giuliano G, Terzi M. Análisis of the heat shock protein during somatic embryogenesis of carrot. *Plant Mol Biol.* 1983; 2: 231-237.
  - Pla M, Huguet G, Verdaguer D, Puigderrajols P, Llompert B, Nadal A, Molinas M. Stress proteins co-expressed in suberized and lignified cells and in apical meristems. *Plant Science.* 1998;139:49-57.
  - Plumier JC, Hopkins DA, Robertson HA, Currie RW. Constitutive expression of the 27-kDa heat shock protein (Hsp27) in sensory and motor neurons of the rat nervous system. *J Comp Neurol.* 1997 Aug 4;384(3):409-28.
  - Polle A. & Rennenberg H. Significance of antioxidants in plant adaptation to environmental stress. In *Plant Adaptation to Environmental Stress* (eds L. Fowden, F.T. Mansfield & J. Stoddard), 1993; 263–273. Chapman & Hall, London, UK.

- 
- Prändl R, Kloske E, Schoffl F. Developmental regulation and tissue-specific differences of heat shock gene expression in transgenic tobacco and Arabidopsis plants. *Plant Mol Biol.* 1995 Apr; 28(1):73-82.
  - Prasher D.C, Eckenrode V.K, Ward W.W, Prendergast F.G, Cormier M.J. Primary structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Gene.* 1992; 111: 229-233.
  - Prasher DC. Using GFP to see the light. *Trends Genet.* 1995; 11(8): 320-323. Review.
  - Puigderrajols P, Jofré A, Mir G, Verdaguer D, Huguet G, Molinas M. Developmentally and stress-induced small heat shock proteins in cork oak somatic embryos. *J Exp Bot.* 2002 Jun; 53(373):1445-52.
  - Puigderrajols P, Mir G, Molinas. Ultrastructure of early secondary embryogenesis by multicellular and unicellular pathways in cork oak (*Quercus suber* L.). *Annals of Botany.* 2001; 87(2): 179-189.
  - Ramakrishna W, Deng Z, Ding CK, Handa AK, Ozminkowski RH Jr. A novel small heat shock protein gene, *vis1*, contributes to pectin depolymerization and juice viscosity in tomato fruit. *Plant Physiol.* 2003 Feb; 131(2):725-35.
  - Ritossa F. A new puffing pattern induced by heat shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia.* 1962; 18: 571-573.
  - Robert B, Caritat A, Bertoni G, Vilar L, Molinas M. Nutrient content and seasonal fluctuations in the leaf component of cork oak (*Quercus suber*) litterfall. *Vegetatio.* 1996; 122: 29-35.
  - Romberger JA, Hejnowicz Z, Hill JF, *Plant Structure, Function and Development*, Springer Verlag, New York. 1993, 347–458.
  - Roy SK, Hiyama T, Nakamoto H. Purification and characterization of the 16-kDa heat shock responsive protein from the thermophilic cyanobacterium *Synechococcus vulcanus*, which is an  $\alpha$ -crystallin related, small heat shock protein. *Eur J Biochem.* 1999; 262:406-416.
  - Rüdiger S, Germeroth L, Schneider-Mergener J, Bukau B. Substrate specificity of the DnaK chaperone determined by screening cellulose-bound peptide libraries. *EMBO J.* 1997; 16:1501.
  - Sabehat A, Lurie S, Weiss D. Expression of heat shock proteins at low temperatures. a possible role in protecting against chilling injuries. *Plant Physiol.* 1998; 117:651-658.
  - Sabehat A, Weiss D, Lurie S. The correlation between heat shock accumulation and persistence and chilling tolerance in tomato fruit. *Plant Physiol.* 1996; 110:531-537.
  - Saibil H. Molecular chaperones: containers and surfaces for folding, stabilising or unfolding proteins. *Curr Opin Struct Biol.* 2000; 10:251-258.
  - Sales K, Brandt W, Rumbak E, Lindsey G. The LEA-like protein HSP 12 in *Saccharomyces cerevisiae* has a plasma membrane location and protects membranes against desiccation and ethanol-induced stress. *Biochim Biophys Acta.* 2000 Feb 15; 1463(2):267-78.
  - Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning. A laboratory manual.* Cold Spring Harbour Laboratory Press. 1989.
  - Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1977; 74: 5463-5467.

- 
- Schärf KD, Siddique M, Vierling E. The expanding family of *Arabidopsis thaliana* small heat stress proteins and a new family of proteins containing alpha-crystallin domains (Acd proteins). *Cell Stress Chaperones*. 2001 Jul;6(3):225-37.
  - Schöffl F, Prändl R, Reindl A. Regulation of the heat-shock response. *Plant Physiol*. 1998 Aug; 117(4):1135-41. Review.
  - Sébastien M, Geneviève M, Julie M, Tanguay RM. *Drosophila* small heat shock proteins: cell and organelle-specific chaperones? In: *Small Stress Proteins*, ed Arrigo A-P and Müller WEG. Heidelberg, Springer-Verlag.
  - Sharma KK, Kumar RS, Kumar GS, Quinn PT. Synthesis and characterization of a peptide identified as a functional element in  $\alpha$ A-crystallin. *J. Biol. Chem*. 2000; 275: 3767-3771.
  - Shearstone JR, Baneyx F. Biochemical characterization of the small heat shock protein IbpB from *Escherichia coli*. *J Biol Chem*. 1999; 274:9937-9945.
  - Shigapova N. Alteration of membrane physical state regulates the *E.coli* heat shock response. PhD thesis. Institute of Biochemistry, Biological Research Center. Szeged (Hungary). 2003.
  - Shtikerman M, Lorimer GH, Englander SW. Chaperonin function: folding by forced unfolding. *Science*. 1999; 284: 822.
  - Smirnov N. Plant resistance to environmental stress, *Curr. Op. Biotech*. 1998; 9:214–219.
  - Smulders RHPH, Carver JA, Linder RA, van Boekel MA, Bloemendal H, de Jong WW. Immobilization of the C-terminal extension of bovine alpha-crystallin reduces chaperone-like activity. *J Biol Chem*. 1996; 271: 29060-29066.
  - Smýkal P, Hrdý I, Pechan PM. High-molecular-mass complexes formed in vivo contains smHsps and Hsp70 and display chaperone-like activity. *Eur J Biochem*. 2000; 267:2195-2207.
  - Soto A, Allona I, Collada C, Guevara M, Casado R, Rodriguez-Cerezo E, Aragoncillo C, Gomez L. Heterologous expresión of a plant small heat shock protein enhances *Escherichia coli* viability under heat and cold stress. *Plant Physiol*. 1999; 120: 521-528.
  - Squires CL, Pedersen S, Ross BM, Squires C. ClpB is the *Escherichia coli* heat shock protein F84.1. *J. Bacteriol*. 1991; 173: 4254.
  - Stromer T, Fischer E, Richter K, Haslbeck M, Buchner J. Analysis of the regulation of the molecular chaperone Hsp26 by temperature-induced dissociation. *J. Biol. Chem*. 2004; 279: 11222-11228.
  - Studer S, Obrist M, Lentze N, Narberhaus F. A critical motif for oligomerization and chaperone activity of bacterial  $\alpha$ -heat shock proteins. *Eur. J. Biochem*. 2002; 269: 3578-3586.
  - Sun TX, Das BK, Liang JJN. Conformational and functional differences between recombinant human lens  $\alpha$ A and  $\alpha$ B-crystallin. *J Biol Chem*. 1997;272:6220-6225.
  - Sun TX, Liang JJN. Intermolecular exchange and stabilization of recombinant human  $\alpha$ A and  $\alpha$ B-crystallin. *J Biol Chem*. 1998; 273:286-290.

- Sun W, Bernard B, van de Cotte B, van Montagu M, Verbruggen N. At-Hsp17.6A, encoding a small heat shock protein in *Arabidopsis*, can enhance osmotolerance upon overexpression. *Plant J.* 2001; 27: 407-415.
- Sun W, van Montagu M, Verbruggen N. Small heat shock proteins and stress tolerance in plants. *Biochem Biophys Acta.* 2002; 1577:1-9.
- Thomas JG, Baneyk F. roles of the *Escherichia coli* small heat shock proteins IbpA and IbpB in thermal stress management: comparison with ClpA, ClpB and HtpG *in vivo*. *J. Bacteriol.* 1998; 180: 5165.
- Tissières A, Mitchell HK, Tracy UM. Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: relation to chromosome puffs. *J Mol Biol.* 1974 Apr 15;84(3):389-98.
- Török Z, Goloubinoff P, Horváth I, Tsvetkova NM, Glatz A, Balogh G, Varvasovski V, Los DA, Vierling E, Crowe JH, Vigh L. *Synechocystis* HSP17 is an amphitropic protein that stabilizes heat-stressed membranes and binds denatured proteins for subsequent chaperone mediated refolding. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001; 98:3098-3103.
- Tsvetkova NM, Horvath I, Torok Z, Wolkers WF, Balogi Z, Shigapova N, Crowe LM, Tablin F, Vierling E, Crowe JH, Vigh L. Small heat-shock proteins regulate membrane lipid polymorphism. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Oct 15;99(21):13504-9.
- Turgay K, Hahn J, Burghoorn J, Dubnau D. Competence in *Bacillus subtilis* is controlled by regulated proteolysis of a transcription factor. *EMBO J.* 1998; 17: 6730.
- van Boegelen RA, Neidhart FG. Ribosomes as sensors of heat and cold shock in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1990; 87: 5589-5593.
- van Bogelen RA, Acton MA, Neidhardt FC. Induction of the heat shock regulon does not producethermotolerance in *Escherichia coli*. *Genes & Dev.* 1987; 1: 525.
- van de Klundert FA, Smulders RH, Gijzen ML, Linder RA, Jaenicke R, Carver JA, de Jong WW. The mammalian small heat-shock protein Hsp20 forms dimers and is a poor chaperone. *Eur. J. Biochem.* 1998; 258: 1014-1021.
- van den Oetelaar PJM, van Someren PFHM, Thompson JA, Siezen RJ, Hoenders HJ. *Biochemistry.* 1990;29:3488-3493.
- Veinger L, Diamant S, Buchner J, Goloubinoff P. The small heat shock protein IbpB from *E.coli* stabilizes stress-denatured proteins for subsequent refolding by a multichaperone network. *J Biol Chem.* 1998; 273: 11032-11037.
- Vierling E. The small heat shock protein in plants are members of an ancient family of heat induced proteins. *Acta Physiol Plant.* 1997; 19: 539-547.
- Vierling E. The role of heat shock proteins in plants. *Annual Review Plant Physiology Plant Molecular Biology.* 1991; 42:579-620.
- Vigh L, Los D, Horváth I, Murata. The primary signal in the biological perception of temperature: Pd-catalysed hydrogenation of membrane lipids stimulated the expression of the desA gene in *Synechocystis* PCC6803. *N. Proc Natl Acad Sci.* 1993; 90:9090-9094.
- Vigh L, Maresca B, Harwood JL. Does the membrane's physical state control the expression of heat shock and other genes?. *Trends Biochem Sci.* 1998; 23: 369-374.
- Visioli G, Maestri E, Marmioli N. Differential display-mediated isolation of a genomic sequence for a putative mitochondrial LMW HSP specifically expressed in conditions of

- induced thermotolerance in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Plant Mol. Biol. 1997; 34: 517-527.
- Vuillard L, Freeman A. Preparation of active proteins from inclusion bodies. U.S. Dept. Commerce. Molecular Biology Protocols. 2000.
  - Wang S. i Hazelrigg T. Implications for bcd mRNA localization from spatial distribution of exu protein in *Drosophila* oogenesis. Nature. 1994; 369:400-403.
  - Waters ER, Garrett J, Vierling E. Evolution, structure and function of the small heat shock proteins in plants. J. of Experimental Botany. 1996;47(96):325-338.
  - Waters ER, Vierling E. Chloroplast small heat shock proteins: evidence for atypical evolution of an organelle-localized protein. Proc Natl Acad Sci USA. 1999; 96:14394-14399.
  - Waters ER. The molecular evolution of the small heat shock proteins in plants. Genetics. 1995;141:785-795.
  - Wehmeyer N, Hernández LD, Finkelstein, Vierling E. Synthesis of small heat shock proteins is part of the developmental program of late seed maturation, Plant Physiol. 1996; 112:747-757.
  - Wehmeyer N, Vierling E. 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. 2000 Apr;122(4):1099-108.
  - Whetten R, Sederoff R. Lignin Biosynthesis. Plant Cell. 1995 Jul;7(7):1001-1013
  - Wojtaszek P. Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. Biochem J. 1997 Mar 15;322 ( Pt 3):681-92. Review.
  - Wollgiehn R, Neumann D. Stress response of tomato cell cultures to toxic metals and heat shock: differences and similarities. J Plant Physiol. 1995; 146: 736-742.
  - Wu C. Heat shock transcription factors: structure and regulation. Ann Rev Cell Dev Biol. 1995; 11: 441-469.
  - Xu Z, Sigler PB. GroEL/GroES: structure and function of a two-stroke folding machine. J. Struct. Biol. 1998; 124:129.
  - Yeh CH, Chang PF, Yeh KW, Lin WC, Chen YM, Lin CY. Expression of a gen encoding a 16.9-kDa heat-shock protein, Oshsp16.9, in *Escherichia coli* enhances thermotolerance. Proc Natl Acad Sci USA. 1997; 94:10967-10972.
  - Yeh CH, Chen YM, Lin CY. Functional regions of rice heat shock protein Oshsp16.9, required for conferring thermotolerance in *Escherichia coli*. Plant Physiol. 2002; 128: 661-668.
  - Zantena A, Verlaan-De Vries M, Maasdam D, Bol S, van der Eb A. Heat shock protein 27 and  $\alpha$ B-crystallin can form a complex, which dissociates by heat shock. J Biol Chem. 1992; 267:12936-12941.
  - zur Nieden U, Neumann D, Bucka A, Nover L. Tissue specific localization of heat stress proteins during embryo development, Planta 1995; 196:530-538.