

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA I BIOLOGÍA
MOLECULAR

CLONACIÓN DEL CDNA Y EXPRESIÓN DEL GEN DE UNA
PROTEÍNA DE LA CROMATINA DE EMBRIÓN DE
GUISANTE

JOSEFA CASTILLO ALIAGA

UNIVERSITAT DE VALENCIA
Servei de Publicacions
2002

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 19 de
Desembre de 2001 davant un tribunal format per:

- Dr. D. Luís Franco Vera
- Dr. D. Juan Carbonell Gisbert
- Dra. Dña. Montserrat Pagés Torrens
- Dr. D. Juan Jordeno Fraga
- Dr. D. Esteban Ballestar Torín

Va ser dirigida per:

Prof. Dr a. M^a Isabel Rodrigo Aleixandre

©Copyright: Servei de Publicacions
Josefa Castillo Aliaga

Depòsit legal:

I.S.B.N.:84-370-5632-2

Edita: Universitat de València
Servei de Publicacions
C/ Artes Gráficas, 13 bajo
46010 València
Spain
Telèfon: 963864115

**Clonación del cDNA y expresión del gen de una
proteína de la cromatina de embrión de guisante**

Memoria presentada por
Josefa Castillo Aliaga
para optar al grado de
Doctora en Ciencias Biológicas

Directora
María Isabel Rodrigo Aleixandre



Departament de Bioquímica i Biologia Molecular

Facultat de Ciències Biològiques



M. Isabel Rodrigo Alexandre, Dra. en Ciencias Biológicas y Profesora Titular del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Biológicas de la Universitat de València.

CERTIFICA:

Que la presente Tesis titulada “Clonación del cDNA y expresión del gen de una proteína de la cromatina de embrión de guisante”, con la que la licenciada en Ciencias Biológicas Dña. Josefa Castillo Aliaga opta al grado de Doctora ha sido realizada bajo su dirección en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Biológicas.

Para que así conste a todos los efectos, se expide la presente certificación en Burjassot, 20 de Septiembre de 2001.

M. Isabel Rodrigo Alexandre

Agradecimientos

Durante los últimos años he pensado mucho en esta página, mentalmente he escrito miles de frases sin embargo intentaré ser breve. En primer lugar, quiero dar las gracias a Maribel, mi directora de tesis, por sus enseñanzas, su dedicación y por entusiasmarse con el trabajo sin por ello dejar de ser crítica. Su constante ánimo y apoyo tanto a nivel científico como a nivel personal han sido fundamentales para que este trabajo haya llegado a su fin. Quiero agradecer también a Luís Franco la confianza depositada en mí desde el principio. Al Dr Juan Renau y a los miembros de su laboratorio la ayuda prestada en los experimentos de microscopía electrónica. Al Dr Ramón Serrano y todos los miembros de su laboratorio quiero agradecer su disposición en los ya lejanos primeros meses, en especial a Josan, Gabino y Feli por su inestimable ayuda y amistad.

A todos los compañeros del Departamento de Bioquímica quiero agradecer su apoyo constante, en especial a Gerardo, Lola, Marisa y Merche por sus palabras de ánimo a lo largo del pasillo. A Gema, Ana, Marcial, Helena, Mar y Maite, gracias a todos por estar ahí en los momentos difíciles. No me olvido de los que están fuera, Vicente, Julia y Tere a los que he hecho mucho de menos. A Paco debo el haberme sacado de más de un apuro informático.

El laboratorio de cromatina ha sido mi refugio desde que empecé como alumna colaboradora, de aquellos tiempos guardo un especial recuerdo de mis dos primeros “maestros”, Esteban y Gabino. Desde entonces han pasado por él personas que de una forma u otra me han ayudado, en especial quiero agradecer a Asún su cariño y preocupación constante a pesar de la distancia. Por haberme sufrido más de cerca merecen un agradecimiento especial: Silvia, por compartir nado, café y confesiones y Nelo, por nuestras discusiones y por estar siempre ahí. Finalmente a todos los becarios por compartir, cerveza en mano, los mejores “momentos de la tesis”.

Quiero dar las gracias a Montse y Toni, por hacer de su casa la mía, por su respeto, apoyo y cariño. A todos mis amigos de cuadrilla, que a pesar de no verme el pelo en estos últimos meses me siguen queriendo y apoyando. A Amparo por nuestras largas charlas. A Merche, por su insustituible amistad. A todos los compañeros del Brasilia por compartir “faena” y cenas a altas horas de la noche.

A Rosa, por ser mi amiga del alma.

Finalmente a toda mi familia. En particular, a mi prima Mónica por preguntarme siempre por mi tesis, ¡por fin!. A mis primas Marlena y Sheila, por contagiarme de su alegría y sus locuras. A mi tía Yeyes por estar siempre ahí. A mi yaya Yina, por sus relatos y sus oraciones, y a mi yaya María por las cuatro “esquinitas” y las tardes de “boladillos”. A las dos por cuidarme y quererme tanto. A Ignacio y a Roberto, como hermanos para mí, por su sentido del humor y por ayudarme y animarme a continuar en estos últimos meses. Al pequeño de la casa, Nacho, que nos recuerda cada mañana que hay que seguir sonriendo.

A Javí, por sufrir a mi lado toda la tesis, sobre todo durante los últimos meses y hacer que cada momento de estos últimos años haya valido la pena.

A mi madre y mis hermanos M^a Carmen, Lola y Jose, que son para mí imprescindibles. Gracias por aguantar mis manías y quererme tanto. A todos gracias por vuestro valor, que da sentido a mi vida, y la hace más fácil.

Mis padres han sido el mejor ejemplo a seguir. A ellos se lo debo todo.

A mi padre

*Ahí va el olor de la rosa
cógela en tu sin razón
Juan Ramón Jiménez*

“En todo camino hay una piedra, está en vos saltarla o esculpirla”

Sergio L. Cirigliano

Índice

Abreviaturas

1. Introducción

| | |
|---|----|
| 1.1. Desarrollo del embrión en guisante | 1 |
| 1.2. Germinación | 4 |
| 1.3. Expresión génica durante la maduración de la semilla | 5 |
| 1.4. Aspectos estructurales y evolutivos de la superfamilia cupina | 10 |
| 1.5. Cambios en el núcleo asociados al estado durmiente de las semillas | 16 |
| 1.5.1. Organización de la cromatina: el nucleosoma y estructuras de orden superior | 17 |
| 1.5.2. Las histonas como participantes en la regulación de la expresión génica | 19 |
| 1.5.3. Proteínas no histonas que modulan la estructura del DNA y actúan como elementos arquitectónicos en complejos nucleoproticos | 21 |
| 1.5.4. Cambios estructurales de la cromatina asociados a la transición estado durmiente/germinación de las semillas y su relación con la tolerancia a la deshidratación | 24 |
| 1.6. Antecedentes de la proteína p16 de <i>Pisum sativum</i> | 25 |
| 1.7. Objetivos | 27 |

2. Materiales y Métodos

| | |
|--|----|
| 2.1. Material biológico | 29 |
| 2.1.1. Material vegetal | 29 |
| 2.1.1.1. Imbibición de las semillas | 29 |
| 2.1.1.2. Germinación de las semillas y tratamientos | 29 |
| 2.1.1.3. Crecimiento de las plantas y tratamientos | 30 |
| 2.1.2. Manipulación de <i>Escherichia coli</i> | 31 |
| 2.1.2.1. Cepas de <i>E. coli</i> | 31 |
| 2.1.2.2. Condiciones de crecimiento | 31 |
| 2.1.2.3. Preparación de células competentes y transformación de <i>E. Coli</i> | 32 |

| | |
|--|----|
| 2.2. Aislamiento del cDNA que codifica la proteína p16 | 32 |
| 2.2.1. Construcción y rastreo de una genoteca de cDNA de ejes embrionarios de guisante | 32 |
| 2.2.2. Secuenciación del DNA | 33 |
| 2.3. Subclonado del cDNA que codifica p16 | |
| 2.3.1. Diseño de construcciones | 34 |
| 2.3.2. Purificación de plásmidos de <i>E. coli</i> | 34 |
| 2.3.3. Reacciones de PCR | 35 |
| 2.3.4. Reacciones enzimáticas | 35 |
| 2.3.5. Electroforesis en gel de agarosa y purificación de fragmentos | 36 |
| 2.4. Análisis genómico de <i>psp54</i> de <i>Pisum sativum</i> | 37 |
| 2.4.1. Preparación de DNA genómico | 37 |
| 2.4.2. Análisis mediante <i>Southern blot</i> | 37 |
| 2.4.3. Marcaje radiactivo y purificación de la sonda de cDNA <i>psp54</i> | 38 |
| 2.4.4. Hibridación y autorradiografía | 38 |
| 2.5. Aislamiento y análisis de RNA | 39 |
| 2.5.1. Preparación de RNA total de plantas | 39 |
| 2.5.2. Análisis mediante <i>Northern blot</i> | 40 |
| 2.5.3. Marcaje de la sonda, hibridación y autorradiografía | 40 |
| 2.6. Aislamiento y manipulación de proteínas | 41 |
| 2.6.1. Extracción de proteína total | 41 |
| 2.6.2. Fraccionamiento subcelular | 41 |
| 2.6.3. Extracción de proteínas nucleares de <i>Pisum sativum</i> | 42 |
| 2.6.3.1. Aislamiento de núcleos | 42 |
| 2.6.3.2. Extracción de proteínas solubles en ácido | 42 |
| 2.6.4. Inmunolocalización de p16 en núcleos aislados | 43 |
| 2.6.5. Electroforesis y análisis <i>Western blot</i> | 43 |
| 2.6.6. Purificación y secuenciación de p16 | 44 |
| 2.6.6.1. Purificación de p16 mediante RP-HPLC | 44 |
| 2.6.6.2. Digestión trípica, purificación de péptidos y secuenciación | 45 |
| 2.6.7. Expresión y purificación de proteínas recombinantes | 45 |
| 2.6.7.1. Expresión y purificación de proteínas recombinantes en <i>E. coli</i> | 45 |
| 2.6.7.2. Expresión <i>in vitro</i> de (his ₆)p16 | 46 |
| 2.6.8. Análisis <i>Far Western blot</i> | 46 |
| 2.6.9. Ensayos de <i>pull-down</i> | 47 |

| | |
|---|----|
| 2.6.10. Ensayos de interacción de (his) ₆ p16 con el DNA | 47 |
| 2.6.10.1. Ensayo de movilidad en gel nativo | 48 |
| 2.6.10.2. Cambios en la conformación del DNA en presencia de p16 | 48 |
| 2.7. Análisis informático de las secuencias de cDNA y proteína en los bancos de datos | 49 |

3. Resultados y Discusión

| | |
|---|----|
| 3.1. Aislamiento y caracterización del cDNA que codifica la proteína p16 | 51 |
| 3.1.1. Purificación y secuenciación parcial de la proteína p16 | 51 |
| 3.1.2. Aislamiento del cDNA que codifica la proteína p16 | 53 |
| 3.1.2.1. Construcción de una genoteca de cDNA de ejes embrionarios de guisante | 53 |
| 3.1.2.2. Análisis de la secuencia de cDNA del gen que codifica p16 | 54 |
| 3.1.3. Caracterización de la secuencia de aminoácidos codificada por el gen <i>psp54</i> | 56 |
| 3.1.3.1. Análisis de la secuencia de aminoácidos del precursor p54 | 56 |
| 3.1.3.2. Comparación de la secuencia de aminoácidos de p54 en las bases de datos | 58 |
| 3.1.3.3. Aspectos evolutivos y estructurales de p54 | 61 |
| 3.1.3.3.1. p54 y las globulinas de reserva proceden de un único ancestro común | 61 |
| 3.1.3.3.2. p54, nuevo miembro de la superfamilia cupina | 67 |
| 3.2. Estudio de la expresión del gen <i>psp54</i> | 70 |
| 3.2.1. Organización del gen <i>psp54</i> en el genoma de <i>Pisum sativum</i> | 70 |
| 3.2.2. Expresión del gen <i>psp54</i> en diferentes órganos de la planta | 71 |
| 3.2.3. Estudio de la expresión temporal del gen <i>psp54</i> | 73 |
| 3.2.3.1. Expresión del gen <i>psp54</i> durante la embriogénesis | 73 |
| 3.2.3.2. Expresión del gen <i>psp54</i> durante la germinación y crecimiento de la plántula | 75 |
| 3.2.4. Estudio de la regulación de la expresión del gen <i>psp54</i> bajo condiciones de estrés | 77 |
| 3.2.4.1. Análisis de la expresión del gen <i>psp54</i> en respuesta a estrés hídrico | 77 |
| 3.2.4.2. Análisis de la expresión del gen <i>psp54</i> en respuesta a estrés hídrico en órganos de la planta adulta | 82 |
| 3.2.4.3. Análisis de la expresión del gen <i>psp54</i> en respuesta a herida | 84 |
| 3.2.4.4. Efecto de temperaturas extremas en la expresión del gen <i>psp54</i> | 85 |
| 3.2.5. Expresión de genes homólogos a <i>psp54</i> en otras especies de plantas | 87 |

| | |
|--|------------|
| 3.3. Localización subcelular de p16 | 89 |
| 3.3.1. Fraccionamiento subcelular | 89 |
| 3.3.2. Inmunolocalización de p16 en núcleos aislados | 90 |
| 3.4. Interacción de p16 con la cromatina | 92 |
| 3.4.1. Interacción de p16 con las histonas <i>in vitro</i> | 92 |
| 3.4.1.1. Estudio de la interacción de p16 con las histonas mediante <i>Farwestern blot</i> | 93 |
| 3.4.1.1.1. Expresión de [³⁵ S]-Met(his ₆)p16 <i>in vitro</i> | 93 |
| 3.4.1.1.2. Análisis mediante <i>Farwestern blot</i> | 93 |
| 3.4.1.2. Interacción de p16 con las histonas mediante experimentos de <i>pull-down</i> | 95 |
| 3.4.1.2.1. Expresión en <i>E. coli</i> de la proteína de fusión GST-p16 | 95 |
| 3.4.1.2.2. Experimentos de <i>pull-down</i> | 95 |
| 3.4.2. Interacción de p16 con el DNA | 99 |
| 3.4.2.1. Expresión de (his ₆)p16 en <i>E. coli</i> | 100 |
| 3.4.2.2. Interacción de p16 con diferentes moléculas de DNA | 101 |
| 3.4.2.3. Interacción de p16 con mononucleosomas | 103 |
| 3.4.2.4. Superenrollamiento de un DNA plasmídico relajado en presencia de p16 | 104 |
| 3.5. Posible función de la proteína p16 | 106 |
| | |
| 4. Conclusiones | 109 |
| | |
| 5. Bibliografía | 111 |

Abreviaturas

| | |
|---------|--|
| ABA | ácido abscísico |
| BCIP | 5-bromo-1-cloro-3-indolil-fosfato |
| BSA | albúmina de suero bovino |
| Dnasa I | desoxiribonucleasa |
| DAF | días después de la floración |
| DTT | ditiotreitól |
| EDTA | ácido etilendiamino-tetraacético |
| IPTG | isopropyl- β -D-tiogalactopiranosido |
| HAI | horas después de la imbibición |
| MOPS | ácido 3-morfolino-propano-sulfónico |
| NBT | azul de nitrotetrazolio |
| PCA | ácido perclórico |
| PCR | reacción en cadena de la polimerasa |
| PMSF | fluoruro de parametilsulfonato |
| RNasa | ribonucleasa |
| RP-HPLC | cromatografía líquida de alta resolución en fase invertida |
| SDS | dodecil sulfato sódico |
| PAGE | electroforesis en gel de poliacrilamida |
| TCA | ácido tricloroacético |
| TPCK | tosil-L-fenilalanina clorometil cetona |
| Tris | 2-amino-2-hidroximetil-1,3-propanodiol |
| X-gal | 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido |

1. Introducción

El ciclo de vida de las angiospermas se caracteriza por la existencia de un periodo durmiente que separa el desarrollo embrionario y postembrionario del esporofito. Durante las últimas etapas del desarrollo, el embrión acumula gran cantidad de nutrientes de reserva y entonces comienza un proceso de deshidratación programada y la transición al estado durmiente. El embrión puede permanecer en este estado durante largos periodos de tiempo y finalmente en respuesta a una serie de señales endógenas y/o exógenas, que pueden variar de una especie a otra, el embrión emerge del estado durmiente y comienza su desarrollo postembrionario vegetativo.

1.1. Desarrollo del embrión en guisante

La embriología de guisante ha sido ampliamente estudiada entre otros por Cooper (1938) y Marinos (1970). El ovario del guisante contiene de ocho a diez óvulos. Antes de la fertilización, el óvulo está formado por un saco embrionario haploide multicelular, rodeado de tejido esporofítico diploide, los tegumentos. Estos tegumentos dejan una abertura en el ápice de los sacos embrionarios a modo de canalículo, llamada micrópilo. Por último, un filamento conecta el óvulo con la placenta del ovario denominado funículo. En el extremo del saco embrionario más próximo al micrópilo se halla la ovocélula y dos células adyacentes, las llamadas sinérgidas. En el extremo opuesto se hallan otras tres células, las antípodas, y en el centro una célula binucleada (núcleos polares). Solo dos de estas siete células, la ovocélula y la célula central, participan directamente en la fertilización.

Cada gametófito masculino (polen) produce dos células espermáticas no flageladas. Estas dos células llegan hasta el óvulo llevadas por el tubo polínico, y entran dentro del saco embrionario a través del micrópilo. Las dos células espermáticas se liberan y una de ellas se fusiona con la ovocélula para formar el cigoto, que dará lugar al embrión. La otra célula se fusiona con los dos núcleos polares de la célula central dando lugar al endospermo. Por tanto la fertilización dispara la formación de una nueva generación esporofítica, que engloba el desarrollo de la envoltura de la semilla, el endospermo y el embrión.

Aunque la fertilización de la ovocélula y de la célula central se produce al mismo tiempo, el endospermo se desarrolla más rápidamente de modo que acaba envolviendo al embrión. En los cereales, el endospermo constituye el principal tejido de almacenamiento y persiste en la semilla madura seca. Sin embargo, en guisante, como en la mayoría de las dicotiledóneas, las reservas se almacenan en el embrión y el endospermo se reabsorbe en la semilla madura.

En guisante, el embrión está formado por dos sistemas de órganos primarios, eje y cotiledón. Estos órganos tienen un destino distinto durante el desarrollo y están compuestos por tres tejidos básicos, protodermo, procambium y meristemo fundamental, que darán lugar a los tejidos epidérmico, vascular y parenquimático de la plántula, respectivamente (Goldberg *et al.*, 1994). El eje o región del hipocotilo-radícula, contiene los meristemas de la raíz y el tallo, y dará lugar a la planta adulta tras la germinación. Por otro lado, el cotiledón, es un órgano que ha acabado su diferenciación y acumula material de reserva que será utilizado por la plántula durante su crecimiento y desarrollo, hasta que ésta sea fotosintéticamente activa. En guisante, al contrario que en otras plantas los cotiledones no funcionan como órganos fotosintéticos tras la germinación.

El desarrollo del embrión tras la fertilización se puede dividir básicamente en tres etapas (Goldberg, 1989). (1) En la primera etapa, de intensa división celular, se produce la diferenciación de los meristemas y se establece así un eje bipolar raíz-tallo que constituye el patrón básico de desarrollo de la planta. Por otro lado, se diferencian los tejidos

primarios, epidérmico, vascular y tejido fundamental. (2) Durante la segunda etapa, de expansión celular, cesa la división celular y se produce la síntesis de material de reserva en los cotiledones, de forma que el embrión alcanza su máximo tamaño. (3) Finalmente, las células del embrión y las capas de células de la semilla que lo rodean, pierden más del 90% de su contenido en agua, la actividad metabólica cesa y la semilla entra en un estadio de embrión durmiente.

La definición de estado durmiente es ambigua, quizás porque se manifiesta de formas distintas en diferentes especies (Bewley, 1997). Se podría simplificar diciendo que el estado durmiente se alcanza cuando se produce una parada en el proceso de germinación en semillas viables bajo condiciones favorables. Tras la formación de los meristemos y los sistemas de tejidos básicos no hay ninguna barrera intrínseca que impida el desarrollo de los órganos en los meristemos. De hecho, en algunas especies, durante el desarrollo de la semilla se diferencian los primordios de las hojas, raíces laterales o adventicias, y algunas veces incluso los primordios florales (Crouch, 1988). Sin embargo, en guisante, como en la mayoría de las especies, la formación de órganos queda restringida al crecimiento postgerminativo. En ambos casos, la elongación celular es inhibida en esta fase del crecimiento para que se produzca el almacenamiento de material de reserva y la parada del desarrollo posterior y, de ese modo, el embrión quede encerrado dentro de la semilla. Si un embrión inmaduro se extrae de la semilla y se cultiva en un medio simple con nutrientes, se produce la elongación celular, lo que indica que debe existir algún factor o factores en la semilla que inhiben la germinación precoz de manera que se permite que proceda el resto del desarrollo de la semilla (Crouch, 1988). A lo largo de muchos años, gran cantidad de trabajos han mostrado la existencia de diferentes mecanismos genéticos y bioquímicos que separan e integran el desarrollo del embrión y la germinación, aunque la mayor parte de estos estudios se han realizado sobre las especies de maíz y *Arabidopsis*. Recientemente, se ha demostrado que estos mecanismos operan a través de un número escaso de rutas que contienen reguladores que simultáneamente reprimen la germinación y estimulan el desarrollo del embrión (revisado en Holdsworth *et al.*, 1999). La influencia de las

hormonas en el control de la transición embrión-plántula se estableció hace muchos años. De hecho, muchos de los genes implicados en el control de la maduración del embrión y la germinación codifican proteínas que regulan la producción o sensibilidad a hormonas. Por ejemplo, el ABA es un potente inhibidor de la germinación en muchas especies, mientras que el ácido giberélico (GA_3) promueve la germinación (Kende & Zeevaart, 1997). La identificación de genes que codifican proteínas implicadas en la síntesis y percepción del ABA, ha proporcionado evidencias genéticas acerca del papel del ABA en la inducción de la maduración de la semilla y represión de la germinación. Mutaciones en estos loci trastornan la maduración del embrión (incluyendo la acumulación de material de reserva), la tolerancia a la deshidratación y la entrada en el estado durmiente.

1.2. Germinación

Por definición, la germinación implica una secuencia de eventos que comienza con la entrada de agua en la semilla seca y termina cuando parte del embrión, normalmente la radícula, se extiende hasta penetrar las estructuras que lo rodean (Bewley, 1997).

Inmediatamente después de la imbibición de la semilla se recupera la actividad metabólica y se reanuda la actividad respiratoria. Durante la germinación, probablemente, se produce la reparación del DNA dañado como consecuencia de los procesos de deshidratación e hidratación celular. Sin embargo, la síntesis de DNA se inicia con el restablecimiento de la división celular ya durante el desarrollo postgerminativo (Osborne & Boubriak, 1994).

Tanto la germinación como el desarrollo de la plántula constituyen procesos críticos para la vida del esporofito. Durante este periodo, se establece la arquitectura básica de la planta madura, siguiendo el patrón formado durante la embriogénesis, y tienen lugar cambios fisiológicos muy importantes. Se movilizan las reservas de lípidos y proteínas para proveer de carbono y nitrógeno a la plántula antes de que se inicie la fotosíntesis.

Como ya se ha comentado, las hormonas juegan un papel muy importante durante este proceso, mientras que el ABA es un potente inhibidor, GA₃ promueve la germinación. La relación entre los niveles residuales de ABA en la semilla seca, y los niveles de GA₃ durante la imbibición, así como, la capacidad de percepción de ambas hormonas podría contribuir a la decisión entre estado durmiente o germinación (Holdsworth *et al.*, 1999).

1.3. Expresión génica durante la maduración de la semilla

El proceso de maduración prepara a la semilla para la germinación y el posterior desarrollo de la planta adulta. Durante la maduración, la semilla en desarrollo aumenta dramáticamente en volumen y en masa debido a una significativa expansión celular que va acompañada por la acumulación de material de reserva. El nivel de ABA alcanza un máximo de acumulación durante la maduración temprana, de modo que suprime la germinación precoz y modula la expresión génica.

De entre los genes que se expresan durante la maduración de la semilla de guisante cabe destacar aquellos que codifican proteínas de reserva. En guisante, las proteínas de reserva de la familia de las globulinas (proteínas de reserva solubles en sal) constituyen aproximadamente el 80% de la masa proteica de la semilla madura (Evans *et al.*, 1984; Boulter *et al.*, 1987). Estas se dividen en dos grupos en base a su coeficiente de sedimentación: leguminas 11S y vicilinas 7S. En guisante, como en otras leguminosas, existe además un tercer grupo de proteínas de reserva, denominadas convicilinas, relacionadas inmunológicamente con las vicilinas (Gatehouse *et al.*, 1983). Las leguminas son proteínas hexaméricas cuyas subunidades son sintetizadas como un precursor que contiene una cadena N-terminal ácida (cadena α) y una cadena básica C-terminal (cadena β). Tras un corte proteolítico ambas cadenas permanecen unidas por un enlace disulfuro. Las vicilinas son proteínas triméricas cuyas subunidades presentan tamaños variables entre 50-70 kDa (Shewry *et al.*, 1995). Ambos grupos de globulinas presentan un alto grado de identidad de secuencia, como se discutirá en el apartado 1.4.

Las proteínas de reserva son transportadas y almacenadas en unas vacuolas especializadas denominadas cuerpos proteicos. Estas proteínas son codificadas por familias multigénicas (Bewley & Marcus, 1990) y muchas de ellas sufren modificaciones postraduccionales, como proteólisis limitada y glicosilación. En guisante, como en la mayoría de las especies, los mRNAs de las proteínas de reserva empiezan a detectarse al final de la primera etapa de la embriogénesis, es decir, cuando cesa la división celular, sin embargo su máxima expresión se alcanza durante la etapa de expansión celular. Al final del desarrollo de la semilla, los niveles de mRNA de las proteínas de reserva disminuyen hasta desaparecer completamente en la semilla madura, y sus genes permanecen silenciados durante el resto del ciclo de vida de la planta.

Tradicionalmente, se ha considerado a las proteínas de reserva como meros almacenes de nutrientes que se utilizan durante la germinación y crecimiento de la plántula. Sin embargo, recientemente se han identificado en el exudado de semillas de diferentes especies, una serie de péptidos con actividad antimicrobiana que proceden de cortes proteolíticos en el extremo N-terminal hidrofílico de algunas proteínas de la familia de las vicilinas (Marcus *et al.*, 1999). Estos autores sugieren que ciertas vicilinas poseen un papel en la defensa frente a patógenos durante la germinación de las semillas. Sin embargo, no todas poseen este extremo N-terminal hidrofílico, y es precisamente éste el caso de las vicilinas de guisante (Dure, 1990).

Otras proteínas características de las semillas, ampliamente caracterizadas en muchas especies durante los últimos veinte años, son las proteínas Lea (*Late embryogenesis-abundant*) (Dure, 1985; Galau *et al.*, 1986; Baker *et al.*, 1988; Hughes & Galau, 1989; Espelund *et al.*, 1992). Como su nombre indica, estas proteínas se sintetizan durante la última etapa de la embriogénesis y alcanzan un nivel máximo de acumulación durante la deshidratación de la semilla. Dado que su expresión está regulada por la hormona ABA (Galau *et al.*, 1986; Goday *et al.*, 1988; Giraudat *et al.*, 1994), a algunas de ellas se las ha denominado proteínas Rab (*Responsive to ABA*) (Mundy & Chua, 1988; Pla *et al.*, 1989). A diferencia de las proteínas de reserva, muchas de estas proteínas pueden ser inducidas en

tejidos vegetativos en respuesta a estrés hídrico o tratamiento con ABA (Skriver & Mundy, 1990). Aunque la mayoría de las proteínas Lea son altamente hidrofílicas (Dure *et al.*, 1989; Galau *et al.*, 1987; Hughes *et al.*, 1987) y podrían estar implicadas en la protección de tejidos frente a la deshidratación extrema, no hay todavía una función clara y definitiva para esta clase de proteínas.

Las proteínas Lea han sido clasificadas en diferentes grupos, de los cuales las proteínas Lea de clase II o deshidrinas, han sido las más estudiadas. Las deshidrinas contienen en su secuencia una serie de motivos conservados (DEYGNP, KIKEKLPG) que aparecen una o más veces. Además, poseen en muchos casos otros dos segmentos cortos caracterizados, respectivamente, por una serie de residuos de serina y por una secuencia relacionada con el sitio de unión de nucleótidos de algunas chaperonas (revisado en Close, 1997). Aparte de su aparición al final de la embriogénesis, las deshidrinas se acumulan en tejidos vegetativos expuestos a sequía así como por otros tipos de estrés hídrico como las bajas temperaturas (Houde *et al.*, 1992; Neven *et al.*, 1993), estrés salino (Mundy & Chua, 1988) e incluso por herida (Richard *et al.*, 2000). Robertson & Chandler (1992) demostraron la presencia de deshidrinas en guisante y observaron que su expresión, durante el desarrollo del cotiledón se correlacionaba con la expresión de las proteínas de reserva. Sin embargo, tras la germinación las deshidrinas eran reexpresadas en plántulas de guisante sometidas a sequía, al contrario de lo que ocurría con los genes de las proteínas de reserva, lo que indicaba una regulación diferencial de ambos tipos de proteínas.

Se ha sugerido que las deshidrinas actuarían sinérgicamente con azúcares y otros solutos para estabilizar macromoléculas, creando un capa ordenada de moléculas de agua, lo que dificultaría su desnaturalización (Ingram & Bartels, 1996; Close, 1996). Muchas proteínas y estructuras subcelulares podrían ser preservadas de esta manera durante la deshidratación de los tejidos de la planta.

Al igual que muchos organismos, las plantas responden a las altas temperaturas con la síntesis de proteínas sHSPs (*small Heat Shock Proteins*). Las sHSPs de plantas pueden dividirse en cinco familias en base a su homología de secuencia, inmunoreactividad

cruzada y localización subcelular (Vierling, 1991; Waters *et al.*, 1996; Wehmeyer & Vierling, 2000). Aunque la mayoría de las sHSPs se inducen en respuesta a estrés en los tejidos vegetativos, durante los últimos diez años se han identificado un gran número de proteínas sHSPs en diferentes especies, que se expresan durante el desarrollo de la semilla a la temperatura normal de crecimiento (Györgyey *et al.*, 1991; Almoguera & Jordano, 1992; Coca *et al.*, 1994; DeRocher & Vierling, 1994; zur Nieden *et al.*, 1995).

En guisante también se ha descrito la presencia de proteínas sHSPs citosólicas (clase I y II) que se expresan coordinadamente a lo largo del desarrollo del embrión. Estas proteínas aparecen en el embrión durante la síntesis del material de reserva y el nivel de expresión aumenta a medida que la semilla se deshidrata (DeRocher & Vierling, 1994). Un patrón de acumulación similar se ha observado en las sHSPs de clase II en girasol, mientras que las sHSPs de clase I se acumulan más tarde durante el programa de maduración de la semilla (Coca *et al.*, 1994). El ABA no parece inducir la expresión de estas proteínas en tejidos vegetativos, sin embargo, dado que la regulación de la expresión génica por ABA parece ser normalmente específica de tejido, es posible que durante el desarrollo la expresión de las sHSPs sí esté regulada por el ABA. Debido a su patrón de acumulación, durante la maduración de la semilla, diversos autores han sugerido que las sHSPs podrían estar implicadas en la adquisición del estado durmiente y/o en la tolerancia a la deshidratación, los dos procesos que caracterizan este estadio de desarrollo (Coca *et al.*, 1994; DeRocher & Vierling, 1994; zur Nieden *et al.*, 1995; Wehmeyer & Vierling, 2000). Por otro lado, estas proteínas persisten varios días durante la imbibición y germinación de la semilla y entonces disminuyen rápidamente, lo que indica que también podrían tener un papel en la rehidratación de la semilla.

La función de estas proteínas durante el desarrollo estaría confinada al citoplasma, ya que no se ha observado la expresión, durante el desarrollo, de ningún miembro de proteínas sHSPs con localización en orgánulos. Aunque no existen evidencias *in vivo*, recientes experimentos *in vitro* sugieren que las sHSPs citosólicas funcionarían como chaperonas moleculares, ya que previenen la agregación térmica de proteínas y facilitan su

reactivación posterior (Lee *et al.*, 1995). Las sHSPs de plantas podrían prevenir la agregación no específica de proteínas del citoplasma en semillas durante la deshidratación y/o asistir al plegamiento de proteínas desnaturalizadas durante la imbibición, así como en tejidos vegetativos estresados por calor (Wehmeyer & Vierling, 2000).

El desarrollo de la semilla es un proceso complejo que implica cambios secuenciales de los distintos órganos que la componen. Esto se traduce en la expresión de un gran número de genes en diferentes células a lo largo de las sucesivas fases del desarrollo. Mientras algunos de estos productos se originan en respuesta a señales de desarrollo, otros pueden por sí mismos influir en los procesos de desarrollo. La mayor parte de los estudios realizados se han dirigido hacia la descripción de los diferentes tipos de genes que se expresan en las semillas y sus patrones de expresión espacial y temporal. Sin embargo, en los últimos años se han realizado progresos realmente importantes en el descubrimiento de la estructura y el modo de acción de genes implicados directamente en el desarrollo del embrión y la maduración de la semilla, principalmente en *Arabidopsis* y maíz. Poco a poco se están estableciendo algunas cascadas de transducción de señal con sus componentes, de manera que se conocen algunos factores que modulan o incluso disparan procesos de desarrollo. De los resultados obtenidos hasta el momento parece que existe una amplia red de regulación más que una jerarquía de acciones. Por ejemplo, la idea de que los metabolitos podían actuar como moléculas señalizadoras no ha sido analizada hasta que recientemente se ha demostrado que, especialmente los azúcares, pueden regular la actividad de diversos genes. Con la nueva tecnología de chips de DNA se pueden analizar los cambios a nivel de expresión génica a gran escala, y con ello avanzar rápidamente en el conocimiento de los componentes de esta amplia red de regulación. Sin embargo, no hay que olvidar que son necesarios estudios a nivel de proteína y a niveles estructurales superiores (subcelular, celular y de la planta entera) para profundizar y ampliar nuestro conocimiento acerca de la maduración de la semilla como parte del desarrollo de la semilla

y de la vida de la planta en general (revisado en Wobus & Weber, 1999; Hodlsworth *et al.*, 1999).

1.4. Aspectos estructurales y evolutivos de la superfamilia cupina

Como se ha comentado anteriormente, pronto se observó que las proteínas de reserva de la familia de las globulinas presentaban un elevado grado de similitud de secuencia (Sherry *et al.*, 1995). Desde ese momento, se fue ampliando el número de proteínas relacionadas con las globulinas, hasta que recientemente Dunwell *et al.* (2000) han agrupado un gran número de proteínas, tanto de procariotas como de eucariotas, estructuralmente relacionadas pero funcionalmente distintas, a la que han denominado superfamilia cupina. El nombre cupina procede del latín “cupa” que significa pequeño barril ya que, como se discutirá más adelante, ésta es la estructura compartida por todas las proteínas incluídas en esta superfamilia.

El análisis de secuencia de la proteína codificada por el cDNA clonado en este trabajo, ha permitido incluir esta proteína dentro de la superfamilia cupina. Es por ello que en este apartado se hará un pequeño recorrido histórico sobre aspectos estructurales, funcionales y evolutivos de esta superfamilia.

La primera estructura tridimensional de una proteína de reserva resuelta por difracción de rayos X, fue la de la faseolina de *Phaseolus vulgaris* (Lawrence *et al.*, 1990). La comparación de la estructura tridimensional de la faseolina con la de la canavalina de *Canavalia ensiformis* (Ko *et al.*, 1993) confirmó la proximidad estructural de ambas proteínas y la existencia de un módulo duplicado en la estructura. El módulo, denominado $\alpha + \beta$, está formado por un barril de hojas β y tres hélices α . Ambas proteínas son trímericas y cada monómero está formado por dos módulos $\alpha + \beta$ (figura 1).

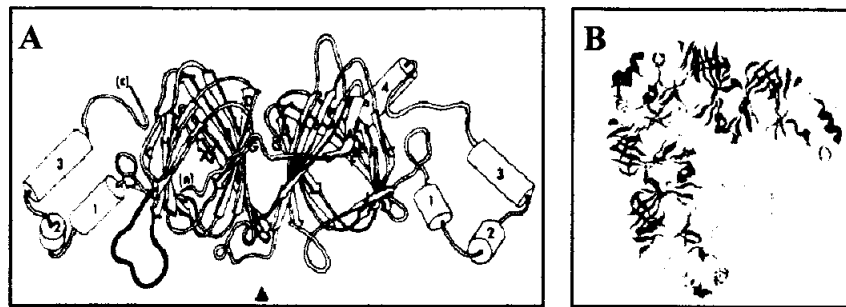


Figura 1. (A) Estructura del monómero de la faseolina, donde se indican los diferentes elementos de estructura secundaria (hélices α en amarillo y hojas β en morado) que constituyen el modelo canónico propuesto por Lawrence *et al.* (1994). La punta de flecha señala el eje de simetría. El lazo EF, aparece coloreado en fucsia. (B) Trímero de faseolina.

El alineamiento de secuencias de faseolina y canavalina con otras globulinas permitió postular un modelo canónico (Lawrence *et al.*, 1994) basado en la identificación del papel estructural de determinados residuos conservados. Los elementos que forman la estructura canónica son los siguientes:

(i) Barriles β

Los barriles β N- y C-terminales se extienden desde la hoja β A' a la hoja β J en ambos módulos N- y C-terminal de un monómero. Es una región especialmente conservada, de manera que se han producido pocas inserciones o deleciones en vicilinas y proteínas tipo vicilina. La hoja C es la más larga, en ella se produce una amplia protuberancia (β -*bulge*) debido a la existencia de un residuo de prolina, que interrumpe los puentes de hidrógeno con la hoja H, conservado en ambos barriles N- y C-terminales (Pro67 en el barril N-terminal y Pro254 en el barril C-terminal de la faseolina). Este residuo parece tener un papel estructural muy importante en el acomodamiento del dominio α -helicoidal insertado entre los segmentos de cadena J y J'. De los residuos estrictamente conservados en los dos barriles solo dos son idénticos en ambos módulos: Pro67 y Gly81 (barril β N-terminal), que corresponden estructuralmente a la Pro254 y

Gly269 (barril β C-terminal). Por último, aparece en el extremo N-terminal del polipéptido una cadena adicional, denominada hoja Z que incluye un motivo altamente conservado P(F/Y)XF. Parece ser que el papel estructural de este motivo en las proteínas 7S es permitir la interacción entre los barriles N- y C-terminales estabilizando la estructura del monómero. La zona anterior a este motivo en el extremo N-terminal del polipéptido es muy variable en cuanto a longitud y secuencia, y aparece desordenado en los estudios de rayos X.

(ii) Dominios α -helicoidales

Los dominios helicoidales N- y C-terminales sobresalen a ambos lados del monómero como un par de “ganchos”, que son básicos para la estabilización del trímero, enlazándose los dominios α -helicoidales N y C-terminales de monómeros adyacentes. Las hélices 2 y 3 presentes en ambos dominios α -helicoidales presentan similitud con el motivo hélice-vuelta-hélice descrito en ciertas proteínas de unión al DNA (Brennan & Matthews, 1989).

Los elementos descritos abarcan del 90 a 95% de las secuencias de las proteínas 7S y describen aquellas partes de la estructura que se consideran invariables. Las inserciones o deleciones se limitan a sitios concretos, y existen 28 residuos estrictamente conservados o que sólo toleran cambios conservativos suficientes para garantizar la integridad de la estructura.

Shutov *et al.* (1995) realizaron un alineamiento múltiple de las regiones N y C-terminales de ocho leguminas y siete vicilinas de varias especies de dicotiledoneas, monocotiledoneas y gimnospermas. Estos autores observaron que las regiones correspondientes a las hojas C a la D y las hojas G y H son las más conservadas y que existían dos motivos de secuencia altamente conservados: P-(X)₁₃₋₁₄-G, donde la prolina y glicina son los dos residuos estrictamente conservados en los dos dominios según el modelo canónico y un segundo motivo G-(X)₅-I-P-X-G. Por otro lado, observaron que en el dominio C-terminal, el lazo EF ha tolerado largas inserciones de hasta 60 residuos, a lo largo de la evolución (inserción I1). Finalmente, el análisis del patrón intrón/exón de los genes de vicilinas y leguminas mostró que al menos tres de las cinco posiciones de intrones en los genes de vicilinas están conservadas en los genes de leguminas. Con todo esto se propuso

que vicilinas y leguminas procederían evolutivamente de la duplicación de un gen ancestral común formado por un único módulo $\alpha + \beta$.

Bäumlein *et al.* (1995) utilizaron los motivos altamente conservados, en busca de posibles proteínas homólogas compuestas por un único dominio. Encontraron que una proteína de trigo, cuya síntesis coincide con el inicio de la germinación, denominada germina, presentaba estos dos motivos. La germina es una glicoproteína homohexamérica con una excepcional resistencia a proteasas. Previamente Lane *et al.* (1991) habían descrito que las germinas estaban claramente relacionadas con las esferulinas 1a y 1b del hongo myxomycete *Physarum polycephalum*. Al realizar el alineamiento de secuencia de estas dos proteínas con los dominios N- y C-terminales de vicilinas y leguminas, se observó que la homología que presentaban se extendía a lo largo de todos los elementos estructurales. El gen que codifica la germina no posee intrones, sin embargo, la esferulina tiene dos intrones, la posición del segundo intrón coincide exactamente con la posición del cuarto intrón en el dominio C-terminal de las globulinas. Estos autores concluyeron que las germinas y esferulinas representarían un estadio anterior a la duplicación del dominio único ancestral, en la evolución de los genes de las globulinas de la semilla. Aunque la función exacta de las esferulinas no se conoce todavía, parecen estar implicadas en procesos de deshidratación/hidratación celular durante la esporulación del hongo. La esporulación (en principio, similar a la maduración de las semillas) permite una eliminación ordenada de agua en los tejidos, dando lugar finalmente a un ciste durmiente, adecuado para la dispersión y capaz de sobrevivir en condiciones ambientales adversas. Por otro lado, Lane *et al.* (1993) descubrieron que la germina de trigo tenía actividad oxalato oxidasa convirtiendo el oxalato en CO_2 y H_2O_2 , y propusieron que el H_2O_2 generado podría promover la remodelación de tejidos mediada por peroxisomas, lo que facilitaría la entrada de agua durante la germinación. El hecho de que ambas proteínas tuviesen funciones relacionadas con procesos de deshidratación e hidratación celular llevó a Bäumlein *et al.* (1995) a sugerir que las globulinas de las semillas de espermatofitos

habrían evolucionado de un grupo de proteínas ancestrales funcionalmente implicadas en estos procesos.

Posteriormente, Braun *et al.* (1996) aislaron y caracterizaron proteínas de reserva de las cicas que contenían en su secuencia los residuos estrictamente conservados del modelo canónico. Las cicas son consideradas fósiles vivientes, ya que han sobrevivido 200 millones de años de evolución con muy pocos cambios. Sólo estas plantas y otra gimnosperma, *Ginkgo biloba*, producen células espermáticas móviles, proporcionando el nexo de unión entre gimnospermas y helechos. La búsqueda de secuencias similares en el banco de datos *Swissprot* reveló que, además de otras proteínas tipo vicilina, aparecía en soja una proteína de unión a sacarosa (Grimes *et al.*, 1992), denominada SBP (*sucrose binding protein*). La comparación directa de la canavalina con la SBP permitió sugerir una estructura similar entre la SBP y las vicilinas, además esta proteína presentaba una precisa conservación de las cinco posiciones de intrones de la vicilinas, lo que sugirió que ambos polipéptidos y sus respectivos genes estarían evolutivamente relacionados. La SBP es una proteína de 62 kDa asociada a la cara externa de la membrana plasmática de algunos tipos celulares implicados en el transporte de sacarosa en cotiledones, hojas y el floema maduro (Grimes *et al.*, 1992; Overvoorde *et al.*, 1996).

Las vicilinas y leguminas actuales están formadas por un conjunto de regiones constantes y regiones variables, éstas últimas ricas en ácido glutámico y glutamina, obviamente relacionadas con su función de reserva. El alineamiento de secuencias de diferentes vicilinas y la SBP demostraron que la SBP carecía de estas regiones variables, lo que llevó a estos autores a sugerir que las globulinas actuales podrían haber derivado de un ancestro como la SBP por inserciones de estas regiones variables ricas en glutámico y glutamina. Finalmente, Braun *et al.* (1996) agruparon todas estas proteínas, estructuralmente relacionadas pero con funciones distintas, en una única superfamilia génica.

La búsqueda de proteínas homólogas en plantas sin semillas, que pudiera dar alguna pista acerca del intermediario entre el módulo ancestral simple y el módulo duplicado de las vicilinas y leguminas, llevó a Shutov *et al.* (1998) al descubrimiento de una proteína

tipo vicilina en el helecho *Matteuccia struthiopteris*, específica de las esporas. Esta proteína (MVP) presentaba las principales características de la familia de vicilinas, además contenía dos intrones que coincidían exactamente con la posición de los intrones cuatro y cinco de otras vicilinas. La secuencia de la MVP era muy similar a las vicilinas de gimnospermas. La mayor diferencia observada entre la MVP y el resto de vicilinas fue su lazo EF extremadamente corto en el dominio C-terminal. La comparación de secuencias indicó que entre todos los miembros de la superfamilia de globulinas, compuestos por dos módulos, la MVP era la que mayor similitud de secuencia presentaba con las germinas y esferulinas, lo que sugería que la MVP representaba el ancestro de dos módulos de las globulinas de reserva y por tanto se podía considerar el eslabón molecular entre los miembros de módulo único (germinas y esferulinas) y los de dos módulos (Shutov *et al.*, 1998).

La reciente publicación de secuencias de genomas completos de arqueas y bacterias ha provocado el desarrollo de gran variedad de nuevos análisis para el estudio de la evolución de genes y proteínas, en este sentido, Dunwell *et al.* (1998, 2000) utilizaron una secuencia de nueve residuos HI/THPRATEI (“germin box”) que se encuentra muy conservada tanto en germinas como en esferulinas. El análisis de esta secuencia en las bases de datos reveló que sólo ciertos residuos estaban absolutamente conservados en todas las proteínas que lo contenían, y que había otro motivo a continuación igualmente conservado formado por las secuencias $G(X)_5HXH(X)_{11}G$ y $G(X)_5P(X)_4H(X)_3N$ separadas por una secuencia de longitud variable. Se utilizó la faseolina, cuya relación estructural con las germinas y esferulinas ya había sido descrita, como referencia estructural, y se observó que estas dos secuencias estaban contenidas en las hojas β C/D y G/H respectivamente, dentro de los dos barriles β (N- y C-terminales) de su estructura. El espacio variable entre secuencias era equivalente a las inserciones toleradas en el lazo EF (Gane *et al.*, 1998).

Un nuevo análisis de estos motivos de secuencia en las bases de datos llevó a la identificación, por primera vez, de una serie de proteínas funcionalmente diferentes pero que contenían un dominio estructural común, un barril β , tanto en procariotas como en

eucariotas, lo que permitió trazar su evolución desde bacterias y arqueas hasta eucariotas, incluyendo animales y plantas superiores. Estas proteínas fueron agrupadas y acuñadas por Dunwell *et al.* (2000) como superfamilia cupina.

Es un hecho que proteínas homólogas pueden evolucionar hacia actividades funcionales diferentes o relacionadas (Murzin, 1993), pero la serie cupina es posiblemente única en cuanto a la amplia gama de funciones que presentan las proteínas que forman parte de esta superfamilia. Entre ellas hay enzimas (isomerasas, epimerasas, ciclasas, oxidasas, descarboxilasas, deshidrogenasas), proteínas de unión a diferentes moléculas (auxinas, azúcares, DNA) y también proteínas de reserva de la semilla. Dunwell *et al.* (2000) especulan que la protocupina ancestral fue una molécula pequeña (aproximadamente 100 residuos), estable al calor, con capacidad de unir metales y de unirse de forma no específica a un amplio rango de moléculas. La estabilidad de la estructura en hojas β permitió que a lo largo de la evolución se reclutara esta estructura para una variedad de propósitos, dando lugar a proteínas funcionalmente distintas aunque muchas de ellas relacionadas con la respuesta a estreses bióticos y abióticos.

1.5. Cambios en el núcleo asociados al estado durmiente de las semillas.

Durante la última etapa del desarrollo de la semilla, el contenido en agua de los tejidos se reduce dramáticamente y la semilla entra en un periodo durmiente. Durante este estadio, los componentes celulares deben ser protegidos frente a diferentes daños inducidos por la deshidratación, que incluyen, desnaturalización de proteínas, pérdida de integridad de las membranas, y múltiples daños ocasionados por los radicales libres que se generan. Los transcritos de los genes *Lea* y algunas sHSPs son muy abundantes en este último periodo del desarrollo, y podrían ejercer un papel muy importante en la protección de los componentes celulares frente al daño inducido por la deshidratación. Sin embargo, sólo unas pocas proteínas asociadas a la deshidratación se han localizado en el núcleo, tales

como Rab17 (Godoy *et al.*, 1994), Tas14 (Godoy *et al.*, 1994), QP47 (Chiatante *et al.*, 1995), Rab28 (Niogret *et al.*, 1996) y Per1 (Stacy *et al.*, 1999).

El núcleo contiene la información necesaria para el desarrollo de un nuevo organismo, por lo tanto cualquier daño que se produzca en el DNA, la membrana nuclear o la capacidad de producir los componentes ribosómicos en el nucleolo, podría ser crítico para la germinación y el crecimiento posterior. Resulta obvio, por tanto, que los mecanismos responsables de la protección de los componentes nucleares frente a la deshidratación sean de importancia vital durante la transición de la vida embrionica a la vida vegetativa. Sin embargo, el núcleo ha recibido escasa atención en lo que se refiere a los mecanismos implicados en la tolerancia a la deshidratación.

1.5.1. Organización de la cromatina: el nucleosoma y estructuras de orden superior

El núcleo eucariota está fundamentalmente constituido por cromatina, una estructura nucleoproteica que tiene como componente más abundante el DNA y las histonas. La unidad básica de la cromatina es el nucleosoma. El nucleosoma está formado por 146 pb de DNA enrolladas alrededor de un octámero de histonas, que contiene dos moléculas de cada una de las cuatro histonas internas H2A, H2B, H3 y H4. Además, el nucleosoma posee una longitud variable de DNA, denominado DNA espaciador, que interacciona con una quinta histona, H1. El octámero de histonas posee una estructura tripartita, formada por un tetrámero de dos copias de las histonas H3 y H4 flanqueado por dos dímeros H2A-H2B. La determinación de la estructura del octámero de histonas a 3.1Å (Arents *et al.*, 1991) permitió identificar un motivo estructural denominado *histone fold*, conservado en las cuatro histonas a pesar de la ausencia de similitud de secuencia entre ellas. El *histone fold* está directamente implicado en la formación de heterodímeros de histonas asociadas a través de un motivo denominado *handshake*, así como en el ensamblaje de éstos para formar el octámero de histonas. El motivo *histone fold* característico de los dos tercios C-

terminales de las histonas internas, está formado por una hélice corta de 10 residuos seguida de un lazo corto y una hoja β , una larga hélice de 27 residuos, otro lazo corto y otra hoja β seguida de una última hélice corta de 10 residuos (Arents & Moudrianakis, 1993).

Posteriormente, el grupo de Richmond resolvió la estructura del nucleosoma a 2.8 Å de resolución (Luger *et al.*, 1997). Este último trabajo confirmó la estructura del octámero de histonas aislado, añadió algunos detalles sobre la estructura de las histonas y permitió trazar la trayectoria exacta del DNA alrededor de las histonas.

El DNA en el núcleo eucariota se encuentra condensado en un factor de aproximadamente 2000 a 10000 veces (Saitoh *et al.*, 1995). Esta compactación se consigue mediante pliegues del DNA que implican la interacción con diferentes proteínas y mantiene el DNA en una forma competente para la transcripción, replicación y reparación. Así, se pueden distinguir distintos niveles de empaquetamiento del DNA. En primer lugar el nucleofilamento de 10 nm de diámetro, constituido por la sucesión de nucleosomas conectados por el DNA espaciador. Además, por cada nucleosoma existe una molécula de H1 que interacciona con el DNA espaciador generando una estructura plegada en una fibra de 30 nm de diámetro (revisado en van Holde & Zlatanova, 1995). Esta fibra es estable en el núcleo interfásico, y es la forma más extendida del DNA en situación fisiológica. La fibra de 30 nm contiene seis nucleosomas por vuelta de solenoide, donde la histona H1 queda en el interior y su presencia es crítica para la formación y el mantenimiento de esta estructura. En el cromosoma interfásico las fibras de 30 nm se encuentran formando lazos de 5-200 kb que están unidos en sus bases a una estructura proteica denominada matriz nuclear. En el anclaje de estos lazos a la matriz nuclear están implicadas unas secuencias de DNA específicas denominadas secuencias MAR (*matrix attached regions*) (Mirkovitch *et al.*, 1984; Hatton & Gray, 1999). Las secuencias MAR son regiones ricas en A+T y se localizan generalmente en las regiones reguladoras de los genes o en la región 3' no traducible, pero raramente en la región codificante.

Durante la mitosis, los dominios en forma de lazo se organizan en el interior de la estructura del cromosoma metafásico, que supone el máximo grado de condensación del DNA en el interior del núcleo.

1.5.2. Las histonas como participantes en la regulación de la expresión génica

Las histonas internas son proteínas de pequeño tamaño (11-15 kDa), de carácter básico, altamente conservadas a lo largo de la evolución. Cada una de las histonas internas contiene el dominio estructurado correspondiente al motivo *histone fold* y una cola N-terminal desestructurada. La elevada conservación de la porción central de las histonas que contiene el motivo *histone fold*, se explica por su implicación en las interacciones histona-histona e histona-DNA implícitas en su papel estructural. Los dominios N-terminales de las histonas han permanecido igualmente conservados a lo largo de la evolución, sobre todo en las histonas H3 y H4. Estas regiones no estructuradas contienen la mayoría de los sitios de modificación postraducciona, lo que refleja su papel esencial en la regulación génica, como se verá más adelante.

La visión de las histonas como meros elementos estructurales ha cambiado en los últimos años y en la actualidad se consideran elementos integrales y dinámicos de la maquinaria responsable de la regulación de la transcripción, así como, probablemente de todos aquellos procesos dependientes del DNA tales como la replicación, reparación, recombinación y segregación cromosomal, funciones que desempeñan mediante interacciones específicas con otras proteínas.

Entre las proteínas que interaccionan con las histonas cabe destacar numerosos silenciadores, correpresores o coactivadores, que en ocasiones se ven afectados por el grado de modificación postraducciona de los extremos N-terminales de las histonas (Struhl, 1998; Strahl & Allis, 2000). Además, las histonas pueden unir otras proteínas con diversas funciones, tales como chaperonas, durante el ensamblaje (Adams & Kamakaka,

1999; Verreault, 2000) o remodelación de la cromatina (McQuibban *et al.*, 1998; Ito *et al.*, 2000). Sin embargo, en muchos casos, se desconoce la función de las proteínas que interactúan con las histonas (Bortvin & Winston, 1996; Borowski *et al.*, 1999).

Las histonas sufren diferentes tipos de modificaciones postraduccionales en sus extremos N-terminales tales como acetilación, fosforilación, metilación, ADP-ribosilación y ubiquitinación (van Holde, 1988). De todas estas modificaciones, la que más atención ha recibido es la acetilación. En los últimos años han sido identificadas la mayor parte de las enzimas responsables de la acetilación (HATs) y desacetilación (HDACs) de histonas, que previamente habían sido identificadas como reguladores transcripcionales (revisado en Grunstein, 1997; Struhl, 1998). Numerosos estudios han demostrado la importancia de esta modificación en la regulación de diferentes procesos celulares tales como, el ensamblaje de la cromatina (Smith & Stillman, 1991; Verreault *et al.*, 1996), la regulación de la transcripción (Turner *et al.*, 1992; Braunstein *et al.*, 1993), el silenciamiento transcripcional y mantenimiento de la heterocromatina (Thompson *et al.*, 1994; Braunstein *et al.*, 1996).

Si se considera únicamente las fuerzas electrostáticas necesarias para el plegamiento del polímero de cromatina, la acetilación, a través de la neutralización de cargas positivas, y la fosforilación de las histonas, mediante la adición de cargas negativas, provocarían una descondensación de la fibra de cromatina (Roth & Allis, 1992). Sin embargo se han descrito casos en donde el resultado de determinadas modificaciones provoca justo el efecto contrario, por ejemplo, para la segregación y condensación de los cromosomas durante la mitosis y la meiosis se requiere la fosforilación de la histona H3 en la serina 10 y la serina 28 (Wei *et al.*, 1999). Por ello, algunos autores coinciden en la idea de que existiría lo que Strahl & Allis (2000) han denominado “código de histonas” (véase también Lopez-Rodas *et al.*, 1993). Struhl & Allis (2000) proponen que las distintas modificaciones de las histonas, en una o más colas, actuarían de manera combinatoria o secuencial, dando lugar a un código que sería reconocido por otras proteínas que posteriormente desencadenarían distintos procesos.

Las colas N-terminales sobresalen de la estructura de la cromatina y constituyen aproximadamente del 25 al 30% de la masa individual de cada histona (van Holde, 1988; Wolffe & Hayes, 1999), de manera que proporcionan una superficie expuesta para la posible interacción con otras proteínas. Sin embargo las proteínas no histona pueden unirse también a otros dominios. El motivo *histone fold* no es exclusivo de las histonas y podría estar implicado en la dimerización de otras proteínas (Arents & Moudrianakis, 1995). El uso de nuevos métodos en la búsqueda de motivos en proteínas (Altschul *et al.*, 1997; Eddy, 1998) ha permitido ampliar el espectro de proteínas conocidas que poseen el motivo *histone fold* (Sullivan *et al.*, 2000). Algunas de las proteínas incluidas en la base de datos generada (<http://genome.nhgri.nih.gov/histones/>) podrían unirse a las histonas a través del *histone fold*. Por ejemplo, se ha sugerido que la proteína centromérica CENP-A, y la proteína macro-H2A, una proteína no histona de rata, relacionada con H2A, sustituirían en algunos nucleosomas a H3 y H2A, respectivamente (Wolffe & Pruss, 1996).

Finalmente destacar, que no solo las histonas sufren modificaciones. El DNA también sufre modificaciones, de las cuales la más frecuente es la metilación de citosinas (Robertson & Jones, 2000). Todas estas modificaciones de la cromatina, y sus implicaciones en el metabolismo de la célula, ponen de manifiesto que la cromatina no es simplemente una estructura estática que sirve para compactar el DNA en el núcleo, sino que constituye un sustrato activo para la maquinaria celular y una fuente importante de regulación de los procesos biológicos.

1.5.3. Proteínas no histonas que modulan la estructura del DNA y actúan como elementos arquitectónicos en complejos nucleoproteicos

Para la catálisis y regulación de una gran variedad de transacciones del DNA los componentes activos resultan, con frecuencia, insuficientes para generar la estructura adecuada del DNA, y se requieren factores accesorios, que faciliten la formación de determinadas estructuras nucleoproteicas. Proteínas como las HU asociadas a la cromatina

en bacterias o las proteínas HMG1-*like* asociadas a la cromatina en organismos eucariotas, constituyen ejemplos de proteínas que se unen al DNA y que pueden actuar como elementos arquitectónicos en el ensamblaje de complejos nucleoproteicos de orden superior (Grosscheld, 1995). Se cree que, al menos en parte, su actividad se basa en la inducción de cambios conformacionales en el DNA y en las proteínas.

En principio, la energía libre necesaria para deformar la hélice de DNA podría ser proporcionada por la fuerza de los contactos proteína-proteína o proteína-DNA. Por ejemplo, en *E. coli*, un simple dímero de la proteína AraC puede unirse a dos sitios no adyacentes del promotor del operon de arabinosa con alta afinidad, formando un lazo específico de DNA (Lobell & Schleif, 1990). Sin embargo, hay situaciones en que las interacciones son débiles, y en estos casos se requiere o bien una curvatura intrínseca en la hélice de DNA, o bien la unión de proteínas que generen la energía necesaria para la deformación de la hélice. Estas proteínas arquitecturales moldean la hélice de DNA de manera que adopta la conformación adecuada para la interacción, por ejemplo, entre proteínas unidas a secuencias no adyacentes. Por otro lado, se ha observado que cambios en la conformación del DNA pueden estimular también el reconocimiento del DNA por proteínas específicas e intensificar, por ejemplo, la activación transcripcional (Schultz *et al.*, 1996; Zappavigna *et al.*, 1996).

Como se ha comentado, entre las proteínas arquitecturales se incluyen las proteínas HMG1-*like* de organismos eucariotas. Las proteínas HMGs forman una familia heterogénea de proteínas cromosomales de pequeño tamaño, constituyendo el grupo de proteínas no-histona más abundante y ubicuo del núcleo eucariota. Las proteínas HMGs presentan una composición de aminoácidos inusual. Contienen una alta proporción de aminoácidos ácidos y básicos, y son solubles en TCA 2% o PCA 5%. Las proteínas HMG1-*like* representan un subgrupo de HMGs (Bustin & Reeves, 1996) y contienen un motivo común, de aproximadamente 75 residuos de aminoácidos, denominado "dominio HMG". Este dominio contacta predominantemente con el surco menor del DNA (Bianchi, 1995; Read *et al.*, 1995). Las proteínas con dominios HMG se pueden dividir en dos

grupos atendiendo al grado de especificidad de secuencia y el número de dominios que poseen (Grosschedl *et al.*, 1994). Por un lado, las proteínas HMG1 y UBF (upstream-binding factor) son proteínas ubicuas que contienen varios dominios HMG y no poseen especificidad de secuencia o sólo en pequeña medida. Por otro lado, factores transcripcionales que contienen un único dominio HMG se unen a secuencias específicas del DNA. Miembros de ambos grupos de proteínas con dominios HMG reconocen estructuras deformadas de DNA e inducen curvaturas en un DNA lineal. Además, las proteínas HMG1 son capaces de introducir superenrollamiento negativo en un DNA plasmídico (Grasser *et al.*, 1996; Ritt *et al.*, 1998), y pueden actuar como elementos arquitectónicos facilitando la formación de estructuras nucleoproteicas complejas (Grosschedl, 1995).

Las proteínas *HU-like* de bacterias presentan una gran similitud con las proteínas HMG1 en lo que respecta a sus propiedades funcionales y de unión al DNA. Ambas proteínas se unen inespecíficamente al DNA y le confieren flexibilidad. A pesar de su relación funcional, las proteínas *HU-like* y el dominio HMG presentan una estructura completamente distinta. Mientras que las proteínas *HU-like* están constituidas por hojas β antiparalelas (Tanaka *et al.*, 1984), el dominio HMG consta de tres hélices α (Weir *et al.*, 1993). Por tanto la similitud de estos dos tipos de proteínas no reside en la forma en que interactúan con el DNA sino en el resultado final de su interacción.

Aunque el ensamblaje de varios complejos nucleoproteicos puede describirse como modelos simples en dos dimensiones, las proteínas que inducen cambios en la estructura del DNA también pueden estar implicadas en la formación de estructuras o lazos tridimensionales de DNA. El nucleosoma sería el prototipo de este tipo de complejos nucleoproteicos, en el cual aproximadamente 160 pb de DNA forman dos superhélices alrededor de un núcleo compacto de histonas. Se ha sugerido que la unión del factor transcripcional UBF al promotor ribosomal *in vitro* implica la formación de una partícula como el nucleosoma en la cual el DNA se enrolla alrededor de UBF. La proteína UBF contiene cinco dominios HMG y un dominio de dimerización, de manera que se generan

dímeros con diez dominios potenciales de unión al DNA. La digestión del complejo UBF-DNA con DNasa I reveló una periodicidad de corte de unas 10 pb muy similar al patrón observado en el nucleosoma (Bazett-Jones *et al.*, 1994). Imágenes de espectroscopía electrónica sugerían que el dímero UBF residía en el interior de un lazo de 200 pb. Sin embargo, a diferencia del nucleosoma, el complejo UBF-DNA poseía un núcleo de baja densidad, consistente con la idea de que el lazo de DNA generado por UBF está estabilizado por una serie de curvaturas en fase del DNA, más que por la formación de un núcleo compacto de proteínas.

En muchos casos, estas proteínas arquitecturales pueden ser inmunoprecipitadas en los complejos nucleoproteicos. Sin embargo, en algunos casos estas pueden jugar un papel transitorio o catalítico en la formación de estructuras nucleoproteicas compactas. Las proteínas no específicas HMG1 y HU se ha propuesto que podrían actuar como chaperonas de DNA uniéndose cooperativamente e incrementando uniformemente la flexibilidad del DNA (Travers *et al.*, 1994). De acuerdo con esta hipótesis, los complejos transitorios entre el DNA y las chaperonas serían rápidamente desplazados por los componentes proteicos del complejo final.

1.5.5. Cambios estructurales de la cromatina asociados a la transición estado durmiente/germinación de las semillas y su relación con la tolerancia a la deshidratación

Aunque se conoce en detalle la estructura de la cromatina a nivel del nucleosoma, esta situación contrasta con un absoluto desconocimiento a nivel de los cambios moleculares que ocurren en la cromatina durante los procesos de desarrollo y germinación de las semillas.

Estudios de microscopía electrónica sobre los efectos de la deshidratación en tejidos vegetales capaces de sobrevivir a condiciones de deshidratación extrema, tales como, embriones maduros, la radícula durante el inicio de la germinación o la planta de la

resurrección, han revelado que la cromatina está sujeta a una fuerte y reversible condensación acompañada de una parada en el metabolismo. Mientras que en los tejidos no tolerantes a la deshidratación, como por ejemplo los de plántulas de 72 horas después de la imbibición en maíz, se produce una condensación irreversible de la cromatina de manera que ésta pierde su integridad funcional y la capacidad de sintetizar mRNA y rRNA tras la rehidratación (Leprince *et al.*, 1995). El proceso de descondensación de la cromatina que ocurre entre las 24 y 72 horas después de la imbibición en maíz, y que implica cambios en la compactación de la cromatina, y en el contenido proteico, estaría, por tanto, asociado con la pérdida de tolerancia a la deshidratación. Aunque en guisante no se han descrito estudios similares, sí se ha descrito que únicamente durante la germinación, hasta 24 horas después de la imbibición, el guisante es tolerante a la deshidratación (Bewley, 1979). Algunos autores han sugerido que la histona H1 y otras proteínas no histonas, como QP47 (Chiatante *et al.*, 1995), podrían estar implicadas en los cambios de estructura de la cromatina durante los procesos de deshidratación e hidratación celular (Chiatante, 1991). Por otro lado, datos obtenidos en nuestro laboratorio (Ull & Franco, 1986) muestran la existencia de cambios en el espaciado nucleosomal entre semillas de guisante no germinadas y plántulas 62 HAI que están de acuerdo con una disminución de la condensación de la cromatina durante la germinación.

1.6. Antecedentes de la proteína p16 de *Pisum sativum*

En estudios previos de nuestro laboratorio dirigidos a caracterizar los cambios que ocurren en el núcleo durante la germinación de la semilla de guisante, se estudiaron cambios en la cromatina y enzimas implicados en la acetilación de histonas tanto en semillas no germinadas como en plántulas de guisante (Ull & Franco, 1986; Sendra *et al.*, 1988; Rodrigo & Franco, 1990; Ull *et al.*, 1991; Mingarro *et al.*, 1993).

Uno de los cambios dependientes de la germinación observados fue la presencia de un polipéptido que se aislaba junto con las histonas en extractos ácidos de proteínas obtenidas

de núcleos o cromatina purificada de ejes embrionarios de guisante no germinados. Se observó que este polipéptido migraba en SDS-PAGE ligeramente retrasado con respecto a la histona H4, con una movilidad electroforética compatible con una masa molecular aparente de 16 kDa. Este polipéptido se denominó p16. La proteína p16 desaparecía a lo largo de la germinación y no se detectaba en extractos proteicos de tejidos adultos, por lo tanto parecía una proteína nuclear específica de embrión de guisante.

Se analizaron las propiedades de solubilidad propuestas para las proteínas HMG, y se observó que aunque se extraía con HCl 0.25 M, p16 no era soluble en TCA 2%. Por lo tanto, no cumplía el criterio operativo de una proteína tipo HMG. Por otro lado, p16 no se extraía junto con la histona H1, la cual es soluble en PCA 5%, sino que aparecía junto con las histonas internas.

La proteína p16 fue purificada por electroforesis preparativa y electroelución, lo que permitió obtener anticuerpos policlonales. El suero utilizado a una dilución 1/500, detectaba una banda específica tanto en extractos de proteína total, como en extractos ácidos de proteínas obtenidas a partir de núcleos purificados.

La interacción de p16 con la cromatina se puso de manifiesto mediante tres tipos de experimentos.

(i) Digestión de núcleos con DNasa I. La digestión del DNA nuclear con DNasa I resulta en la liberación de proteínas unidas a la cromatina. Las histonas, proteínas fuertemente unidas al DNA, sólo se liberan tras una larga digestión. Cuando se utilizó este experimento para analizar el tipo de interacción de p16 a la cromatina se observó que la proteína p16 sólo se liberaba de la cromatina a tiempos largos de digestión y con posterioridad a que lo hiciera la histona H1 e incluso las histonas internas H2A y H2B. Por tanto, parecía haber una desestabilización de la estructura nucleosomal antes de la liberación de p16. Estos resultados indicaban que p16 se une fuertemente al DNA, bien directamente o través de la interacción con las histonas internas.

(ii) Ensayos de entrecruzamiento con formaldehído. Con el objetivo de estudiar la posible interacción de p16 con las histonas, se llevó a cabo un experimento de entrecruzamiento

con formaldehído sobre nucleosomas aislados, en condiciones en que las proteínas que están próximas se entrecruzan entre ellas pero no con el DNA. Se observó la formación de un complejo que contenía p16 junto con las histonas internas. Este complejo no contenía H1 lo que sugería que p16 estaría más próxima a las histonas internas que H1.

(iii) Obtención de núcleos en ausencia de agentes reductores. Para demostrar la posible interacción de p16 con las histonas *in vivo*, se purificaron núcleos en un medio que contenía iodoacetamida y en ausencia de agentes reductores para preservar los enlaces disulfuro preexistentes. Dado que tanto la histona H3 como la proteína p16 contienen un residuo de cisteína, se pensó que si se encontraban próximas ambas proteínas podrían entrecruzarse. Se observó la formación de heterodímeros H3-p16 lo que indicaba de nuevo que p16 se encuentra próxima a las histonas internas en el núcleo de ejes embrionarios de guisante no germinados.

1.6. Objetivos

La cromatina es un componente esencial de las células y su estructura debe ser protegida de alguna manera durante el estado durmiente de las semillas. Los problemas causados por un aumento de la fuerza iónica podrían ser especialmente importantes en el núcleo donde el metabolismo depende de la estabilidad de la organización tridimensional de la cromatina. A pesar del extremo déficit de agua, los tejidos del embrión permanecen viables en la semilla seca y recuperan su actividad inmediatamente después del inicio de la germinación. Como ya se ha descrito, la eliminación de agua durante la maduración de la semilla está relacionada con una condensación de la cromatina. Ésta sufre una descondensación durante el proceso de rehidratación (Leprince *et al.*, 1995). A pesar de la importancia de este proceso, apenas se ha investigado en esta área y existe muy poca información acerca de los mecanismos moleculares que favorecen la condensación de la cromatina durante la deshidratación y permiten la reanudación de las propiedades funcionales de la cromatina tras la rehidratación.

Proteínas asociadas a la cromatina, específicas del embrión y que desaparecen durante la germinación, como es el caso de p16, podrían tener un papel en el establecimiento, mantenimiento o protección de la estructura de la cromatina, preservándola de la pérdida dramática de agua que sufren las semillas al final de la embriogénesis. En este sentido, resultaba interesante el estudio en detalle de las características de esta proteína y su posible función asociada a la cromatina.

Para abordar este trabajo nos planteamos los siguientes objetivos:

1. Aislamiento y caracterización del cDNA que codifica la proteína p16.
2. Estudio de la regulación de la expresión del gen que codifica la proteína p16 durante el desarrollo embrionario y la germinación.
3. Estudio de la interacción de la proteína p16 con los componentes de la cromatina, histonas y DNA.

2. Materiales y Métodos

2.1. Material biológico

2.1.1. Material vegetal

Las semillas de guisante (*Pisum sativum*, cv. Lincoln) se obtuvieron localmente de “Semillas E. Noguera e hijos”. Esta variedad es fácil de conseguir en el mercado y presenta una alta tasa de germinación en cualquier periodo del año.

2.1.1.1. Imbibición de las semillas

Para la desinfección e imbibición de las semillas, éstas se sumergieron en etanol 96% durante 30 segundos, se lavaron con agua desionizada y se dejaron durante 10 minutos en lejía comercial depurada al 12,5% (v/v) en agua. Se lavaron varias veces con agua abundante sumergiéndolas finalmente en un volumen grande de agua desionizada, en una cubeta tapada con papel de aluminio, a 4°C durante 20 horas.

2.1.1.2. Germinación de las semillas y tratamientos

Las semillas embebidas se pusieron a germinar en bandejas, sobre papel de filtro empapado y tapadas con papel humedecido, a 28°C en oscuridad. Semillas de distintos tiempos durante la germinación y crecimiento posterior de la plántula, se sometieron a sequía o fueron tratadas con ABA o sorbitol. Para ello se dispusieron en placas petri de 14 cm, sobre papel de filtro seco, o bien se aplicó sobre cada semilla 100 µl de una solución 100 µM de ABA o 1,5 M de sorbitol. En la placa control se aplicaron 100 µl de agua desionizada sobre cada semilla. El tratamiento de herida se realizó sobre plántulas

HAI 18 pinchando dos veces con una aguja el eje embrionario. En todos estos tratamientos la temperatura se mantuvo constante a 28°C y en oscuridad. Los tratamientos a bajas y altas temperaturas se realizaron sobre plántulas HAI 18, que se dispusieron en placas petri sobre papel de filtro humedecido, en una cámara a 4°C o en una estufa a 40°C. Todo el material vegetal fue congelado con nitrógeno líquido y almacenado a -80°C hasta el momento de su análisis.

2.1.1.3. Crecimiento de las plantas y tratamientos

Para los tratamientos sobre planta adulta, las semillas una vez embebidas, se sembraron en vermiculita estéril y se pusieron a germinar a 28°C en la oscuridad. A los cuatro días las plántulas se pasaron a una cámara de cultivo con un fotoperiodo de 16 horas de luz, 8 horas de oscuridad y se regaron con fertilizante mineral líquido para jardinería (Gesal). Tras 9 días, las plantas fueron sometidas a sequía, colocándolas en una bandeja sobre papel de filtro seco, o tratamiento con ABA, sumergiendo las raíces en una solución 200 µM de ABA en un vaso de precipitados y rociando el resto de la planta varias veces con la misma solución de ABA. Al cabo de 24 horas después del tratamiento se congelaron con nitrógeno líquido por separado hojas, raíces y tallos.

Para obtener muestras durante la embriogénesis, las semillas embebidas, se sembraron en vermiculita estéril y al cabo de una semana se transplantaron a macetas individuales desinfectando las raíces y los cotiledones con Benomilo al 0,5% (p/v). Las plantas se regaron con solución nutritiva Hoagland n° 1 suplementada con oligoelementos de Hewitt (Carbonell & García-Martínez, 1980) y se crecieron en invernadero bajo condiciones de luz natural y temperaturas entre 28°C durante el día y 17°C durante la noche. Entre 45 y 50 días después de la siembra aparecieron las primeras flores que se marcaron en el momento de antésis. Se recogieron muestras periódicamente durante el desarrollo. Todo el material vegetal fue congelado con nitrógeno líquido y almacenado a -80°C hasta el momento de su análisis.

Para determinar el peso fresco, el peso seco y el contenido de agua de la semilla durante su desarrollo, se tomaron 25 semillas que se pesaron conjuntamente para determinar el peso fresco medio por semilla. Estas mismas, se mantuvieron a 80°C durante 24 horas, tras lo cual se determinó el peso seco medio por semilla. Esta operación se realizó en un pesasustancias para evitar la rehidratación de la muestra. Finalmente, se calculó el contenido de agua promedio.

2.1.2. Manipulación de *Escherichia coli*

2.1.2.1. Cepas de *E. coli*

La cepa *DH5 α* se utilizó de forma rutinaria en diferentes etapas durante el aislamiento y manipulación de plásmidos, así como para su almacenamiento en glicerol 15% a -80°C. Para la obtención de proteínas recombinantes se transformó una cepa especial para expresión, *BL21(DE3) pLysS* (Invitrogen). Esta cepa se caracteriza por tener un bajo nivel de proteasas y por la inhibición de la expresión basal de la proteína recombinante, de forma que su expresión sólo se induce en presencia de IPTG (Boehringer Mannheim).

2.1.2.2. Condiciones de crecimiento

Para el crecimiento de *E. coli* se utilizó el medio LB líquido [triptona 1% (p/v) (DIFCO), extracto de levadura 0,5% (p/v) (Pronadisa), NaCl 1% (p/v)] o sólido, añadiendo 2% (p/v) de agar bacteriológico (Pronadisa). Todos los medios se esterilizaron en autoclave durante 20 minutos a 1 atm de presión. Cuando las células de *E. coli* fueron transformadas con plásmidos se añadió al medio de cultivo los antibióticos requeridos. Para la cepa *DH5 α* el medio LB se suplementó con ampicilina, a una concentración final de 50 $\mu\text{g/ml}$, esterilizada por filtración (Boehringer Mannheim). Cuando se utilizó la cepa

BL21(DE3) pLysS, el medio LB se suplementó con ampicilina 100 µg/ml y cloranfenicol 30 µg/ml (Boehringer Mannheim). Para la inducción de la expresión de proteínas se añadió al medio IPTG a una concentración final de 1 mM. En algunos casos, los medios sólidos en placa petri se suplementaron con 50 µl de IPTG 2% (p/v) y 50 µl de X-gal 2% (p/v).

Las células se crecieron a 37°C en todos los casos, excepto en los experimentos de expresión, donde tras la inducción con IPTG se continuó el cultivo a 30°C.

2.1.2.3. Preparación de células competentes y transformación de *E. coli*

Para la transformación, se prepararon células competentes mediante el tratamiento con cationes divalentes, siguiendo el procedimiento descrito en Ausubel *et al.* (1993). La transformación con DNA plasmídico se realizó por choque térmico a 42°C durante 45 segundos de forma convencional siguiendo el protocolo original de Hanahan (1983).

2.2. Aislamiento del cDNA que codifica la proteína p16

2.2.1. Construcción y rastreo de una genoteca de cDNA de ejes embrionarios de guisante

Para la construcción de la genoteca de cDNA se partió de 2 gramos de ejes embrionarios de guisante 30 DAF y se realizó una extracción de RNA total (apartado 2.5.1). El RNA rico en colas poli (A) se aisló a partir de 1 mg de RNA total utilizando el kit de promega *PolyATtract mRNA isolation system III*. A partir de 5 µg de mRNA se sintetizaron los cDNA correspondientes, éstos se clonaron direccionalmente a los brazos del vector λ-ZAP, y se empaquetaron mediante *Gigapack® II Goldpackaging extract* (Stratagene), siguiendo las recomendaciones del fabricante. El título de la genoteca obtenida fue 2.5×10^6 p.f.u. µl⁻¹. La genoteca de cDNA fue rastreada con el anticuerpo de p16. 5×10^4 fagos se incubaron con la cepa XL-1-Blue, se sembraron en placas petri y se

dejaron durante 5 horas a 42°C. A continuación, sobre la superficie de las placas se depositaron filtros de nitrocelulosa impregnados de una solución 10 mM de IPTG y se mantuvieron durante 3,5 horas a 37°C para inducir la expresión de las proteínas heterólogas. Los filtros se revelaron con un protocolo similar al del análisis mediante *Western blot* (apartado 2.6.5), a excepción de las concentraciones utilizadas de anticuerpo de p16 (dilución 1:100) y anticuerpo secundario de cabra anticonejo conjugado a peroxidasa de Promega (dilución 1:3000). Tras sucesivas rondas de rastreo con el anticuerpo se aislaron y purificaron 20 clones que daban reacción con el anticuerpo. Los insertos fueron escindidos del vector λ -ZAP y propagados en el fagémido resultante pBluescript II SK(+/-), según las instrucciones del fabricante. El tamaño de los insertos se determinó por digestión con los enzimas de restricción EcoRI y XhoI. Cinco de ellos fueron analizados observándose que contenían insertos de aproximadamente 1.7 kb.

2.2.2. Secuenciación del DNA

La secuenciación de dos de los clones de cDNA obtenidos del rastreo de la genoteca con el anticuerpo de p16, se realizó mediante el método de terminación de cadenas con dideoxinucleótidos (Sanger *et al.*, 1977), utilizando el sistema *fmolTM DNA sequencing System* (Promega). Como isótopo radiactivo se utilizó [α -³⁵S]-dATP (1000Ci/mmol, Amersham). Como cebadores se utilizaron la secuencia del promotor de la RNA polimerasa del fago T7 (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3') y la del promotor de la transcriptasa reversa (5'-GGAAACAGCTATGACCATG-3') presentes en el vector p-Bluescript (Stratagene). La secuenciación se continuó en las dos direcciones. Para ello se utilizaron oligonucleótidos basados en la secuencia del cDNA a medida que éste se analizaba. A la secuencia de cDNA obtenida se le asignó el nombre de *psp54* (pea seed protein).

2.3. Subclonado del cDNA que codifica a p16

2.3.1. Diseño de construcciones

El cDNA que codifica p16 se clonó en dos vectores de expresión diferentes. En ambos casos se siguió el mismo proceso para la obtención de la construcción adecuada.

(i) Se amplificó por PCR el cDNA que codifica a p16 utilizando como molde el cDNA *psp54*.

(ii) El producto de PCR fue purificado por electroforesis preparativa y subclonado directamente en el vector pGEM-T.

(iii) El plásmido pGEM-p16 se digirió con el enzima XhoI, y el cDNA de p16 con extremos XhoI se purificó por electroforesis preparativa.

(iv) Para la expresión de p16 fusionada a GST se utilizó el plásmido pGEX4T-1 (Pharmacia Biotech), que fue linealizado con XhoI, purificado por electroforesis preparativa y ligado al cDNA de p16 con extremos XhoI.

(iv') Para la expresión de p16 fusionada a cola de histidinas se utilizó el plásmido pRSETA (Invitrogen) linealizado como en el caso anterior con XhoI, purificado por electroforesis preparativa y ligado al cDNA de p16 con extremos XhoI.

A continuación se describirá con detalle cada uno de las técnicas utilizadas en este proceso.

2.3.2. Purificación de plásmidos de *E. coli*

Para el aislamiento a gran escala del plásmido, PBS-*psp54*, se siguió el procedimiento clásico descrito por Sambrook et al. (1989), aunque se introdujo un paso intermedio de precipitación del RNA con LiCl 2,5 M, y una digestión con RNasaA 0,02 mg/ml (Boehringer Mannheim) durante 1 hora a 42°C.

En diferentes etapas durante el proceso de subclonado del cDNA de p16 se han utilizado otros dos métodos de obtención de plásmidos. Por un lado, para el análisis de

gran cantidad de clones, se utilizó un método rápido de obtención de plásmidos (Berghammer & Auer, 1993). A pesar de que el grado de pureza de esta extracción es bajo, los enzimas de restricción digieren estos plásmidos sin problema, lo cual permite el análisis rápido y barato de gran cantidad de clones en la búsqueda de la construcción deseada. Una vez seleccionado el clon positivo se utilizó el kit *QIAprep Spin Miniprep* de QIAGEN, para el aislamiento del plásmido a pequeña escala, siguiendo las instrucciones del fabricante. La calidad de esta extracción es necesaria para la posterior secuenciación del plásmido y transformación de *E. Coli*.

2.3.3. Reacciones de PCR

Para la amplificación por PCR del cDNA que codifica p16 se utilizó como molde el cDNA de *psp54* y se diseñaron los oligonucleótidos: 5'-CCCCTCGAGATGTCTAGACA AAAAAAGATG-3' y 5'-CCCCTCGAGTCACACAACAGCACGAC-3', conteniendo en su extremo 5' tres citosinas y la secuencia diana del enzima de restricción XhoI, seleccionada para su posterior clonación. La reacción en cadena de la polimerasa se realizó en un termociclador Eppendorf. La mezcla de reacción contenía 10 ng de DNA molde (PBS-*psp54*), 1 μ M de cada oligonucleótido, dNTPs 0,25 mM, 1x tampón de PCR comercial, MgCl₂ 1,5 mM y 1 unidad de Taq polimerasa, en un volumen final de 50 μ l. El programa utilizado fue el siguiente: 2 minutos de desnaturalización inicial a 94°C, 25 ciclos de amplificación (1 minuto a 94°C, 1 minuto a 50°C, 2 minutos a 72°C) y una extensión final de 10 minutos a 72°C.

2.3.4. Reacciones enzimáticas

El producto de PCR fue purificado por electroforesis preparativa (apartado 2.3.5) y subclonado directamente en el vector pGEM-T (Promega), aprovechando el residuo de adenina que deja en los extremos 3' la Taq polimerasa utilizada. Este plásmido permite la

selección por color de clones positivos (plásmido más inserto) en placas IPTG/X-gal. En todos los casos se utilizó la T4 DNA ligasa y una relación molar inserto a plásmido de 3 a 1, según sugiere Revie *et al.* (1988) para insertos pequeños (menores de 0.3 kb). Las reacciones de ligación se llevaron a cabo durante 4 horas a temperatura ambiente, o toda la noche a 16°C.

Para la clonación del cDNA de p16 en los diferentes plásmidos de expresión se digirió con XhoI tanto el plásmido recombinante pGEM-T-p16 como los plásmidos de expresión seleccionados. Posteriormente, con el fin de determinar la presencia de inserto (en este caso el cDNA de p16), así como su orientación en los plásmidos de expresión, se realizaron digestiones con diferentes enzimas de restricción. En todos los casos, se digirió con 5 unidades de enzima por μg de DNA, en el tampón comercial indicado y un volumen final de reacción al menos 10 veces el volumen de enzima utilizado. La duración de la incubación fue de 1 hora a la temperatura óptima del enzima. La cantidad de DNA se estimó por comparación con el patrón λ -HindIII (Promega), preparado a una concentración de 0,1 mg/ml.

2.3.5. Electroforesis en gel de agarosa y purificación de fragmentos

Para geles analíticos se utilizó el tampón TBE [Tris-HCl 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 2 mM, pH 8,0] y para geles preparativos el tampón TAE [Tris-HCl 40 mM, ácido acético 20 mM, EDTA 2 mM, pH 8,0]. Tanto el gel como el tampón contenían bromuro de etidio a una concentración final de 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en geles analíticos y de 0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en geles preparativos. En ambos casos la concentración de agarosa varió entre 0,7-1,2% (p/v) dependiendo del tamaño del DNA.

Las muestras de DNA se prepararon añadiendo tampón de carga 6x [sacarosa 40% (p/v), azul de bromofenol 0,05% (p/v), EDTA 100 mM]. Los geles se corrieron a 100 V.

El aislamiento de fragmentos tras la electroforesis preparativa se realizó mediante el kit *QIAquick Gel Extraction* de QIAGEN y se siguieron las instrucciones del fabricante.

2.4. Análisis genómico de *psp54* de *Pisum sativum*

2.4.1. Preparación de DNA genómico

La extracción de DNA se realizó siguiendo el método descrito por Michaels *et al.* (1994). Se utilizó como material vegetal 2 gramos de hojas jóvenes que se trituraron en un mortero en presencia de nitrógeno líquido, el tejido se homogeneizó en 5 ml de tampón de extracción [NaCl 0,25 M, Tris-HCl 50 mM pH 8,0, EDTA 20 mM, SDS 0,5% (p/v), β -mercaptoetanol 0,25% (v/v)], y se agitó durante 5 minutos a 60°C. Se añadieron 3 ml de fenol y se agitó 5 minutos más a 60°C. Se añadieron 3 ml de cloroformo y se centrifugó a 15000g durante 10 minutos. A la fase acuosa se añadieron 0,35 volúmenes de etanol absoluto y se incubó 20 minutos en hielo, en estas condiciones se consigue la precipitación de los polisacáridos. Los polisacáridos inhiben la actividad de enzimas de restricción, ligasas, etc., utilizadas posteriormente para modificar el DNA. Se centrifugó de nuevo y los ácidos nucleicos se precipitaron con 1 volumen de isopropanol durante 15 minutos a temperatura ambiente. El precipitado se lavó con etanol 80%, se secó, se disolvió en 3 ml de tampón TE [Tris-HCl 10 mM pH 8,0, EDTA 1 mM], y se trató con RNasa A 1 μ g/ml durante 1 hora a 37°C. El DNA fue precipitado con 1/3 volúmenes de 8 M acetato amónico y 2,5 volúmenes de etanol 100% durante 15 minutos a temperatura ambiente. El DNA precipitado se disolvió en 1 ml de agua estéril y se cuantificó por determinación de la absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV, modelo 160A.

2.4.2. Análisis mediante *Southern blot*

El DNA genómico fue digerido (10 μ g/digestión), con los enzimas de restricción BclI, BglII, EcoRV, KpnI y EcoRI. Los fragmentos resultantes se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 0,7% (p/v) en tampón TBE 1X. El gel se trató con HCl 0,25 M durante 15 minutos, se desnaturalizó incubando dos veces durante 15 minutos con una solución

desnaturalizante [NaOH 0,5 M, NaCl 1,5 M], y finalmente se incubó 20 minutos con una solución neutralizante [NaCl 1,5 M, Tris-HCl 1 M pH 8,0]. Finalmente, se transfirió en SSC 10X [NaCl 1,5 M, citrato trisódico 150 mM, pH 7,0] a una membrana de nylon Hybond-N (Amersham) siguiendo el procedimiento descrito por Southern, (1975), y detallado en Ausubel *et al.* (1993). El DNA se entrecruzó a la membrana mediante irradiación ultravioleta (150 mJoule) en un *GS Gene linker UV chamber* (Bio-Rad).

2.4.3. Marcaje radiactivo y purificación de la sonda de cDNA *psp54*

El DNA utilizado como sonda fue el fragmento ApaI/SpeI del cDNA de *psp54*. 25 ng de DNA se marcaron con [α - 32 P]dCTP (3000Ci/mmol, Amersham), mediante el método de cebadores al azar (Feinberg & Vogelstein, 1983), utilizando el kit *Random Primed DNA labelling* (Boehringer Mannheim). La sonda se purificó de los dNTP marcados no incorporados, en una columna de exclusión *MicroSpinTM S-300HR columns* (Amersham Pharmacia Biotech) siguiendo las instrucciones del fabricante. La sonda se desnaturalizó a 100°C durante 10 minutos antes de añadirla a la solución de hibridación.

2.4.4. Hibridación y autorradiografía

La membrana de nylon fue prehibridada e hibridada a 65°C en las condiciones descritas por Church & Gilbert (1984). La membrana se prehibridó durante 10 minutos en solución PSE [fosfato sódico 0,3 M pH 7,2, SDS 7% (p/v), EDTA 1 mM]. La hibridación se llevó a cabo en la misma solución pero en presencia de la sonda radiactiva, durante toda la noche, en una estufa de hibridación (*Amersham Pharmacia Biotech*). Posteriormente la membrana se lavó dos veces, durante 5 minutos a 65°C en una solución [Na₂HPO₄ 40 mM pH 7,2, SDS 5%, EDTA 1 mM]; seis veces durante 5 minutos a 65°C en una solución [Na₂HPO₄ 40 mM pH 7,2, SDS 1%, EDTA 1 mM]; y durante 20 minutos adicionales en este último tampón. Todos estos lavados se realizaron con agitación constante.

La membrana se expuso a una película Kodak sensible a rayos X (Kodak XAR-5), a -80°C , en un estuche *Hypercassette*TM (Amersham) con pantalla intensificadora, durante 1-2 días de exposición. El revelado se realizó manualmente: (i) la película se introdujo en la solución reveladora *Roentogen (Tetenal)* de 30 segundos a 2 minutos, (ii) se pasó a una cubeta con H_2O durante 1 minuto, y finalmente, (iii) se introdujo en una cubeta con la solución fijadora *Agefix (AGFA)* durante 2 minutos .

Todas las disoluciones y el material utilizado en la manipulación de DNA se autoclavaron durante 20 minutos a 1 atm de presión.

2.5. Aislamiento y análisis de RNA

2.5.1. Preparación de RNA total de plantas

La extracción de RNA se basó en el método fenol/SDS descrito en Ausubel *et al.* (1993). El material vegetal fue triturado en mortero con nitrógeno líquido. El polvo resultante se transfirió a un tubo estéril que contenía tampón de extracción [Tris-HCl 180 mM pH 8,2, LiCl 90 mM, EDTA 4,5 mM, SDS 1% (p/v)] en proporción 10 ml/gr tejido y fenol (3 ml/gr tejido). Se agitó y se añadió cloroformo (3 ml/gr tejido). El homogeneizado se incubó 20 minutos a 50°C y se centrifugó a 17700g durante 20 minutos a 4°C . La fase acuosa fue extraída una vez más con fenol/cloroformo, y otra con cloroformo solo. El RNA fue selectivamente precipitado con LiCl 2 M toda la noche a 4°C . El precipitado se recogió por centrifugación a 15300g durante 20 minutos a 4°C y se disolvió en H_2O (2 ml/gr tejido). Se realizó una segunda precipitación con LiCl 2M durante 2 horas a 4°C y finalmente el RNA se recuperó por centrifugación a 12100g durante 20 minutos. El sedimento se disolvió en H_2O (0,5 ml/gr tejido). La concentración de RNA se determinó por absorbancia a 260 nm, y su integridad se comprobó mediante observación de los RNAs ribosómicos en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio. El RNA se repartió en

alícuotas, se precipitó con 0.1 volúmenes de acetato sódico 3 M y 2 volúmenes de etanol 100%, y se almacenó a -80°C hasta su utilización.

2.5.2. Análisis mediante *Northern blot*

El RNA total (10 µg) se separó por electroforesis desnaturizante en gel de agarosa 1% (p/v) en tampón MAE 1X [MOPS 20 mM, acetato sódico 5 mM, EDTA 1 mM, ajustado a pH 7,0 con NaOH] y 2,2 M de formaldehído. Las muestras se prepararon añadiendo 4 volúmenes de tampón de RNA 1,25 X [2,2 ml formamida, 0,8 ml formaldehído, 0,5 ml MAE 10X, 0,4 ml glicerol 80%, 0,1 ml azul de bromofenol 2% (p/v)], para visualizar el RNA ribosómico se añadió al tampón de RNA, bromuro de etidio a una concentración final de 0,05 µg/µl. La electroforesis se corrió a 100 V.

La transferencia de RNA a membrana de nylon Hybond-N se realizó en tampón SSC 5X, como se describe en Ausubel *et al.* (1993). El RNA se entrecruzó a las membranas mediante irradiación ultravioleta (150 mJoule) en un *GS Gene linker UV chamber* (Bio-Rad).

2.5.3. Marcaje de la sonda, hibridación y autorradiografía

El marcaje de la sonda, la prehibridación e hibridación de las membranas se realizó en las mismas condiciones indicadas en el apartado 2.4, así como los lavados, exposición de las membranas y revelado.

Todas las disoluciones y el material utilizado en la manipulación del RNA se esterilizaron durante 1 hora a 2 atm de presión , y en todo momento se trabajó con guantes.

2.6. Aislamiento y manipulación de proteínas

2.6.1. Extracción de proteína total

Para la extracción de proteína total de diferentes tejidos vegetales se siguió el método descrito por Rivin & Gruth (1991). El material vegetal se trituró en mortero con nitrógeno líquido y se homogeneizó en el tampón de extracción [Tris-HCl 0,5 M pH 6,8, SDS 1% (p/v), urea 2 M, PMSF 1 mM, β -mercaptoetanol 0,6% (v/v)] en proporción 5 ml/gramo de tejido. El homogeneizado se sonicó durante 3 minutos en hielo y se centrifugó a 17500g durante 15 minutos. El sobrenadante se precipitó añadiendo TCA a una concentración final del 25% (v/v) durante 1 hora a 0°C . El precipitado se recuperó por centrifugación a 17500g durante 10 minutos en frío, se lavó una vez con acetona:HCl (60:1) y dos veces con acetona deshidratada. Finalmente, el precipitado de proteínas se secó en una bomba a vacío.

2.6.2. Fraccionamiento subcelular

Ejes embrionarios de guisante se homogeneizaron en tampón ME-6 [MES 10 mM pH 6,0, sacarosa 0,3 M, CaCl₂ 8 mM, MgCl₂ 8 mM, glicerol 20%, PMSF 0,7 mM] en proporción 10 ml/gramo de tejido. Posteriormente se añadió Tritón X-100 a una concentración final de 0,75% (v/v) y se incubó durante 1 hora a 4°C en agitación. Este homogeneizado se filtró a través de muselina y filtros de nylon de un tamaño de poro descendiente: 200, 100, 54 y 20 μ m. El sedimento de la centrifugación a 800g constituye una fracción nuclear cruda que se purificó según se describe en el apartado 2.6.3.1. El sobrenadante obtenido tras la sedimentación de los núcleos se centrifugó a 10000g durante 10 minutos y finalmente, el sobrenadante de 10000g se centrifugó a 100000g durante 1 hora. Para analizar la presencia de p16 en las diferentes fracciones subcelulares, la fracción nuclear purificada y los sedimentos de 10000g y 100000g fueron extraídos con ácido

(HCl 0,25 M). Las proteínas presentes en el sobrenadante de 100000g se precipitaron con ácido tricloroacético a una concentración final del 25% (v/v). Las proteínas obtenidas de las diferentes fracciones se analizaron mediante SDS-PAGE y *Western blot*.

2.6.3. Extracción de proteínas nucleares de *Pisum sativum*

2.6.3.1. Aislamiento de núcleos

En el apartado anterior se ha descrito la obtención de una fracción nuclear cruda a partir de ejes embrionarios de guisante. Posteriormente, los núcleos obtenidos se purificaron por centrifugación en un gradiente de percoll siguiendo el método descrito por Ull & Franco (1986). Para ello los núcleos se depositaron sobre un gradiente de percoll al 30, 60 y 90% en tampón ME-6 situado sobre un colchón de sacarosa 2,3 M, y se centrifugaron a 800g durante 30 minutos. Los núcleos se recogieron con ayuda de una pipeta pasteur entre la capa de percoll 90% y el colchón de sacarosa. Todo el proceso se realizó a 4°C.

2.6.3.2. Extracción de proteínas solubles en ácido

Las proteínas solubles en ácido de núcleos purificados, se extrajeron con HCl a una concentración final de 0,25 M durante 2 horas a 4°C. Las proteínas solubles en ácido se recogieron mediante centrifugación a 16000g durante 10 minutos y se precipitaron con ocho volúmenes de acetona toda la noche a -20°C. Las proteínas precipitadas se recogieron mediante centrifugación a 18900g durante 15 minutos, los sedimentos se lavaron dos veces más con acetona deshidratada y se secaron. Las muestras se almacenaron a 4°C en fiambresas con silicagel hasta el momento de su análisis.

2.6.4. Inmunolocalización de p16 en núcleos aislados

Núcleos purificados en gradiente de percoll se fijaron con Lowicryl K 4M y se polimerizaron en cápsulas de gelatina. Secciones finas de 94 nm de espesor se procesaron tal y como describen Bendayan *et al.* (1987) para la inmunolocalización con partículas de oro. Las muestras se trataron con el anticuerpo de p16 utilizando una dilución 1/5000, o bien con el suero preimmune como control, en el tampón de inmunodetección [NaCl 0,23 M, BSA 0,1%, Tris-HCl 20 mM, pH 7,4] conteniendo suero fetal bovino a una concentración del 1%. Como anticuerpo secundario se utilizaron inmunoglobulinas de cabra anticonejo conjugados a partículas de oro (10 nm, Sigma) diluido diez veces en el tampón anterior pero conteniendo Tween 20 0,05% y suero fetal bovino 5%. Tras los lavados con el tampón de inmunodetección, las muestras se lavaron con agua destilada y se tñieron con acetato de uranilo. Las preparaciones se examinaron y fotografiaron en un microscopio electrónico Philips modelo CM-10.

2.6.5. Electroforesis y análisis *Western blot*

Los extractos de proteínas se disolvieron en el tampón de muestras de SDS [Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8, glicerol 10% (v/v), SDS 2% (p/v), azul de bromofenol 0,002% (p/v), β -mercaptoetanol 5% (v/v)] habitualmente a 5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ y se aplicaron en cada pocillo 25 μg de proteína.

Las proteínas procedentes de diferentes extractos se separaron en geles de poliacrilamida 15% (p/v) en presencia de SDS, siguiendo básicamente el método descrito por Laemmli (1970). Los geles se tñieron con azul Coomassie y en ocasiones con plata (Wray *et al.*, 1981).

En el análisis mediante *Western blot* las proteínas de los geles se electrotransfirieron a membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad) utilizando el tampón [metanol 20% (v/v), glicina 192 mM, SDS 0,1% (p/v), Tris-HCl 25 mM pH 8,3]. La transferencia se llevó a cabo en el

sistema Trans-blot (Bio-Rad). Las membranas de nitrocelulosa se bloquearon en TBS [Tris-HCl 20 mM pH 7,6, NaCl 150 mM] con 5% de leche en polvo desnatada (TBSL), durante 1 hora. El anticuerpo de p16 se utilizó rutinariamente a una dilución 1:500 en TBSL. Las membranas se incubaron durante 1 hora con el anticuerpo primario, y se lavaron tres veces durante 10 minutos en TBSL, el primer lavado se preparó añadiendo tween-20 0.1% (v/v) (TTBSL). Los anticuerpos secundarios utilizados fueron de cabra-anticonejo conjugados con peroxidasa (dilución 1/3000) (Bio-Rad), o conjugados con fosfatasa alcalina (dilución 1/5000) (Bio-Rad), ambos fueron diluidos en TBSL. Los lavados se realizaron con el tampón TBS sin leche, añadiendo al primer lavado Tween-20 0,1%. El revelado se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante para cada anticuerpo. En el caso del anticuerpo unido a peroxidasa se utilizaron como sustratos HRP y H₂O₂. En el caso del anticuerpo unido a fosfatasa alcalina se utilizaron como sustratos NBT y BCIP.

2.6.6. Purificación y secuenciación de p16

2.6.6.1. Purificación de p16 mediante RP-HPLC

La purificación de p16, a partir de un extracto ácido de proteínas nucleares, se llevó a cabo siguiendo el método descrito por *Ballestar et al.* (1996). Se utilizó una columna de fase reversa Deltapak C-18 de Waters Assoc. (15 x 0,78 cm D.I.) y se colocó una precolumna Guard-PAK (μ Bondapak C-18, Waters Assoc.) entre el inyector y la columna. Se utilizó un equipo Waters 600E conectado a un detector UV-visible 486 (Waters Assoc.). La separación de p16 se llevó a cabo mediante un gradiente lineal de acetonitrilo (30-55% en 105 minutos), que contenía ácido trifluoroacético 0,3%. Se recogieron fracciones de 1ml y alícuotas de 100 μ l de cada fracción se liofilizaron y se analizaron en SDS-PAGE. La identidad de p16 se determinó mediante *Western blot*.

2.6.6.2. Digestión trípica, purificación de péptidos y secuenciación

La digestión trípica de 150 µg de p16 pura se realizó a 37°C durante 4 horas con tripsina (Sigma) 1 mg/ml tratada con TPCK a razón p16/enzima de 37,5 (p/p). Los péptidos trípticos se purificaron por RP-HPLC, mediante un gradiente lineal de acetonitrilo 0-55% en 50 minutos. El análisis de la secuencia N-terminal de la proteína intacta y los péptidos trípticos se llevó a cabo por degradación automática de Edman en un Prosequencer 6625 (Waters).

2.6.7. Expresión y purificación de proteínas recombinantes

2.6.7.1. Expresión y purificación de proteínas recombinantes en *E. coli*

Para la obtención de las proteínas GST y GST-p16, las células de *E. coli*, cepa BL21(DE3)pLysS (*Invitrogen*), se transformaron con el plásmido pGEX4T-1 y con la construcción pGEX4T-1-p16 respectivamente. La inducción de la expresión de proteínas se realizó cuando el cultivo alcanzó una A_{600} de 0,7, añadiendo al medio IPTG a una concentración final de 0,1 mM. El cultivo se incubó durante 3 horas a 30°C. Las células se resuspendieron en tampón PBS [NaCl 140 mM, KCl 2,7 mM, Na_2HPO_4 10 mM, KH_2PO_4 1,8 mM, pH 7,2], se lisaron por sonicación, y las proteínas de fusión se purificaron de la fracción soluble por cromatografía de afinidad, en Glutathion–Sepharose, mediante el kit *GST gene fusion system* (*Pharmacia Biotech*), según las instrucciones del fabricante.

Para la obtención de la proteína de fusión (his_6)p16, las células de *E. coli*, cepa BL21(DE3)pLysS (*Invitrogen*), se transformaron con la construcción pRSETA-p16. Las células transformantes se inocularon directamente de la placa al medio de cultivo, sin pasar por precultivo. La inducción de la expresión de la proteína recombinante se realizó cuando el cultivo alcanzó una A_{600} de 0,7, añadiendo al medio IPTG a una concentración final de 1 mM. El cultivo se incubó durante 3 horas a 30°C. Las células se recogieron por centrifugación y se suspendieron en el tampón de sonicación [fosfato sódico 50 mM

pH 7,6, imidazol 20 mM, β -mercaptoetanol 5 mM, Tween-20 0,5%(v/v), cóctel de inhibidores de proteasas para extractos bacterianos 0,2% (v/v) (Sigma)], se lisaron por sonicación, y la proteína de fusión se purificó de la fracción soluble utilizando la resina *Ni-NTA Agarose* (QIAGEN) siguiendo las instrucciones del fabricante. La proteína (his₆)p16 eluye en imidazol 300 mM.

2.6.7.2. Expresión *in vitro* de (his₆)p16

Para la expresión *in vitro* de la proteína de fusión (his₆)p16 se utilizó 1 μ g de la construcción pRSETA-p16 como molde y se empleó el kit *TNT T7 Quick Coupled Transcription-translation System* (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para el marcaje de la proteína sintetizada se utilizó un aminoácido radiactivo L-[³⁵S]Met (Amersham Pharmacia Biotech). Las proteínas sintetizadas se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS y autorradiografía.

2.6.8. Análisis *Far Western blot*

Para el análisis *Far Western blot* histonas internas de eritrocito e histonas de guisante se separaron en SDS-PAGE y se transfirieron a membrana de nitrocelulosa en el tampón T [glicina 192 mM, SDS 0,02%(p/v), Metanol 20%(v/v), Tris-HCl 25 mM pH 8,3]. La membrana se incubó 30 minutos a temperatura ambiente en el tampón Farwest [KCl 75 mM, NaCl 75 mM, EDTA 1 mM, MgCl₂ 0,25 mM, DTT 0,5 mM, Nonidet NP-40 0,05%, BSA 0,4% (p/v), Ficoll 400 0,4% (p/v), PVP 0,4% (p/v), Hepes 20 mM, pH 7,7] y se incubó 16 horas a 4°C en 2 ml de tampón Farwest conteniendo la proteína radiactiva [³⁵S]Met-(his₆)p16, finalmente se realizaron tres lavados de 10 minutos en el mismo tampón. La unión de [³⁵S]Met-(his₆)p16 se examinó con la ayuda de un analizador de imagen Fla-3000 (Fujifilm) y por autorradiografía.

2.6.9. Ensayos de *pull-down*

Para los ensayos de *pull-down* alícuotas de 600 µl de la fracción soluble de extractos de *E. coli* transformadas con las construcciones pGEX4T-1 y pGEX4T-1-p16, se incubaron con 20 µl del gel *glutathion-Sepharose 4B* durante 1 hora a temperatura ambiente. El gel se lavó exhaustivamente con PBS y con el tampón de unión [MgCl₂ 15 mM, NaCl 150 mM, EDTA 15 mM, glicerol 10%(v/v), Triton X-100 0,3% (v/v), NaN₃ 0,02% (p/v), DTT 1 mM, cóctel de inhibidores de proteasas para extractos bacterianos 0,2% (v/v) (Sigma), Tris-HCl 25 mM, pH 7,5]. A continuación histonas internas de eritrocito de pollo o de guisante (20 µg en 65 µl de tampón de unión) o bien histonas individuales de eritrocito de pollo (5 µg en 65 µl de tampón de unión), se añadieron al gel con GST o GST-p16 inmovilizadas. La mezcla se incubó 15 minutos a temperatura ambiente en un agitador orbital. El gel se sedimentó a 3000g durante 1 minuto y se recuperó el sobrenadante (fracción no retenida). Posteriormente, el gel se lavó sucesivamente con 65 µl de tampón de unión conteniendo cantidades crecientes de NaCl (150, 250, 500, 700, 1000, 2000 mM), se centrifugó y se recogieron los sobrenadantes. Las proteínas retenidas después del último lavado fueron liberadas hirviendo el gel en el tampón de muestras de SDS. El contenido de proteínas de cada fracción se analizó mediante SDS-PAGE.

2.6.10. Ensayos de interacción de (his₆)p16 con el DNA

En los ensayos de interacción de p16 con el DNA se utilizaron diferentes moléculas de DNA: (i) DNA plasmídico pBluescript y pRSETA, obtenidos según se describe en el apartado 2.3.2. El plásmido pBluescript se utilizó en la conformación superenrollada, tal y como se extrae de *E. coli*, y lineal, digerido con el enzima de restricción EcoRI. La cuantificación del DNA se realizó por determinación de la absorbancia a 260 nm. (ii) El DNA (208-12) que consiste en 12 repeticiones en tandem de una secuencia de 208 pb

derivada del gen rRNA 5S de *Lytechinus* (Tse *et al.*, 1998). (iii) Mononucleosomas de eritrocito de pollo obtenidos por digestión de la cromatina con nucleasa de micrococo y purificados en una columna Ultrogel AcA34 según el procedimiento descrito por Kornberg *et al.* (1989). Las dos últimas preparaciones de DNA fueron cedidas por el Dr. Ramón Sendra.

2.6.10.1. Ensayo de movilidad en gel nativo

La proteína recombinante (his₆)p16 obtenida de *E. coli* se cuantificó por el método de Bradford (1976). Los ensayos de interacción con el DNA se realizaron en un volumen final de 10 µl, en el tampón [Tris-HCl 10 mM pH 7,5, NaCl 75 mM, MgCl₂ 5 mM, EDTA 1 mM, DTT 1 mM, Ficoll 3%]. En algunos casos se añadió poli-L-glutámico (Sigma) como competidor. Esta molécula está compuesta por 90 residuos de glutámico y tiene un peso molecular de 13,6 kDa. Las incubaciones DNA-proteína se realizaron durante 10 minutos a temperatura ambiente, siguiendo el protocolo descrito por Grasser *et al.* (1994) y la formación de complejos DNA-proteína se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa 1% (p/v) en tampón TBE 0,5 X.

2.6.10.2. Cambios en la conformación del DNA en presencia de p16

El plásmido pBluescript extraído de *E. coli* en su conformación superenrollada se relajó por acción de la topoisomerasa I de germen de trigo de Sigma (1 unidad/µg DNA) durante 1 hora a 37°C, en el tampón de la topoisomerasa [Tris-HCl 40 mM pH 7,5, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM, MgCl₂ 5 mM, BSA 100 µg/ml]. Alícuotas del DNA relajado (5,2 nM) se incubaron en presencia de topoisomerasa I (1 unidad/µg DNA) con diferentes cantidades de la proteína (his₆)p16 (3 µM y 15 µM), citocromo c (15 µM) o la histona H4 (15 µM), en el tampón anterior durante 1 hora a 37°C (Grasser *et al.*, 1996). Transcurrido este tiempo la muestra se desproteinizó con SDS y proteinasa K a una concentración final

de 1% y 0,05 µg/µl respectivamente durante 30 minutos a 37°C. El DNA desproteinizado se analizó en un gel de agarosa al 1% en tampón TAE 1X [Tris-acetato 40 mM pH 8,0, EDTA 1 mM].

2.7. Análisis informático de las secuencias de cDNA y proteína en los bancos de datos

Existen numerosas bases de datos disponibles en la red informática que permiten realizar estudios comparativos y predicciones acerca de una gran variedad de aspectos importantes para el estudio de la estructura y función de proteínas no caracterizadas.

En la siguiente tabla se detallan las bases de datos y los servicios automáticos disponibles en la red, que se han utilizado en el análisis de la secuencia del cDNA de *psp54* así como de las secuencias de proteínas derivadas: p54 y p16.

Bases de datos

Secuencias de DNA, cDNA y secuencias de proteína derivadas

GenBank (<http://www.ncbi.nlm.gov/Web/Genbank/index.html>)

EMBL Nucleotide sequence Database (<http://www.ebi.ac.uk/embl.html>)

Genomas

SGD (<http://genome-www.stanford.edu/Saccharomyces/>)

AtDB (<http://genome-www.stanford.edu/Arabidopsis/>)

Secuencias de proteínas

SWISS-PROT/TrEMBL (<http://www.expasy.ch>)

Motivos de secuencia de proteína

PROSITE (<http://www.expasy.ch/sprot/prosite.html>)

Pfam (<http://Pfam.wustl.edu>)

Estructura tridimensional de proteínas

PDB (<http://www.pdb.bnl.gov>)

Servidores

ProtParam tool (<http://www.expasy.ch/cgi-bin/protparam>)

Características de la proteína: composición en aminoácidos, punto isoeléctrico, masa molecular, etc.

PredictProtein (<http://www.embl-heidelberg.de/predictprotein/>)

Alineamiento de secuencias (identificación de proteínas homólogas); accesibilidad al solvente; localización de hélices transmembrana; estructura secundaria; predicción de estructura tridimensional.

PSORT (<http://psort.nibb.ac.il/jpl>)

Predicción de la localización subcelular

Comparación del perfil de hidropatía (<http://bioinformatics.weizmann.ac.il>)

ProfileScan Server (<http://www.isrec.isb-sib.ch>)

Utiliza el programa “pfscan” para la búsqueda de motivos de secuencia en la proteína en estudio, que estén descritos en las bases de datos de motivos significativos de secuencia, como son PROSITE y pfam.

3. Resultados y Discusión

3.1. Aislamiento y caracterización del cDNA que codifica la proteína p16

3.1.1. Purificación y secuenciación parcial de la proteína p16

En estudios previos se había puesto a punto el aislamiento de p16 mediante extracción ácida de la cromatina, seguida de electroforesis preparativa y electroelución. La proteína purificada de esta forma se utilizó para la inmunización de conejos, que permitió la obtención de anticuerpos altamente específicos. Sin embargo, este método era muy laborioso y la proteína purificada se obtenía en pequeñas cantidades, de manera que resultaba necesario el empleo de alguna técnica alternativa. Para ello se puso a punto el aislamiento de p16 mediante RP-HPLC.

En el protocolo alternativo de purificación de p16, se realizó una extracción ácida de núcleos purificados de ejes embrionarios de guisantes no germinados y las proteínas solubles se fraccionaron mediante RP-HPLC con un gradiente 30-55% de acetonitrilo en 105 minutos. En la figura 2, se muestran los resultados de un cromatograma típico. Se recogieron fracciones que se analizaron mediante SDS-PAGE. De esta forma se identificó p16, que eluye con un tiempo de retención de 41 minutos, equivalente a 40% de acetonitrilo.

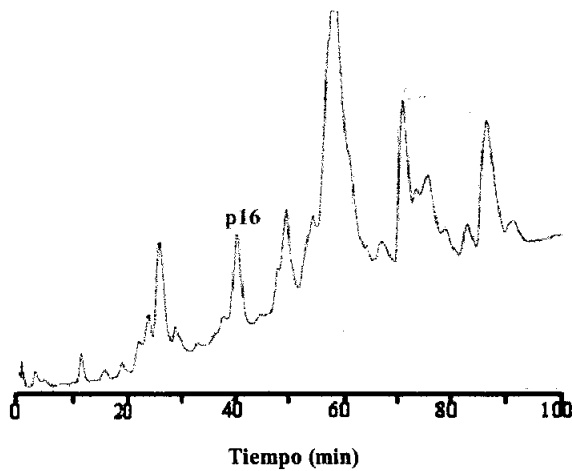


Figura 2. Separación mediante RP-HPLC de un extracto ácido de proteínas nucleares de ejes embrionarios de guisante. Se muestra el perfil de absorbancia a 230 nm, donde se señala el pico correspondiente a la proteína p16.

En la figura 3A, se muestra el análisis mediante SDS-PAGE de las fracciones correspondientes a p16. Junto a p16 pura se muestra las proteínas presentes en el extracto ácido de partida. El anticuerpo de p16 confirmó que la proteína aislada era p16 (figura 3B). También se observó que en ausencia de agentes reductores aparece una banda adicional con una masa molecular compatible con la formación de un dímero de p16 (figura 3C). Como se verá en el apartado 3.1.2, p16 contiene un residuo de cisteína que estaría implicado en la formación del dímero.

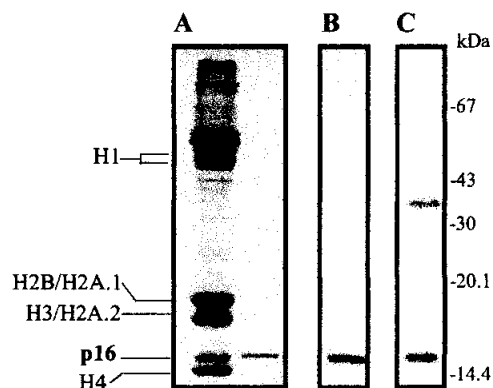


Figura 3. Purificación de la proteína p16. (A) SDS-PAGE de un extracto ácido de proteínas nucleares (línea izquierda) y p16 purificada mediante RP-HPLC (línea derecha).

Western blot de p16 purificada, electroforesis realizada en presencia (B) o ausencia (C) de agentes reductores. La masa molecular de los patrones se muestra a la derecha del panel C.

El aminoácido N-terminal de la proteína no estaba bloqueado, lo que permitió secuenciar el extremo N-terminal de p16. La secuencia obtenida fue: S-R-Q-K-K-S-X-I-S-Y-H-N-I-N-A-K-L-R-P-G-; donde el aminoácido X no pudo ser identificado. Por otro lado, la proteína p16 purificada por RP-HPLC se digirió con tripsina y los péptidos trípticos se fraccionaron mediante RP-HPLC. En la figura 4, se muestra el cromatograma de la digestión tríptica. Se secuenciaron los dos picos mayoritarios (péptidos T1 y T2). La secuencia de T1 corresponde a la del péptido 6 - 16 del extremo N-terminal y la del péptido T2 corresponde a una secuencia interna de p16: K-E-E-F-F-F-P-Y-D-N-E-E-R.

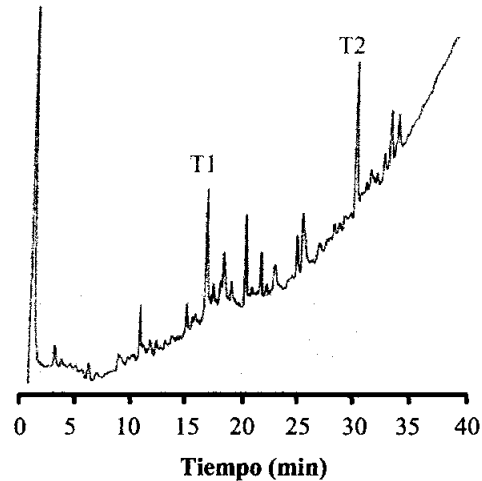


Figura 4. Separación mediante RP-HPLC de los péptidos trípticos de p16. Se muestra el perfil de absorbancia a 230 nm, donde se señalan en morado los péptidos elegidos para la secuenciación.

3.1.2. Aislamiento del cDNA que codifica la proteína p16

3.1.2.1. Construcción de una genoteca de cDNA de ejes embrionarios de guisante

La disponibilidad de anticuerpos policlonales específicos contra p16 permitió la obtención del clon de cDNA que codifica esta proteína. Para ello se construyó una genoteca de expresión en el vector λ -ZAP a partir de mRNAs de ejes embrionarios de semillas de guisante recolectadas 30 días después de la floración (DAF). Se seleccionó este periodo de tiempo asumiendo que, si la proteína p16 se encontraba en la semilla y no en la

planta adulta (como se verá en el apartado 3.2.2), su mRNA debía acumularse durante la maduración de la semilla. La genoteca se rastreó con el anticuerpo de p16, y se obtuvieron 20 clones que daban reacción con el anticuerpo. Se analizaron cinco de ellos y se observó que contenían insertos de aproximadamente 1,7 kb. Dos de estos clones fueron caracterizados posteriormente. Los insertos fueron escindidos del vector λ -ZAP, propagados en el plásmido resultante pBluescript II SK(+/-) y se secuenciaron las dos cadenas de DNA de los dos insertos seleccionados. La secuencia de nucleótidos del primer clon se muestra en la figura 5. El segundo clon resultó ser una versión truncada del primero, que empieza en la posición 131, siendo el resto de la secuencia idéntica al primero.

3.1.2.2. Análisis de la secuencia de cDNA del gen que codifica p16

La secuencia de cDNA obtenida, contiene un codón de inicio ATG dentro de la secuencia AACCATGGCG, que se aproxima bastante a la secuencia consenso de inicio de la traducción en plantas (Lütke *et al.*, 1987) y un codón de parada TGA, mostrados en negrita en la figura 5. Ambos codones delimitan una pauta de lectura abierta de 1449 pb, que codifica un polipéptido de 483 aminoácidos con una masa molecular de 54,5 kDa, al que se hará referencia a partir de este momento como p54. 90pb por delante del sitio poli(A) se encuentra una posible secuencia señal de poliadenilación (AAATAAAAA) y un motivo menos conservado rico en GT (Wu *et al.*, 1995). El gen que codifica la proteína p54 se denominó *psp54* (de *pea seed protein*). La secuencia de cDNA se depositó en la base de datos GenBank donde se le asignó el código de acceso Y11207.

Figura 5. Secuencia de nucleótidos y de aminoácidos deducida del cDNA *psp54*. El codon de inicio y de terminación se marcan en negrita. En el extremo 3' la supuesta señal de adenilación y la secuencia rica en GT se marcan en cursiva. El núcleo hidrofóbico del supuesto péptido señal se marca en negrita y el punto entre la Gly27 y la Arg28 indica el posible lugar de procesamiento del péptido señal. Las dos supuestas señales de localización nuclear se señalan en negrita y cursiva. El péptido N-terminal y el péptido tríptico secuenciados de p16 se muestran con un subrayado simple y doble respectivamente. La flecha entre la Asn371 y la Ser372 indica el punto de procesamiento para rendir p16 madura. La secuencia de nucleótidos ha sido depositada en el GeneBank/EBI Data Bank con el n° de acceso Y11207.

3.1.3. Caracterización de la secuencia de aminoácidos codificada por el gen *psp54*

3.1.3.1. Análisis de la secuencia de aminoácidos del precursor p54

La proteína codificada por el gen *psp54* es de mayor tamaño que p16, sin embargo tanto el péptido N-terminal como el péptido tríptico interno de p16 pueden alinearse en la secuencia proteica deducida del cDNA (figura 5, subrayado simple y doble). La localización del péptido N-terminal de la proteína p16 en este polipéptido más largo, indica que la proteína p16 madura comienza en la Ser 372 de p54. De acuerdo con estos datos, p16 estaría codificada por el último tercio del cDNA del gen *psp54*, y por tanto la proteína precursora p54 debe ser procesada para dar lugar a la proteína p16 madura.

La secuencia deducida del cDNA indica que p16 es una proteína básica con un punto isoeléctrico de 9,52 y con una masa molecular real de 12,5 kDa, calculados con el programa *ProtParam tool*.

Para el análisis de posibles motivos de localización subcelular en la secuencia de aminoácidos de p54, se utilizó el programa *PSORT*. Este programa analiza la secuencia proteica en base a características de señales de distribución subcelular de proteínas conocidas. En los primeros 27 residuos de p54 se encontraron motivos consenso de péptidos señal (Watson, 1984; von Heijne, 1986), que normalmente tienen una longitud de 20-40 aminoácidos. De acuerdo con el patrón establecido, esta secuencia presenta un núcleo hidrofóbico (IFLFFLLALL) precedido por dos residuos cargados (Lys4 y Lys6). El punto de procesamiento de la secuencia señal N-terminal podría ser entre la Gly27 y Arg28, ya que la presencia de dos aminoácidos de cadena corta en las posiciones -1 y -3 respecto al sitio de corte (Gly27 y Ala25 en p54) es un hecho común en el procesamiento de secuencias señal (von Heijne, 1986).

Por otro lado, se encontraron dos posibles secuencias bipartitas de localización nuclear (Robbins *et al.*, 1991; Stacy *et al.*, 1999), una en la región N-terminal de p54 y otra en la

región correspondiente a p16 (figura 5). Estas señales, sugieren la posible existencia de más de un destino subcelular tanto de p54 como de los productos resultantes de su procesamiento, y estarían de acuerdo con la presencia de p16 en núcleos de guisante. Aunque no es un hecho frecuente la coexistencia de más de una señal de localización subcelular en un mismo polipéptido, se conocen algunas proteínas en donde se presenta esta peculiaridad. Por ejemplo, existe una nucleosido trifosfatasa (NTPasa) de guisante, asociada a la cromatina, que posee un péptido señal en su extremo N-terminal y una secuencia bipartita de localización nuclear hacia la mitad de la proteína (Hsieh *et al.*, 1996). Estos autores plantean la posibilidad de que parte de la población de mRNAs podría perder la región que codifica el péptido señal (o bien que ésta quedara oculta), la NTPasa traducida de esta población de mRNAs no tendría el péptido señal para dirigirse al retículo endoplásmico, pero sí la secuencia de localización nuclear que la transportaría al núcleo. Alternativamente, podría existir alguna ruta, hasta el momento desconocida, de transporte de proteínas desde el retículo endoplásmico al interior del núcleo o podría darse una competencia entre las distintas señales que permitiera una distribución de las proteínas a diferentes localizaciones subcelulares.

Finalmente, se llevó a cabo una búsqueda de secuencias consenso de modificaciones postraduccionales mediante el servidor *ProfileScan Server* y el programa *ScanProsite*. p54 posee secuencias consenso para diversos tipos de modificaciones (fosforilación, glicosilación, etc.). Algunas de las secuencias consenso de fosforilación por proteína quinasas A y C se encuentran en la región correspondiente a p16. La posible fosforilación de la Ser7 de p16 sería compatible con la ausencia de señal en el ciclo 7° de secuenciación del péptido N-terminal de p16. Algunos resultados preliminares de fosforilación *in vitro* de p16, obtenidos en nuestro laboratorio, indican que p16 es sustrato de proteína quinasas A y C. La existencia de modificaciones postraduccionales de p16 o de su precursor p54 podrían tener algún papel en el destino subcelular de estas proteínas, en su degradación y/o en su función.

3.1.3.2. Comparación de la secuencia de aminoácidos de p54 en las bases de datos

El alineamiento de la secuencia de p54 con secuencias no redundantes de los diferentes bancos de datos (*Genbank*, *EMBL*, *PIR*, *SwissProt*) se llevó a cabo mediante el programa *BLAST* (Altschul *et al.*, 1990), al que se puede acceder a través del servidor *NCBI* (*National Center for Biotechnology Information*). Entre las secuencias resultantes, aparece en primer lugar una proteína de haba (*Vicia faba*), que ha sido depositada recientemente (Wobus, 2001) en las bases de datos y que presenta un 85% de identidad y un 94% de similitud de secuencia con p54. Hasta el momento no existe ninguna publicación acerca de las propiedades de esta proteína. En el capítulo 3.2.5, se mostrará que el anticuerpo de p16 reconoce en haba una proteína de un tamaño muy similar a p16, que podría ser el resultado del procesamiento de la proteína precursora, *p54-like*, depositada en el banco de datos. Esta proteína *p54-like* contiene la secuencia de corte Asn-Ser y las posibles secuencias de péptido señal y de localización nuclear presentes en p54.

En segundo y tercer lugar aparecen dos proteínas de soja muy similares entre sí y con funciones análogas, la proteína SBP (*sucrose binding protein*) descrita por Grimes *et al.* (1992) y otra proteína descrita recientemente denominada *SBP-like* por Pedra *et al.* (2000). La SBP de soja, cuyo precursor es un poco mayor que p54, presenta un 54% de identidad de secuencia y un 60% de similitud de secuencia con p54. Esta proteína se asocia a la cara externa de la membrana plasmática en células implicadas en el importe de sacarosa, incluyendo células del mesófilo de hojas jóvenes, células acompañantes del floema maduro y células de cotiledones en desarrollo. La similitud entre p54 y el precursor de la SBP se extiende a lo largo de toda la secuencia, de manera que p16 muestra una identidad de secuencia similar con la región C-terminal de la proteína SBP.

Cuando se comparan los perfiles de hidropatía de p54 y SBP se observa que prácticamente se superponen (figura 6). El programa utilizado, calcula el perfil de hidropatía de la proteína de interés mediante el método seleccionado (Kyte & Doolittle, 1982; ventana de 7 residuos) y busca proteínas con un perfil similar en la base de datos

SwissProt. Como se observa en la figura 6, la comparación de los perfiles de hidropatía de las proteínas p54 y SBP indica que, a pesar de que ambas secuencias poseen en su extremo N-terminal un dominio hidrofóbico, el resto de la proteína es bastante hidrofílica y no contienen dominios de secuencia transmembrana convencionales. Obviamente, la proteína p54-like de *V. faba* presenta un perfil de hidropatía prácticamente idéntico a p54.

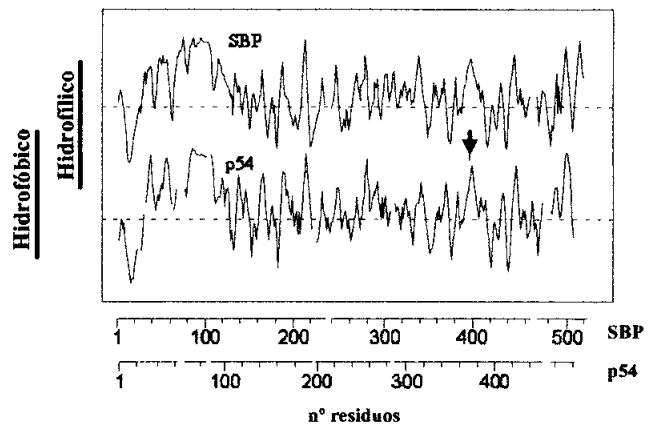


Figura 6. Perfil de hidropatía de las proteínas p54 de guisante y SBP de soja según el método de Kyte & Doolittle (1982) con una ventana de siete residuos. Las regiones hidrofílicas se sitúan por encima de la línea de puntos y las hidrofóbicas por debajo. La flecha indica el punto de procesamiento para rendir p16.

Al igual que p54, el precursor de la SBP posee en el extremo N-terminal un péptido señal, sin embargo, no posee secuencias de localización nuclear, lo que estaría de acuerdo con su localización en la cara externa de la membrana plasmática. La SBP de 62 kDa no se procesa para rendir un polipéptido homólogo a p16, la causa de esta ausencia de procesamiento probablemente es debida a la sustitución de la Asn 371 de p54 por un Glu en la SBP. Las diferencias mencionadas sobre procesamiento y señales de localización subcelular sugieren que estas proteínas tienen funciones diferentes a pesar de estar estructuralmente relacionadas. Aunque en el presente trabajo no se ha estudiado la capacidad de unión y/o transporte de sacarosa de p54, Wobus *et al.* (comunicación personal) han expresado la proteína p54-like de *V. faba* en levadura y no han podido demostrar ninguna relación con el transporte de sacarosa. La ausencia de relación funcional entre estas proteínas es apoyada por la presencia en guisante de un homólogo a la SBP distinto de p54 que es reconocido mediante análisis *Northern* y *Western blot* por el cDNA y el anticuerpo de la SBP de soja (Tegeeder *et al.*, 1999).

Otras proteínas con las que p54 muestra similitud de secuencia, aunque en menor medida (del orden del 30-35 % de identidad y 50-55 % de similitud de secuencia), son proteínas de reserva de la familia de las vicilinas. Entre las vicilinas con mayor similitud de secuencia se encuentra una preproteína de la especie *Macadamia integrifolia*, que durante la germinación de la semilla rinde una serie de péptidos antimicrobianos, por procesamiento del extremo N-terminal (Marcus *et al.*, 1999). Estos péptidos tienen un motivo de secuencia C-X-X-X-C-(10-12)X-C-X-X-X-C y un tamaño aproximado de 50 aminoácidos. p54 posee uno de estos motivos que son característicos de la región N-terminal de la mayor parte de vicilinas de 70 kDa. Aunque se conoce poco sobre posibles funciones que podrían realizar las vicilinas, a parte de la de servir como reserva de nutrientes, recientemente se ha sugerido (Chung *et al.*, 1997; Marcus *et al.*, 1999) que estos péptidos resultantes del procesamiento N-terminal de algunas vicilinas ejercerían un papel de defensa durante la germinación de la semilla.

En orden de similitud de secuencia aparecen otras proteínas vicilinas de maíz (*Zea mays*), abeto rojo (*Picea glauca*), nuez (*Juglans regia*), algodón (*Gossypium hirsutum*), cacao (*Theobroma cacao*), calabaza (*Cucurbita máxima*), haba (*Vicia faba*), guisante (*Pisum sativum*), soja (*Glycine max*), cebada (*Hordeum vulgare*), etc.

Al comparar la secuencia de p54 con el genoma de *Arabidopsis thaliana* aparecen también proteínas tipo vicilinas con un grado de identidad del 20-25% y un 30-40% de similitud de secuencia. Finalmente, al comparar la secuencia de p54 con el banco de datos de *Saccharomyces cerevisiae* aparece una proteína nuclear que presenta un 30% de similitud de secuencia sólo en la zona correspondiente a p16. Esta proteína denominada Nhp2p (Kolodrubetz *et al.*, 1991) se encuentra localizada en el nucleolo y forma parte de complejos implicados en la maduración del rRNA (Henras *et al.*, 1998), siendo una proteína esencial para la levadura. Existe un homólogo en humanos, la proteína NHP2L1 (Saito *et al.*, 1996), ambas pertenecen a una familia de posibles proteínas de unión a RNA.

Con el fin de analizar la posible existencia de algún motivo de secuencia, en p54 o p16, que pudiese aportar algún dato acerca de su posible estructura y/o función, se utilizó

el servidor *ProfileScan Server*. El programa *Pfscan* de este servidor busca en la secuencia de interés aquellos motivos de secuencia descritos en las bases de datos *PROSITE* y *Pfam*. Hay una gran cantidad de secuencias cortas que con frecuencia, aunque no siempre, pueden diagnosticar ciertas propiedades de unión a otras moléculas o sugerir la existencia de sitios activos. Estos motivos surgen por la necesidad particular de los sitios de unión o sitios catalíticos de preservar una determinada estructura para realizar una función. El análisis de la secuencia de p54 en estas bases de datos indicó que contenía un motivo conservado entre las proteínas de reserva 7S y 11S a lo largo de toda la secuencia, incluyendo la zona correspondiente a p16.

Por otro lado, apareció el motivo hélice-vuelta-hélice tipo *AraC* únicamente en la región correspondiente a p16. Muchos factores transcripcionales bacterianos se unen al DNA a través de este motivo hélice-vuelta-hélice. Una de las subfamilias mayoritarias de este tipo de proteínas está relacionada con la proteína *AraC*, reguladora del operon arabinosa en *E.coli* (Gallegos *et al.*, 1993). Este motivo se encuentra localizado en el extremo C-terminal de la mayor parte de las secuencias que lo contienen, mientras que la región N-terminal y central están implicadas en la dimerización y en la interacción con moléculas efectoras. La posible existencia de este motivo de unión al DNA en la región correspondiente a p16, sería consistente con la hipótesis de partida de que p16 es una proteína nuclear asociada a la cromatina, y que se discutirá a lo largo de este trabajo.

3.1.3.3. Aspectos evolutivos y estructurales de p54

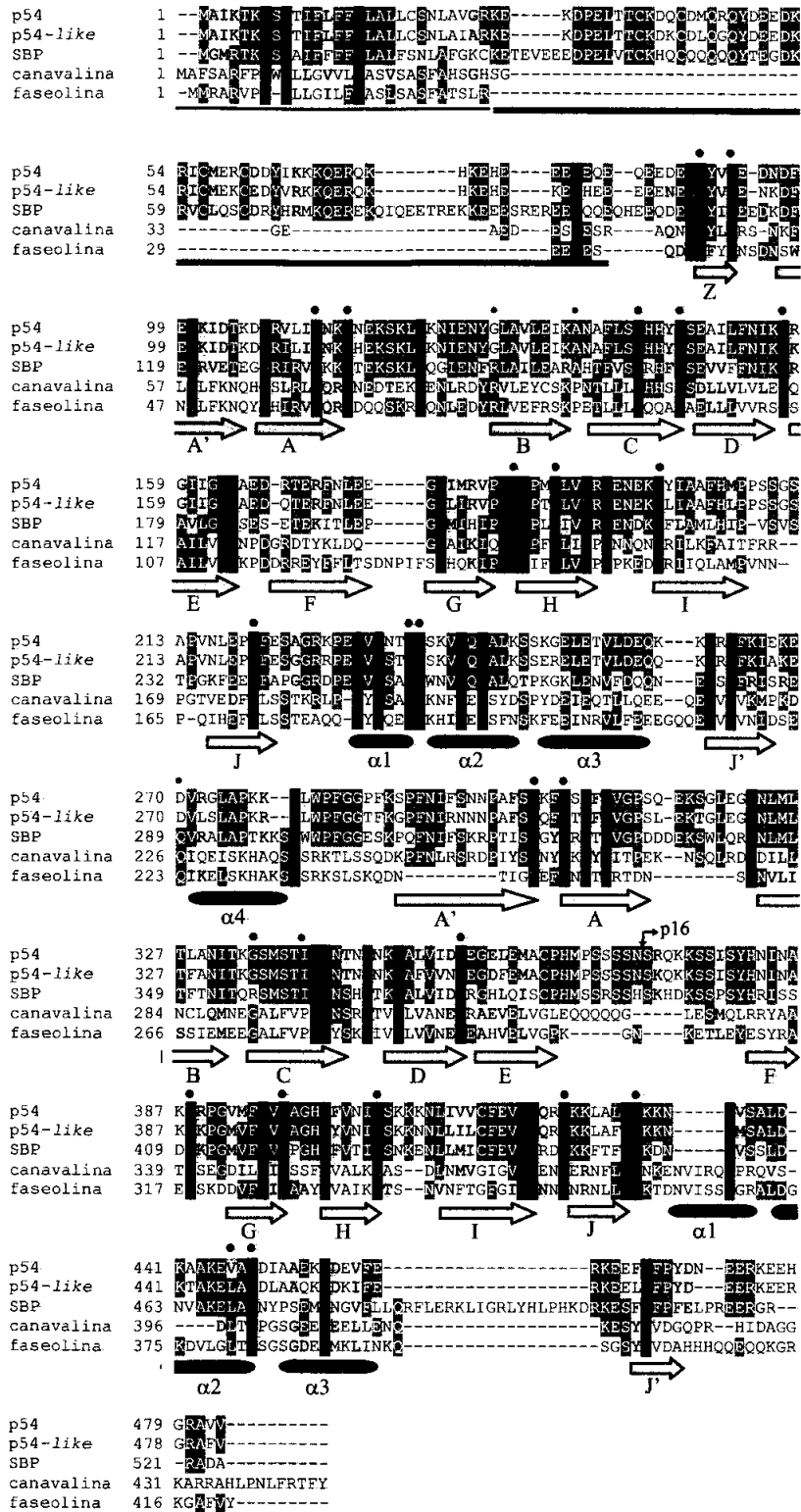
3.1.3.3.1. p54 y las globulinas de reserva proceden de un único ancestro común

El estudio de la estructura resuelta por difracción de rayos X de dos proteínas tipo vicilina, la faseolina de *Phaseolus vulgaris* (Lawrence *et al.*, 1990, 1994) y la canavalina de *Canavalia ensiformis* (Ko *et al.*, 1993), mostró la presencia de un motivo estructural formado por un barril de hojas β seguido de tres hélices α . El motivo estructural ($\alpha+\beta$) aparece por duplicado y está conservado tanto en vicilinas como en leguminas, consta de

28 residuos estrictamente conservados en todas las secuencias alineadas, que son esenciales para garantizar la integridad de la estructura. El alineamiento de los módulos N- y C-terminales de vicilinas y leguminas reveló además que existían dos motivos de secuencia conservados: **P-X₁₃₋₁₄-G** y **G-X₄-I-P-X-G** (Shutov *et al.*, 1995). Como ya se ha comentado en la introducción, la búsqueda de estos dos motivos en las bases de datos, permitió la identificación de otras proteínas constituidas por un único módulo ($\alpha+\beta$), las germinas de trigo y las esferulinas de hongos. El hecho de que ambas proteínas tengan funciones relacionadas con procesos de deshidratación e hidratación celular llevó a Baümllein *et al.* (1995) a sugerir que las globulinas de las semillas de espermatofitos habrían evolucionado de un grupo de proteínas ancestrales funcionalmente implicadas en procesos relacionados con el estado hídrico de la célula.

En la figura 7, se muestra el alineamiento de secuencia de las proteínas faseolina (*Phaseolus vulgaris*), canavalina (*Canavalia ensiformis*), SBP (*Glycine max*), p54 (*P. sativum*) y p54-like (*V. faba*). p54 contiene 24 de los 28 residuos estrictamente conservados en las secuencias de vicilinas y posee también una duplicación interna, de manera que es posible predecir la posición de los dos dominios estructurales ($\alpha+\beta$) N- y C-terminales.

Figura 7. Alineamiento de secuencias de p54 con p54-like de *Vicia faba* (AJ292221), SBP (Q04672) y dos vicilinas con estructura tridimensional conocida, canavalina (P10562) y faseolina (P02853). Los aminoácidos idénticos en todas las secuencias aparecen sombreados en negro, en gris oscuro aquellos que se encuentran en más del 50% de las secuencias y en gris claro los cambios conservativos. Los elementos de estructura secundaria de la faseolina se indican en la parte inferior de cada bloque de secuencias, en azul las hojas β y en rojo las hélices α . Los 28 residuos altamente conservados en la estructura de las vicilinas se marcan con un punto negro (●), excepto el cambio no conservativo de prolina por isoleucina coloreado en rojo (●) y otros tres cambios no conservativos coloreados en azul (●). El lineado simple indica el dominio N-terminal hidrofóbico y el doble lineado indica un segmento altamente hidrofílico presente en p54, p54-like y SBP. La doble flecha indica el punto de procesamiento para rendir p16.



El dominio N-terminal de p54 contiene los dos motivos de secuencia conservados, sin embargo en el dominio C-terminal el residuo de prolina estrictamente conservado del motivo **P-X₁₃₋₁₄-G** (residuo 339 de p54), es reemplazado por un residuo de isoleucina. Este cambio no conservativo, que se produce también en p54-like (*V. faba*) y en la SBP (*G. max*), podría tener importantes implicaciones estructurales. Estos residuos de prolina forman una protuberancia en la hoja C del barril β de ambos dominios y probablemente facilita la incorporación en la estructura del motivo en α -hélice insertado entre los segmentos de cadena J y J'. Por otro lado, esta protuberancia parece estar implicada también en la formación de oligómeros.

El programa *SwissModel* permite obtener modelos de estructura para aquellas proteínas que posean un homólogo cuya estructura tridimensional esté resuelta y depositada en el banco de datos de estructuras *Protein Data Base* (PDB). Estos programas realizan un alineamiento de secuencia con la proteína de estructura conocida y proponen una estructura para la proteína homóloga. El factor limitante para la obtención del modelo de estructura por homología es el porcentaje de aminoácidos idénticos entre las dos proteínas comparadas, de manera que el mínimo necesario para obtener un modelo fiable es del 25%. El precursor p54 posee un 29% de aminoácidos idénticos con la canavalina y la faseolina. El programa es capaz de obtener un modelo de estructura de la región comprendida entre los residuos Asn82 y Val396 de p54 (figura 8). La Asn82 está situada justo antes del comienzo de lo que correspondería al dominio estructural ($\alpha+\beta$) N-terminal, sin embargo la Val396 se encuentra situada en lo que correspondería al lazo GH, y por tanto el dominio estructural C-terminal de p54 no se consigue plegar completamente, le faltarían tres cadenas β y el dominio en α hélice, más o menos la zona correspondiente a p16. Cuando los cuatro aminoácidos no conservados en p54, se sustituyen por los residuos conservados, el programa continúa sin poder plegar la región correspondiente a p16, lo que sugiere que aunque estas sustituciones pueden ser importantes para la estructura, la secuencia inherente a p16 es la que impide el plegamiento.



Figura 8. Modelización de la estructura de p54 mediante el programa SwissModel. En la parte superior se muestra la estructura de la faseolina utilizada por el programa como modelo. En la parte inferior se muestra la estructura obtenida para p54 donde se señala la Val396 como último aminoácido plegado.

Según el modelo canónico, el lazo EF del dominio C-terminal ha tolerado largas inserciones a lo largo de la evolución (figura 3.6). El sitio de corte de p54 que da lugar a la proteína p16 aparece en la inserción I1 presente en el lazo EF del dominio C-terminal. Este lazo tiene carácter hidrofílico y probablemente se encuentra en la superficie de la estructura tridimensional lo cual favorecería el procesamiento de p54.

La inserción I1 de p54 empieza con un motivo CPH, que se ha sugerido podría haber derivado de la inserción I1, formada únicamente por el motivo YPN, de la proteína tipo vicilina de helecho (MVP), cuya secuencia sería muy similar a la del ancestro duplicado (Shutov *et al.*, 1995). Este motivo CPH aparece también en el lazo EF del dominio N-terminal de las leguminas. En el caso de las leguminas esta cisteína está estrictamente conservada debido a que participa en la formación del enlace disulfuro que mantiene unidos los dominios estructurales N- y C-terminales, mientras que en algunas vicilinas este motivo se ha perdido. Por otro lado las proteínas p54, p54-like y SBP poseen una extensión N-terminal hidrofílica similar a la que presentan las vicilinas de 70 kDa (mostrado por doble lineado en la figura 7). El hecho de que la proteína MVP de helecho presente

también este tipo de extensión en su extremo N-terminal confirma que se trata de un carácter ancestral, que debieron perder las vicilinas de 50 kDa. Estos dos hechos, el motivo CPH y la extensión N-terminal conservados en las secuencias de p54, p54-like y SBP apoyarían su carácter ancestral situándose más próximas a la secuencia del ancestro común duplicado que otras proteínas tipo vicilina de sus mismas especies.

En la figura 9 se muestra un árbol sin raíz que pone de manifiesto la homología entre vicilinas de diferentes especies, SBP, p54-like, y p54 y en la figura 10 se muestra el enclave taxonómico de las mismas especies. Es de resaltar, que p54 presenta mayor homología con vicilinas pertenecientes a especies taxonómicamente muy distantes al guisante, como las de maíz (monocotiledonea) y abeto rojo (gimnosperma), lo que sugiere que p54, p54-like y SBP poseen caracteres ancestrales previos incluso a la separación de gimnospermas y angiospermas.

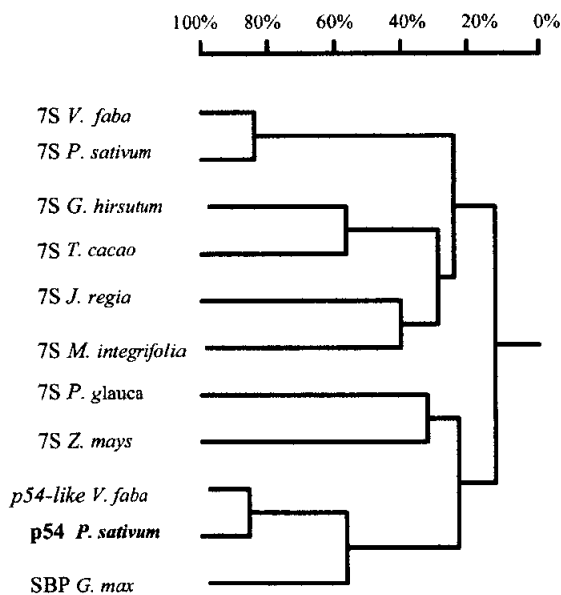


Figura 9. Árbol sin raíz que denota las diferencias entre las secuencias de aminoácidos de diferentes vicilinas, expresadas en % de identidad de residuos a lo largo de toda la secuencia, realizado con el programa Dnaman. Las secuencias comparadas son: vicilinas 7S de *Pisum sativum* (P13918), *Vicia faba* (P08438), *Gossypium hirsutum* (M19378), *Theobroma cacao* (S22477), *Juglans regia* (AF066055), *Macadamia integrifolia* (AF161885), *Picea glauca* (X63191), *Zea mays* (X59083); proteína homóloga a p54 en *Vicia faba* (AJ292221), p54 de *Pisum sativum* (Y11207), y SBP de *Glycine max* (L06038).

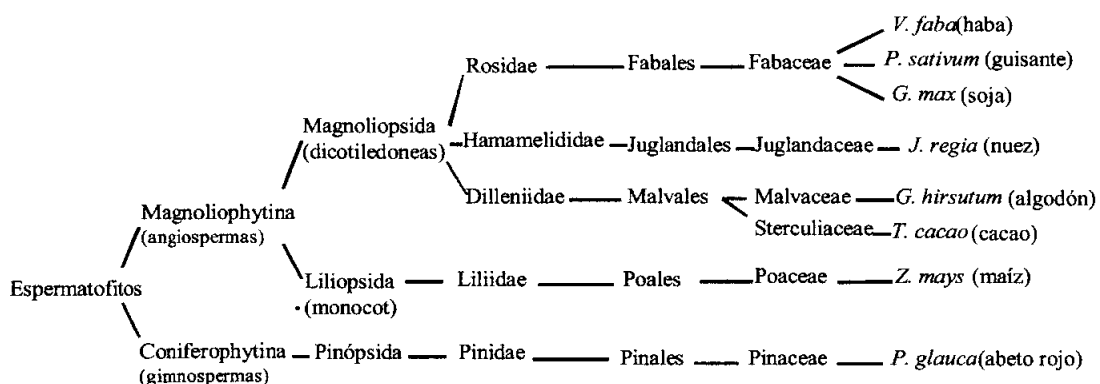


Figura 10. Emplazamiento taxonómico de las especies indicadas. Clasificación según Strasburger, (1991) en división, subdivisión, clase, subclase, orden, familia, género y especie.

3.1.3.3.2. p54, nuevo miembro de la superfamilia cupina

Recientemente Dunwell *et al.* (2000) han propuesto agrupar todas las proteínas que formaban la superfamilia con el dominio ($\alpha+\beta$), que incluía leguminas, vicilinas, proteínas de unión a sacarosa (SBP), esferulinas y germinas, junto con un gran número de proteínas tanto de organismos procariotas como eucariotas en una única superfamilia denominada *cupina* (de *cupa*, barril). La superfamilia *cupina* reúne un gran número de proteínas con una estructura común pero funcionalmente diferentes. La estructura que caracteriza esta superfamilia es la presencia de un barril de hojas β que contiene dos motivos de secuencia conservados ($G(X)_5HXH(X)_{11}G$; $G(X)_5P(X)_4H(X)_3N$) separados por una región entre motivos de longitud variable. Estos motivos están contenidos en las hojas β C/D y G/H de ambos dominios N- y C-terminal de la faseolina. En esta superfamilia se agrupan proteínas que muestran una gran variedad de funciones: enzimas (germinas que poseen actividad oxalato oxidasa, isomerasas, descarboxilasas, etc.), proteínas de unión a azúcares (SBP,

factores de transcripción bacterianos de la familia AraC/XylS implicados en el metabolismo de azúcares), proteínas de unión a auxinas y unión al DNA (de nuevo los factores de unión al DNA tipo AraC) y globulinas de reserva. Aunque las proteínas de la superfamilia cupina tienen funciones diferentes parece haber una relación general entre estas proteínas y procesos relacionados con la respuesta a estrés hídrico tanto en procariotas como en eucariotas, de hecho se ha propuesto que la protocupina ancestral estaría implicada en procesos de deshidratación e hidratación celular. Es más, se supone que el ancestro común tendría una estructura predominante en hoja β y que probablemente el motivo en α -hélice presente en las proteínas más grandes fue añadido a una secuencia *core* muy temprano en la evolución. Recientemente, Clissold & Ponting (2001) han demostrado la similitud existente entre el dominio cupina y el dominio jumonji C-terminal (*JmjC*), presente en numerosos factores transcripcionales eucariotas. El dominio *JmjC* está presente en proteínas que contienen también dominios de unión al DNA o a la cromatina, lo que hace a estas proteínas candidatos excelentes para la regulación de procesos de remodelación de la estructura de la cromatina al igual que hacen otros enzimas via fosforilación, metilación y acetilación.

Considerando el conjunto de datos de este apartado es posible proponer un esquema evolutivo (figura 11) para la proteína p54 y sus homólogos en base al propuesto por Shutov *et al.*, (1998).

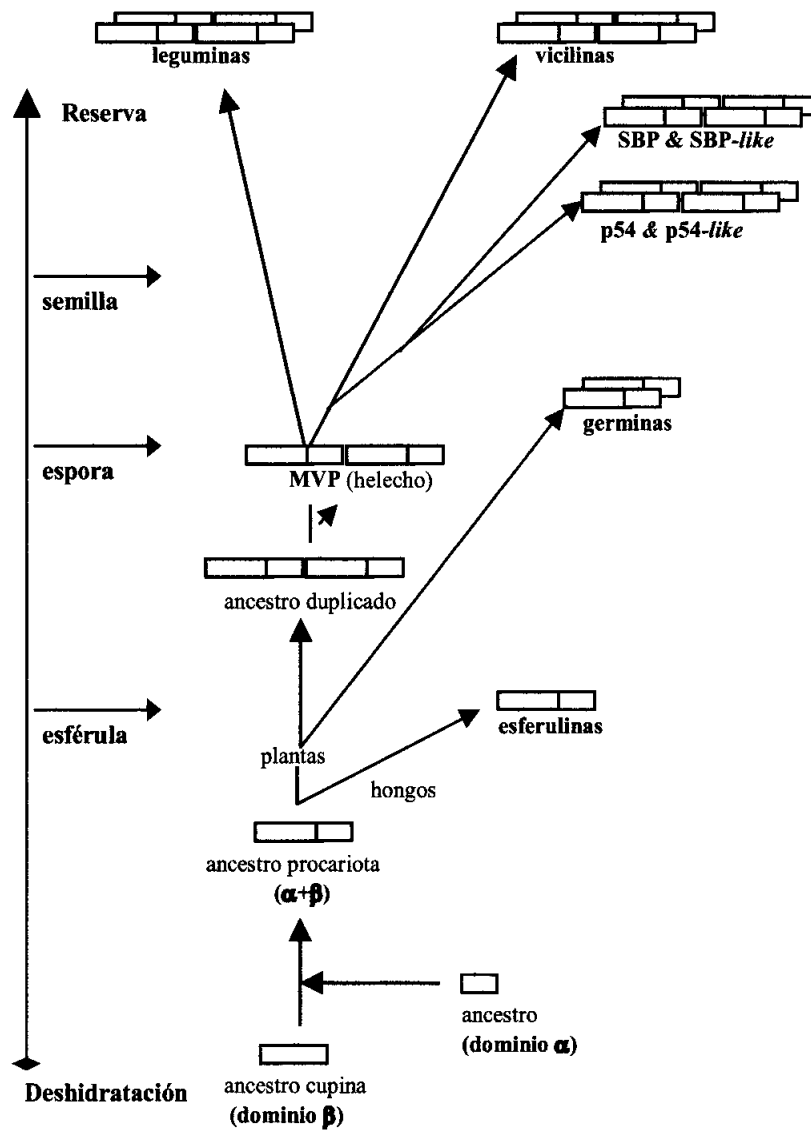


Figura 11. Esquema hipotético de la evolución de p54 junto con otras proteínas homólogas.

3.2. Estudio de la expresión del gen *psp54*

La proteína p16 desaparece durante la germinación de la semilla de guisante y no se detecta en tejidos de la planta adulta, por tanto, es obvio que debe sintetizarse en algún momento durante el desarrollo embrionario. La clonación del cDNA de *psp54*, así como la disponibilidad de anticuerpos específicos contra la proteína p16, han hecho posible el análisis de la regulación de la expresión del gen *psp54* tanto a nivel de transcrito como de proteína.

3.2.1. Organización del gen *psp54* en el genoma de *Pisum sativum*

La organización molecular del gen *psp54* en el genoma de guisante se analizó mediante *Southern blot*. El DNA genómico de hojas, digerido con una serie de enzimas de restricción, separado mediante electroforesis de agarosa y transferido a membrana, se hibridó en condiciones restrictivas con la sonda del cDNA de *psp54* marcada radiactivamente, según se indica en Materiales y Métodos. En el análisis de las digestiones con los enzimas BclI, BglII y EcoRV, que no cortan dentro de la secuencia del cDNA, se detecta un única banda. El mismo resultado se obtiene con la digestión EcoRI, enzima que corta a 44 pb del extremo 3' del cDNA. Por último, la digestión con KpnI, enzima que corta hacia la mitad de la secuencia del cDNA, da lugar a dos fragmentos (figura 12). Estos resultados están de acuerdo con la existencia de una copia única del gen *psp54* en el genoma de *P. sativum* y contrasta con la situación de los genes de globulinas de reserva en guisante y otras semillas, que típicamente constituyen familias multigénicas (Lycett *et al.*, 1983; Gatehouse *et al.*, 1983; Bewley & Marcus, 1990; Sherry *et al.*, 1995).

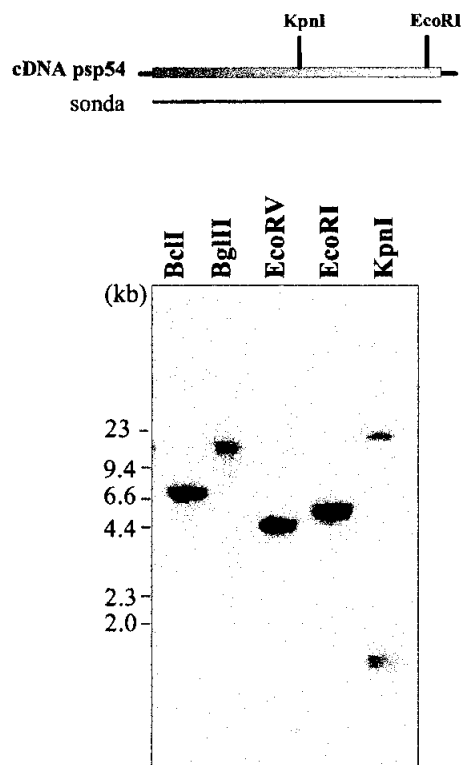


Figura 12. Southern blot de DNA genómico de guisante, digerido con los enzimas de restricción, BclI, BglII, EcoRV, EcoRI y KpnI ($10\mu\text{g}/\text{digestión}$) e hibridado con la sonda del cDNA de *psp54*. En la parte superior de la figura se muestra un esquema de los sitios de corte del cDNA y la sonda utilizada. La masa molecular de los patrones de DNA se señalan a la izquierda de la figura.

3.2.2. Expresión del gen *psp54* en diferentes órganos de la planta

En una primera instancia, se analizaron los niveles de mRNA del gen *psp54* en los diferentes órganos de la planta mediante *Northern blot* de RNA total extraído de diferentes tejidos (Figura 13A). La sonda del cDNA del gen *psp54* detecta una sola banda que corresponde a un transcrito de 1.4 kb, de acuerdo con el tamaño del cDNA de *psp54*. El mRNA se encuentra presente en la semilla madura, periodo previo a la latencia, así como

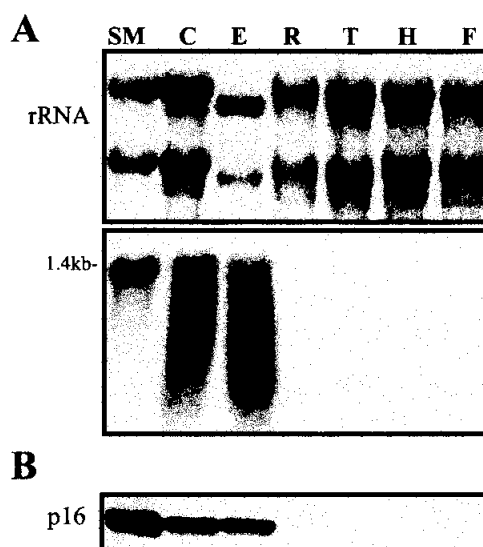
en ejes y cotiledones procedentes de semillas secas y embebidas durante 20 horas a 4°C. El mensajero no se detectó en tejidos de la planta adulta ni en flores.

Por otro lado, se analizaron los niveles de proteína en extractos de proteína total de los diferentes tejidos mediante *Western blot*, utilizando el anticuerpo de p16, y se confirmó la presencia de la proteína p16 únicamente en aquellos tejidos donde hay mRNA (figura 13B). Ambos análisis demuestran que la expresión del gen *psp54* está regulada a nivel de tejido, siendo p16 una proteína específica de la semilla.

Figura 13. Análisis del patrón de expresión por tejidos del gen *psp54*.

(A) Análisis mediante *Northern blot* de extractos de RNA total (10 µg/línea) de diferentes tejidos de la planta (SM, semilla madura; C y E, cotiledones y ejes embrionarios de semillas tras un periodo de imbibición de 20 horas; R, raíz; T, tallo; H, hoja; F, flor). Como control de carga se muestra la tinción con bromuro de etidio de los RNAs ribosómicos. A la izquierda se muestra el tamaño del mRNA de *psp54*.

(B) Análisis mediante *Western blot* de extractos crudos de los diferentes tejidos de la planta. Se cargaron 25µg de proteína total por muestra analizada.



En la semilla seca del guisante se almacenan mRNAs que normalmente codifican proteínas importantes para la maduración y deshidratación de la semilla, como las Lea (Late embryogenesis abundant), mientras que no se almacenan los mRNAs de proteínas de reserva como las vicilinas (Robertson & Chandler, 1992; DeRocher & Vierling, 1994). Desde este punto de vista aunque el gen *psp54* comparte características estructurales con las vicilinas, se comporta fisiológicamente como una Lea.

3.2.3. Estudio de la expresión temporal del gen *psp54*

3.2.3.1. Expresión del gen *psp54* durante la embriogénesis

El desarrollo de la semilla se caracteriza por una serie de etapas específicas y la tasa de desarrollo puede variar en función de diversos factores genéticos y ambientales (Hedley & Ambrose, 1980). Después de la fertilización, el desarrollo del embrión se inicia con una intensa división celular, seguida de una etapa de expansión celular y almacenamiento de reservas. Finalmente, durante las últimas etapas del desarrollo embrionario, se produce una dramática pérdida de agua que facilita la entrada en un estado durmiente. Durante el estudio de la expresión del gen *psp54*, se han realizado medidas de parámetros como el peso fresco, peso seco, contenido en agua de la semilla y longitud de la vaina, que han permitido delimitar las diferentes etapas del desarrollo (Figura 14). Como se puede ver en la figura, las semillas de guisante alcanzan el máximo peso fresco entre los 20 y 25 DAF. A partir de este momento, el peso seco de la semilla se mantiene aproximadamente constante, por lo que la disminución en peso fresco a partir de 25 DAF es debida a la pérdida de agua. La semilla de 35 DAF ha perdido aproximadamente un 90% del agua. El desarrollo embrionario finaliza entre 35 y 40 DAF.

El estudio de la expresión del gen *psp54* durante el desarrollo se realizó mediante *Northern blot* y *Western blot*. En la figura 15 se muestran los resultados del análisis de la expresión a 10, 15, 20 y 35 DAF. En el panel A de la figura se observa que hasta 20 DAF no aparece el transcrito de *psp54*, cuando, según nuestras condiciones experimentales, la semilla ha perdido ya el 30% de agua. A los 35 DAF, cuando las semillas han perdido el 90 % de agua, el mRNA de *psp54* permanece en la semilla seca, de acuerdo con lo observado en el análisis de la expresión por tejidos.

En el panel B de la figura 15, se muestra el resultado del análisis mediante *Western blot* de extractos de proteína total. De acuerdo con el patrón de acumulación del transcrito

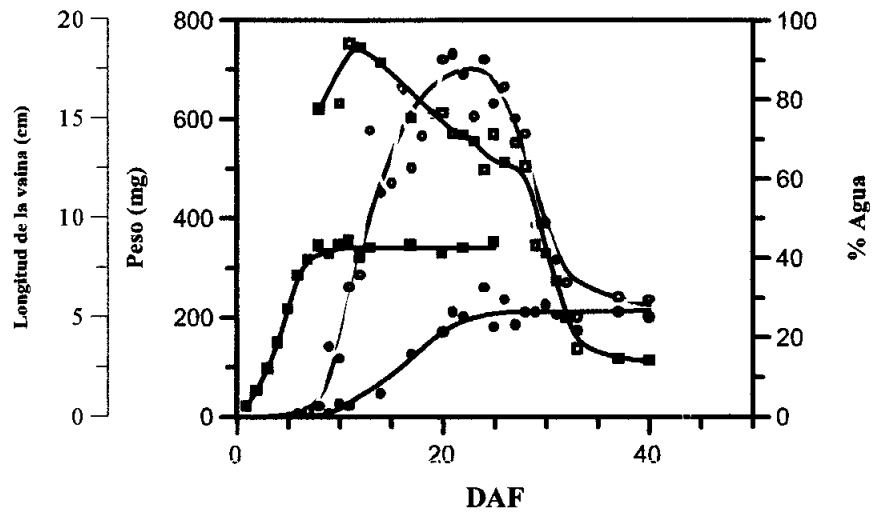


Figura 14. Evolución durante la embriogénesis del peso fresco (○), peso seco (●), longitud de la vaina (■) y contenido en agua (■).

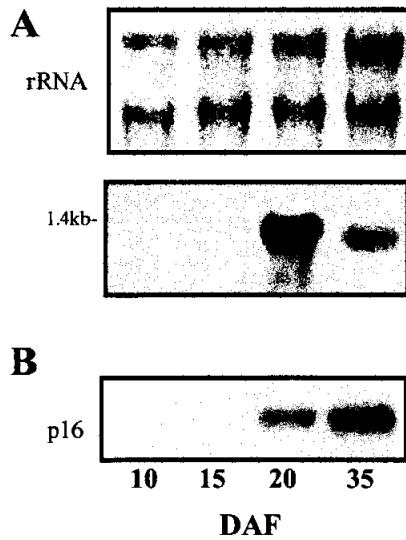


Figura 15. Expresión del gen *psp54* durante la embriogénesis.

(A) Northern blot donde se analizan los niveles de transcrito de *psp54* durante los días indicados después de la floración (DAF). Los RNAs totales de 10 y 15 DAF han sido extraídos de semillas completas, mientras que 20 y 35 DAF sólo de ejes embrionarios. En el panel superior se muestra la tinción con bromuro de etidio de los rRNAs como control de carga. (B) Análisis mediante Western blot de extractos de proteínas totales durante los días indicados.

de *psp54*, la proteína p16 comienza a acumularse en la semilla a los 20 DAF, alcanza un máximo quince días más tarde (35 DAF) y permanece en la semilla seca, tal y como se demuestra en el análisis de la expresión por tejidos.

3.2.3.2. Expresión del gen *psp54* durante la germinación y crecimiento de la plántula.

La germinación comienza con la absorción de agua por la semilla seca durmiente y termina con la elongación del eje embrionario. El signo visible de que la germinación ha finalizado se produce cuando la radícula rompe la testa, que en guisante ocurre aproximadamente 24 horas después de la imbibición. En la figura 16, se muestra la evolución del peso fresco, peso seco y contenido de agua de los ejes durante la germinación y crecimiento de la plántula. El contenido de agua aumenta rápidamente durante las 20 horas de imbibición hasta alcanzar un valor próximo al 60% y después permanece constante durante las siguientes 24 horas. Una vez la radícula rompe la testa, se produce una rápida absorción de agua hasta las 36 horas y a partir de ese momento, el contenido en agua se mantiene constante (85%).

En el análisis mediante *Northern blot* (figura 17A), se muestra que durante la imbibición de las semillas (HAI 0), el mRNA de *psp54* empieza a degradarse de manera que a las seis horas de germinación ya no se detecta. En el análisis mediante *Western blot* (figura 17B) se observa que el nivel de p16 se mantiene e incluso parece aumentar ligeramente durante todo el periodo de germinación, observándose las primeras bandas de degradación alrededor de 24 HAI.

La presencia de la proteína en el último periodo de la embriogénesis y durante la germinación, sugieren que p16 podría facilitar algún proceso durante la deshidratación de la semilla o durante la rehidratación del embrión maduro.

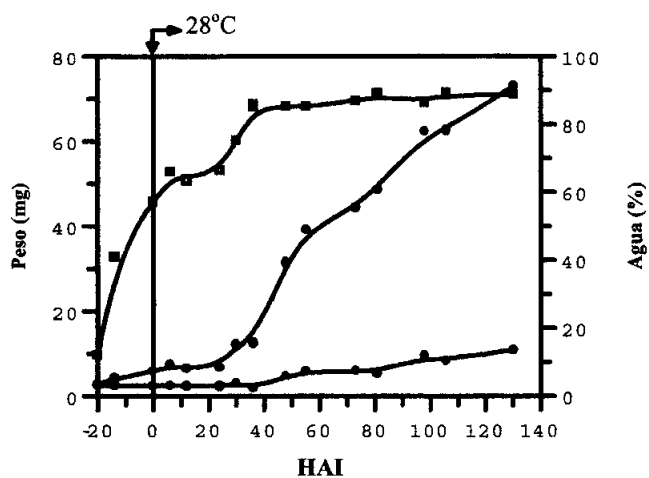


Figura 16. Evolución durante la germinación y crecimiento de la plántula del peso fresco (◻), peso seco (●) y contenido de agua (◻).

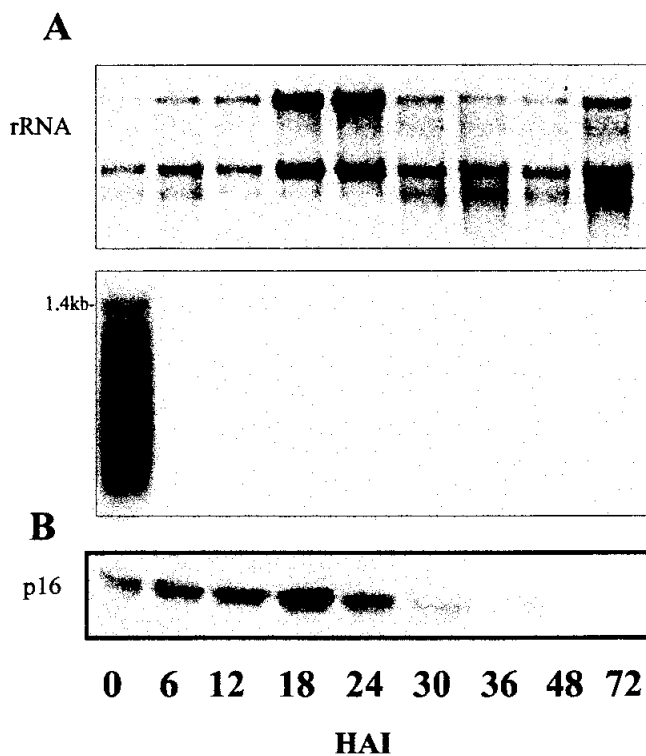


Figura 17. Expresión del gen *psp 54* durante la germinación y crecimiento de la plántula. (A) *Northern blot* donde se muestran los niveles de transcrito de *psp 54* durante las horas indicadas después de la imbibición (HAI). En el panel superior se muestra la tinción con bromuro de etidio de los rRNAs como control de carga. (B) *Western blot* de extractos de proteínas totales durante las horas indicadas.

3.2.4. Estudio de la regulación de la expresión del gen *psp54* bajo condiciones de estrés

3.2.4.1. Análisis de la expresión del gen *psp54* en respuesta a estrés hídrico

Los resultados anteriores indicaban una clara correlación entre la expresión del gen *psp54* y los procesos fisiológicos de deshidratación e hidratación que se producen durante la maduración y germinación de la semilla de guisante. Por tanto, resultaba interesante estudiar si era posible inducir el gen *psp54* por tratamientos de estrés hídrico, una vez ha cesado su expresión en la semilla. En este sentido, se realizaron distintos tratamientos sobre plántulas HAI 18, periodo en el que el mRNA de *psp54* ya no se detecta y sobre plántulas HAI 72, en las que ha desaparecido por completo tanto el transcrito como la proteína. Las plántulas HAI 18 y HAI 72 fueron sometidas a los siguientes tratamientos: (i) estrés osmótico, mediante rociado con una solución 1.5 M de sorbitol; (ii) sequía, mediante la incubación de las plántulas a 28°C sin regar, y (iii) tratamiento con una solución 100 µM de ABA, factor clave en la ruta de respuesta a estrés de gran cantidad de genes inducidos por sequía (Bray, 1997).

Se analizaron mediante *Northern blot* los patrones de expresión de *psp54* en plántulas sometidas a los distintos tratamientos durante 6 y 24 horas (figura 18). En todos los casos se observó inducción del mRNA de *psp54*, aunque la respuesta a los distintos tratamientos difiere en intensidad y tiempo de respuesta y es dependiente del estadio de desarrollo de las plántulas. La mayor inducción se obtiene en respuesta a ABA exógeno en plántulas HAI 18, en las que ya se observan niveles muy elevados de transcrito a las 6 horas de tratamiento. La respuesta de plántulas HAI 72 a los distintos tratamientos es menor a la observada en plántulas HAI 18, siendo este efecto mucho más acusado en el tratamiento con ABA. Por otro lado, la respuesta a sequía en plántulas HAI 72 es más rápida, de manera que se detecta transcrito a las 6 horas de tratamiento. Esto se podría explicar por el hecho de que en plántulas HAI 18 la radícula aún no ha emergido, de manera que la testa

protegería frente a la pérdida de agua mientras que en HAI 72 tanto el epicotilo como el hipocotilo están expuestos al tratamiento de sequía y perderían agua con más facilidad.

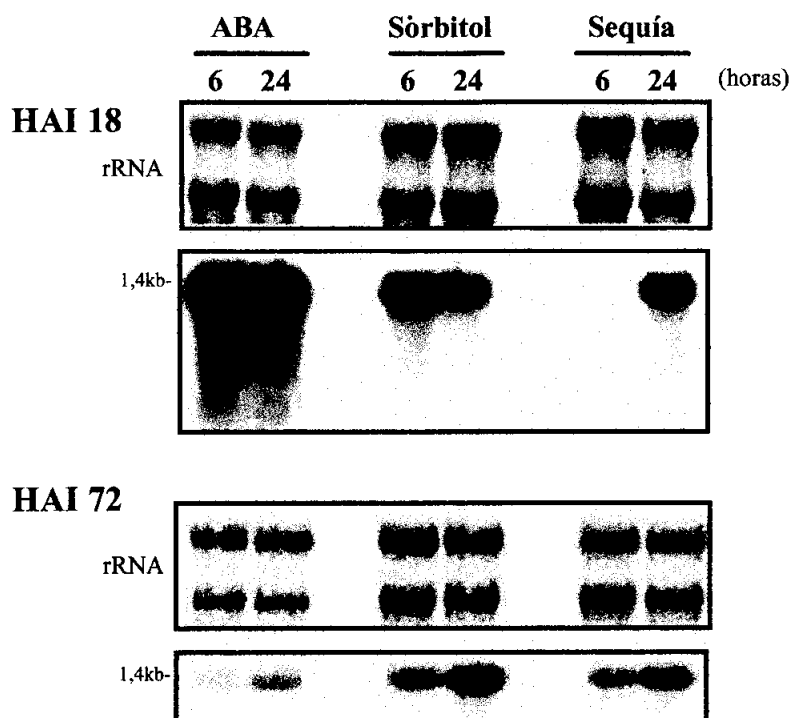


Figura 18. Análisis mediante *Northern blot* de la expresión del gen *psp54* en plántulas HAI 18 y HAI 72 sometidas a sequía (28°C, sin regar), estrés osmótico (sorbitol 1,5 M) y ABA 100 μ M a las 6 horas y 24 horas después del tratamiento. En los paneles superiores se muestra la tinción de los rRNAs como control de carga. Se han realizado los controles HAI 18 (6 y 24h) y HAI 72 (6 y 24 h) y no se detecta mRNA de *psp 54* en ningún caso.

Dejando al margen las diferencias en la respuesta al estrés dependiente del estadio de desarrollo que se discutirán posteriormente, estos resultados sugieren de nuevo que la acumulación del mRNA de *psp54* está regulada por el estado hídrico de la planta, de modo que su expresión se induce en respuesta a sequía, estrés osmótico y tratamiento con ABA. Los genes de las proteínas Lea, sHSPs y otros genes implicados en la tolerancia al estrés

también se inducen durante la germinación y en tejidos vegetativos si las plantas se someten a determinadas condiciones de estrés. Por el contrario, la expresión de las proteínas de reserva es rigurosamente específica de tejido, se expresan principalmente en cotiledones y ejes embrionarios pero nunca en tejidos vegetativos. Robertson & Chandler (1992) realizaron un estudio comparativo de la inducción de la expresión de deshidrinas y proteínas de reserva de guisante por estrés hídrico o tratamiento con ABA durante la germinación. Estos autores observaron que las deshidrinas se inducían en respuesta a estrés, cosa que no ocurría con las proteínas de reserva. Incluso se ha observado una regulación negativa sobre la expresión de los genes de las proteínas de reserva cuando las semillas de guisante en desarrollo se someten a una deshidratación prematura (Jiang *et al.*, 1995). Por otro lado, aunque en algunas especies la síntesis de proteínas de reserva esta regulada por ABA, en guisante, Barrat *et al.* (1989) no observan ningún efecto del ABA sobre la inducción de los mRNAs de leguminas y vicilinas.

Cuando los tratamientos de estrés se realizaron con plántulas de 5 días, se observó claramente una disminución en la respuesta de *psp54* respecto a plántulas HAI 72, de nuevo más patente en el tratamiento con ABA (datos no mostrados). El guisante presenta tolerancia a una deshidratación severa únicamente durante la germinación, aproximadamente hasta HAI 24 (Lalonde & Bewley, 1986). La disminución de la expresión en respuesta a estrés del gen *psp54* en periodos postgerminativos podría ser un reflejo de la incapacidad que tiene la planta de guisante para recuperarse de una deshidratación severa tras la germinación. Los resultados anteriores son similares a los observados en otros genes, como el gen *Lea Atrab28* de *A. thaliana*, cuyo mRNA tampoco se induce en plántulas de cinco días por tratamiento con ABA, NaCl o sequía (Arenas-Mena *et al.*, 1999).

Con el fin de analizar si el incremento en los niveles de transcrito de *psp54* se traducían en un aumento de la cantidad de proteína, se seleccionó el periodo en donde se produce una mayor inducción del gen *psp54*, HAI 18, y se realizaron extracciones de proteína total de las plántulas tras 24 horas de tratamiento con ABA, sorbitol, y sequía. Las

muestras se analizaron mediante *Western blot*. El resultado se muestra en la figura 19, donde se observa que en los tratamientos con ABA y sorbitol parece haber un ligero aumento en la cantidad de proteína respecto al control HAI 18, aunque esto podría deberse a ligeras diferencias en la carga de la electroforesis. Sin embargo, en el tratamiento de sequía la cantidad de proteína es menor que en el control, de acuerdo con la disminución de los niveles de proteína que se producen durante la germinación y desarrollo de la plántula.

Dado que los niveles de proteína detectados no eran compatibles con la elevada inducción del mRNA, se realizó un estudio de la cinética de acumulación tanto del transcrito de *psp54* como de la proteína p16 para descartar un posible desfase entre la acumulación del mRNA y de la proteína. Para ello se seleccionó el tratamiento con ABA sobre plántulas HAI 18, donde se observa la mayor respuesta del gen *psp54*. Se tomaron muestras de plántulas a las 6, 24 y 48 horas tras la aplicación de ABA y se llevaron a cabo análisis mediante *Northern blot* y *Western blot*. Los resultados se muestran en la figura 20, donde de nuevo se observó que la inducción del mRNA se produce a las 6 horas de tratamiento, con un máximo a las 24 horas. En el análisis mediante *Western blot* se observa

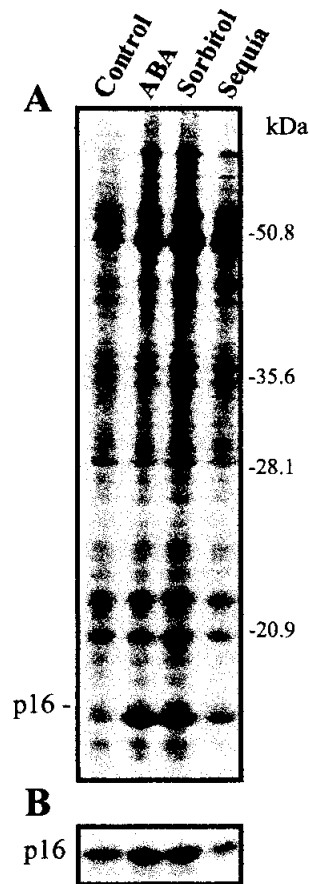


Figura 19. Análisis del nivel de la proteína p16 en plántulas HAI 18 sometidas a sequía, estrés osmótico y ABA tras 24 horas de tratamiento. (A) SDS-PAGE de extractos crudos de proteína teñido con azul Coomassie. A la izquierda se indica la migración de p16 y a la derecha la masa molecular de los patrones. (B) Análisis *Western blot*.

que a las 6 horas todavía no hay diferencias entre las plántulas control y las tratadas con ABA, sin embargo, a partir de las 24 horas las diferencias son notables. El nivel de p16 disminuye rápidamente en los controles, mientras que los niveles de proteína se mantienen elevados en las plántulas tratadas con ABA. Cuando se comparan los paneles A y B, se puede concluir que la inducción de *psp54* a nivel transcripcional no se correlaciona con un incremento en la cantidad de proteína. Más bien los resultados parecen indicar que en las condiciones del tratamiento con ABA la estabilidad de la proteína aumenta. Esto podría ser debido a una regulación de la velocidad de síntesis y de degradación de la proteína o alternativamente a que en ausencia de síntesis de *nov*o la

resistencia de la proteína a la degradación aumentase durante el estrés. Hay algunos ejemplos en la bibliografía de genes inducidos por estrés en donde también se observa una falta de correlación entre el nivel de mensajero y el de proteína, como es el caso de algunas quinasas (MAPKs) de plantas, posiblemente implicadas en las cascadas de señalización de estrés (Seo et al, 1999; Saijo et al, 2000). Es posible, que en los casos en que el nivel de

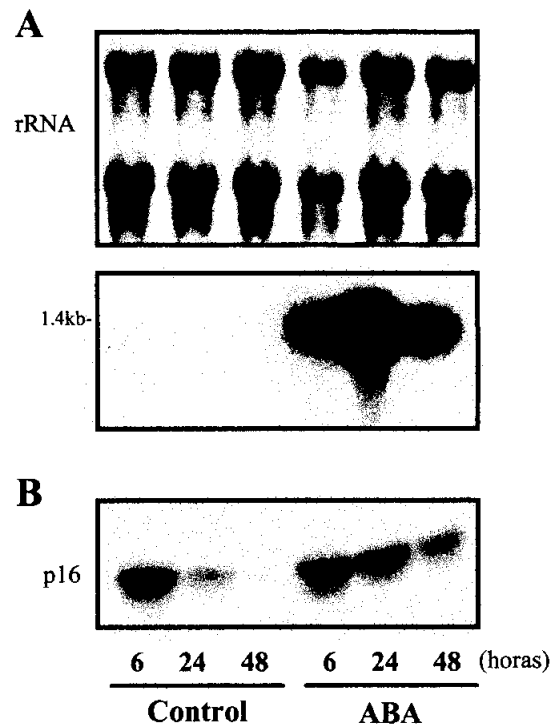


Figura 20. Comparación de los niveles de mRNA de *psp54* y de la proteína p16 en plántulas control y tratadas con 100 μ M de ABA durante 6, 24 y 48 horas después del tratamiento. (A) Análisis mediante *Northern blot* de RNAs totales. En el panel superior se muestra la tinción con bromuro de etidio de los rRNAs como control de carga. (B) Análisis mediante *Western blot* de extractos crudos de proteínas.

proteína no varíe se produzcan modificaciones postraduccionales que afecten a la función de dichas proteínas durante el estrés.

Es importante señalar aquí que la mayor parte de los estudios sobre regulación de la expresión génica en condiciones de estrés se realizan a nivel de transcrito, sin analizar que ocurre a nivel de proteína. El gen *psp54* constituye un ejemplo claro de la importancia del estudio de la regulación de los genes tanto a nivel de transcripción como de traducción.

3.2.4.2. Análisis de la expresión del gen *psp54* en respuesta a estrés hídrico en órganos de la planta adulta

Para realizar este estudio se obtuvo RNA total de raíces, tallos y hojas de plantas adultas control y sometidas a estrés por sequía y tratamiento con ABA y se analizó la expresión del gen *psp54* mediante análisis *Northern blot*. En la figura 21 se muestran los resultados de un experimento típico. Hay que indicar que durante los tratamientos de sequía se produce un marchitamiento de la planta, en mayor o menor medida, lo que provoca que en algunos experimentos se obtengan RNAs algo degradados. A pesar de ello, en los tratamientos de sequía siempre se ha observado una reexpresión del gen *psp54*. Sin embargo, el tratamiento con ABA no induce el mRNA de *psp54* en tejidos adultos, ni incluso cuando las plantas son tratadas con una solución 200 μ M de ABA.

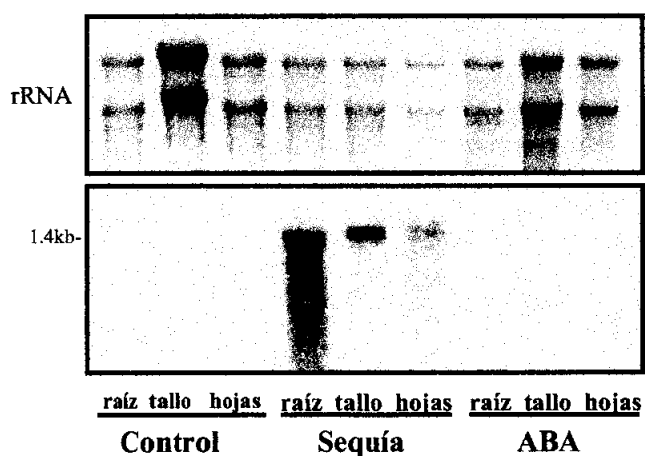


Figura 21. Expresión del gen *psp54* en órganos de la planta adulta. *Northern blot* de RNAs totales obtenidos de raíces, tallos y hojas sometidos a sequía (28°C, sin regar), 200 μ M de ABA y sin tratar durante 24 horas. En el panel superior se muestra la tinción con bromuro de etidio de los rRNAs como control de carga.

Cuando se realizó el análisis mediante *Western blot* de extractos crudos se observó que la inducción del mRNA de *psp54* en plantas sometidas a estrés por sequía no resultaba en la reaparición de la proteína p16 en los diferentes órganos de la planta adulta (datos no mostrados), lo que sugiere de nuevo que debe existir una regulación compleja del gen *psp54* por estrés hídrico a nivel transcripcional, postranscripcional y/o traduccional dependiente del estadio de desarrollo de la planta de guisante. Es posible que diferentes elementos del promotor del gen *psp54* así como la presencia de diferentes proteínas en diferentes tejidos puedan estar implicados en la regulación de su expresión a nivel transcripcional. Existen ejemplos en la bibliografía de genes cuya inducción por ABA es específica de tejido, por ejemplo el gen *rab17* de maíz está regulado por diferentes elementos en *cis* en embriones y hojas de manera que se ha sugerido la existencia de diferentes proteínas específicas del embrión y específicas de las hojas que pueden unirse a estos elementos (Busk & Pagès, 1998).

En resumen, el patrón de expresión del gen *psp54* y de la proteína p16, junto con los resultados de la respuesta a estrés dependiente del estadio de desarrollo de guisante sugieren que la función de p16 se restringe al periodo de embriogénesis tardía, estado durmiente y/o a la germinación. Aunque el gen no parece estar silenciado durante el periodo postgerminativo, de manera que hay una respuesta basal a nivel transcripcional frente a sequía y estrés osmótico, debe existir una regulación de la expresión a nivel postranscripcional o traduccional de forma que este mRNA no se traduce. Con los datos obtenidos hasta el momento, *psp54* podría formar parte de la red reguladora dependiente de ABA implicada en el mantenimiento de la semilla durmiente. Algunos genes, como el *HVA22* de cebada, se cree que son determinantes en el estado durmiente del grano, ya que su expresión se correlaciona muy bien con el estado durmiente de las semillas (Shen *et al.*, 2001). Sin embargo estos estudios realizados exclusivamente a nivel de transcrito no aportan datos sobre la presencia de la proteína ni su correlación con la presencia de mensajero. Por el contrario, otras proteínas de la semilla como algunas Lea y Rab se

inducen en tejidos vegetativos en respuesta a estrés y ABA, y por tanto su expresión no puede ser asociada a la imposición del estado durmiente *per se* sino más bien a la protección de las semillas durmientes frente a la deshidratación.

3.2.4.3. Análisis de la expresión del gen *psp54* en respuesta a herida

Las plantas reaccionan ante la herida o ataque por patógenos mediante la activación de grupos de genes, implicados en la cura de la herida y en la prevención de la subsiguiente invasión por patógenos. La herida puede considerarse un factor de estrés biótico simulando el ataque por microorganismos tales como la infección por hongos o por insectos .

Con el objeto de estudiar si la expresión del gen *psp54* se inducía en respuesta a herida, se efectuaron dos pinchazos en la zona correspondiente a la radícula sobre plántulas HAI 18. Después de 24 horas se extrajo el RNA y se analizó mediante *Northern blot* la aparición de transcrito de *psp54*. Como se observa en la figura 22, el mRNA de *psp54* se induce en respuesta al tratamiento de herida.

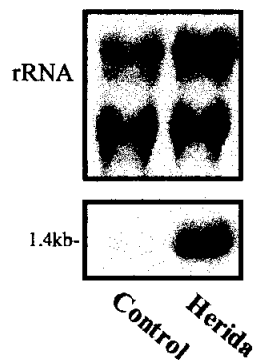


Figura 22. Expresión del gen *psp54* mediada por herida en HAI 18. *Northern blot* de RNAs totales obtenidos de HAI 18 y tras 24 horas de herir la radícula. En el panel superior se muestra la tinción con bromuro de etidio de los rRNAs como control de carga.

Es posible (i) que esta inducción se deba a la pérdida de agua que se produce como consecuencia del daño mecánico en la zona afectada, ya que este gen responde a sequía, (ii) que la respuesta sea independiente del estado hídrico, o (iii) que sea el resultado de una combinación de los dos estreses (herida y sequía).

La señal de herida a menudo está mediada por hormonas como el etileno, el cual se produce durante la senescencia, o en respuesta a señales medioambientales como el ataque por patógenos o herida mecánica. El tratamiento de semillas de guisante HAI 18 con 0.14 ppm de etileno durante 24 horas no induce la expresión del gen *psp54* (análisis *Northern blot* no mostrado). Aunque este dato es preliminar y necesita ser corroborado con otras concentraciones de etileno, parece indicar que esta hormona no media la respuesta del gen *psp54* a la herida. Se han descrito casos en donde el etileno no parece intervenir en la respuesta a herida, en este sentido, la familia de genes *Pin2* (*proteinase inhibitor II*) de patata y tomate constituyen uno de los ejemplos mejor estudiados de respuesta sistémica a daño mecánico sin mediación de etileno (Peña-Cortés & Willmitzer, 1995). Los genes *Pin2*, sin embargo, responden a ABA y a ácido jasmónico (JA).

3.2.4.4. Efecto de temperaturas extremas en la expresión del gen *psp54*

Las plantas sufren deshidratación no solo por sequía sino también por otros estreses ambientales como bajas y altas temperaturas. Para el tratamiento a altas temperaturas las plántulas HAI 18 se incubaron a 40°C durante 6, 12 y 24 horas, mientras que para el tratamiento a bajas temperaturas, las plántulas se mantuvieron a 4°C durante 24, 48 y 72 horas. En la figura 23, se muestra el análisis mediante *Northern blot* de los RNAs extraídos, donde se observa que tanto las altas como las bajas temperaturas inducen la expresión del gen *psp54*.

En el tratamiento a 40°C, debido al tiempo que tarda en detectarse el mensajero, la inducción del gen no parece producirse por choque térmico sino más bien sería debida a la deshidratación producida por las altas temperaturas. A pesar de que en ambos casos las plántulas fueron humedecidas, a altas temperaturas el agua se evapora rápidamente. Esta conclusión estaría de acuerdo con el resultado sobre la inducción del gen por sequía expuesto en la figura 18.

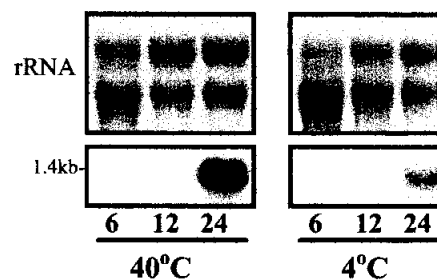


Figura 23. Expresión del gen *psp54* mediada por altas y bajas temperaturas. *Northern blot* de RNAs totales obtenidos de HAI 18 mantenidas durante 6, 12 y 24 horas a 40°C y durante 24, 48 y 72 horas a 4°C. En el panel superior se muestra la tinción con bromuro de etidio de los rRNAs como control de carga.

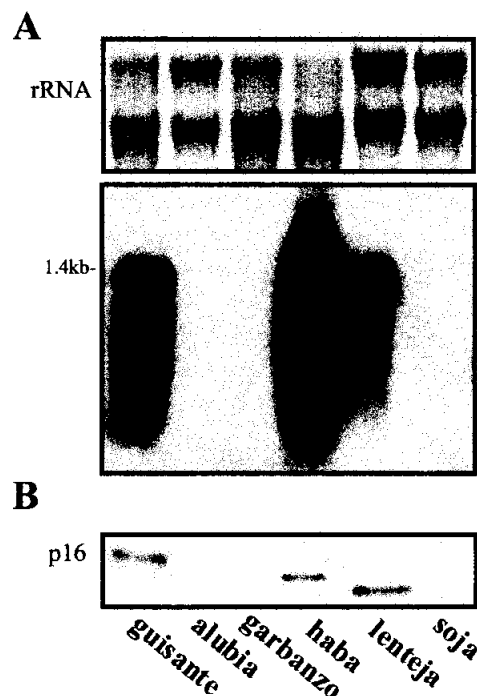
Considerando globalmente los resultados expuestos en los apartados anteriores, se puede concluir que el gen *psp54* se induce por estreses relacionados con el potencial hídrico celular. Como ya se ha comentado en el apartado de resultados 3.1, las cupinas actuales se cree que proceden de una proteína ancestral funcionalmente implicada en procesos de deshidratación/hidratación celular. Tanto p54 como otras cupinas actuales, en base a su función, deben haber mantenido en su promotor elementos ancestrales necesarios para su inducción por estrés hídrico. Por el contrario, tanto las globulinas de almacenamiento actuales como la SBP han debido perder estos elementos y no se inducen por estrés.

3.2.5. Expresión de genes homólogos a *psp54* en otras especies de plantas

La búsqueda de genes homólogos en diferentes semillas se realizó mediante *Northern blot* y mediante *Western blot*. Las semillas estudiadas fueron de girasol, soja, *Arabidopsis*, tomate, alubia, garbanzo, haba, lenteja, cebada y zanahoria.

En la Figura 24 se muestran algunos de los resultados obtenidos. De las especies analizadas se dedujo que existían homólogos del gen *psp54* de guisante en otras dos especies de leguminosas, haba (*V. faba*) y lenteja (*Lens sculentum*). En los dos casos el mRNA detectado por la sonda de cDNA de *psp54*, tenía aproximadamente el mismo tamaño que el mRNA del gen *psp54* ($\approx 1.4\text{kb}$) y en el análisis mediante *Western blot* el anticuerpo de p16 detectó proteínas de un tamaño también similar a p16. En haba la proteína detectada por el anticuerpo de p16 probablemente corresponde al producto del procesamiento de la proteína incluida en las bases de datos con el n° P08438 y que presenta un 94% de similitud de secuencia con el precursor p54 (Wobus, 2001).

Figura 24. Genes homólogos a *psp54*. (A) *Northern blot* de RNAs totales obtenidos de semillas de guisante, alubia, garbanzo, haba, lenteja y soja. (B) *Western blot* de extractos crudos de proteínas.



El hecho de que la sonda de cDNA no detecte el mRNA de la SBP en soja es lógico, ya que el mRNA no se almacena en la semilla seca. La proteína SBP sí que está presente en la semilla y sin embargo el anticuerpo de p16 no la detecta a pesar de que presenta un 60% de similitud de secuencia, lo que indica la gran especificidad del anticuerpo de p16. Por otra parte el anticuerpo de la SBP de soja tampoco detecta a p16 en guisante (Tegeder *et al.*, 1999).

La presencia de esta proteína en haba, lenteja y guisante es consistente con la clasificación botánica más clásica basada en características morfológicas y fisiológicas que agrupa a estas tres especies en la misma tribu (figura 25).

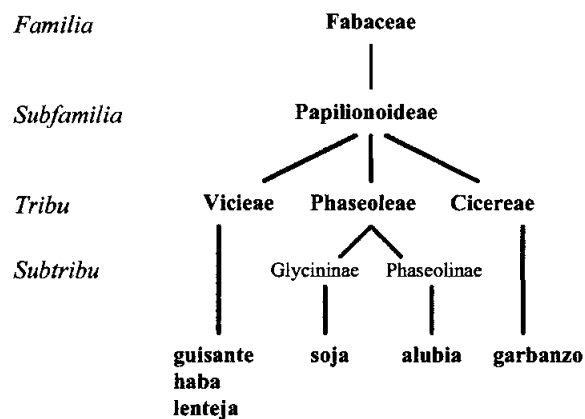


Figura 25. Emplazamiento taxonómico (Polhill & Raven, 1981), de seis de las especies analizadas en la búsqueda de genes homólogos a *psp54*.

3.3. Localización subcelular de p16

Aunque p16 fue identificada y aislada a partir de núcleos o cromatina, un análisis de la secuencia de su precursor p54 reveló, no solo la presencia de secuencias de localización nuclear, sino también la existencia de un péptido señal. Este resultado sugería que p16 podría poseer múltiples localizaciones subcelulares.

3.3.1. Fraccionamiento subcelular

El fraccionamiento subcelular se realizó mediante centrifugación diferencial a partir de un homogeneizado de ejes embrionarios de guisante tal como se describe en el apartado 2.6.2. El contenido proteico de las distintas fracciones se analizó mediante SDS-PAGE y el gel fue teñido con azul Coomassie o sometido a electrotransferencia para realizar análisis de *Western blot*. Como se observa en la figura 26A, p16 está presente claramente en la fracción nuclear así como en el sedimento de 10000g y en menor medida en el sedimento de 100000g, pero no aparece en la fracción soluble. El análisis mediante *Western blot* permitió la identificación inequívoca de p16 (figura 26B). Es importante destacar que el sedimento de 1000g que aparece en la figura fue purificado en un gradiente de percoll (Ull *et al.*, 1986) y por tanto representa una fracción nuclear fiable, donde las proteínas mayoritarias son las histonas. La proteína está también presente en la fracción de 10000g, que contiene principalmente mitocondrias, cuerpos proteicos y otros orgánulos de tamaño mediano. La abundancia de p16 en esta fracción no parece debida a la presencia de restos de núcleos, como indica la ausencia de histonas, y por tanto parece claro que, aparte del núcleo, p16 está también presente en otros orgánulos. Sin embargo, como se observa en la figura 26B, p16 no es un componente soluble del citosol.

La existencia de un péptido señal N-terminal y dos señales de localización nuclear sería compatible con este reparto de p16 entre el núcleo y algún otro orgánulo subcelular. Aunque no se realizó un estudio sistemático para identificar el orgánulo/s no nucleares que

contienen p16, el hecho de que p16 y p54 muestren homología con proteínas de reserva sugiere que parte de p16 podría almacenarse en cuerpos proteicos.

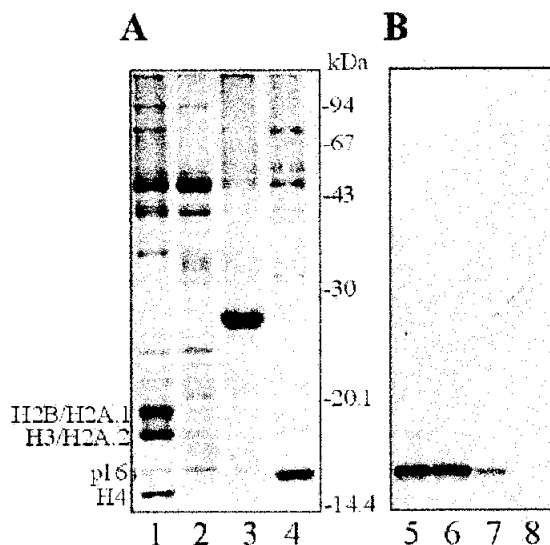


Figura 26. Presencia de p16 en diferentes fracciones subcelulares. Fracción nuclear purificada (líneas 1 y 5). Sedimento de 10000g (líneas 2 y 6). Sedimento de 100000g (líneas 3 y 7). Fracción soluble (líneas 4 y 8). Las proteínas se separaron en SDS-PAGE y el gel se tiñó con azul Coomassie (panel A) o fue transferido a membrana e incubado con el anticuerpo de p16 (panel B). La migración del patrón de masas moleculares se muestra a la derecha del panel A y a la izquierda se indica la migración de las histonas internas de guisante y de p16.

3.3.2. Inmunolocalización de p16 en núcleos aislados

Con objeto de confirmar la presencia de p16 en el núcleo, se realizó un análisis inmunocitoquímico de núcleos aislados a partir de ejes embrionarios de guisante. Las preparaciones de núcleos se incubaron con el anticuerpo de p16 a una dilución 1/5000 seguido de incubación con el anticuerpo secundario unido a partículas de oro coloidal. Como control se utilizó suero preinmune. Como se observa en la figura 27, sólo se detecta

la acumulación de partículas de oro en núcleos tratados con el anticuerpo de p16 y no en los núcleos incubados con el suero preinmune. Este resultado confirma la presencia de la proteína p16 en el núcleo, principalmente en las regiones perinucleares.

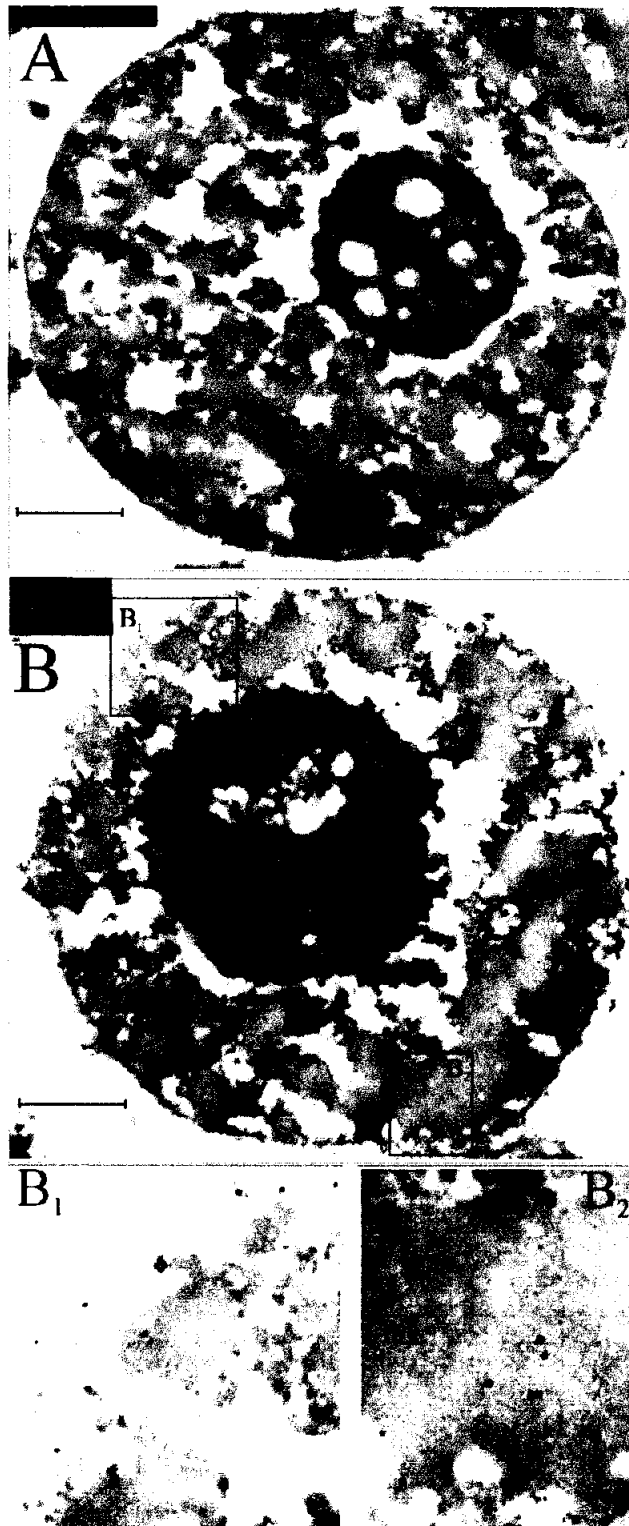


Figura 27. Detección inmunocitoquímica de p16 en núcleos purificados de ejes embrionarios de guisante. Cortes finos de núcleos fijados, fueron tratados con suero preinmune (panel A) o con una dilución 1:5000 del anticuerpo de p16 (panel B). En el panel B se observan áreas con depósitos de oro, especialmente en regiones perinucleares. Dos de estas áreas, marcadas como B1 y B2, se han ampliado y se muestran en la parte inferior de la figura.

Se desconoce en estos momentos la relación temporal entre la distribución de p16 en los diferentes orgánulos y el procesamiento del polipéptido precursor p54. La existencia de dos posibles secuencias de localización nuclear, una en el extremo N-terminal de p54 y otra en p16 hace posible que p16 pueda entrar al núcleo antes o después del procesamiento del polipéptido precursor.

3.4. Interacción de p16 con la cromatina

En estudios previos de nuestro laboratorio, se puso de manifiesto que p16 interaccionaba con la cromatina y había indicios de que en esta interacción podrían participar las histonas (Zúñiga, 1990). Diversos experimentos apoyaban esta hipótesis, como se ha comentado en la Introducción. En experimentos de digestión con DNasa I de núcleos de ejes embrionarios de guisante, la proteína p16 comenzaba a liberarse de la cromatina a tiempos de digestión largos (a partir de 45 minutos). Se observó que previa a la aparición de p16 en la fracción soluble, se producía la liberación de H1 y las histonas internas H2A y H2B. Por lo tanto la liberación de p16 mediante digestión era precedida por una disociación de algún componente del nucleosoma. Estos resultados indicaban que la proteína p16 estaba fuertemente anclada al DNA nucleosomal, bien por interacción directa o a través de la interacción con las histonas. Por otro lado, el tratamiento de núcleos de ejes embrionarios de guisante con formaldehído producía el entrecruzamiento de p16 con las histonas internas. Finalmente, cuando los núcleos se obtenían bajo condiciones en que se preservaban los puentes disulfuro existentes *in vivo*, una fracción de p16 formaba heterodímeros con la histona H3.

3.4.1. Interacción de p16 con las histonas *in vitro*

Los resultados anteriores sugerían que la fuerte asociación de esta proteína a la cromatina *in vivo*, podría deberse a una interacción directa de p16 con las histonas. Para

estudiar esta posibilidad con más detalle, se utilizaron dos tipos de aproximación *in vitro*: (i) análisis mediante *Farwestern blot*; (ii) experimentos de *pull-down*.

3.4.1.1. Estudio de la interacción de p16 con las histonas mediante *Farwestern blot*

3.4.1.1.1. Expresión de [³⁵S]Met-(his₆)p16 *in vitro*

Para la expresión de p16 *in vitro* se obtuvo la construcción pRSET-p16 según se describe en el apartado 2.3. En esta construcción el cDNA de p16 queda fusionado a una secuencia que codifica un fragmento de aproximadamente 4 kDa que contiene una cola de 6 histidinas, bajo el control del promotor de la RNA polimerasa T7. La expresión *in vitro* se realizó con el *kit TNT T7 Quick coupled Transcription/Tranlation System* y metionina marcada con ³⁵S. La síntesis de (his₆)p16 se comprobó mediante SDS-PAGE. Como se observa en la autorradiografía (figura 28), se obtuvo una única banda con una masa molecular aproximada de 20 kDa consistente con la de p16 fusionada a la cola de histidinas.

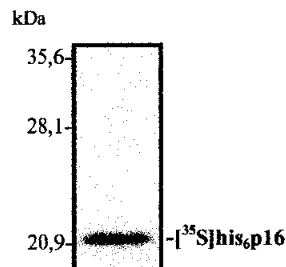


Figura 28. Síntesis *in vitro* de la proteína recombinante (his₆)p16 marcada con [³⁵S]-Met. En la figura se muestra la autorradiografía del gel de electroforesis. A la izquierda se señala la migración del patrón de masas moleculares y a la derecha la migración de la proteína sintetizada.

3.4.1.1.2. Análisis mediante *Farwestern blot*

El análisis de la capacidad de interacción de p16 con las histonas se realizó mediante *Farwestern blot*. Este método es similar al *Western blot*, aunque en este caso se utiliza una

proteína marcada (en nuestro caso p16 marcada con ^{35}S -Met) como sonda para detectar la interacción con proteínas inmobilizadas en una membrana de nitrocelulosa. Se realizó una SDS-PAGE de histonas internas de eritrocito de pollo y de guisante (figura 29A). Las histonas fueron posteriormente transferidas a una membrana de nitrocelulosa e incubadas con la proteína $[^{35}\text{S}]\text{Met}(\text{his}_6)\text{p16}$ (figura 29B).

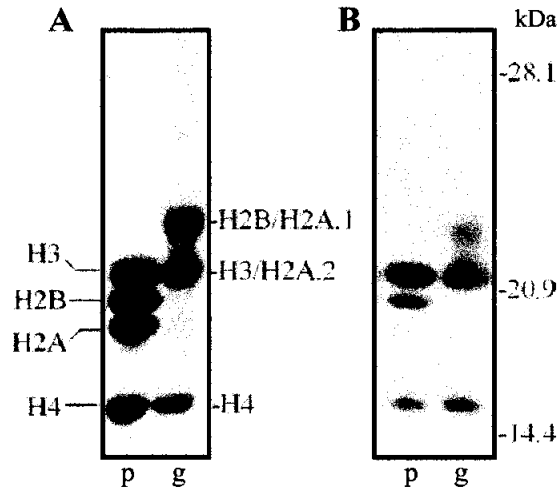


Figura 29. Análisis mediante *Farwestern blot* de la interacción de p16 con las histonas. SDS-PAGE de histonas core de eritrocito de pollo (p) y de guisante (g). En el panel A se muestra la tinción con azul Coomassie del gel y en el panel B un gel similar transferido a membrana e incubado con $[^{35}\text{S}]\text{his}_6\text{p16}$. La migración del patrón de masas moleculares se muestra a la derecha del panel B.

En primer lugar, se observó que p16 se une tanto a histonas de eritrocito de pollo como a histonas de guisante *in vitro*. Además se observó que la interacción más fuerte se produce entre p16 y H3, y en menor medida con H4 y H2B. No se detectó interacción con H2A. La fuerte interacción entre p16 y H3 es compatible con la posible formación de un puente disulfuro entre estas dos proteínas *in vivo*. Para descartar la posibilidad de artefactos debido a la desnaturalización y renaturalización de las proteínas en este tipo de ensayos y corroborar los resultados anteriores se realizaron experimentos de *pull-down*.

3.4.1.2. Interacción de p16 con las histonas mediante experimentos de *pull-down*

3.4.1.2.1. Expresión en *E. coli* de la proteína de fusión GST-p16

Para estos experimentos se obtuvo la construcción pGEX4T-1-p16, según se describe en el apartado 2.3, a partir del plásmido pGEX4T-1 y el cDNA de p16. En esta construcción p16 queda fusionada a la proteína *Glutathion S-Tranferasa* (GST) y la expresión de la proteína se realizó en *E. coli*. En la figura 30, se muestra una SDS-PAGE de los extractos crudos de proteínas de *E. coli* transformadas con el plásmido pGEX4T-1 (líneas 1, 2 y 3) o pGEX4T-1-p16 (líneas 4, 5 y 6) antes (líneas 1 y 4) y después (líneas 2, 3, 5 y 6) de inducir la expresión de las proteínas con IPTG. La identidad de la proteína de fusión se confirmó mediante *Western blot* con el anticuerpo de p16 y con el anticuerpo de la GST.

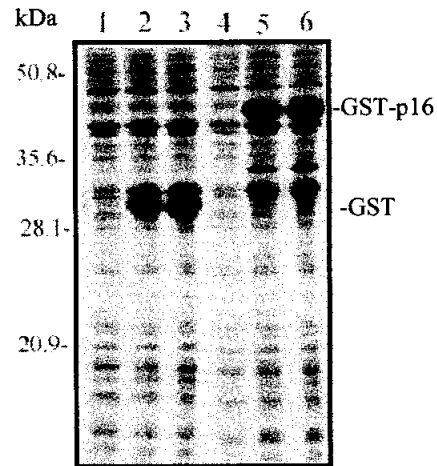


Figura 30. Expresión de GST y GST-p16 en *E. coli*. Tinción con azul Coomassie de un gel SDS-PAGE de extractos crudos de proteínas de *E. coli* antes de inducir (1 y 4) y tras 2h (2 y 5) y 3h (3 y 6) de inducción con IPTG. A la derecha se indica la migración de las proteínas GST y GST-p16 en el gel y a la izquierda la migración del patrón de masas moleculares.

3.4.1.2.2. Experimentos de *pull-down*

En los experimentos de *pull-down* las histonas se incubaron con GST o GST-p16 inmovilizadas en un gel *glutathion-Sepharose*, en el tampón de unión (ver apartado 2.6.9). La incubación se realizó en presencia de 150 mM de NaCl y a continuación el gel se lavó con el mismo tampón pero a concentraciones crecientes de sal. Como se observa en las

figuras 31A y 31C, la proteína GST es incapaz de retener las histonas, de manera que todo el *input* aparece en la fracción de "no retenido". Sin embargo, la proteína de fusión GST-p16 retiene las histonas de eritrocito de pollo y de guisante. Las histonas eluyen del gel a partir de 500 mM de NaCl. En primer lugar eluyen H2A y H2B y posteriormente H3 y H4. La interacción con las histonas de guisante parece ser más fuerte, pues la elución se produce a una concentración de NaCl mayor, incluso después de 2 M de NaCl, aún queda H3 y H4 unidas al gel (ver figura 31C, línea *gel*).

Estos resultados indican una preferencia en la unión de p16 a las histonas H3 y H4 *in vitro*, de acuerdo con los resultados obtenidos en el *Farwestern blot* (ver figura 29). Además, en experimentos previos, se había observado que la liberación de p16 de la cromatina mediante la digestión de núcleos con DNasa I, iba precedida de la liberación de H2A y H2B. Dada la estructura del octámero de histonas formada por un tetrámero de dos copias de H3 y H4 flanqueado por dos dímeros H2A-H2B, todos estos resultados sugieren que p16 interacciona de forma diferencial con los componentes de cada uno de los módulos del octámero de histonas.

Para confirmar que p16 interaccionaba directamente con cada una de las histonas y descartar que los resultados observados eran debidos, en parte, a interacciones histona-histona, se llevó a cabo un experimento similar con histonas individuales de eritrocito de pollo. Como se observa en la figura 31B, p16 es capaz de unirse a cada una de las histonas por separado. Debido a que la relación p16/histona es cuatro veces mayor en este experimento que en el de las figuras A y C, cada histona individual queda totalmente retenida. H2A y H2B eluyen antes (ver línea de 500 mM de NaCl) que H3 y H4, las cuales se detectan también en el gel después de la elución con 2 M de NaCl, lo que corrobora que p16 muestra mayor afinidad por H3 y H4 que por H2A y H2B. En contraste con los experimentos de *Farwestern blot* en estos experimentos se detecta interacción de p16 con la histona H2A. Como ya se ha comentado, el cambio de estructura de las histonas debido a procesos de desnaturalización-renaturalización en el *Farwestern* podrían explicar estas diferencias. En cualquier caso la interacción con H2A es más débil.

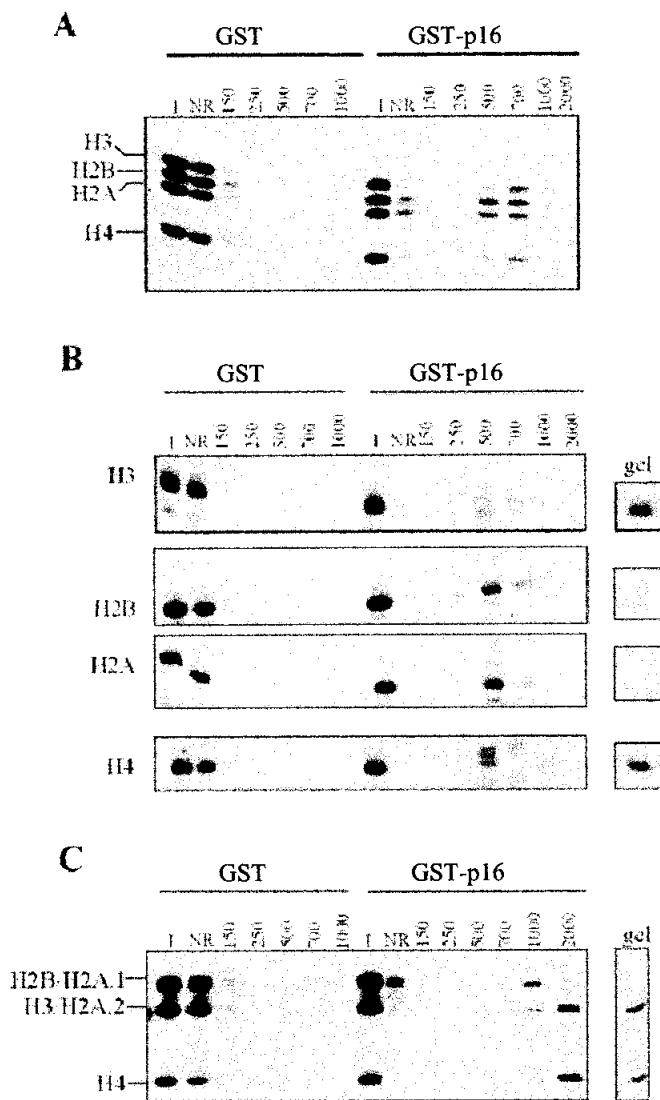


Figura 31. Interacción de p16 con las histonas internas mediante ensayos de *pull-down*. La proteína GST y GST-p16 fueron inmovilizadas en el gel *glutathione-Sepharose* y posteriormente incubadas con histonas internas de eritrocito de pollo (panel A), histonas de eritrocito purificadas (panel B), o histonas de guisante (panel C). El gel fue lavado con el tampón de incubación para recuperar la fracción no retenida y sucesivamente con cantidades crecientes de sal, tal como se indica. Tras el último lavado, el gel se hirvió en presencia de tampón de muestras de SDS, este resultado solo se muestra para los experimentos del panel B y C. Los geles de los paneles A y C fueron teñidos con azul Coomassie, mientras que los geles del panel B fueron teñidos con plata. I: *Input*; NR: no retenido. La concentración de NaCl de los sucesivos lavados se indican con números encima de cada línea.

Como se ha comentado en la introducción, la acetilación de los grupos ϵ -amino de residuos de lisina de las colas N-terminales de las histonas modulan, con frecuencia, la interacción con otras proteínas (Vettese-Dadey *et al.*, 1996). Para comprobar si esto ocurría en la interacción de p16 con las histonas, se llevó a cabo un análisis de *pull-down* con histonas internas de eritrocito acetiladas *in vitro* con la enzima recombinante *Esalp* de levadura expresada en *E. coli*. *Esalp* acetila preferentemente H3, H4 y, en menor medida, H2A. H2B no resulta modificada. Este experimento se realizó conjuntamente con los de la figura 31 descritos anteriormente. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 32, donde se observa que p16 interacciona más débilmente con las histonas acetiladas que con las no acetiladas (compárese *input* y “no retenido” de las figuras 31A y 32A). Debido a que las histonas acetiladas se tiñen peor con azul Coomassie que las histonas no acetiladas, este resultado es más patente cuando se observa la autorradiografía (figura 32B), donde obviamente solo aparecen las histonas acetiladas.

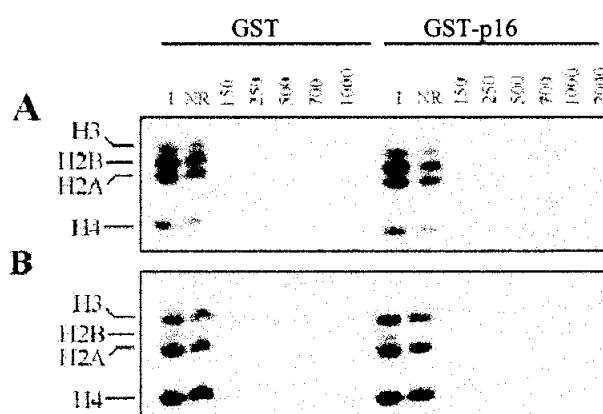


Figura 32. Interacción de p16 con histonas internas de eritrocito de pollo acetiladas *in vitro* con [14 C]acetilCoA en presencia de la enzima *Esalp*. El experimento se realizó tal como se describe en la figura 31. En el panel A se muestra la tinción del gel con azul Coomassie y su autorradiografía se muestra en el panel B.

Estos experimentos no permiten deducir la forma en que se produce la interacción entre p16 y las histonas. Sin embargo, el hecho de que p16 tenga un punto isoeléctrico de 9,5, y que según los resultados obtenidos, el complejo entre p16 y cada histona pueda permanecer estable incluso a elevada fuerza iónica sugiere que la unión de p16 con las histonas no es debida, predominantemente, a interacciones iónicas. La interacción diferencial entre las histonas acetiladas y no acetiladas sugiere que las colas N-terminales, altamente básicas, de las histonas podrían participar en la unión, aunque no descarta que el dominio estructurado pueda también participar. En este sentido, se ha investigado sobre si p16 contiene el motivo *histone fold*, responsable de la interacción histona-histona y presente en algunos factores transcripcionales (Altschul et al., 1997; Eddy, 1998). A pesar de que este motivo no se ha encontrado en la proteína p16, esto no descarta una posible interacción con el dominio globular de las histonas. Existen ejemplos de proteínas que se unen a las histonas a través del dominio globular y tampoco poseen este motivo, como por ejemplo, la proteína Spt6p (Bortvin *et al.*, 1996), las proteínas p46 y p48, de mamíferos, que se encuentran presentes en diversos complejos de ensamblaje y remodelamiento de la cromatina (Verreault *et al.*, 1998; Wade *et al.*, 1998). Obviamente serán necesarios estudios adicionales para dilucidar como se produce la interacción entre p16 y las histonas. Por ejemplo, experimentos de delección de diferentes dominios de p16 podría clarificar cual es el dominio exacto de interacción de p16 con las histonas. Por otro lado, la eliminación de las colas N-terminales de las histonas mediante una digestión breve de nucleosomas con tripsina (Edmondson & Roth, 1998), permitiría determinar el dominio de interacción de las histonas con p16.

3.4.1. Interacción de p16 con el DNA

Numerosos procesos que implican al DNA requieren severas deformaciones de la doble hélice para adquirir la estructura tridimensional adecuada a su función biológica. La intrínseca inflexibilidad del DNA desnudo, necesita de la asistencia de proteínas que,

facilitan la formación de estructuras nucleoproteicas complejas (Echols, 1986). Algunas de estas proteínas, como HU de *E. coli* y las HMG-1 like de organismos eucariotas, se unen al DNA sin presentar especificidad de secuencia y su principal función consiste en modificar la topología del DNA. Se ha propuesto que estas proteínas funcionan como chaperonas del DNA, al que se unen de forma cooperativa para incrementar su flexibilidad, lo que facilita la formación de complejos nucleoproteicos de orden superior (Travers *et al.*, 1994). De acuerdo con este modelo, los complejos transitorios entre chaperonas y DNA serían rápidamente desplazados por los componentes proteicos del complejo final.

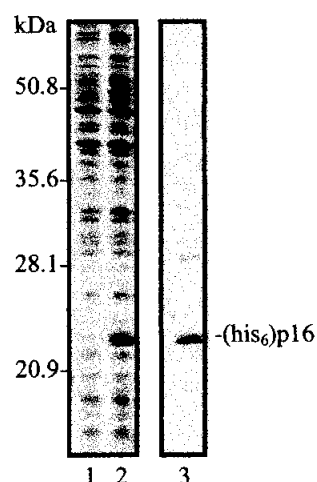
La modificación de la estructura tridimensional del DNA, mediada por interacciones proteína-DNA y proteína-proteína regula procesos esenciales para la célula (Grosscheld, 1995). En este sentido, durante la maduración y entrada en el periodo durmiente de la semilla se produce una fuerte condensación de la cromatina, lo que constituye un ejemplo de la severa deformación que debe sufrir el DNA durante este proceso fisiológico vital para las plantas.

La proteína p16 es muy básica, con un punto isoeléctrico de 9,5. Dado su elevado contenido en aminoácidos básicos es evidente que puede unir DNA simplemente por interacción iónica. Con el fin de caracterizar la interacción de p16 con el DNA se examinó la unión a diferentes tipos de DNA sustrato y la posible alteración de la estructura del DNA mediada por esta proteína.

3.4.2.1. Expresión de (his₆)p16 en *E. coli*

Se utilizó la construcción pRSETA-p16 para la expresión de la proteína (his₆)p16 en *E. coli*. La proteína recombinante fue purificada en una columna de *Ni-agarose* según se indica en el apartado 2.6.7, y analizada por SDS-PAGE (figura 33).

Figura 33. Expresión de (his₆)p16 en *E. coli*. Tinción con azul Coomassie de un gel SDS-PAGE de extractos crudos de proteínas de *E. coli* antes (línea 1) y después de inducir con IPTG (línea 2). En la línea 3 se muestra el resultado de la purificación de la proteína (his₆)p16.



3.4.2.2. Interacción de p16 con diferentes moléculas de DNA

En una primera aproximación se incubó la proteína p16 recombinante con diferentes moléculas de DNA: DNA lineal de 146 pb, DNA (208-12), DNA del plásmido pRSETA y DNA del plásmido pGEX4T-1. La formación de complejos DNA-proteína se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa como se indica en el apartado 2.6.10. La proteína p16 se unió de la misma forma a todas las moléculas de DNA ensayadas, de lo que se dedujo que la unión de la proteína no es específica de secuencia. En la figura 34 se muestra el resultado de dos de los experimentos típicos de interacción de p16 con el DNA realizados en presencia o ausencia de poli-L-glutámico como competidor. La interacción de p16 con el DNA es altamente cooperativa, en un proceso de todo o nada, de manera que se observa la formación de complejos de orden superior que no llegan a migrar en el gel (líneas 2 y 6), mientras que las moléculas de DNA que no unen p16 migran en la misma posición que el DNA control (línea 2).

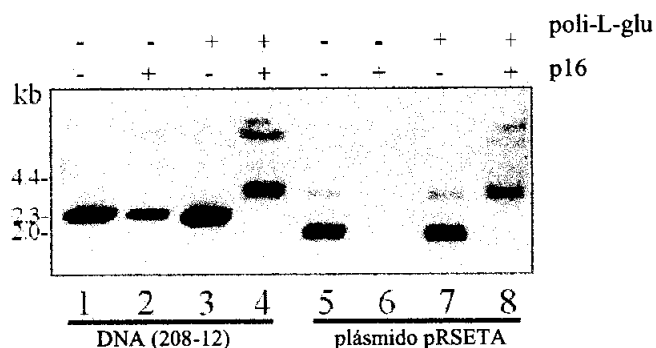


Figura 34. Ensayos de unión de la proteína (his)₆p16 (15 μM) con el DNA (208-12) (15 nM) (líneas 1-4) y con el DNA plasmídico pRSETA (5,2 nM) (líneas 5-8), en ausencia (1,2,5,6) o en presencia de poli-L-glutámico (2 μM) (líneas 3,4,7,8).

Una posible explicación sería que p16 se uniese al DNA formando puentes entre diferentes moléculas de DNA lo que daría como resultado la formación de grandes agregados, con la subsiguiente compactación del DNA. Aunque un comportamiento similar se ha descrito en la unión al DNA de algunas proteínas como las HMG1-like de maíz (Ritt *et al.*, 1998) y la proteína LrpC de *Bacillus subtilis* (Tapias *et al.*, 2000) entre otras, la formación de grandes agregados *in vitro* debe ser considerada con precaución ya que podría ser debido a simples interacciones de tipo iónico entre el DNA cargado negativamente y proteínas con cierta carga positiva. De hecho, cuando histonas internas individuales se incuban *in vitro* con el DNA, también se forman grandes complejos que en principio no parecen tener ningún sentido fisiológico. Sin embargo, cuando la incubación del DNA y p16 se produce en presencia de poli-L-glutámico (líneas 4 y 8), la interacción del polianión con p16, favorece la formación de agregados homogéneos, de tamaño discreto e inhibe en gran medida la formación de agregados de orden superior, lo que sugiere que en ausencia de una carga global positiva en p16, la proteína aún es capaz de interaccionar con el DNA.

Diversos autores, han descrito que las proteínas HMG1-like de eucariotas muestran una unión al DNA que es independiente de la secuencia pero dependiente de ciertas características estructurales, de manera que presentan una preferencia por el DNA superenrollado o circular (Grasser *et al.*, 1996; Ritt *et al.*, 1998).

Para discernir si p16 era capaz de distinguir entre dos conformaciones diferentes de una misma molécula de DNA, se incubaron cantidades crecientes de la proteína p16 recombinante con dos conformaciones distintas del plásmido *pBluescript* (PBS): (i) superenrollado y (ii) linealizado con el enzima de restricción *EcoRI*.

Como se observa en la figura 35, p16 muestra mayor afinidad por el DNA superenrollado, de modo que la formación de agregados se produce a concentraciones menores de p16 que las requeridas para observar el mismo efecto sobre el DNA lineal. En ambos casos se observa, de nuevo, la cooperatividad en la unión de p16 con el DNA.

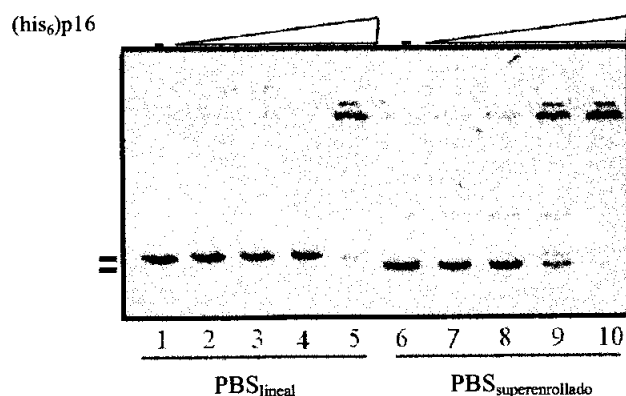


Figura 35. Ensayos de unión de la proteína $(his_6)p16$ con dos conformaciones distintas del plásmido PBS (5,2 nM): (i) plásmido linealizado con el enzima de restricción EcoRI (líneas 1-5), (ii) plásmido superenrollado (líneas 6-10). En el ensayo se han utilizado cantidades crecientes de proteína (2.7 μ M, 5.4 μ M, 10.8 μ M, 21.6 μ M).

3.4.2.3. Interacción de p16 con mononucleosomas

Dada la capacidad de p16 de unirse tanto a las histonas como al DNA por separado, se realizó un ensayo para comprobar si p16 podía unirse a la estructura nucleoproteica básica de la cromatina, el nucleosoma. El ensayo fue realizado en presencia y ausencia de poli-L-glutámico tal y como se describe en el apartado 2.6.10. En la figura 36 se muestra la electroforesis en gel de agarosa de los complejos obtenidos. En ambos casos se observa la formación de complejos discretos nucleosoma-p16 (líneas 2 y 4) y la ausencia de grandes agregados. No se observan diferencias entre la ausencia o presencia de poli-L-glutámico quizás porque la presencia de histonas en el nucleosoma modula la interacción de p16 con la estructura nucleoproteica, disminuyendo las interacciones de tipo iónico entre p16 y el DNA.

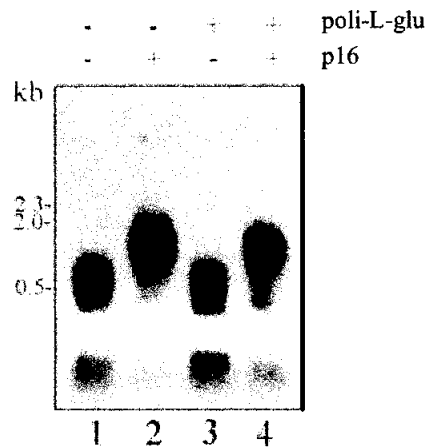


Figura 36. Interacción de p16 ($15\mu\text{M}$) con mononucleosomas ($1\mu\text{M}$) en ausencia (líneas 1-2) o presencia de poli-L-glutámico ($2\mu\text{M}$) (líneas 3-4). Las líneas 1 y 3 corresponden a los ensayos control sin proteína.

De los resultados expuestos hasta el momento se deduce que: (i) p16 es capaz de unirse tanto al DNA desnudo, de forma cooperativa, como a los nucleosomas, y (ii) que muestra preferencia por estructuras superenrolladas del DNA.

3.4.2.4. Superenrollamiento de un DNA plasmídico relajado en presencia de p16

En la célula el DNA se encuentra normalmente en forma superenrollada. En células procariontas, la proteína HU, y en eucariotas, las histonas, utilizan un mecanismo de superenrollamiento del DNA alrededor de las mismas, no específico de secuencia, para la organización y el empaquetamiento del DNA en un pequeño volumen compatible con el tamaño de las bacterias o el núcleo eucariota. Broyles & Pettijohn (1986) demostraron que cuando la proteína HU se une al DNA *in vitro*, en presencia de topoisomerasa I, produce compactación y superenrollamiento del DNA. Este tipo de experimentos se ha realizado también con las proteínas HMG1-like de organismos eucariotas donde se observó que en ensayos *in vitro* eran capaces de provocar curvaturas en un DNA lineal y producir

superenrollamiento de un DNA plasmídico en presencia de topoisomerasa I (Grasser *et al.*, 1996; Ritt *et al.*, 1998). La topoisomerasa I puede relajar una molécula de DNA superenrollado, libre de proteínas, produciendo un corte en una de las cadenas de DNA y permitiendo que esta cadena gire alrededor de la cadena complementaria. Sin embargo, cuando el superenrollamiento se produce por la interacción del DNA con una proteína, éste no se pierde por acción de la topoisomerasa.

Para ensayar la capacidad de p16 de inducir cambios en la estructura del DNA, se incubaron, en presencia de topoisomerasa I, dos cantidades de p16 (3 μ M y 15 μ M) con el plásmido PBS (5,2 nM) previamente relajado por la enzima. Este experimento se realizó también con dos proteínas básicas, el citocromo c (15 μ M) y la histona H4 (15 μ M). Después de la incubación y desproteinización de las muestras, estas se aplicaron a una electroforesis en gel de agarosa (figura 37). En las líneas 2 y 3 se muestra el plásmido PBS superenrollado y relajado por la topoisomerasa I respectivamente. El resultado de la incubación con el citocromo c (línea 4) y con H4 (línea 5), pone de manifiesto que aunque estas proteínas son capaces de unirse al DNA, no modifican su estructura, de manera que el plásmido queda relajado después de desproteinizar. El resultado obtenido mediante la incubación con p16 es claramente distinto (líneas 6 y 7), la unión de p16 al DNA relajado en presencia de topoisomerasa I, provoca un superenrollamiento en el DNA que es patente a ambas concentraciones de p16 ensayadas.

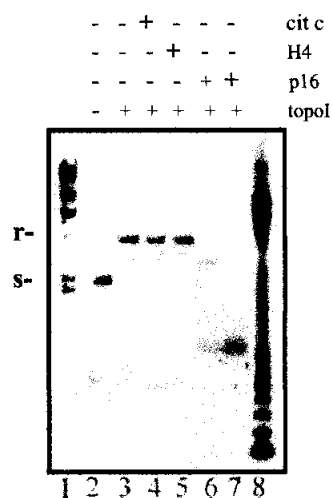


Figura 37. Ensayo de superenrollamiento del DNA plasmídico PBS (5,2 nM) en presencia de diferentes proteínas básicas. (1) patrón de tamaños λ -HindIII (23, 9.9, 6.6, 4.4, 2.3, 2.0, 0.5 kb). (2) DNA plasmídico superenrollado. (3) DNA plasmídico relajado por la topoisomerasa I. (4) Plásmido PBS incubado con citocromo c (15 μ M). (5) Plásmido PBS incubado con histona H4 (15 μ M). (6 y 7) Plásmido PBS incubado con (his₆) p16 (15 μ M). (8) patrón de tamaños p100.

Este efecto se podría explicar, si p16, en forma monomérica u oligomérica, constituyera una matriz o bobina donde el DNA se enrollara formando bucles de corta longitud, de una forma similar a como el DNA se enrolla alrededor de las histonas internas en el nucleosoma.

Al igual que las proteínas asociadas a la cromatina HU, Hbsu, HMG1 y H-NS (Grosschedl, 1995), la unión de p16 al DNA es independiente de la secuencia (figura 34), reconoce estructuras específicas en el DNA (figura 35), y es capaz de modificar la conformación del DNA introduciendo superenrollamiento *in vitro* (figura 37). Si se establece un paralelismo entre la función de estas proteínas y p16, la proteína p16 podría considerarse una proteína estructural asociada a la cromatina.

3.5. Posible función de p16

A pesar de que los resultados disponibles aún no permiten asignar una función definida a la proteína p16, es posible proponer diversas hipótesis acerca del papel de esta proteína en la semilla de guisante. Los resultados obtenidos parecen indicar que p16 es una proteína multifuncional. La proteína p16 está presente en distintos compartimentos subcelulares, en particular en el núcleo y en otros orgánulos, probablemente en los cuerpos proteicos. La similitud de secuencia de p16 y su precursor p54 con las proteínas de reserva de la familia de las vicilinas, su presencia en cuerpos proteicos y su desaparición en los ejes embrionarios coincidente con el desarrollo y crecimiento de la plántula, sugieren que es utilizada como proteína de reserva. Sin embargo, presenta marcadas diferencias con las vicilinas de guisante. La más destacable es la capacidad del gen *psp54* de responder a diferentes tipos de estrés relacionados con el contenido hídrico celular, característica que, probablemente, tiene su origen en la cupina ancestral de la cual evolutivamente procede.

Aunque el gen *psp54* se expresa en respuesta a estrés hídrico, la ausencia de correlación entre los niveles de mensajero y de proteína sugiere que p16 no ejerce un efecto de protección frente al estrés similar al propuesto para proteínas tipo Lea y sHSPs.

Por otro lado, las posibles funciones de p16 como proteína nuclear resultan de enorme interés. Podría ser relevante que la proteína se encuentre presente en periodos del desarrollo que se caracterizan por la ausencia de división celular y por la tolerancia a la deshidratación. Quizás la presencia de p16 en tejidos que no cumplan estas características no sea deseable para la célula de manera que la proteína sólo está presente en las etapas media/final de la embriogénesis y durante la germinación. En este sentido, son sugerentes los resultados obtenidos por Galvez & de Lumen (1999) sobre la proteína lunasina de 43 residuos de aminoácidos, que procede del procesamiento de una albúmina 2S de soja. La transformación de células de mamífero con esta proteína causa una inhibición de la división celular en un proceso mediado por su interacción con las histonas, principalmente con isoformas hipoacetiladas. La proteína p16 interacciona con las histonas y muestra también una preferencia por las histonas no acetiladas. Aunque no existen homologías de secuencia entre lunasina y p16, diferentes genes podrían haber sido utilizados a lo largo de la evolución para funciones similares. De la misma forma que la lunasina, p16 podría participar en el cese de la división celular en células embrionarias a través de su interacción con la cromatina (histonas y/o DNA). Por otro lado, en experimentos *in vitro* p16 es capaz de provocar cambios en la conformación del DNA lo que permite sugerir que podría estar implicada en el establecimiento y/o mantenimiento de una estructura compacta de la cromatina, incompatible con cualquier actividad nuclear pero probablemente imprescindible para su protección frente a la deshidratación extrema que se produce al final del desarrollo de la semilla.

4. Conclusiones

1. La construcción y análisis de una genoteca de expresión de ejes embrionarios de guisante 30 DAF ha permitido el aislamiento y caracterización del cDNA que codifica la proteína p16. Este cDNA codifica una proteína precursora de 54,5 kDa, que contiene un péptido señal y dos posibles secuencias de localización nuclear. p16 corresponde al tercio C-terminal de la proteína precursora, p54, después del procesamiento del enlace Asn371-Ser372.

2. El análisis de la secuencia de p54 en las bases de datos ha mostrado la existencia de una proteína prácticamente idéntica en haba, a la que denominamos *p54-like*. El anticuerpo de p16 reconoce una proteína de un tamaño similar a p16 tanto en haba como en lenteja, lo que indica, por un lado que la proteína *p54-like* de haba se procesa de una forma similar a p54, y por otro que en lenteja existe también un gen homólogo a *psp54* todavía no identificado.

3. El alineamiento de secuencias de p54 con dos vicilinas de estructura conocida ha llevado a incluir a p54 en la superfamilia cupina que agrupa proteínas tanto de organismos eucariotas como procariotas con estructura similar y funciones diversas. Esto ha permitido trazar un posible esquema evolutivo para p54, basado en modelos previamente descritos.

4. El gen *psp54* está presente en copia única en el genoma de guisante.

5. La expresión de *psp54* está regulada durante el desarrollo embrionario, siendo específica de las etapas media y final de la embriogénesis. El mRNA de *psp54* y la proteína p16 se acumulan en la semilla seca, desaparecen a lo largo de la germinación y no se detectan en tejidos vegetativos.

6. El gen *psp54* se induce por sequía, estrés osmótico, herida, temperaturas extremas y tratamiento con ABA, de una forma dependiente del estadio de desarrollo de la plántula. Los niveles de proteína no se corresponden con la acumulación de mRNA tras los

diferentes tratamientos, aunque se observa un aumento en la estabilidad de la proteína preexistente.

7. La proteína p16 se encuentra presente en el núcleo y en otras fracciones particuladas de la célula.

8. La proteína p16 se asocia a la cromatina a través de la interacción con las histonas internas, especialmente con H3 y H4, y muestra preferencia por las histonas no acetiladas.

9. La proteína p16 interacciona *in vitro* con el DNA desnudo de forma cooperativa y con nucleosomas. La unión es independiente de secuencia pero dependiente de ciertas características estructurales del DNA, de manera que muestra preferencia por estructuras superenrolladas del DNA. La proteína p16 es capaz de inducir superenrollamiento de un DNA plasmídico en presencia de topoisomerasa I, por lo que podría ejercer un papel estructural durante el proceso de compactación de la cromatina.

5. Bibliografia

- Adams, C.R. & Kamakaka, R.T. (1999) Chromatin assembly: biochemical identities and genetic redundancy. *Curr. Op. Genet. Develop.* **9**, 185-190.
- Almoguera, C. & Jordano, J. (1992) Developmental and environmental concurrent expression of sunflower dry-seed sotred low-molecular weight heat-shock proteins during late embryogenesis. *Plant Mol. Biol.* **19**, 781-792.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**, 403-410.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D.J. (1997) Grapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**, 3389-3402.
- Arenas-Mena, C., Raynal, M., Borell, A., Varoquaux, F., Cutanda, M.C., Stacy, R.A.P., Pagès, M., Delseny, M. & Culiáñez-Macià, F.A. (1999) Expression and cellular localization of Atrab28 during *Arabidopsis* embryogenesis. *Plant Mol. Biol.* **40**, 355-363.
- Arents, G., Burlingame, R.W., Wang, B.W., Love, W.E. & Moudrianakis, E.N. (1991) The nucleosomal core histone octamer at 3.1Å resolution: a tripartite protein assembly and a left-handed superhelix. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 10148-10152.
- Arents, G. & Moudrianakis, E.N. (1993) Topography of the histone octamer surface: Repeating structural motifs utilized in the docking of nucleosomal DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 10489-10493.
- Arents, G. & Moudrianakis, E.N. (1995) The histone fold: A ubiquitous architectural motif utilized in DNA compaction and protein dimerization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 11170-11174.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. & Struhl, K. Eds. (1993) *Current protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons inc, New York.

- Ballestar, E., Abad, C. & Franco, L. (1996) Core histones are glutaminyl substrates for tissue transglutaminase. *J. Biol. Chem.* **271**, 18817-18824.
- Baker, J.C., Steele, C. & Dure, III L. (1988) Sequence and characterization of 6 Lea proteins and their genes from cotton. *Plant Mol. Biol.* **11**, 277-291.
- Barrat, D.H.P., Domeneq, C., Wang, T.L. (1989) Purification and partial characterization of two abscisic-acid-responsive proteins induced in cultured embryos of *Pisum sativum* L. *Planta* **180**, 16-23.
- Baümlein, H., Braun, H., Kakhovskaya, I.A. & Shutov, A.D. (1995) Seed storage proteins of spermatophytes share a common ancestor with desiccation proteins of fungi. *J. Mol. Evol.* **41**, 1070-1075.
- Bazett-Jones, D.P., Leblanc, B., Herfort, M. & Moss, T. (1994) Short-range DNA looping by the *Xenopus* HMG-box transcription factor, xUBF. *Science* **264**, 1134-1137.
- Bendayan, M., Nancy, A., & Kan, F.W.K. (1987) Effect of tissue processing on colloidal gold cytochemistry. *J. Histochem. Cytochem.* **35**, 983-996.
- Berghammer, H. & Auer, B. (1993) Easypreps: Fast and easy plasmid minipreparation for analysis of recombinant clones in *E. coli*. *Biotechniques* **14**, N°4.
- Bewley, J.D. (1979) Physiological aspects of desiccation tolerance. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **30**, 195-238.
- Bweley, J.D. & Marcus, A. (1990) Gene expression in seed development and germination. *Progr. Nucleic Acid. Res. Mol. Biol.* **38**, 165-193.
- Bweley, J.D. (1997) Seed germination and dormancy. *Plant Cell* **9**, 1055-1066.
- Borowski, P., Kuhl, R., Laufs, R., Sxhulze zur Wiesch, J. & Heiland, M. (1999) Identification and characterization of a histone binding site of the non-structural protein 3 of hepatitis C virus. *J. Clin. Virol.* **13**, 61-69.
- Bortvin, A. & Winston, F. (1996) Evidence that Spt6p controls chromatin structure by a direct interaction with histones. *Science* **272**, 1473-1476.

- Boulter, D., Evans, I.M., Ellis, J.R., Shirsat, A., Gatehouse, J.A. & Croy, R.R.D. (1987) Differential gene expression in the development of *Pisum sativum*. *Plant Physiol. Biochem.* **25**, 283-289.
- Braun, H., Czihal, A., Shutov, A.D. & Bäumlein, H. (1996) A vicilin-like seed protein of cycads: similarity to sucrose-binding proteins. *Plant Mol. Biol.* **31**, 35-44.
- Braunstein, M., Rose, A.B., Holmes, S.G., Allis, C.D. & Broach, J.R. (1993) Transcriptional silencing in yeast is associated with reduced nucleosome acetylation. *Genes Dev.* **7**, 592-604.
- Braunstein, M., Sobel, R.E., Allis, C.D., Turner, B.M. & Broach, J.R. (1996) Efficient transcriptional silencing in *Saccharomyces cerevisiae* requires a heterochromatin histone acetylation pattern. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 4349-4356.
- Bray, E.A. (1997) Plant responses to water deficit. *Trends Plant Sci.* **2**, 48-54.
- Brennan, R.G. & Matthews, B.W. (1989) The helix-turn-helix DNA binding motif. *J. Biol. Chem.* **264**, 1903-1906.
- Broyles, S., & Pettijohn, D.E. (1986) Interaction of the E. Coli HU protein with DNA: Evidence for formation of nucleosome-like structures with altered DNA helical pitch. *J. Mol. Biol.* **187**, 47-60.
- Bustin, M. & Reeves, R. (1996) High-mobility-group chromosomal proteins: architectural components that facilitate chromatin function. *Prog. Nucl. Acid Res. Mol-Biol* **54**, 35-100.
- Busk, P.K. & Pagès, M. (1998) Regulation of abscisic acid-induced transcription. *Plant Mol. Biol.* **37**, 425-435.
- Carbonell, J. & García-Martínez, J.L. (1980) Fruit-set of unpollinated ovaries of *Pisum sativum* L. influence of vegetative parts. *Planta* **147**, 444-450.
- Chiatante, D., Brusa, P., Levi, M. & Sparvoli, E. (1991) Nuclear proteins during the onset of cell proliferation in root pea meristems. *J. Exper. Bot.* **42**, 45-50.

- Chiatante, D., Onelli, E., Patrignani, G. & Scippa, G.S. (1995) Localization of a nuclear protein (QP47) in embryonic meristems during seed maturation and germination and its distribution among crop plants. *J. Exp. Bot.* **46**, 815-821.
- Chung, R.P.T., Neumann, G.M. & Polya, G.M. (1997) Purification and characterization of basic proteins with *in vitro* antifungal activity from seeds of cotton, *Gossypium hirsutum*. *Plant Sci.* **127**, 1-16.
- Church, G.M. & Gilbert, W. (1984) Genomic sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 1991-1995.
- Clissold, P.M. & Ponting, C.P. (2001) JmjC: cupin metalloenzyme-like domains in jumonji, hairless and phospholipase A₂β. *Trends Biochem. Sci.* **26**, 7-9.
- Close, T.J. (1996) Dehydrins: emergence of a biochemical role of a family of plant dehydration proteins. *Physiol. Plant.* **97**, 795-803.
- Close, T.J. (1997) Dehydrins: a commonality in the response of plants to dehydration and low temperature. *Physiol. Plant.* **100**, 291-296.
- Coca, M., Almoguera, C. & Jordano, J. (1994) Expression of sunflower low-molecular-weight heat-shock proteins during embryogenesis and persistence after germination: localization and possible functional implications. *Plant Mol. Biol.* **25**, 479-492.
- Coca, M., Almoguera, C., Thomas, T. & Jordano, J. (1996) Differential regulation of small heat-shock genes in plants: analysis of a water-stress-inducible and developmentally activated sunflower promoter. *Plant Mol. Biol.* **31**, 863-876.
- Cooper, D.C. (1938) Embryology of *Pisum sativum*. *Bot. Gaz.* **100**, 123-132.
- Crouch, M.L. (1988) Regulation of gene expression during seed development in flowering plants. En: *Developmental Biology. A comprehensive synthesis. vol 5.* (Edited by Leon & Browden) pp 367-404. Plenum press. New York and London.
- DeRocher, A.E. & Vierling E. (1994) Developmental control of small heat shock protein expression during pea seed maturation. *Plant J.* **5**, 93-102.

- Dunwell, J.M. & Gane, P.J. (1998) Microbial relatives of seed storage proteins: conservation of motifs in a functionally diverse superfamily of enzymes. *J. Mol. Evol.* **46**, 147-154.
- Dunwell, J.M., Khuri, S. & Gane, P.J. (2000) Microbial relatives of the seed storage proteins of higher plants: conservation of structure and diversification of function during evolution of the cupin superfamily. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**, 153-179.
- Dure, L., Crouch, M., Harada, J., Ho, T.H.D., Mundy, J., Quatrano, R., Thomas, T. & Sung, Z.R. (1989) Common amino acid sequence domains among the LEA proteins of higher plants. *Plant Mol. Biol.* **12**, 475-486.
- Eddy, S.R. (1998) Profile hidden Markov models. *Bioinformatics* **14**, 755-763.
- Edmondson, D.G. & Roth, S.Y. (1998) Interactions of transcriptional regulators with histones. *Methods* **15**, 355-364.
- Echols, H. (1986) Multiple DNA-protein interactions governing high-precision DNA transactions. *Science* **233**, 1050-1056.
- Espelund, M., Saeboe-Larsen, S., Hughes, D.W., Galau, G.A., Larsen, F. & Jakobsen, K.S. (1992) Late embryogenesis-abundant genes encoding proteins with different numbers of hydrophilic repeats are regulated differentially by abscisic acid and osmotic stress. *Plant J.* **2**, 241-252.
- Evans I.M., Gatehouse J.A., Croy R.R.D. & Boulter D. (1984) Regulation of the transcription of storage-protein mRNA in nuclei isolated from developing pea (*Pisum sativum* L.) cotyledons. *Planta* **160**, 559-568.
- Feinberg, A.P. & Volgelstein, B. (1983) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragment to high specific activity. *Anal. Biochem.* **132**, 6-13.
- Galau, G.A., Hughes, D.W. & Dure, L. (1986) Abscisic acid induction of cloned cotton late embryogenesis abundant (Lea) mRNAs. *Plant Mol. Biol.* **7**, 155-170.
- Galau, G.A., Bijaisoradat, N. & Hughes, D.W. (1987) Accumulation kinetics of cotton late embryogenesis-abundant mRNAs and storage protein mRNAs: Coordinate regulation during embryogenesis and the role of abscisic acid. *Dev. Biol.* **123**, 189-212.

- Gallegos, M.T., Michan, C. & Ramos, J.L. (1993) The Xyl/AraC family of regulators. *Nucleic Acids Res.* **21**, 807-810.
- Galvez, A.F. & de Lumen, B.O. (1999) A soybean cDNA encoding a chromatin-binding peptide inhibits mitosis of mammalian cells. *Nature Biotech.* **17**, 495-500.
- Gane, P.J., unwell, J.M. & Warwidker, J. (1998) Modelling based on the structure of vicilins predicts a histidine cluster in the active site of oxalate oxidase. *J. Mol. Evol.* **46**, 488-493.
- Gatehouse J.A., Lycett G.W., Delauney A.J., Croy R.D.R. & Boulter D. (1983) Sequence specificity of the post-translational proteolytic cleavage of vicilin, a seed storage protein of pea (*Pisum sativum L.*). *Biochem. J.* **212**, 427-432.
- Giradaut, J., Parcy, F., Bertauche, N., Gosti, F., Leung, J., Morris, P.C., Bouvier-Durand, M. & Vartanian, N. (1994) Current advances in abscisic acid action and signaling. *Plant Mol. Biol.* **26**, 1557-1577.
- Goldberg R.B., Barker S.J. & Perez-Grau L. (1989) Regulation of gene expression during plant embryogenesis. *Cell* **56**, 149-160.
- Goday, A., Sánchez-Martínez, D., Gómez, J., Puigdoménech, P. & Pagès, M. (1988) Gene expression in developing *Zea mays* embryos: Regulation by abscisic acid of a highly phosphorylated 23-25 kDa group of proteins. *Plant Physiol.* **88**, 564-569.
- Goday, A., Jensen, A., Culiáñez-Macià, F.A., Alba, M.M., Figueras, M., Serratos, J., Torrent, M. & Pagès, M. (1994) The maize abscisic acid responsive protein Rab17 is located in the nucleus and cytoplasm and interacts with nuclear localization signals. *Plant Cell* **6**, 351-360.
- Godoy, J.A., Lunar, R., Torres-Schumann, S., Moreno, J., Rodrigo, R.M. & Pintor-Toro, J.A. (1994) Expression, tissue distribution and subcellular localization of dehydrin TAS14 in salt-stressed tomato plants. *Plant Mol. Biol.* **26**, 1921-1934.
- Grasser, K.D., Krech, A.B. & Feix, G. (1994) The maize chromosomal HMGa protein recognizes structural features of DNA and increases DNA flexibility. *Plant J.* **6**, 351-358.

- Grasser, K.D., Grimm, R. & Ritt, C. (1996) Maize Chromosomal HMGC. Two closely related structure-specific DNA-binding proteins specify a second type of plant high mobility box protein. *J. Biol. Chem.* **271**, 32900-32906.
- Grimes, H.D., Overvoorde, P.J., Ripp, K., Franceschi, V.R. & Hitz, W.D. (1992) A 62-kD Sucrose Binding Protein is expressed and localized in tissues actively engaged in sucrose transport. *Plant Cell* **4**, 1561-1574.
- Grosschedl, R., Giese, K., Pagel, J. (1994) HMG domain proteins: architectural elements in the assembly of nucleoprotein structures. *Trends Genet.* **10**, 94-100.
- Grosschedl, R. (1995) Higher-order nucleoprotein complexes in transcription: analogies with site-specific recombination. *Curr. Opin. Cell Biol.* **7**, 362-370.
- Grunstein, M. (1997) Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature* **389**, 349-352.
- Györgyey, J., Gartner, A., Nemeth, K., Magyar, Z., Hirt, H., Heberle-Bors, E. & Dudits, D. (1991) Alfalfa heat shock genes are differentially expressed during somatic embryogenesis. *Plant Mol. Biol.* **16**, 999-1007.
- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J.Mol.Biol.* **166**, 557-580.
- Hatton, D. & Gray J.C. (1999) Two MAR DNA-binding proteins of the pea nuclear matrix identify a new class of DNA-binding proteins. *Plant J.* **18**, 417-429.
- Hedley, C.L. & Ambrose, M.J. (1980). An analysis of seed development in *Pisum sativum* L. *Ann. Bot.* **46**, 89-105.
- Henras, A., Hery, Y., Bousquet-Antonelli, C., Noaillac-Depeyre, J., Gélugne, J.P. & Caizergues-Ferrer, M. (1998) Nhp2p and Nop10p are essential for the function of H/ACA snoRNPs. *EMBO J.* **17**, 7078-7090.
- Holdsworth, M., Kurup, S. & McKibbin, R. (1999) Molecular and genetic mechanisms regulating the transition from embryo development to germination. *Trends Plant Sci.* **4**, 275-280.

- Houde, M., Danyluk, J., Laliberte, J.-F., Rassart, E., Dhindsa, R.S. & Sarhan, F. (1992) Cloning, characterization and expression of a cDNA encoding a 50-kilodalton protein specifically induced by cold acclimation in wheat. *Plant Physiol.* **99**, 1381-1387.
- Hsieh, H.L., Tong, C.G., Thomas, C. & Roux, S.J. (1996) Light-modulated abundance of mRNA encoding a calmodulin-regulated, chromatin-associated NTPase in pea. *Plant Mol. Biol.* **30**, 135-147.
- Hughes, D.W. & Galau, G.A. (1987) Translation efficiency of Lea mRNAs in cotton embryos: only minor changes during embryogenesis and germination. *Plant Mol. Biol.* **9**, 301-313.
- Hughes, D.W. & Galau, G.A. (1989) Temporally modular gene expression during cotyledon development. *Genes Dev.* **3**, 358-369.
- Ingram, J. & Bartels, D. (1996) The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **47**, 377-403.
- Ito, T., Ikehara, T., Nakagawa, T., Kraus, W.L. & Muramatsu, M. (2000) p300-mediated acetylation facilitates the transfer of histone H2A-H2B dimers from nucleosomes to a histone chaperone. *Genes Dev.* **14**, 1899-1907.
- Jiang, L., Downing, W.L., Baszczynski, C.L. & Kermode, A.R. (1995) The 5' Flanking regions of vicilin and napin storage protein genes are down-regulated by desiccation in transgenic tobacco. *Plant Physiol.* **107**, 1439-1449.
- Kende H. & Zeevaart J.A.D. (1997) The five "classical" plant hormones. *Plant Cell* **9**, 1197-1210.
- Ko, T.-P., Ng, J.D. & McPherson, A. (1993) The three-dimensional structure of canavalin from jack bean (*Canavalia ensiformis*). *Plant Physiol.* **101**, 729-744.
- Kolodrubetz, D. & Burgum, A. (1991) Sequence and genetic analysis of NHP2: a moderately abundant High Mobility Group-like nuclear protein with a essential function in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **7**, 79-90.
- Kornberg, R., LaPointe, J.W. & Lorch, Y. (1989) Preparation of nucleosomes and chromatin. *Methods Enzymol.* **170**, 3-14.

- Kyte, J. & Doolittle, R.F. (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* **157**, 105-132.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lane, B.G., Bernier, F., Dratewka-Kos, E., Shafai, R., Kennedy, T.D., Pyne, C., Munro, J.R., Vaughan, T., Walters, D. & Altomare, F. (1991) Homologies between members of the germin gene family in hexaploid wheat and similarities between these wheat germins and certain physarum spherulins. *J. Biol. Chem.* **266**, 10461-10469.
- Lane, B.G., Dunwell, J.M., Ray, J.A., Schmitt, M.R. & Cuming, A.C. (1993) Germin, a protein marker of early plant development, is an oxalate oxidase. *J. Biol. Chem.* **268**, 12239-12242.
- Lawrence, M.C., Suzuki, E., Varghese, J.N., Davis, P.C., Van Donkelaar, A., Tulloch, P.A. & Colman, P.M. (1990) The three-dimensional structure of the seed storage protein phaseolin at 3 Å resolution. *EMBO J.* **9**, 9-15.
- Lawrence, M.C., Izard, T., Beuchat, M., Blagrove, R.J. & Colman, P.M. (1994) Structure of Phaseolin at 2.2 Å resolution. Implications for a common vicilin/legumin structure and the genetic engineering of seed storage proteins. *J. Mol. Biol.* **238**, 748-776.
- Lee, G., Pokala, N. & Vierling, E. (1995) Structure and in vitro molecular chaperone activity of cytosolic small heat shock proteins from pea. *J. Biol. Chem.* **270**, 10432-10438.
- Leprince, O., Colson, P., Houssier, C. & Deltour, R. (1995) Changes in chromatin structure associated with germination of maize and their relation with desiccation tolerance. *Plant Cell Environ.* **18**, 619-629.
- Lobell, R.B. & Schleif, R.F. (1990) DNA looping and unlooping by AraC protein. *Science* **250**, 528-532.
- Luger, K., Mäder, A.W., Richmond, R.K., Sargent, D.F. & Richmond, T.J. (1997) Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* **389**, 251-260.

- Lütke, H.A., Chow, K.C., Mickel, F.S., Moss, K.A., Kern, H.F. & Scheelse, G.A. (1987) Selection of AUG initiation codons differs in plants and animals. *EMBO J.* **6**, 43-48.
- Lycett, G.W., Delauney, A.J., Gatehouse, J.A., Gilroy, J., Croy, R.D.R., Boulter, D. (1983) The vicilin gene family of pea (*Pisum sativum* L.): a complete cDNA coding sequence for preprovicilin. *Nucleic Acids Res.* **11**, 2367-2380.
- Marcus, J.P., Green, J.L., Goulter, K.C. & Manners, J.M. (1999) A family of antimicrobial peptides is produced by processing of a 7S globulin protein in *Macadamia integrifolia* kernels. *Plant J.* **19**, 699-710.
- Marinos N.G. Embryogenesis of the Pea (*Pisum sativum*). *Protoplasma* **70**, 261-279.
- McQibban, G.A., Commisso-Cappelli, C.N. & Lewis, P.N. (1998) Assembly, remodeling, and histone binding capabilities of yeast nucleosome assembly protein 1. *J. Biol. Chem.* **273**, 6582-6590.
- Michaels, S.D., John, M.C. & Amasino, R.M. (1994) Removal of polysaccharides from plant DNA by ethanol precipitation. *Biotechniques* **17**, 274-275.
- Mingarro, I., Sendra, R., Salvador, M.L. & Franco, L. (1993) Site specificity of pea histone acetyltransferase B *in vitro*. *J. Biol. Chem.* **268**, 13248-13252.
- Mirkovitch, J., Mirault, M.E. & Laemmli, U.K. (1984) Organization of the higher-order chromatin loop: specific DNA attachment sites on nuclear scaffold. *Cell* **39**, 223-232.
- Mundy, J. & Chua, N.H. (1988) Abscisic acid and water-stress induce the expression of a novel rice gene. *EMBO J.* **7**, 2279-2286.
- Murzin, A.G. (1993) Can homologous proteins evolve different enzymatic activities?. *Trends Biochem. Sci.* **18**, 403-405.
- Nan, X., Ng, H.H., Johnson, C.A., Laherty, C.D., Turner, B.M., Eisenman, R.N. & Bird, A. (1998) Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature* **393**, 386-389.
- Neven, L.G., Haskell, D.W., Hofig, A., Li, Q.-B. & Guy, C.L. (1993) Characterization of a spinach gene responsive to low temperature and water stress. *Plant Mol. Biol.* **21**, 291-305.

- Niogret, M.F., Culiáñez-Macià, F.A., Goday, A., Albà, M.M. & Pagès, M. (1996) Expression and cellular localization of rab28 mRNA and Rab28 protein during maize embryogenesis. *Plant J.* **9**, 549-557.
- Osborne D.J., & Boubriak I.I. DNA and desiccation tolerance. *Seed Sci. Res.* **4**, 175-185.
- Overvoorde, P.J., Frommer, W.B. & Grimes, H.D. (1996) A soybean sucrose binding protein independently mediates nonsaturable sucrose uptake in yeast. *Plant Cell* **8**, 271-280.
- Pearson, W.R., Lipman, D.J. (1988) Improved tools biological sequence comparison. *Proc. Nat.l Acad. Sci. USA*, **85**: 2444-2448.
- Pedra, J.H.F., Delú-Filho, N., Pirovani, C.P., Contim, L.A.S., Dewwy, R.E., Otoni, W. & Fontes, E.P.B. (2000) Antisense and sense expression of a sucrose binding protein homologue gene from soybean in transgenic tobacco affects plant growth and carbohydrate partitioning in leaves. *Plant Sci.* **152**, 87-98.
- Peña-Cortés, H. & Willmitzer, L. (1995) The role of hormones in gene activation in response to wounding. Davies, P.J. (ed). En: *Plant hormones*, pp395-414.
- Pla, M., Goday, A., Vilardell, J., Gómez, J. & Pagès, M. (1989) Differential regulation of ABA-induced 23-25 kDa proteins in embryo and vegetative tissues of the *viviparous* mutants of maize. *Plant Mol. Biol.* **13**, 385-394.
- Revie, D., Smith, D.W. & Yee, T.W. (1988) Kinetic analysis for optimization of DNA ligation reactions. *Nucleic Acids Res.* **16**, 10301-10319.
- Richard, S., Morency, M.-J., Drevet, C., Jouanin L. & Armand, S. (2000) Isolation and characterization of a dehydrin gene from white spruce induced upon wounding, drought and cold stresses. *Plant Mol. Biol.* **43**, 1-10.
- Ritt, C., Grimm, R., Fernández, S., Alonso, J.C. & Grasser, K.D. (1998) Four differently chromatin-associated maize HMG domain proteins modulate DNA structure and act as architectural elements in nucleoprotein complexes. *Plant J.* **14**, 623-631.
- Rivin, C.J. & Gruth, T. (1991) Abscisic acid and the developmental regulation of embryo storage proteins in maize. *Plant Physiol.* **95**, 358-365.

- Robbins, J., Dilworth, S.M., Laskey, R.A. & Dingwall, C. (1991) Two interdependent basic domains in nucleoplasmin nuclear targeting sequence: identification of a class of bipartite nuclear targeting sequence. *Cell* **64**, 615-623.
- Robertson, M. & Chandler, P.M. (1992) Pea dehydrins: identification, characterisation and expression. *Plant Mol. Biol.* **19**, 1031-1044.
- Robertson, K.D. & Jones, P.A. (2000) DNA methylation: past, present and future directions. *Carcinogenesis* **21**, 461-467.
- Rodrigo, M.I. & Franco, L. (1990) Histones variants from pea (*Pisum sativum*): their differential presence in fractions obtained by Dnase I digestion of nuclei. *Physiol. Plant.* **78**, 602-608.
- Roth, S.Y. & Allis, M.C. (1992) Chromatin condensation: does histone H1 dephosphorylation play a role?. *Trends Biochem. Sci.* **17**, 93-98.
- Saijo, Y., Hata, S., Kyozuka, J., Shimamoto, K. & Izui, K. (2000) Over-expression of a single Ca²⁺-dependent protein kinase confers both cold and salt/drought tolerance on rice plants. *Plant J.* **23**, 319-327.
- Saitoh, N., Goldberg, I. & Earnshaw, W.C. (1995) The SMC proteins and the coming of age of the chromosome scaffold hypothesis. *BioEssays* **17**, 759-766.
- Saito, H., Fujiwara, T., Shin, S., Okui, K. & Nakamura, Y. (1996) Cloning and mapping of a human novel cDNA (NHP2L1) that encodes a protein highly homologous to yeast nuclear protein NHP2. *Cytogenet. Cell Genet.* **72**, 191-193.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Manniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5467.
- Schultz, T.F., Spiker, S. & Quatrano, R.S. (1996) Histone H1 enhances the DNA binding activity of the transcription factor EmBP-1. *J. Biol. Chem.* **271**, 25742-25745.
- Sendra, R., Rodrigo, M.I., Salvador, M.L. & Franco, L. (1988) Characterization of pea histone deacetylases. *Plant Mol. Biol.* **11**, 857-866.

- Seo, S., Sano, H. & Ohashi, Y. (1999) Jasmonate-based wounding signal transduction requires activation of WIPK, a tobacco mitogen-activated protein kinase. *Plant Cell* **11**, 289-298.
- Shen, Q., Chen, C-N., Brands, A., Pan, S-M. & Ho, T-H.D. (2001) The stress- and abscisic acid-induced barley gene HVA22: developmental regulation and homologues in diverse organisms. *Plant Mol. Biol.* **45**, 327-340.
- Shewry, P.R., Napier, J.A. & Tatham, A.S. (1995) Seed storage proteins: structures and biosynthesis. *Plant Cell* **7**, 945-956.
- Shutov, A.D., Kakhovskaya, I.A., Braun, H., Bäumlein, H. & Müntz, K. (1995) Legumin-like and vicilin-like seed storage proteins: evidence for a common single-domain ancestral gene. *J. Mol. Evol.* **41**, 1057-1069.
- Shutov, A.D., Braun, H., Chesnokov, Y.V. & Bäumlein, H. (1998) A gene encoding a vicilin-like protein is specifically expressed in fern spores. Evolutionary pathway of seed storage globulins. *Eur. J. Biochem.* **252**, 79-89.
- Skriver, K. & Mundy, J. (1990) Gene expression in response to abscisic acid and osmotic stress. *Plant Cell* **2**, 503-512.
- Smith, S. & Stillman, B. (1989) Purification and characterization of CAF-1, a human cell factor required for chromatin assembly during DNA replication. *Cell* **58**, 15-25.
- Southern, E.M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**, 503-517.
- Spencer, M.E. & Hodge, R. (1992) Cloning and sequencing of a cDNA encoding the mayor storage proteins of *Theobroma cacao*. Identificación of the proteins as members of the vicilin class of storage proteins. *Planta* **186**: 567-576.
- Stacy, R.A.P., Nordeng, T.W., Culiáñez-Macià, F.A. & Aalen, R.B. (1999) The dormancy-related peroxiredoxin anti-oxidant, PER1, is localized to the nucleus of barley embryo and aleurone cells. *Plant J.* **19**, 1-8.
- Strahl, B.D. & Allis, C.D. (2000) The language of covalent histone modifications. *Nature* **403**, 41-45.

- Struhl, K. (1998) Histone acetylation and transcriptional regulatory mechanisms. *Genes Dev.* **12**, 599-606.
- Sullivan, S.A., Aravind, L., Makalowska, I., Bawevanis, A.D. & Landsman, D. (2000) The histone database: a comprehensive www resource for histones and histone fold-containing proteins. *Nucleic Acids Res.* **28**, 320-322.
- Tanaka, I., Appelt, K., Dijk, J., White, S. & Wilson, K. (1984) 3Å resolution structure of a protein with histone-like properties in prokaryotes. *Nature* **310**, 376-381.
- Tapias, A., López, G. & Ayora, S. (2000) *Bacillus subtilis* LrpC is a sequence-independent DNA-binding and DNA-bending protein which bridges DNA. *Nucleic Acids Res.* **28**, 552-559.
- Tegeder, M., Wang, X.-D., Frommer, W.B., Offler, C.E. & Patrick, J.W. (1999) Sucrose transport into developing seeds of *Pisum sativum* L. *Plant J.* **18**, 151-161.
- Thompson, J.S., Ling, X. & Grunstein, M. (1994) Histone H3 amino terminus is required for telomeric and silent mating locus repression in yeast. *Nature* **369**, 245-247.
- Travers, A.A., Ner, S.S. & Churchill, M.E.A. (1994) DNA chaperones: a solution to a persistence problem?. *Cell* **77**, 167-169.
- Turner, B.M., Birley, A.J. & Lavender, J. (1992) Histone H4 isoforms acetylated at specific lysine residues define individual chromosomes and chromatin domains in *Drosophila* polytene nuclei. *Cell* **69**, 375-384.
- Ull, M.A., Franco, L. (1986) The nucleosomal repeat length of pea (*Pisum sativum*) chromatin changes during germination. *Plant Mol. Biol.* **7**, 25-31.
- Ull, M.A., Herrero, M.E., Franco, L. (1991) Putative HMG non-histone chromosomal proteins from pea (*Pisum sativum*). *Plant Sci.* **75**: 55-62.
- van Holde, K.E. (1988) *Chromatin*, Springer-Verlag, New York.
- van Holde, K.E. & Zlatanova, J. (1995) Chromatin higher order structure: chasing a mirage?. *J. Biol. Chem.* **270**, 8373-8376.
- Verreault, A., Kaufman, P.D., Kobayashi, R. & Stillman, B. (1996) Nucleosome assembly by a complex of CAF-1 and acetylated histones H3/H4. *Cell* **87**, 95-104.

- Verreault, A., Kaufman, R., Kobayaski, R. & Stillman, B. (1998) Nucleosomal DNA regulates the core-histone-binding subunits of the human Hat1 acetyltransferase. *Curr. Biol.* **8**, 96-108.
- Verreault, A. (2000) De novo nucleosome assembly: new pieces in an old puzzle. *Genes Dev.* **14**, 1430-1438.
- Vierling, E. (1991) The roles of heat shock proteins in plants. *Ann.Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **42**, 579-620.
- Von Heijne, G. (1986) A new method for predicting signal sequence cleavage sites. *Nucleic Acids Res.* **14**, 4683-4690.
- Waters, E., Lee, G. & Vierling, E. (1996) Evolution, structure and function of the small heat shock proteins in plants. *J. Exp. Bot.* **47**, 325-338.
- Watson, M.E. (1984) Compilation of published signal sequences. *Nucleic Acids Res.* **12**, 5145-5159.
- Wehmeyer, N. & Vierling, E. (2000) The expression of small heat shock proteins in seeds responds to discrete developmental signals and suggests a general protective role in desiccation tolerance. *Plant Physiol.* **122**, 1099-1108.
- Wei, Y., Yu, L., Bowen, J., Gorovsky, M.A. & Allis, C.D. (1999) Phosphorylation of histone H3 is required for proper chromosome condensation and segregation. *Cell* **97**, 99-109.
- Weir, H.M., Draulis, P.J., Hill, C.S., Raine, A.R.C., Laue, E.D. & Thomas, J.O. (1993) Structure of the HMG box motif in the B-domain of HMG1. *EMBO J.* **12**, 1311-1319.
- Wobus, U. & Weber, H. (1999) Seed maturation: genetic programmes and control signals. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2**, 33-38.
- Wolffe, A.P. & Hayes, J.J. (1999) Chromatin disruption and modification. *Nucleic Acids Res.* **27**, 711-720.
- Wolffe, A.P. & Pruss, D. (1996) Deviant nucleosomes: the functional specialization of chromatin. *Trends Genet.* **12**, 58-62.

- Wray, W., Boulikas, T., Wray, V.P. & Hancock, R. (1981) Silver staining of proteins in polyacrilamide gels. *Anal. Biochem.* **118**, 197-203.
- Wu, L., Ueda, T. & Messing, J. (1995) The formation of mRNA 3'-ends in plants. *Plant J.* **8**, 323-329.
- Zappavigna, V., Falciola, L., Helmer Citterich, M., Mavilio, F. & Bianchi, M.E. (1996) HMG1 interacts with HOX proteins and enhances their transcriptional activation. *EMBO J.* **15**, 4981-4991.
- Zuñiga, A. (1990) Fraccionamiento de la cromatina de guisante (*Pisum sativum*) y caracterización de una proteína cromosomal no histona tipo Lea. Tesis de licenciatura. Universitat de València.
- zur Nieden, U., Neumann, D., Bucka, A. & Nover, L. (1995) Tissue-specific localization of heat-stress proteins during embryo development. *Planta* **196**, 530-538.