

Universidad de Barcelona
División de Ciencias
Experimentales y Matemáticas
Facultad de Biología
Departamento de Genética

Aislamiento y caracterización funcional de dos factores de transcripción bZIP de maíz

Claudia Nieva Boza

2003

Programa de Doctorado del Departamento de Genética
Facultad de Biología
Universitat de Barcelona
Bienio 1997-1999

Memoria presentada por

Claudia Nieva Boza

Para optar al grado de Doctor en Biología

Este trabajo ha sido realizado en el Departamento de Genética Molecular del Instituto de Biología Molecular de Barcelona (CSIC) bajo la dirección de la Dra Montserrat Pagès i Torrens.

Visto bueno:

La directora de la Tesis

El Tutor

La Autora

Dra Montserrat Pagès

Dr Jordi García

Claudia Nieva

Abreviaturas y símbolos.	I
Listado de tablas y figuras.	III
1. Introducción.	1
1.1. Respuesta a la deshidratación a nivel celular.	3
1.2. La fitohormona Ácido Abscísico	4
1.2.1 Metabolismo del ABA.	5
1.2.2 Mecanismos de transducción en respuesta al ABA.	6
-El receptor de ABA.	6
-Proteínas G y mensajeros secundarios.	7
1.2.3. Funciones fisiológicas del ABA.	10
-Papel funcional del ABA en el desarrollo de las semillas.	10
-Papel funcional del ABA en el crecimiento de las plántulas.	12
-Papel funcional del ABA en la respuesta de los tejidos vegetativos al estrés hídrico.	13
1.3. Estudio de la expresión génica inducida por ABA.	15
1.3.1 Expresión génica en el desarrollo embrionario y en los tejidos vegetativos.	16
1.3.2. Regulación de la expresión génica en respuesta a ABA.	18
-Identificación de los elementos <i>cis</i> reguladores.	18
-Estructura de la cromatina y control de la transcripción.	19
-Factores <i>trans</i> -reguladores de la transcripción.	20
1.4. Factores de transcripción de la familia bZIP de plantas.	24
1.4.1. Dominios estructurales y función de cada dominio.	25
-Dominio de cremallera de leucinas: permite la dimerización.	25
-El dominio básico: translocación, interacción proteína-proteína y unión al DNA.	25
-Dominios activadores y represores.	27
-Región mosaico multifuncional.	27
1.4.2. Modulación de la actividad de las bZIP.	28
-Modulación de la actividad por el nivel de expresión.	28
-Modulación de la actividad por la localización subcelular.	28
-Modulación de la actividad por modificaciones post-traduccionales.	28
-Modulación de la actividad por el control combinatorial.	29
-Activación de las bZIP en respuesta a diferentes señales.	29
1.5. Regulación del gen <i>rab28</i> de <i>Zea mays</i> .	33
2. Objetivos	39
3. Resultados	43
3.1. Aislamiento y caracterización de EmBP-2 y ZmBZ.	45
3.1.1. Aislamiento de Zm1 y Zm2 mediante la técnica de RT-PCR.	46
3.1.2. Aislamiento de ZmBZ y EmBP-2 mediante el cribado de una genoteca de embrión seco.	48
3.1.3. Evaluación del número de copias de los genes EmBP-2 y ZmBZ.	52

3.2. Estudio de la expresión de EmBP-2 y ZmBZ a nivel de RNA y proteína.	55
3.2.1. Análisis de la transcripción de ZmBZ y EmBP-2 en los diferentes tejidos de maíz.	56
3.2.2. Sobreexpresión de las proteínas EmBP-2 y ZmBZ en E.coli.	57
3.2.3. Características estructurales de las proteínas recombinantes.	60
3.2.4. Estudio de la expresión de las proteínas EmBP-2 y ZmBZ en los tejidos de maíz.	63
3.3. Funcionalidad biológica de EmBP-2 y ZmBZ.	67
3.3.1. Análisis de la interacción de EmBP-2 y ZmBZ con el DNA en estudios <i>in vitro</i> .	68
3.3.2. Evaluación del efecto de la sobreexpresión de EmBP-2 y ZmBZ sobre la actividad del promotor <i>rab28</i> en maíz.	69
3.3.3. Evaluación del efecto de la sobreexpresión de EmBP-2 y ZmBZ sobre la actividad del promotor <i>rab28</i> en células de callos BMS.	71
3.3.4. Evaluación del efecto de la sobreexpresión de ZmBZ sobre la actividad del promotor <i>rab28</i> en embriones W64A de 17 y de 23 daps.	81
3.3.5. Evaluación del efecto de la sobreexpresión de ZmBZ sobre la actividad del promotor <i>rab28</i> en embriones <i>vp1</i> de 17 y de 23 daps.	84
3.3.6. Evaluación del efecto de la sobreexpresión de EmBP-2 y ZmBZ sobre la actividad del promotor <i>rab28</i> en coleoptilos de plántulas de 2 dag.	88
3.4. Estudio de la interacción de las proteínas presentes en extractos nucleares de embrión con los ABREs	93
3.4.1. Análisis de la interacción entre las proteínas nucleares de embrión y los ABRE presentes en el promotor de <i>Rab28</i> .	94
3.4.2. Análisis de la formación de las bandas retardadas en presencia de EmBP-2 y ZmBZ.	94
3.4.3. Análisis de la formación de las bandas retardadas en presencia de los anticuerpos generados contra EmBP-2 y ZmBZ.	97
3.5. Mecanismos de modulación de la actividad de EmBP-2 y ZmBZ	101
3.5.1. Regulación de la actividad de EmBP-2 y ZmBZ por mecanismos de fosforilación/desfosforilación	102
3.5.1.1. Determinación del estado de fosforilación de EmBP-2 mediante electroforesis en dos dimensiones.	102
3.5.1.2. Análisis de las secuencias proteínas de EmBP-2 y ZmBZ: Determinación de posibles dianas de fosforilación por CK2.	103
3.5.1.3. Ensayos de fosforilación <i>in vitro</i> de EmBP-2 y ZmBZ por la proteína quinasa CK2.	105
3.5.1.4. Modulación <i>in vitro</i> de la actividad de EmBP-2 y ZmBZ mediada por la fosforilación por la proteína quinasa CK2.	105
3.5.2. Estudio de la modulación <i>in vivo</i> de la actividad de ZmBZ mediada por la localización subcelular.	106

-Estudio de la localización subcelular de EmBP-2 y ZmBZ por microscopía electrónica.	110
3.5.3. Modulación de la actividad de ZmBZ y EmBP-2 mediada por el control combinatorial: Estudio de la interacción entre EmBP-2 y ZmBZ.	115
3.5.3.1. Estudio de la interacción <i>in vitro</i> entre EmBP-2 y ZmBZ.	115
3.5.3.2. Estudio de la interacción <i>in vitro</i> entre el heterodímero EmBP-2-ZmBZ con el ABRE A.	116
4. <u>Discusión.</u>	117
4.1. Aislamiento de los factores EmBP-2 y ZmBZ de maíz.	120
4.2. Estudio del patrón de transcripción de los factores aislados.	123
4.3. Estudio del patrón de acumulación de las proteínas aisladas.	127
-Sobreexpresión de las proteínas recombinantes.	127
-Estudio del patrón de acumulación en los tejidos de las proteínas ZmBZ y EmBP-2	128
4.4. Análisis de la interacción de las proteínas recombinantes con el DNA <i>in vitro</i>.	130
4.5. Estudio del papel funcional de ZmBZ y EmBP-2 en la regulación de la transcripción <i>in vivo</i> de <i>rab28</i>.	134
-Efecto de la sobreexpresión de ZmBZ.	136
-Efecto de la sobreexpresión de EmBP-2.	141
4.6. Estudio de la interacción de las proteínas de los extractos nucleares de embrión con los ABRE.	143
-Análisis de las bandas retardadas utilizando competidores y cambios del estado de fosforilación.	145
-Efecto de la adición de las proteínas recombinantes al extracto de proteínas nucleares.	146
-Efecto de la adición de los anticuerpos específicos al extracto de proteínas nucleares.	147
4.7. Estudio de los mecanismos de modulación de la actividad de EmBP-2 y ZmBZ	148
-Modulación de la actividad de ZmBZ y EmBP-2 mediante mecanismos de fosforilación y desfosforilación	149
-Estudio de la modulación de la actividad de las bZIP mediada por localización subcelular	151
-Modulación de la actividad de las bZIP mediada por el control combinatorial: Estudio de la heterodimerización entre EmBP-2 y ZmBZ.	153
4.8. Perspectivas futuras	156
5. <u>Materiales y métodos</u>	157
5.1. Material vegetal y tratamientos	159
5.2. Cepas bacterianas	159
5.3. Vectores, oligonucleótidos y construcciones	159
5.4. Digestión de DNA con enzimas de restricción, reacción de desfosforilación y reacción de ligación	160

5.4.1.	Digestión	161
5.4.2.	Desfosforilación	162
5.4.3.	Ligación	162
5.5.	Preparación y transformación de células competentes de <i>E. coli</i>	162
5.6.	Extracción y purificación de ácidos nucleicos	163
5.6.1.	Extracción y purificación de DNA plasmídico de <i>E. coli</i>	163
5.6.2.	Extracción de DNA genómico de maíz	163
5.6.3.	Extracción y purificación de RNA total de maíz	164
5.6.4.	Purificación de bandas de DNA de geles de agarosa	165
5.7.	Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa	166
5.7.1.	Electroforesis de DNA	166
5.7.2.	Electroforesis de RNA	166
5.8.	Transferencia de ácidos nucleicos: Southern blot	167
5.9.	Hibridación de ácidos nucleicos	167
5.9.1.	Marcaje radiactivo de sondas de DNA para Southern blot	167
5.9.2.	Purificación de la sonda	168
5.9.3.	Hibridación de Southern blot	168
5.10.	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	169
5.11.	Cribado de las genotecas de embrión seco y de hoja estresada de maíz	169
5.11.1.	Genoteca de embrión seco	169
5.11.2.	Genoteca de hoja estresada	169
5.12.	RACE	170
5.13.	RT-PCR	170
5.14.	Extracción, purificación y análisis de las proteínas	171
5.14.1.	Extracción de proteínas	171
	-Extracción total de tejido	171
	-Inhibidores de proteasas	171
	-Extracción de proteínas nucleares	172
5.14.2.	Sobreexpresión y purificación de las proteínas recombinantes	173
	-Sobreexpresión de las proteínas recombinantes (pequeña escala)	173
	-Sobreexpresión de las proteínas recombinantes (gran escala)	173
	-Purificación de las proteínas recombinantes	174
	-Preparación de la columna de purificación	174
	-Inmunodetección de las proteínas marcadas con la cola de histidinas	175
5.14.3.	Cuantificación de proteínas	175
5.14.4.	Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida	175
	-Electroforesis monodimensional	175
	-Electroforesis bidimensional	176
5.14.5.	Desfosforilación de extractos proteicos	177
5.14.6.	Visualización de las proteínas por tinción de azul de coomassie	177

5.14.7. Electrotransferencia	178
5.14.8. Inmunodetección	178
5.15. Obtención de anticuerpos policlonales en conejos	180
-Imunización	180
-Obtención del suero	181
5.16. Transformación transitoria mediante la técnica de la biolística	181
-Preparación de las partículas de oro	181
-Precipitación de las muestras de DNA	182
-Disparo de los microproyectiles	182
-Preparación de la muestra biológica	183
-Bombardeo y tratamiento de las muestras	184
-Ensayo luciferasa	184
-Ensayo actividad β -glucuronidasa (GUS)	185
-Análisis en el microscopio confocal	185
5.17. Interacción DNA-proteína	186
-Reacción de unión	186
-Electroforesis y tratamiento del gel	186
-Hibridación de los oligonucleótidos de cadena sencilla	187
5.18. Ensayo de inmunodeplección	187
-Imunoprecipitación del extracto con el anticuerpo contra EmBP-2	187
-Ensayo de interacción con el DNA de las proteínas inmunoprecipitadas	187
5.19. Ensayos <i>in vitro</i> de fosforilación	188
5.20. Ensayos <i>in vitro</i> de <i>pull-down</i>	189
5.21. Programas informáticos	190
6. Conclusiones	191
7. Bibliografía	195

LISTA DE ABREVIATURAS

ABA: Ácido abscísico	l: litro
ABI: ABA insensible	LEA: Abundante en la embriogénesis tardía
ABRE: Elemento de Respuesta a ABA	LTP: proteína transferidora de lípidos
AP: Fosfatasa alcalina	LUC: luciferasa
APS: Persulfato de amonio	μ: micro
ATP: Trifosfato de adenosina	m: mili
b: base(s)	min: minutos
bZIP: Proteína con dominio básico y cremallera de leucinas	mRNA: RNA mensajero
BSA: Albúmina bovina	M: molar
cADP-R: Ribosa adenosinadifosfato cíclica	MAPK: Proteína quinasa mitógeno activada
cDNA: cDNA copia	MEK: Proteína quinasa de MAPK
CDPK: Proteína quinasa dependiente de calcio	n: nano
CE: Elemento acoplador	N: normalidad
CTP: Citosina trifosfato	NLS: Señal de Localización Nuclear
°C: grados celsius	OD: densidad óptica
d: deoxi	O/N: toda la noche
dH ₂ O: agua destilada	ORF: Marco abierto de lectura
Da: Dalton	PBS: tampón salino fosfato
DDT: ditiotreitol	PEG: polietilenglicol
DMSO: dimetilsulfóxido	PKABA1: Proteína quinasa activada por ABA
DNA: Ácido desoxiribonucleico	PMSF: fluoruro de fenilmetilsulfonilo
DRB: 5,6-dichloro-1-β-D-ribofuranosilbencilimidazol	PP2C: proteína fosfatasa tipo 2C
EDTA: ácido etilendiaminetetracético	PR: respuesta a patógeno
EMSA: Ensayo de movilidad electroforética	rpm: repetición por minuto
g: gramos	rRNA: RNA ribosómico
GFP: Proteína verde fluorescente	R: repetición
GRA: Activador RAB rico en GC	RAB: Respuesta a ABA
GTP: guanosina trifosfato	RNA: ácido ribonucleótido
GUS: Glucuronidasa	ROS: Especies reactivas de oxígeno
HPLC: Cromatografía líquida de alta presión	SDS: dodecil sulfato sódico
HPR: Peroxidasa de rábano	SOS: sensible a exceso de sal
IgG: inmunoglobulina G	TA: temperatura ambiente
IAA: isoamilalcohol	TAE: EDTA tris-acetato
IP ₃ : inositol 1,4,5-trifosfato	TBE: EDTA tris-borato
IPTG: isopropiltiogalactósido	TE: tris EDTA
JA: Ácido jasmónico	TEMED: N,N,N',N'-tetrametilendiamina
K: kilo	UTR: región no traducida
	UV: ultravioleta
	v: voltios

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla I. Comparación de las secuencias obtenidas en el PCR con otras proteínas de la familia bZIP.

Tabla II. Cepas bacterianas usadas en este trabajo

Tabla III. Plásmidos usados en este trabajo

Tabla IV. Oligonucleótidos usados en este trabajo

Tabla V. Construcciones usadas en este trabajo

Figura a. Respuesta de la célula frente a una situación de déficit hídrico

Figura b. Vías metabólicas del ABA en plantas.

Figura c. Representación esquemática de la vía de transducción de señal desencadenada por el ABA

Figura d. Esquema de las vías de señalización en el desarrollo de la semilla.

Figura e. Esquema de las vías de señalización que interaccionan con la regulación de la germinación por el ABA.

Figura f. Tabla con los valores de expresión del gen *RD29* en respuesta al ABA y al NaCl a diferentes temperaturas.

Figura g. Respuestas moleculares frente a la sequía y a las bajas temperaturas y regulación de la expresión génica.

Figura h. Elementos *cis* inducibles por ABA y estrés.

Figura i. Reguladores transcripcionales implicados en la transducción de la señal en respuesta a ABA.

Figura j. Características estructurales de los factores bZIP.

Figura k. Esquema con los posibles mecanismos de activación de las bZIP desde la percepción de una señal por la célula hasta la regulación de la expresión génica por las bZIP.

Figura m. Regulación de la expresión de *rab28* durante el desarrollo embrionario y en el tejido vegetativo en maíz salvaje y en los mutantes *vp1* y *vp2*.

Figura n. Ensayo EMSA con proteínas nucleares de extractos de embrión maduro y de hojas deshidratadas de 7 días, utilizando como sonda el fragmento de promotor *rab28* -393/-60.

Figura ñ. Secuencias de los elementos de respuesta a ABA en el promotor de *rab28* mínimo inducible por ABA.

Figura o. Activación de *rab28* por el desarrollo y en respuesta a ABA.

Figura 1. Diseño de los oligonucleótidos degenerados, VL1 y VL2, a partir de los elementos bZIP de las proteínas EmBP-1 y OsBZ8 y secuencias aisladas en el PCR.

Figura 2. Comparación de los dominios básicos de Zm1-4 con otros de otras proteínas conocidas de la familia de las bZIP.

Figura 3. Secuencia nucleotídica y aminoacídica deducida de ZmBZ.

- Figura 4.** Secuencia nucleotídica y aminoacídica deducida de ZmBZb.
- Figura 5.** Secuencia nucleotídica y aminoacídica de EmBP-2.
- Figuras 6 y 7.** Ensayos Southern de ZmBZ y ZmBZb.
- Figuras 8 y 9.** Ensayos Southern de EmBP-2
- Figura 10.** Patrones de transcripción de los dos factores en tejidos embrionarios (fondo amarillo) y vegetativos (fondo verde).
- Figura 11.** Patrones de transcripción de EmBP-2 y ZmBZ durante la germinación.
- Figura 12.** Representación esquemática de las construcciones generadas para la sobreexpresión de las proteínas (figura 12a) y de las proteínas recombinantes (figura 12b).
- Figura 13.** ECL de Western blots de extractos de proteína de *E.coli* sobreexpresando las proteínas recombinantes EmBP-2 (numeración en azul) y ZmBZ (numeración en rojo).
- Figura 14.** ECL de Western blots de la purificación de las dos proteínas recombinantes.
- Figura 15.** Predicción de la estructura secundaria de la proteína ZmBZ recombinante.
- Figura 16.** Predicción de la estructura secundaria de la proteína EmBP-2 recombinante.
- Figura 17.** ECL de un Western blot de un ensayo de hibridación cruzada de los dos anticuerpos.
- Figura 18.** Acumulación de la proteína EmBP-2 durante el desarrollo embrionario y en tejido vegetativo.
- Figura 19.** Acumulación de la proteína ZmBZ durante el desarrollo embrionarios y en tejido vegetativo.
- Figura 20.** Ensayos EMSA de la proteína recombinante EmBP-2 y diferentes elementos *G-box*.
- Figura 21.** Especificidad en la interacción de la proteína EmBP-2 recombinante con el ABRE A.
- Figura 22.** Especificidad en la interacción de la proteína ZmBZ recombinante con el ABRE A.
- Figura 23.** Esquema de las construcciones utilizadas en los experimentos de transformación transitoria
- Figura 24.** Representación gráfica de los valores de actividad GUS/LUC de una transformación en callos BMS de maíz con los promotores 35S y *rab28*
- Figura 25.** Representación gráfica de los valores de actividad GUS/LUC de una cotransformación en callos BMS de maíz con el promotor *rab28* y el factor ZmBZ.
- Figura 26.** Representación gráfica de los valores de actividad GUS/LUC de una cotransformación de callos BMS de maíz con los promotores *rab28* salvaje o *rab28* mutado en la caja ABRE A y el factor ZmBZ
- Figura 27.** Representación gráfica de los valores de actividad GUS/LUC de una cotransformación en callos BMS de maíz con los promotores *rab28* salvaje, *rab28* ABREB- o *rab28* ABRE AB- y el factor ZmBZ.
- Figura 28.** Representación gráfica de los valores de actividad GUS/LUC de una cotransformación en callos BMS de maíz con los promotores *rab28* salvaje o *rab28* con los dos ABRE mutados y los factores ZmBZ y VP1.

- Figura 29.** Representación gráfica de los valores de actividad GUS/LUC de una cotransformación en callos BMS de maíz con los promotores *rab28* salvaje o *rab28* con los dos ABRE mutados y los factores EmBP-2 y VP1.
- Figura 30.** Representación gráfica de los valores de actividad GUS/LUC de una cotransformación en embriones W64A de 23 dap con el promotor *rab28* salvaje, *rab28* ABRE A- o *rab28* ABRE B- y el factor ZmBZ.
- Figura 31.** Representación gráfica de los valores de actividad GUS/LUC de una cotransformación en embriones W64A de 17 dap con el promotor *rab28* salvaje, *rab28* ABREA- o ABRE B- y el factor ZmBZ.
- Figura 32.** Representación gráfica de los valores de actividad GUS/LUC en una cotransformación de embriones *vp1* de 23 dap con el promotor *rab28* salvaje, *rab28* ABRE A- o *rab28* ABRE B- y el factor ZmBZ.
- Figura 33.** Representación gráfica de los valores de actividad GUS/LUC en una cotransformación de embriones *vp1* de 17 dap con el promotor *rab28* salvaje, *rab28* ABRE A- o ABRE B- y el factor ZmBZ.
- Figura 34.** Representación gráfica de los valores de actividad GUS/LUC de una cotransformación de embriones W64A de 23 dap de maíz con el promotor *rab28* salvaje y los factores ZmBZ y EmBP-2.
- Figura 35.** Representación gráfica de los valores de actividad GUS/LUC en una cotransformación de coleoptilos de 2 dag con el promotor *rab28* salvaje o *rab28* ABRE B- y los factores ZmBZ y EmBP-2.
- Figura 36.** Ensayo EMSA con extractos proteicos nucleares de embrión de 60 dap y las sondas ABRE A y ABRE B.
- Figura 37.** Experimento EMSA que muestra las movilidades electroforéticas relativas de las proteínas recombinantes y las proteínas nucleares de extractos de 20 y 60 dap utilizando la sonda ABRE A.
- Figura 38.** Ensayo de competición de un extracto de 60 dap
- Figura 39.** Ensayo de desfosforilación del extracto de proteínas nucleares.
- Figura 40.** Ensayo de competición de un extracto de proteínas nucleares de embrión de 20 dap con las proteínas recombinantes EmBP-2 y ZmBZ.
- Figura 41.** Ensayo *supershift* de las proteínas recombinantes con los anticuerpos generados contra ellas.
- Figura 42.** Ensayo *supershift* con extractos de proteínas nucleares de embriones de 60 dap y los sueros preinmunes e inmunes generados contra las proteínas recombinantes.
- Figura 43.** Comparación entre dos ensayos EMSA realizados con extractos proteicos nucleares de embrión de 60 dap antes y después de una inmunoprecipitación con el anticuerpo generado contra EmBP-2.
- Figura 44.** Autoradiografía de una electroforesis en un gel de acrilamida 15% donde detectamos el DNA marcado retenido mediante una reacción de unión proteína-DNA, utilizando las

proteínas inmunoprecipitadas por los sueros preinmune (cuadro amarillo) e inmune (cuadro azul) de un extracto de embrión seco.

Figura 45. Electroforesis de dos dimensiones de EmBP-2

Figura 46. Dianas teóricas de fosforilación por CK2 en las secuencias proteicas de EmBP-2 y ZmBZ.

Figura 47. Reacción de fosforilación *in vitro* de las proteínas recombinantes EmBP-2 y ZmBZ por la quinasa CK2.

Figura 48. Comparación entre la interacción de las proteínas recombinantes EmBP-2 y ZmBZ con el ABRE A antes y después de su fosforilación por CK2.

Figura 49. Imágenes de microscopía confocal de la localización subcelular de la proteína de fusión ZmBZ-GFP en células epidérmicas de cebolla.

Figura 50. Imágenes de microscopía confocal de la localización subcelular de la proteína de fusión ZmBZ-GFP en células de callos BMS.

Figura 51. Imágenes de microscopio confocal con luz UV y proyección de Normansky de células en suspensión BMS que sobreexpresan GFP (recuadro amarillo) o la proteína de fusión ZmBZ-GFP (recuadro azul).

Figura 52. Inmunolocalización de la proteína ZmBZ en la cofia (A) de embriones de maíz sin germinar y control negativo (B).

Figura 53. Inmunolocalización de la proteína EmBP-2 en la cofia (A) y la raíz (B) de embriones de maíz sin germinar.

Figura 54. Autoradiografía de un ensayo de *pull-down* con las proteínas recombinantes EmBP-2 y ZmBZ.

Figura 55. Estudio de la interacción de las dos proteínas recombinantes con el ABRE A mediante un ensayo de competición.

La deficiencia de agua es uno de los factores ambientales que más limita el crecimiento y la producción agrícola a nivel mundial (Boyer, 82). La deshidratación se produce cuando la pérdida de agua por la evaporación y la transpiración es superior al agua absorbida por las raíces. El déficit de agua es un componente no sólo de la sequía, sino también de la salinización de los suelos y de las bajas temperaturas, las cuales hacen disminuir la cantidad de agua disponible en las células de una manera indirecta.

La mayoría de las plantas sufren a lo largo de la vida disminuciones transitorias del contenido de agua en sus células y desarrollan estrategias para responder a estas situaciones, mediante el desarrollo de semillas tolerantes a la desecación (Ingram and Bartels, 1996), mediante respuestas globales (aumento de la biomasa de las raíces, control estomático) y mediante respuestas a nivel celular (ajuste osmótico). En las adaptaciones mediadas por el desarrollo y en las respuestas globales hay muchos genes implicados, mientras que en las respuestas a nivel celular están implicados un número menor de genes y la respuesta a la desecación es más estudiada a este nivel.

1.1. Respuesta a la deshidratación a nivel celular

Hay un modelo general de estudio de la respuesta celular a la deshidratación en el que se definen tres etapas: La percepción de la señal de deshidratación, la transducción esta la señal al núcleo y la regulación de la expresión génica. Mediante este proceso se permite obtener una respuesta bioquímica a partir de un estímulo físico (figura a).

El mecanismo sensor del déficit hídrico no se conoce aunque se postula que el cambio osmótico produce un cambio en la presión de turgencia celular, que es el desencadenante de la transducción de la señal. También se postula que en esta primera etapa están involucrados el receptor del ABA y esta fitohormona.

A partir de esta señal se activa una cadena de transducción que amplifica la señal inicial en la que participan mensajeros secundarios como el Ca^{2+} o el IP_3 . Se han descrito dos tipos de vías de transducción, dependientes e independientes de ABA.

Cuando la señal llega al núcleo se produce la activación de genes específicos, los cuales se pueden dividir en dos grupos según las proteínas que codifican:

- ➔ Genes que codifican para proteínas funcionales
- ➔ Genes que codifican para proteínas reguladoras

La función de las proteínas funcionales es proteger a la célula de los efectos de la deshidratación, e incluyen proteínas que participan en el metabolismo de osmoprotectores (osmolitos), proteínas de transporte (canales iónicos, acuaporinas), proteínas involucradas en procesos de reparación y

degradación (chaperonas, proteasas), enzimas detoxificantes (ascorbato peroxidasa), así como otras proteínas de función desconocida, como las LEA (*late embryogenesis abundant*) que posiblemente estén involucradas en la protección de otras proteínas y de las membranas celulares (Ingram and Bartels 1996, Campalans et al 1999).

Las proteínas reguladoras están involucradas en el control de la expresión génica durante la deshidratación e incluyen factores de transcripción (bZIP, MYC, MYB, proteínas 14-3-3) y proteínas quinasas y fosfatasas.

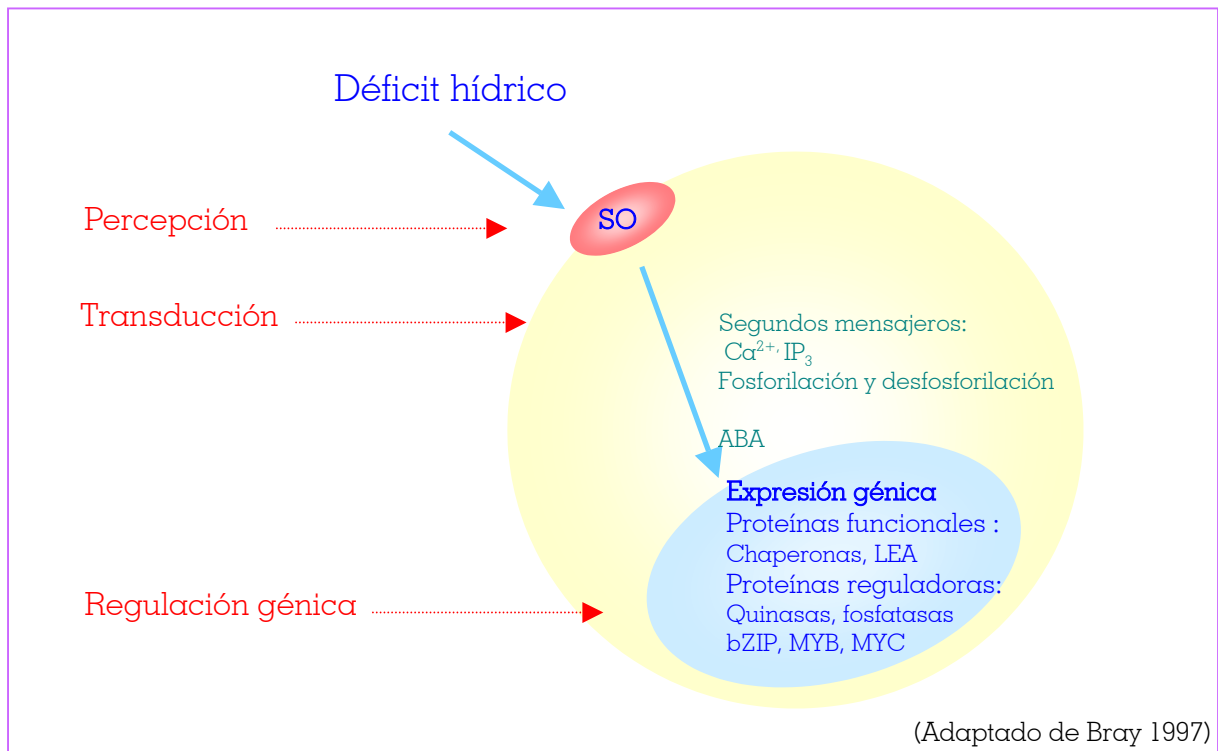


Figura a: Respuesta de la célula frente a una situación de déficit hídrico. A la derecha se indican las diferentes etapas de la respuesta. El sensor de cambio osmótico se representa con SO y el núcleo de la célula con una elipse azul.

1.2. La fitohormona Ácido Abscísico

La fitohormona Ácido Abscísico es una reguladora de procesos importantes para el desarrollo de las plantas, como es el desarrollo de la semilla, donde aumenta la tolerancia a la desecación, induce a la dormancia y regula la transición del estado embrionario al crecimiento vegetativo (Quatrano 1983, McCarty 1995, López-Molina et al 2001). El ABA además es un mediador esencial de la respuesta de las plantas a los estreses ambientales, tanto abióticos (sequía, sal, hipoxia, herida, frío) como bióticos (patógenos) (revisado por Ingram and Bartels 1996). Se encuentra en todas las plantas superiores y en todos los tejidos vegetales. Para conocer cómo el ABA regula estos procesos es muy importante conocer los mecanismos que regulan su metabolismo así como los mecanismos que transducen una variación en su concentración en respuestas fisiológicas.

1.2.1. Metabolismo del ABA

El balance entre el anabolismo y el catabolismo de ABA determina el nivel de la hormona en los tejidos. En las plantas superiores el precursor es el ácido mevalónico y en la síntesis de ABA tienen lugar reacciones oxidativas. La descripción de mutantes en la vía biosintética ha ayudado a conocer los diferentes enzimas que participan y los intermediarios que se forman.

Durante el desarrollo de las plantas y en diferentes situaciones de estrés hay variaciones en la concentración de ABA. Ésta aumenta al principio de la maduración de la semilla, cuando el embrión ha completado su formación y en situaciones de deshidratación. Los genes biosintéticos de ABA ZEP, NCED, AAO3 y MCSU (figura b) se regulan positivamente por sequía y estrés salino, y excepto ZEP, también se regulan positivamente por ABA, indicando la existencia de una retroalimentación positiva (Audran et al 1998, Seo et al 2000, Luchi et al 2001, Xiong et al 2001a, 2002a). Esta ruta está controlada en múltiples pasos, ya que la sobreexpresión de un único enzima produce un incremento en la biosíntesis de ABA (Luchi et al 2001). Aunque los mecanismos por los cuales estos enzimas están regulados por la sequía y el estrés salino no se conocen, se cree que se regulan mediante una cascada dependiente de Ca^{2+} común (Xiong et al 2002a). Cuando se produce la deshidratación hay un incremento en la conversión de ABA en ácido faseico (Li and Walton 1990).

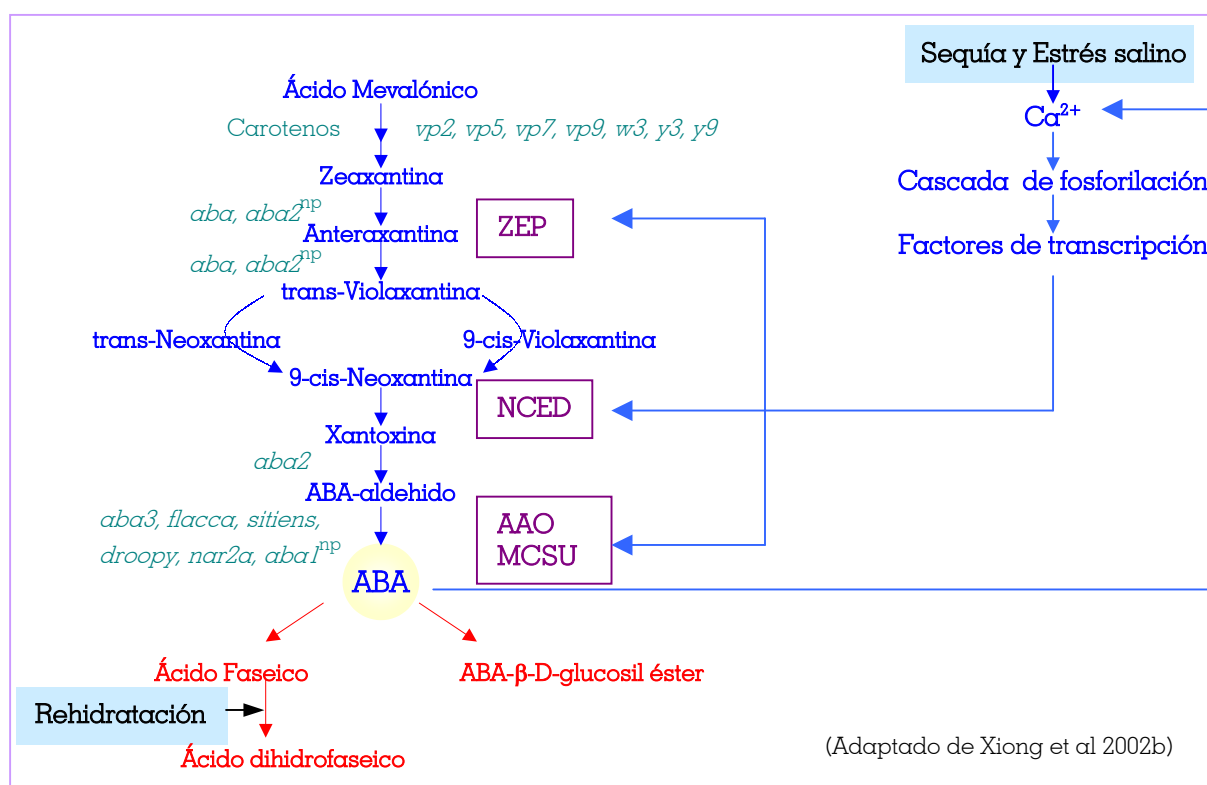


Figura b. Vías metabólicas del ABA en plantas. En azul se indica la biosíntesis y en rojo el catabolismo. En verde se indican los mutantes metabólicos. Maíz: Mutantes de la vía de los carotenos *vp2, vp5, vp7, vp9, w3, y3, y9* (Fong et al 1983, Neill et al 1986); Arabidopsis: *aba* (Koornneef et al 1982), *aba2, aba3* (Schwartz et al 1996). *N. Plumbaginifolia*: *aba^{np}* (Parry et al 1991), *aba2^{np}* (Marin et al 1996). Tomate: *flacca, sitiens* (Taylor et al 1988). Patata: *droopy* (Duckham et al 1989), *nar2a* (Walker-Simmons et al 1989). En recuadros lilas se incluyen los enzimas biosintéticos que se regulan positivamente en situación de estrés salino y sequía: ZEP: zeaxantina epoxidasa; NCED: 9-cis-epoxicarotenoide dioxigenasa; AAO: ABA-aldehído oxidasa; MCSU: molibdeno cofactor sulfurasa. El ABA regula positivamente la expresión de estos genes, promoviendo un incremento de Ca^{2+} y además por otro mecanismo que no afecta a ZEP.

1.2.2. Mecanismos de transducción en respuesta al ABA

El receptor de ABA

El ABA tiene que ser detectado en las células mediante algún mecanismo, aunque hasta ahora no se ha identificado ningún receptor. Se han realizado muchos estudios que indican que podría haber diferentes tipos de receptores que presentarían tanto una localización intracelular como extracelular, aunque hay que tener presente también que existe la posibilidad de que el ABA no necesite interactuar con un receptor, si lo comparamos con moléculas también de pequeño peso molecular como las vitaminas lipofílicas o con el ácido retinoico, que pueden regular la transcripción mediante mecanismos desconocidos o a través de la unión a un receptor intracelular que actúa como un factor de transcripción, respectivamente (Carlberg 1999, Schwartz et al 1997).

Experimentos en células de guarda sugieren tanto receptores intracelulares de ABA como extracelulares (Schwartz et al 1994, Anderson et al 1994), y experimentos en protoplastos de células de aleurona de cebada y suspensiones celulares de *Arabidopsis* y de arroz sugieren la existencia de receptores extracelulares (Gilroy and Jones 1994, Jeannette et al 1999, Schultz and Quatrano 1997). Todos estos experimentos se basan en la aplicación de la hormona, o en el medio extracelular, controlando las condiciones del ensayo como el pH y los conjugados ABA-proteína (para permitir o impedir su paso a través de la membrana plasmática y medir si hay algún cambio en el interior de la célula), o mediante la microinyección en el interior de las células de guarda.

Mediante el uso de análogos moleculares se ha sugerido la existencia de diferentes receptores con diferentes requerimientos estructurales en las diferentes vías de respuesta a la hormona (Kim et al 1999). Aunque se han encontrado proteínas que se unen al ABA, no hay evidencias que asocien estas proteínas con los efectos fisiológicos del ABA. Esta búsqueda de proteínas que pueden funcionar como receptores de ABA se ha basado principalmente en cribados de genotecas de expresión de cDNA y en el uso de sistemas heterólogos donde construir la vía de señalización de ABA. Con las genotecas de expresión se buscan proteínas que interactúen con sueros policlonales elaborados utilizando como antígenos sueros monoclonales anti-ABA (en el suero policlonal pueden haber epítomos que mimeticen la estructura del ABA). Mediante esta estrategia se ha clonado aba45, un cDNA inducible por ABA en el embrión (Liu et al 1999) y un cDNA con un 60% de homología a las proteínas de unión a los ácidos nucleicos (Zheng et al 1998). La otra estrategia consiste en la microinyección en oocitos de *Xenopus* grupos de mRNA provenientes de diferentes tipos celulares, y en el estudio de las variaciones de la corriente de iones como K⁺, Ca²⁺ o Cl⁻ debidas a tratamientos con ABA, al formar parte de la vía de transducción del ABA como ya se verá en el siguiente apartado (Sutton et al 2000). Se ha aislado con estos experimentos una proteína *syntaxin-like*, Nt-SYR1 (Leyman et al 2000), aunque no hay evidencias de que esta proteína se una al ABA.

Proteínas G y mensajeros secundarios

Los análisis genéticos han posibilitado la identificación de componentes muy iniciales en la señal de transducción de ABA, basándose en los cribados genéticos en la búsqueda de mutantes con fenotipos parecidos a los ya muy bien caracterizados de los mutantes biosintéticos de ABA. Se han aislado mutantes insensibles a ABA, buscando semillas que fuesen capaces de germinar en presencia de la hormona, como *abi1-abi5*, y se han identificado los genes que están alterados (Kornneef et al 1984, Finkelstein 1994). ABI1 y ABI2 son Ser-Thr-fosfatasa tipo 2C. Estas mutaciones son dominantes y afectan a las respuestas vegetativas principalmente, como el cierre de los estomas en respuesta a ABA. Las otras mutaciones son recesivas y los genes afectados codifican para factores de transcripción: *abi3* de la familia B3, *abi4* de la familia AP2 y *abi5* de la familia bZIP. Se ha aislado también una mutación que confiere un fenotipo de hipersensibilidad a ABA en la germinación, *era1* (Cutler et al 1996). Este gen codifica para una subunidad de una farnesiltransferasa y su mutación es recesiva. El mutante *era1* presenta una aumentada respuesta estomática al ABA y tolerancia a la sequía. Posteriormente se han aislado muchos mutantes de la respuesta a ABA así como mutantes con defectos en la respuesta a múltiples señales a la vez, reflejando la existencia de intercomunicación entre las diferentes vías de transducción de señales. Los genes aislados de los mutantes codifican para factores de transcripción, proteínas de unión a RNA, quinasas y fosfatasa, una enzima del metabolismo de fosfoinosítidos y GTPasas (revisado en Finkelstein 2002).

La figura c) es una representación esquemática donde se muestran algunos componentes de la vía de transducción del ABA. Se ha descrito la implicación de estos componentes en la regulación génica y en el control de la apertura y cierre de los estomas en respuesta a ABA. La figura c2) indica la respuesta de las células de guarda al ABA que conduce al cierre estomático.

PROTEÍNAS G

- ➔ GAP1: Subunidad α de una proteína G trimérica. Su pérdida de función altera aspectos de la vía de transducción del ABA y las auxinas (Ullah et al 2001, Wang et al 2001).
- ➔ Las proteínas Rop: Constituyen una familia de proteínas GTPasa monoméricas. ROP 9 y ROP10 presentan una localización en la membrana plasmática dependiente de farnesilación por ERA1. Entonces actúan regulando negativamente los efectos del ABA en la germinación de la semilla y en el crecimiento de las seedlings. El doble mutante *Rop9/Rop10* tiene el fenotipo *era1* (Yang 2002). ROP2 regula negativamente los efectos del ABA en la dormancia y en la germinación (Li et al 2001).

La localización subcelular de estas proteínas G triméricas y Rop está regulada probablemente por farnesilación pero no hay evidencias que relacionen a ROP2 y GAP1 con ERA1 (figura c1).

SEGUNDOS MENSAJEROS

->AtPLC1: Proteína fosfolipasa C de Arabidopsis. Su expresión es inducida por ABA (Hirayana et al 1995). AtPLC1 produce inositol trifosfato, IP3, un segundo mensajero de la vía del ABA que regula el cierre de los estomas (promoviendo la salida de Ca^{2+} de reservorios intracelulares como la vacuola) y la expresión génica (Gilroy et al 1990). Estudios de sobreexpresión de AtPLC1 muestran que esta enzima es necesaria pero no suficiente para la regulación por ABA de la germinación, crecimiento y expresión génica en tejidos vegetativos (Sanchez and Chua 2001) (figura c1).

->En cebada el ABA estimula la actividad fosfolipasa D (PLD) cuando es detectado en la membrana plasmática, mediada por proteína G (Ritchie and Gilroy 2000). La PLD produce ácido fosfatídico (PA), un mensajero secundario que media la apertura de estomas regulada por ABA (Jacob et al 1999) y la expresión génica (Ritchie and Gilroy 1998, Gampala et al 2001) (figura c1).

El cierre de los estomas inducido por ABA es mediado tanto por un incremento de la concentración de Ca^{2+} citoplasmático como por mecanismos independientes de Ca^{2+} (Schoeder et al 2001) (figura c2).

-> La concentración de Ca^{2+} citosólica aumenta debido a la entrada desde el exterior a través de canales en la membrana y a una liberación desde reservorios intracelulares promovida por el IP3, ADP-Ribosa cíclica, ADP-R (Leckie et al 1998), la 1-P-esfigosina (Ng et al 2001) y el Ca^{2+} citosólico (McAinsh et al 1995). Estos segundos mensajeros están involucrados además en el control de la expresión génica inducida por ABA (Gilroy and Jones 1992, Heimovaara-Dijkstra et al 1995, Wu et al 1997, Ritchie and Gilroy 1998, Ghelisi et al 2000b, Webb et al 2001). El ABA además sensibiliza los canales de Ca^{2+} aumentando la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). Las ROS también participan en la transducción de señal en respuesta a muchos estreses (Yang 2002), ya que en experimentos de activación constitutiva de una vía de MAPK dependiente de H_2O_2 se consigue una mayor tolerancia al estrés abiótico (Kovtun et al 2000).

-> Los iones K^+ y H^+ también participan en el control de los estomas. El ABA promueve el cierre estomático mediado en parte por alcalinización citosólica (Grabov and Blatt 1998b). El cierre estomático dependiente del pH se relaciona con una disminución en la concentración de K^+ , promovida por un incremento en su salida y una disminución en su entrada. En el exterior de la célula la alcalinización incrementa la actividad de un canal de salida de K^+ denominado GORK (Ache et al 2000) así como la disminución de la entrada de K^+ . Dentro de la célula la subida de pH activa la proteína fosfatasa 2C ABI1 (Leube et al 1998), la cual inactiva a su vez las respuestas de la célula al ABA (Gosti et al 1999, Merlot et al 2001). Esta activación de ABI1 puede tratarse de un mecanismo de regulación negativa de la respuesta al ABA.

->La activación de los canales aniónicos de tipo lento está también implicada en el cierre estomático (Knox et al 1995). La pérdida de Cl^- provoca la pérdida de K^+ y la salida de agua produciéndose entonces el cierre del estoma (figura c2).

Se han categorizado las vías de transducción de señal en respuesta al estrés hídrico en 3 tipos, según las quinasas involucradas: I: Vía de las MAPK, en transducción de señales de estrés osmótico y oxidativo (Schaeffer and Weber 1999); II: Vía de las CDPKs, dependiente de Ca^{2+} , que conducen a la activación de genes tipo LEA (Sheen 1996); Vía de las SOS, dependiente de Ca^{2+} , que regulan la homeostasis iónica (Liu and Zhu 1998). Se han aislado en arroz 2 quinasas de la vía de las MAPK, osMAP1 y osMEK1 involucradas en la respuesta a bajas pero moderadas temperaturas (12°C). Estas quinasas se inducen con un tratamiento con ABA (Wen et al 2002). También se ha aislado una CDPK activada a 12 °C en arroz (Martin and Busconi 2001). Las CDPKs se inducen por frío, sequía y ABA (Sheen 1996).

Las vías de fosforilación/desfosforilación relacionadas con el ABA son muy estudiadas en las células de guarda. La fosforilación es un regulador positivo central en el cierre de los estomas inducido por ABA (Schroeder et al 2001)(figura c2). Se han descrito las quinasas OST1 de *Arabidopsis* y AAPK (su homóloga en *Vicia faba*), y las fosfatasa ABI1 y ABI2. OST1/AAPK regulan el cierre estomático específicamente en la respuesta a ABA y son activadas por esta hormona independiente de Ca^{2+} . OST1 está descrita en esta vía antes de las ROS (Mustilli et al 2002) AAPK media la activación inducida por ABA de los canales aniónicos mediante fosforilación (Li et al 2000), mientras que la proteína ABI1 actúa inhibiendo este mecanismo. Las fosfatasa tipo 2C ABI1 y ABI2 de *Arabidopsis* son reguladores negativos de la respuesta a ABA en las células de guarda, aunque su actividad incrementa en respuesta a ABA (control por retroalimentación negativa, Merlot et al 2001). Estudios de estos mutantes descritos indican su posible localización en la vía de respuesta a ABA independiente de Ca^{2+} en las células de guarda (figura c2). Hay otros reguladores de los que no se conoce su posición relativa en la vía de respuesta al ABA que controla los estomas, como GPA1 y AtRAC1 de *Arabidopsis* (Wang et al 2001 y Lemichez et al 2001, respectivamente) y Nt-SYR1 de tabaco (Leyman et al 1999).

La quinasa PKABA1 es una homóloga a OST1/AAPK en cebada y se expresa en las células de la capa de aleurona. También tiene una expresión inducida por ABA (Gomez-Cadenas et al 1999).

1.2.3. Funciones fisiológicas del ABA

Papel funcional del ABA en el desarrollo de las semillas

Hay un momento en el desarrollo embrionario en el que cesa la división celular y las células empiezan a crecer y a acumular sustancias de reserva. Este momento coincide con un incremento en el contenido de ABA de la semilla y hay evidencias que sugieren que el ABA está involucrado en la parada del ciclo celular, ya que es capaz de inducir la expresión de un inhibidor de quinasa dependiente de ciclinas, el ICK1 (Wang et al 1998).

En muchas especies se producen dos picos en la acumulación de ABA en la maduración de la semilla. El primer pico es de origen materno. Se produce al inicio de la fase de maduración y es importante para prevenir la germinación prematura, es decir el viviparismo (Karssen et al 1983, Raz

et al 2001). Los mecanismos que controlan el viviparismo en las diferentes especies son diferentes, ya que en los mutantes de maíz deficientes en la síntesis de ABA o en su respuesta (mutante *vp1*) son vivíparos (Robichaud et al 1980), mientras que en *Arabidopsis*, mutantes en la síntesis, como *aba3*, o insensibles, como los *abi*, no presentan viviparismo (Seo et al 2000). Otros estudios indican que en el maíz el balance entre las giberelinas y el ABA controla el viviparismo, ya que mutantes deficientes en la síntesis de las dos hormonas no son vivíparas (White et al 2000). El segundo pico de acumulación de ABA tiene origen embrionario y es esencial para la inducción de la dormancia y la inhibición de la germinación (Karssen et al 1983). El embrión en esta etapa de la embriogénesis se hace tolerante a la desecación, en parte por la síntesis de proteínas LEA, y pierde hasta el 80% de su contenido en agua. Aunque el ABA tiene un papel fundamental en la regulación de la dormancia, hay otros factores que participan en su control, como las proteínas ABI1, ABI2, ABI3 y ERA1 de *Arabidopsis*. Aunque el viviparismo y la dormancia afectan en la decisión del embrión de germinar o no, los factores que regulan estos dos procesos son diferentes, en la misma especie y entre especies diferentes.

Mediante análisis genéticos se ha demostrado que son importantes para la expresión génica específica de la semilla ABI3/*VP1*, ABI4, ABI5, LEC1, LEC2 y FUS3 (Giraudat et al 1992, McCarty et al 1991, Rook et al 2001, López-Molina and Chua 2000, Lotan et al 1998, Luerksen et al 1998, Stone et al 2001). Algunos de ellos regulan la respuesta a ABA (ABI3/*VP1*, ABI4 y ABI5) y otros regulan principalmente la transición de la embriogénesis a la germinación (LEC1, LEC2, FUS3), aunque esta distinción no es clara porque ABI3/*VP1* reprime también la germinación (Holdsworth et al 2001). Se han descrito interacciones genéticas entre los mutantes *abi3/vp1*, *abi4* y *abi5*, lo que sugiere que estos 3 factores de transcripción pueden controlar la expresión génica específica de semilla o inducible por ABA mediante la formación de un complejo (Finkelstein and Lynch 2000).

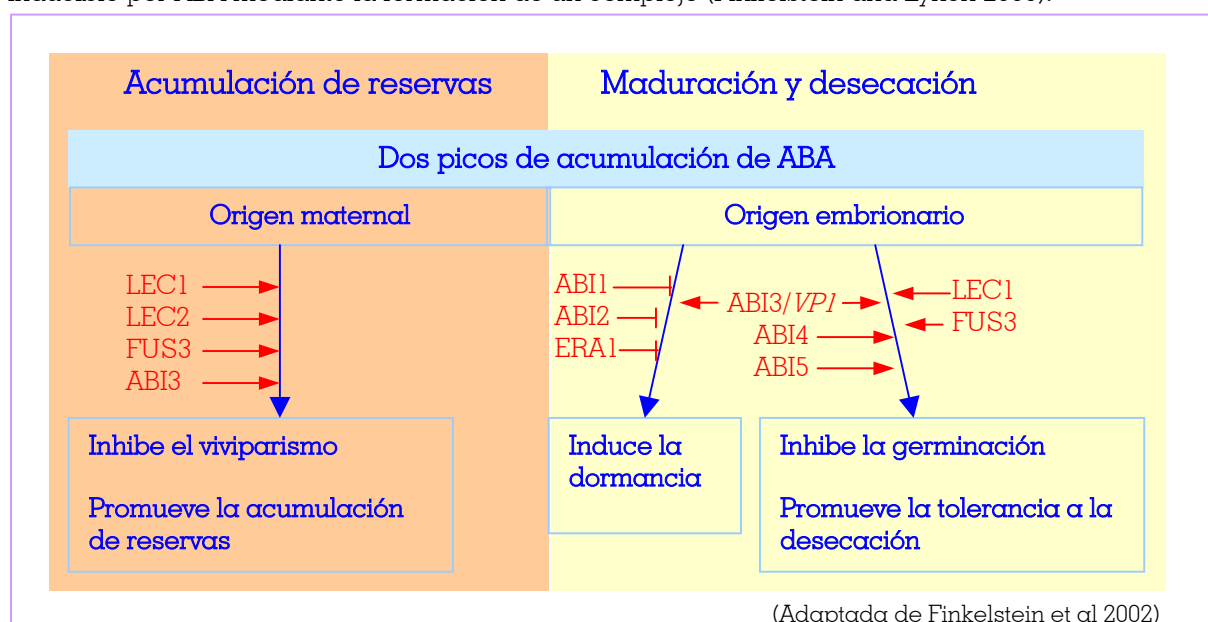


Figura d. Esquema de las vías de señalización en el desarrollo de la semilla. Las referencias se encuentran en el texto.

Reforzando esta idea, en ensayos de tipo doble híbrido en levadura se ha visto interacción entre las proteínas de arroz os *VPI* y *TRAB1* (Hobo et al 1999), homólogas de *ABI3* y *ABI5*. En la figura d) se presenta un esquema donde se sitúan las proteínas implicadas en la regulación de estos procesos comentados. Se representan unidas con una flecha si actúan como promotoras y con una barra si son inhibitoras.

Papel del ABA en el crecimiento de las plántulas

La dormancia es un mecanismo de adaptación que aumenta la supervivencia del embrión previniendo la germinación en condiciones ambientales desfavorables. En el embrión maduro de muchas plantas superiores la concentración de ABA es muy alta, y el incremento en la germinabilidad de estas semillas se correlaciona con la disminución del ABA endógeno. La germinación comprende la emergencia de la radícula, la movilización de las reservas y la pérdida de la tolerancia a la desecación.

En *Arabidopsis* se han descrito dos puntos de control del proceso germinativo de las semillas. El primero se localiza al principio de la germinación, cuando se produce la emergencia de la radícula. El crecimiento de la plántula a partir de este momento se producirá o no según la valoración de la disponibilidad de agua en el medio ambiente, lo que representa otro punto de control. Si las condiciones no son favorables, el crecimiento queda detenido. El significado biológico de este segundo punto de control es aumentar la supervivencia porque estas semillas germinadas con el crecimiento detenido presenta una mayor resistencia a la desecación que las plántulas que continúan con el proceso. La proteína *ABI5* es necesaria para que se produzca esta parada de la germinación siendo el ABA un regulador de su acumulación, estabilidad y actividad (López-Molina et al 2001).

En la germinación los efectos del ABA son antagonizados por las giberelinas, el etileno y los brasinosteroides, mientras que el ácido jasmónico actúa sinérgicamente. Mediante estudios genéticos se han aislado mutaciones que eran capaces de revertir a mutantes deficientes en la vía de las giberelinas que no permitían la germinación, y que resultaron ser mutaciones que causaban deficiencia de ABA (Koornneef et al 1982). Estudios más recientes han mostrado la interacción de ABA con brasinosteroides (Steber and NcCourt 2001) y con etileno (Beaudoin et al 2000)(figura e).

Utilizando ensayos de inhibición de la germinación aplicando ABA exógeno se ha intentado diseccionar los mecanismos de respuesta a ABA. Hay muchos intermediarios descritos, entre los que se encuentran algunos mensajeros secundarios ya descritos en el apartado 1.2.2. (*Rop2*, *Rop9*, *Rop10*, *AtPLC1*, *ERA* y *ABI1*)(Finkelstein et al 2002).

El crecimiento de las plántulas está regulado por el ABA, el etileno y los azúcares. Aunque el ABA y el etileno actúan antagonísticamente durante la germinación, ambos inhiben el crecimiento de la raíz. Después de la germinación las vías de señalización de las dos hormonas presentan

interacciones complejas. Contrariamente al efecto observado sobre el crecimiento de la raíz, cuando se bloquea la síntesis de etileno se produce un incremento en la sensibilidad al ABA, lo que implica la existencia de una interacción antagónica entre ellas (Ghassemian et al 2000). Por otro lado, se sugiere una interacción entre las vías del ABA y de los azúcares. Cuando la concentración de azúcares es baja, su efecto sobre la germinación es antagónico con el del ABA, sin embargo cuando la concentración de azúcares es alta (>300mM), éstos inhiben el crecimiento de la raíz de una manera dependiente de ABA, pudiendo actuar en vías paralelas o con intersecciones. Es consistente con esta idea el que en situaciones de alta concentración de glucosa se induzca la síntesis de ABA y de ABI4 y ABI5, y que la sobreexpresión de ABI3, ABI4 y ABI5 confiera hipersensibilidad a glucosa.

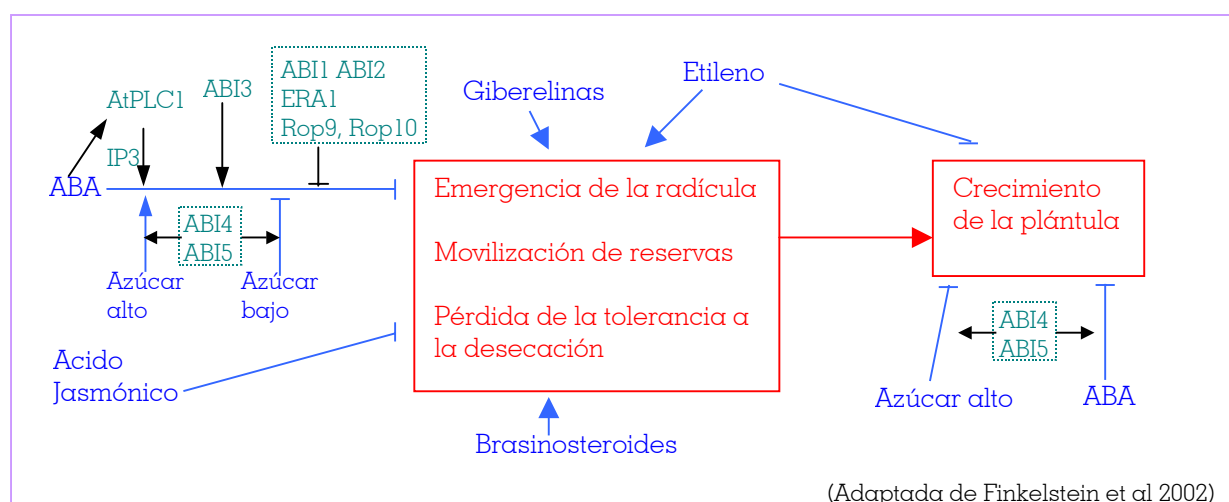


Figura e. Esquema de las vías de señalización que interactúan con la regulación de la germinación mediada por el ABA. En azul se representan los reguladores y en verde se indican algunos de los mensajeros secundarios que participan. Las flechas indican una función sinérgica y las barras una función antagónica. Las referencias se encuentran en el texto.

Papel funcional del ABA en la respuesta de los tejidos vegetativos al estrés hídrico

El ABA es el mayor mediador de respuestas a nivel de planta entera en situaciones de deshidratación. El papel principal del ABA durante el crecimiento vegetativo es optimizarlo en las condiciones adversas, mediante el mantenimiento de la homeostasis osmótica, y para ello promueve respuestas de desarrollo (como la disminución del crecimiento), adaptaciones morfológicas (como el cierre de estomas) y cambios fisiológicos (como la disminución de la transpiración). Las raíces son probablemente los órganos que primero perciben el estrés hídrico y sintetizan el ABA, que posteriormente será transportado a otras partes de la planta, como las hojas, donde producirá el cierre de los estomas (Hwang and Goodman 1995).

El ABA promueve la tolerancia a estreses abióticos como las bajas temperaturas, la alta salinidad y la sequía, los cuales inducen una situación de deshidratación celular. En el apartado 1.1 de la introducción se describe la existencia de vías de señalización dependientes e independientes de ABA en respuesta a la deshidratación. El estrés osmótico y las bajas temperaturas incrementan la

concentración de ABA celular (Chadler and Robertson, 1994). La expresión de muchos genes de respuesta a estas situaciones se inducen con un tratamiento con ABA exógeno. En la mayoría de las ocasiones la respuesta de la planta en la naturaleza integra las diferentes vías de respuesta: Un estrés osmótico causado por sequía en verano se acompaña frecuentemente de estrés por altas temperaturas y las bajas temperaturas se relacionan con el estrés osmótico al dificultar la absorción y el transporte del agua.

Un estudio realizado en *Arabidopsis* por Xiong et al (1999) intenta analizar la respuesta de la planta frente al impacto de diferentes estreses ambientales simultáneos. Se usó el promotor del gen *RD29A* fusionado al gen marcador luciferasa (LUC). *RD29A* se induce en respuesta al ABA, desecación y frío (Xiong et al 1999). Los resultados del experimento sugieren que hay interacciones positivas y negativas en la regulación de la expresión génica entre los diferentes factores inductores de estrés estudiados. En la figura f se presenta una tabla con los resultados, que sugieren que:

- el estrés osmótico y el ABA son sinérgicos en la activación de la transcripción de *RD29A* en plantas que crecen a una temperatura ambiente de 22 °C.
- el efecto del ABA a bajas y altas temperaturas es mayor que a temperatura ambiente.
- las bajas temperaturas impiden el efecto del tratamiento con estrés osmótico e incluso del doble tratamiento ABA y estrés osmótico.
- las altas temperaturas no activan la expresión de *RD29A* pero aumentan el efecto del tratamiento con ABA o estrés osmótico.

Estos tratamientos con las diferentes temperaturas eran de 48 h. Pero, en cambio, el resultado es diferente si el tratamiento con bajas temperaturas es de 4,5h. En esta situación no se induce la expresión de *RD29A* y además se inhibe la respuesta frente a los otros tratamientos. Esto parece indicar que los tratamientos con bajas temperaturas largos inducen cambios que son esenciales para la regulación de la expresión génica por ABA y estrés osmótico en esta situación de frío.

22°C			0°C			30°C			37°C		
Control	ABA		Control	ABA		Control	ABA		Control	ABA	
1	4,3		2,9	8,6		1	10**		2,8	18,6**	
Control	NaCl		Control	NaCl		Control	NaCl		Control	NaCl	
1	10,7		2,9	2,8*		1	24,3		2,9	11,4*	
ABA	NaCl	ABA+ NaCl	ABA	NaCl	ABA+ NaCl	ABA	NaCl	ABA+NaCl	ABA	NaCl	ABA+NaCl
1	2,8	5,8	2	0,7	0,8	2,5	5,7	13,3	4,2	2,5	4,2

(Ref. Xiong et al 1999)

Figura f. Tabla con los valores de expresión del gen *RD29A* en respuesta al ABA y al NaCl a diferentes temperaturas. Los valores en rojo son los más significativos y están comentados en el texto. Los valores marcados con * sugieren los autores que se obtienen porque algunos de los componentes de la vía de transducción al estrés osmótico son sensibles a las bajas y a las altas temperaturas. Los valores marcados con ** pueden ser debidos según los autores a un menor nivel de ABA endógeno que provocaría este incremento de sensibilidad al ABA exógeno(estudios previos indican que la concentración de ABA en las hojas es baja durante un tratamiento con altas temperaturas debido a una mayor degradación (Radin 1992)).

Un modelo de estudio del papel del ABA en la respuesta de los tejidos vegetativos frente a la deshidratación es el análisis de mutantes que exhiben una respuesta alterada a los tratamientos con ABA o con estrés hídrico. Análisis genéticos muestran que los *loci* importantes para la respuesta a ABA en el embrión en *Arabidopsis* tienen diferente relevancia después de la germinación, siendo ABI1, ABI2, ERA1, ABH1, HYL1, GCA1 y GCA2 los que más afectan en la regulación del crecimiento vegetativo, principalmente a nivel de elongación celular y regulación estomática. ABH1 codifica para una proteína de unión al CAP de los mRNAs maduros. El mutante *abh1* presenta un fenotipo con una mayor tolerancia a la desecación (Hugouvieux et al 2001). HYL1 codifica para una proteína de unión a RNA de doble cadena. El mutante *hyl1* tiene un fenotipo de hipersensibilidad a ABA (Lu and Fedoroff, 2000). Todavía no se conoce el producto de los genes *gca1* y *gca2*, presentando los mutantes efectos pleiotrópicos en el crecimiento, en la regulación estomática y en la germinación (Himmelbach et al 1998, Pei et al 2000).

Otro modelo interesante para el estudio del papel biológico del ABA en el estrés hídrico es la planta *Craterostigma plantagineum*, la cual puede perder hasta un 99% de su contenido de agua y sigue siendo viable después de la rehidratación. Los cultivos de callos de esta especie sólo sobreviven a la desecación después de un tratamiento de 4 días con ABA. Se ha aislado un gen, CDT-1, el cual al ser sobreexpresado induce tolerancia a la desecación a este tejido en ausencia de este tratamiento con ABA. La caracterización del mecanismo de acción de CDT-1 proporcionará información importante sobre el papel del ABA en el estrés hídrico (Furini et al 1997).

1.3. Estudio de la expresión génica inducida por ABA

Una parte importante de las respuestas fisiológicas de las plantas al ABA requieren la expresión génica *de novo*. Muchos genes que se expresan en la embriogénesis tardía se pueden inducir con ABA exógeno en el embrión y en tejidos vegetativos. Aunque el ABA parece ser necesario para la expresión de estos genes, su concentración es muy superior a la necesaria y no hay una correlación entre concentración de ABA y nivel de expresión génica. Esto se ha demostrado mediante análisis en mutantes con bajo contenido de ABA, como los mutantes vivíparos de maíz, donde la expresión de *rab17* y *rab28* está reducida pero no ausente (Pla et al 1989, Pla et al 1991). La expresión génica en la embriogénesis se correlaciona con la tolerancia a la desecación, y probablemente está regulada por factores de maduración y postabscisión (Giraudat et al 1994). Hay otros genes que responden al tratamiento con ABA exógeno en tejidos vegetativos, y que además se pueden inducir por un tratamiento con bajas temperaturas en mutantes deficientes de ABA o en presencia de inhibidores de la biosíntesis de esta hormona, sugiriendo que para su inducción no se necesita una síntesis de ABA *de novo* (Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki 2000). Las plantas presentan una menor sensibilidad al ABA exógeno en condiciones normales que al ABA endógeno durante una situación de estrés. Esto se demostró comparando la inducción génica en

respuesta al déficit hídrico y al ABA exógeno, donde la inducción en respuesta al déficit hídrico era 10 veces mayor aunque los niveles de ABA endógeno producido por los dos tratamientos era el mismo (Imay et al 1995). Cuando la aplicación de ABA se combina con estrés hídrico, la expresión génica en el mutante *flacca* de tomate era mucho mayor que la aplicación de ABA solamente. Este mutante es deficiente en la biosíntesis de ABA y el contenido de ABA endógeno era de origen externo en las dos situaciones, por lo que este resultado sugiere que el déficit hídrico incrementa la sensibilidad al ABA aplicado (Bray et al 1996).

1.3.1. Expresión génica en el desarrollo embrionario y en los tejidos vegetativos

Las etapas del desarrollo controlan la expresión génica en respuesta al ABA. Los genes de maíz *Em* y *rab28* se regulan posiblemente de una manera similar en el embrión, debido a que ambos se acumulan en la embriogénesis tardía y esta acumulación disminuye en los mutantes deficientes en ABA. Sin embargo *Em* es específico de tejidos embrionarios y *rab28* se induce en tejidos vegetativos en respuesta al ABA y al estrés hídrico. En la regulación transcripcional de los dos genes el activador *VPI* es necesario para la expresión específica de embrión. Debido a que *VPI* está presente en el embrión antes de la inducción de *Em* y *rab28*, debe de haber otros factores regulados por el desarrollo que participen en la expresión de estos genes en respuesta a ABA (Quatrano 1996, Pla et al 1991). Además de la expresión génica específica de tejidos embrionarios y vegetativos, hay una regulación específica de los genes de respuesta a ABA dependiente de la edad y órgano en tejidos vegetativos. Los genes *le4* y *le25* de tomate se inducen en respuesta a la deshidratación en plantas de 3 semanas a niveles parecidos pero en plantas de 3 meses *le4* se induce más que *le25*. Esto sugiere un control de la expresión génica en respuesta a estrés mediado por el desarrollo. Además de este control, *le4* y *le25* se expresan de manera diferente en los diferentes órganos de la planta sin haber una correlación entre el nivel de expresión génica y la concentración endógena de ABA en los tejidos. Así, *le4* y *le25* se expresan en hojas y no en raíz durante la desecación, mientras que la expresión en plantas tratadas con altas concentraciones salinas su expresión es mayor en las raíces. Una posible explicación sería una mayor sensibilidad al ABA en los tejidos, inducida por desecación en las hojas y por sal en las raíces. En cambio, el gen *le16* es inducible en hojas pero no en raíces en respuesta a varios estreses abióticos. Todos estos datos indican un control de la expresión génica específica de tejido independiente del nivel de ABA (Cohen et al 1991, Plant et al 1991).

Expresión génica dependiente e independiente de ABA en respuesta al estrés hídrico

Los genes que se inducen en respuesta a la sequía son de varios tipos. Algunos de ellos responden también a las bajas temperaturas y a la alta salinidad y otros se inducen también por la hormona ABA. El análisis de los patrones de expresión de los genes que se inducen por sequía y bajas temperaturas muestra una variación en el tiempo de inducción (muchos genes inducibles por ABA requieren para su inducción la biosíntesis de proteínas) y diferencias en su respuesta al ABA (hay genes que responden a la sequía y a las bajas temperaturas en mutantes deficientes e insensibles

al ABA en Arabidopsis, mostrando que no necesitan el ABA para su inducción pero si responden a él). Se han descrito además genes inducibles por sequía y bajas temperaturas que no responden a la aplicación de ABA exógeno, sugiriendo la existencia de vías de respuesta a la sequía dependientes e independientes de ABA (Ingram and Bartels 1996, Thomashow 1999, Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki, 2000).

Hay al menos 3 vías de transducción de señal en respuesta a la desecación independientes en Arabidopsis (figura g). Dos de ellas son dependientes de ABA y la tercera es independiente. La biosíntesis de ABA se induce en situación de deshidratación y activa la expresión génica mediante dos vías. En la primera las proteínas bZIP son activadas e inducen la expresión de genes que contienen potenciales elementos de respuesta a ABA (ABREs) en sus promotores. La segunda vía requiere la biosíntesis de factores de transcripción. Los factores MYC y MYB se sintetizan en respuesta al ABA y actúan regulando de manera cooperativa la expresión de genes que contienen elementos *cis* en sus promotores que son reconocidos por estos factores. Estas dos vías parecen actuar en la respuesta lenta y adaptativa de las plantas a la deshidratación. La tercera vía media la respuesta rápida a la sequía y al frío a través del elemento *cis* DRE (o *drought responsive element*). Los factores de transcripción que interaccionan con este elemento son miembros de la familia de factores de transcripción AP2/EREBP.

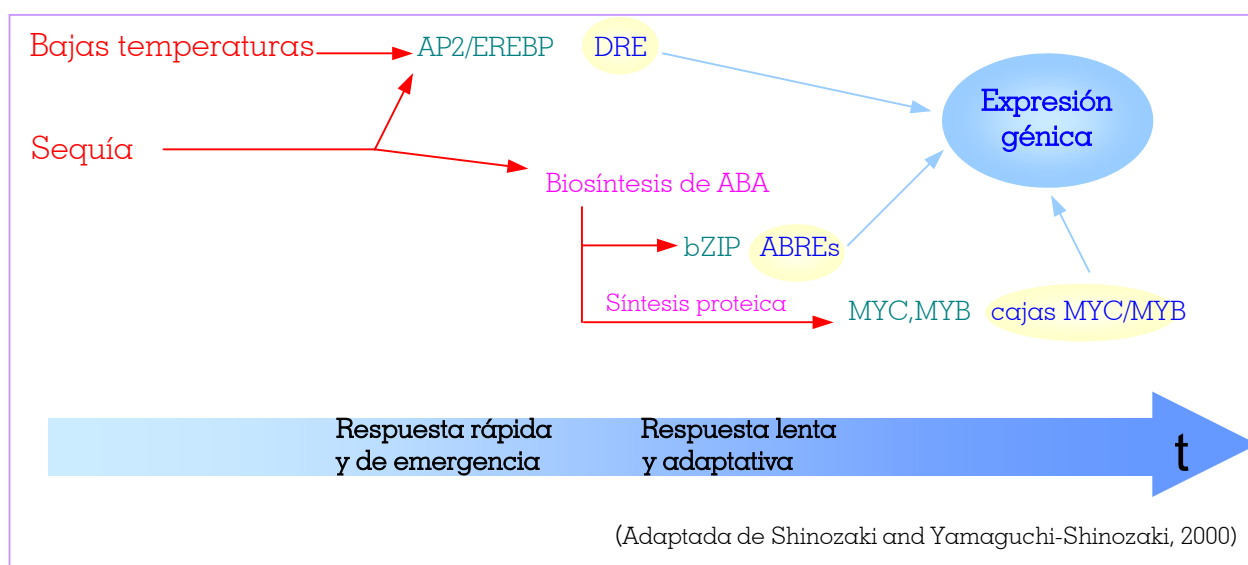


Figura g. Respuestas moleculares en respuesta a la sequía y a las bajas temperaturas y regulación de la expresión génica. La flecha azul indica el transcurso del tiempo. En verde se indican los factores de transcripción involucrados en cada vía y en azul los elementos *cis* que regulan la expresión génica. Las referencias se encuentran en el texto.

1.3.2. Regulación de la expresión génica en respuesta a ABA

Identificación de los elementos *cis* reguladores

Se conocen 4 grupos principales de secuencias *cis* requeridas o suficientes para conferir inducción por ABA: Elementos *G-box* designados como ABREs, los elementos CE3 (coupling element)-like, los elementos RY/Sph y las secuencias de reconocimiento de los factores de transcripción de la clase MYB y MYC (Busk and Pagès 1998, Rock 2000). El elemento ABRE tiene un papel crucial en la inducción de muchos genes de respuesta a ABA. El ABRE se define como una secuencia de 8-10 pares de bases con el núcleo central ACGT y forma parte de los elementos llamados *G-box*. Se han descrito hasta ahora más de 20 ABREs funcionales en promotores de genes inducibles por ABA. La secuencia flanqueante a este núcleo o *core* es muy importante para la función *in vivo* y la unión de proteínas *in vitro*. La funcionalidad del ABRE depende además del contexto del promotor, habiéndose definido los complejos mínimos de respuesta a ABA, los ABRC, que consisten en un elemento ABRE y un elemento acoplador, capaces de conferir a un promotor mínimo inducibilidad por ABA. Estos elementos acopladores son cajas que sólo son activas en combinación con un ABRE y que suelen tener un alto contenido en citosinas y guaninas. La posición relativa de los elementos en el promotor puede ser importante para la función. El elemento CE1 del gen de cebada *HVA22* media la inducción junto con el ABRE cuando está colocado a 3' del ABRE pero no en 5' (Shen et al 1996). Los elementos ABRE solos tampoco son capaces de dirigir la expresión génica inducible por ABA. Estudios de expresión indican que la secuencia (G/T)ACGTGGC es un ABRE fuerte, aunque no se han podido encontrar diferencias significativas entre la secuencia de este ABRE y los demás ABREs funcionales descritos, y otras cajas *G-box* que confieren respuesta a factores como la luz blanca, la luz ultravioleta o la anaerobiosis (Guiliano et al 1988, Weisshaar et al 1991, McKendree and Ferl 1992). Un análisis estadístico de 19 ABREs y de elementos de respuesta a la luz muestra que estos dos tipos de elementos tienen una secuencia consenso prácticamente idéntica (Busk, no publicado). Esto indica que para definir un posible papel funcional para los elementos ABRE en la regulación de la transcripción inducida por ABA hay que caracterizar el elemento en el contexto del promotor nativo.

ELEMENTO	SECUENCIA	FACTOR	REFERENCIAS
ABRE	8-10 pares de bases con el <i>core</i> ACGT	bZIP	Marcotte et al '89 Nakagawa et al '96
ABRE fuerte	YACGTGGC	bZIP	Busk and Pagès '97 Shen and Ho '95 Vasil V et al '95
CE1	TGCCACCGG	? AP2	Shen and Ho '95 Niu et al '02
CE3	ACGCGTGTCCCTC ACGCGCCTCCTC ACGCGTGG	? ? ?	Shen et al '96 Busk and Pagès '97 García-G et al '96

ELEMENTO	SECUENCIA	FACTOR	REFERENCIAS
Motivo IIa	CCGCCGCGCCTG	?	Skriver and Mundy '90 Mundy et al '90
Motivo IIb	CCGCCGCGCTG	?	Mundy et al '90
GRA	CACTGGCCGCCC CATGCCGCC	?	Busk et al '97 Busk and Pagès '97
DRE ^α	TACCGACAT	AP2	Stockinger et al '97 Y-Sh and Shinozaki '94
DRE1 ^b	CGAGAAGAACCGAGA	?	Busk et al '97
DRE2 ^b	CCGGGCCACCGACGCACGG	AP2	Kizis and Pagès '02
Motivo III	GCCGCGTGCC	?	Ono et al '96
HexIII	TTCGGCCACGCGTCCAATCCG	?	Lam and Chua '91
Myb	YAAC(G/T)G	Myb	Abe et al '97 Iwasaki et al '95
Myc	CANNTG	Myc	Abe et al '97 Iwasaki et al '95
ASCE	CGTGTCGTCCATGCATG	VPI	Hattori et al '92 Kao et al '96 Suzuki et al '97
Motivo-TT	TTTCGTGT	bZIP	Kim et al '97
AT-rich	CAATTATTA	HD-ZIP	Himmelbach et al '02

Figura h. Elementos *cis* inducibles por ABA y estrés. Figura adaptada de Busk et al 1998.

En la figura h) se muestran algunos elementos *cis* relacionados con la inducibilidad por ABA y estrés, así como los factores de transcripción que se ha descrito que interaccionan con ellos. El elemento ASCE se denomina así por *ABA-inducible Sph-Containing Element*. La secuencia Sph está subrayada. Y: pirimidina. R: purina. El elemento DRE^α es de *Arabidopsis*, inducible por estrés pero no por ABA. Los elementos DRE1^b y DRE2^b son de maíz y son inducibles por ABA.

Estructura de la cromatina y control de la transcripción

El empaquetamiento del DNA en nucleosomas es importante para la regulación de la transcripción en eucariotas, actuando generalmente como represores de la unión de factores de transcripción al DNA, y debe ser modificado para que pueda ocurrir la transcripción (Felsenfeld 1992). Se han descrito algunos genes en los que una posición de los nucleosomas concreta activa la transcripción al permitir el contacto entre los activadores transcripcionales y el complejo de iniciación, como es el gen de *D. Melanogaster hsp26* (Thomas and Elgin, 1988). La posición de los nucleosomas puede ser

diferente cuando el gen está activo o inactivo, o puede ser la misma. El gen *adh* de *Arabidopsis* se induce por ABA y desecación y tiene una estructura nucleosomal cuando está inducido diferente de la que tiene cuando no lo está, siendo además esta estructura nucleosomal la responsable de la unión de los factores de transcripción necesarios para su activación (Vega-Palas and Ferl, 1995). Por otro lado, los genes *rab17* y *rab28* contienen elementos ABRE en su promotor que regulan su inducción por ABA. Ensayos de *footprinting in vivo* muestran que no presentan modificaciones importantes en las protecciones de estos elementos *cis* reguladores, aunque hay un incremento de la unión de proteínas al promotor después de un tratamiento con ABA también hay proteínas unidas cuando el gen no está inducido. Esto sugiere que estos genes presentan una estructura de la cromatina abierta y que los nucleosomas probablemente están ausentes. Esta unión constitutiva de factores de transcripción a los ABRE sugiere que la inducción por ABA y estrés se regula por modificación de las interacciones proteína-proteína o por modificaciones post-transcripcionales sobre las mismas proteínas unidas a las cajas *cis* cuando el gen está inactivo (Busk and Pagès 1997, Busk et al 1997).

Factores *trans*-reguladores de la transcripción

El ABA regula procesos muy importantes para el desarrollo de las plantas, principalmente a nivel del control de la expresión génica. Se han descrito 5 clases de factores de transcripción involucrados en la regulación por ABA: proteínas bZIP, de dominio B3, AP2/EREBP, MYC/MYB y proteínas con homeodominio y cremallera de leucinas (figura i). Hasta la fecha solamente 6 factores de transcripción han demostrado por análisis genético ser esenciales para la expresión génica específica de la semilla y en la respuesta al ABA (*ABI3/VP1*, *ABI4*, *ABI5*, *LEC1*, *LEC2* y *FUS3*). Estos factores se agrupan en familias con un alto número de miembros, lo que implica que probablemente los miembros de la misma familia tendrán algunas funciones comunes. La consecuencia de esto es una cierta redundancia entre los diferentes factores así como un importante papel del control combinatorial en la regulación de la expresión génica en respuesta al ABA. Por este motivo, algunos estudios realizados con mutantes para un factor de transcripción determinado o con plantas transgénicas que lo sobreexpresen no han sido suficientes para poder asignar una determinada función fisiológica a este factor de transcripción.

-> Hasta la fecha se han descrito 4 mutaciones de factores bZIP: *HY5*, *PERIANTHIA*, *ABI5* y *AtbZIP 18*. La subfamilia de factores bZIP *ABI5* está compuesta por *ABI5* y sus homólogos ABFs y AREBs (*ABRE binding factors*, Choi et al 2000, Uno et al 2000) y *AtDPBFs* (*A. Thaliana Dc3 promoter binding factors*) en *Arabidopsis*, y los homólogos de estos genes en girasol y en arroz (Kim et al 1997, Kim and Thomas, 1998, Hobo et al 1999). Esta es la única subfamilia de factores bZIP que se ha relacionado genéticamente con la respuesta a ABA. Aunque las proteínas bZIP interaccionen *in vitro* con los ABRE, son necesarios estudios genéticos para saber si están implicadas en la regulación de la expresión génica *in vivo* (Nantel and Quatrano, 1996). Las plantas transgénicas

que sobreexpresan ABI5 son hipersensibles a ABA en la germinación y en el crecimiento vegetativo (Finkelstein and Lynch 2000, López-Molina et al 2001).

-> Los factores de la familia B3 se han implicado en la transducción de señal en respuesta a ABA. A esta familia pertenecen ABI3, *VPI* y sus homólogos en otras especies vegetales (revisado en Finkelstein et al 2002). Se han aislado mutantes de algunos miembros de la familia, los cuales presentan un fenotipo con defectos pleiotrópicos en la maduración de la semilla (Giraudat et al 1992, McCarty et al 1991).

-> La proteína ABI4 de la familia AP2/EREBP de Arabidopsis, se requiere también para la respuesta al ABA. El mutante *abi4* presenta un fenotipo insensible a ABA en la germinación, además de una germinación y crecimiento de las plántulas resistente a azúcares y a alta concentración de sal.

-> Se han aislado en Arabidopsis dos proteínas de las familias MYB y MYC, ATMYB2 y ATMYC, involucradas en la respuesta al ABA. Su papel transactivador en la regulación del gen *rd22*, que presenta una expresión dependiente de ABA en respuesta al estrés hídrico, se ha estudiado solamente a nivel de expresión transitoria (Urao et al 1993, Abe et al 1997, Riechmann et al 2000).

-> La proteína ATHB6 de Arabidopsis es un sustrato de la fosfatasa ABI1 y posiblemente sea un regulador negativo de la vía de respuesta al ABA que actúa por debajo de esta fosfatasa. Las plantas que sobreexpresan esta proteína son más insensibles a ABA que las controles y sufren mayor pérdida de agua por transpiración.

Estudios transcripcionales preliminares de *microarrays* han mostrado que el 8-10% de los genes de un *chip* se inducen o reprimen por una exposición de 12h al ABA en un estado de desarrollo concreto, indicando que el número de genes de respuesta a ABA identificados hasta ahora representa una pequeña parte del total de genes de respuesta a la hormona. El hecho de que se tenga acceso a la secuencia completa del genoma de Arabidopsis facilita la identificación de genes desconocidos relacionados con la respuesta al ABA. En el control de la expresión génica regulada por ABA son potencialmente importantes la redundancia y el control combinatorial, por la existencia de 5 familias de reguladores de la transcripción con muchos miembros cada una.

En el genoma de Arabidopsis se han predicho 81 genes que codifican para factores bZIP (aunque muy probablemente muchos de ellos no estarán involucrados en la respuesta al ABA), 43 genes que codifican proteínas con dominio B3 (14 de ellos están relacionados con la subfamilia ABI3/*VPI*), 190 genes de la familia MYB y uno de la familia MYC. Los datos genéticos que tenemos sobre el papel de estos factores en la regulación de la expresión génica en respuesta a ABA no nos permiten predecir con seguridad su función concreta. Para poder entender el papel de cada factor individual es necesaria la identificación de todos los genes de cada familia y hacer un estudio funcional de cada uno de ellos.

Clases de factores de transcripción que participan en la vía del ABA y dominios funcionales

Los factores de transcripción se agrupan en familias multigénicas. Análisis de la distribución y las secuencias de estos genes sugieren que estas familias han evolucionado mediante la duplicación génica, captura de exones y mutaciones.

Un factor de transcripción típico, aunque hay algunas excepciones, contiene una región de unión al DNA, un lugar de oligomerización, un dominio regulador transcripcional y una señal de localización nuclear.

La clasificación de los factores de transcripción depende de sus características estructurales, y muchas veces las familias están subdivididas en función del número y la distancia entre los dominios funcionales. A continuación se describirán las características generales de cada clase de factores de transcripción involucrados en la regulación de la expresión génica en respuesta al ABA (figura i).

→ Proteínas con el dominio B3: *ABI3/VPI(ABAinsensitive/viviparous-1)*

Las proteínas de esta familia contienen 4 dominios conservados: un dominio de activación ácido y 3 dominios básicos llamados B1, B2 y B3. La proteína *VPI* no se une *in vitro* al DNA específicamente, sugiriendo que interacciona con otras proteínas, las cuales interaccionan con el DNA (Suzuki et al 1997): el dominio B2 es necesario para su interacción con la proteína EmBP-1 y la regulación del gen *Em* (Hill et al 1996). No se ha descrito oligomerización de estas proteínas.

→ Proteínas de la familia MYB (*AtMYB2*) y MYC (*AtMYC*):

Las proteínas de la familia MYB se caracterizan por tener una región básica con la estructura helix-helix-vuelta-helix, única o repetida hasta 3 veces. Las proteínas de la familia MYC se caracterizan por tener un grupo de aminoácidos básicos adyacente a un motivo tipo helix-vuelta-helix, seguido de un dominio cremallera de leucinas.

→ Proteínas de la familia HD-Zip: *ATHB6, -7, -12*

Las proteínas de esta familia se caracterizan por tener un dominio homeodominio, constituido por unos 60 aminoácidos aproximadamente formando 3 o 4 α -hélices, seguido por un dominio de oligomerización tipo cremallera de leucinas. La interacción con el DNA se produce a través de la α -hélice 3.

→ Proteínas de la familia AP2: *ABI4*

Las proteínas de esta familia se caracterizan por el dominio AP2 de unión al DNA, compuesto por unos 70 aminoácidos. En el extremo C terminal del dominio es frecuente encontrar el elemento

RAYD capaz de formar una α -hélice. Se ha sugerido que este elemento tiene un papel importante en la estructura y función del dominio, así como mediador de interacciones proteína-proteína.

→ Proteínas de la familia bZIP: ABI5

Las proteínas de esta familia se caracterizan por el elemento bZIP, que contiene 2 dominios: el dominio básico de interacción con el DNA y translocación al núcleo, y el dominio de cremallera de leucinas de dimerización. Es frecuente encontrar dominios de activación, otras señales de translocación al núcleo y otros dominios relacionados con la función específica de algunos miembros de la familia. Estas proteínas se describirán ampliamente en el siguiente apartado.

Lugar de unión/Clase de factor	Género	Factor	Referencias	
ABREs /bZIPs	<i>Arabidopsis</i>	ABI5/AtDPBF1	Choi et al 2000; Finkelstein and Lynch 2000; Lopez-Molina and Chua 2000;	
		AtDPBF2	Uno et al 2000.	
		AtDPBF3/AREB3		
		ABF1		
		ABF2/AREB1		
			ABF4/AREB2	
			GBF3	Lu et al 1996
		<i>Helianthus</i>	DPBF1, -2 y -3	Kim and Thomas 1998
		<i>Oryza</i>	TRAB1	Hobo et al 1999
		<i>Phaseolus</i>	PvZIP6	AF369792 ^a
	ROM2		Chern et al 1996	
	<i>Triticum</i>	EmBP-1	Guiltinan et al 1990	
Elementos RY/Sph / Proteínas con dominio B3	<i>Arabidopsis</i>	ABI3	Giraudat et al 1992	
	<i>Avena</i>	Af VPI	Jones et al 1997	
	<i>Craterostigma</i>	Cp VPI	Chandler and Bartels 1997	
	<i>Daucus</i>	C-ABI3	Shiota et al 1998	
	<i>Phaseolus</i>	PvALF	Bobb et al 1995	
	<i>Populus</i>	PtABI3	Rohde et al 1998	
	<i>Oryza</i>	Os VPI	Hattori et al 1994	
	<i>Triticum</i>	Ta VPI	Bailey et al 1999	
	<i>Zea mays</i>	VPI	McCarty et al 1991	
MYB	<i>Arabidopsis</i>	AtMYB2	Abe et al 1997	
MYC	<i>Arabidopsis</i>	AtMYC	Abe et al 1997	
Desconocido/HD-Zip	<i>Arabidopsis</i>	ATHB6	Söderman et al 1996; Lee and Chun 1998;	
		ATBH7		
		ATBH12	Söderman et al 1999.	

<u>Lugar de unión/Clase de factor</u>	<u>Género</u>	<u>Factor</u>	<u>Referencias</u>
Desconocido/AP2	<i>Arabidopsis</i>	ABI4	Finkelstein et al 1998; Söderman et al 2000.
DRE1 / AP2	<i>Zea mays</i>	DBF1 DBF2	Kizis and Pagès 2002.
CE1 / AP2	<i>Zea mays</i>	ZmABI4	Niu et al 2002

(Adaptado de Finkelstein et al 2002)

Figura i. Reguladores transcripcionales implicados en la transducción de la señal en respuesta a ABA.

^a: Miembro de la subfamilia de homólogos de ABI5, pero no hay evidencia directa de su papel en la transducción de la señal en respuesta a ABA.

1.4. Factores de transcripción de la familia bZIP de plantas

La familia de proteínas bZIP es muy grande y diversa, y ha sido una de las familias de factores reguladores de la transcripción más estudiada. Estudios bioinformáticos han identificado sus dominios estructurales más importantes, los cuales posteriormente han sido caracterizados funcionalmente mediante ensayos *in vitro* e *in vivo*. Los factores bZIP participan en múltiples procesos relacionados con el desarrollo y con procesos fisiológicos en respuesta a fenómenos tan diversos como la luz, la anaerobiosis, el ataque de patógenos, la desecación o las fitohormonas, aunque debido a la complejidad de esta familia es difícil asignar una función fisiológica a una proteína bZIP en particular (Marcotte et al 1989, Mundy et al 1990, Oeda et al 1991, Liu and Lam 1994, Feldbrügge et al 1994, Rosahl et al. 1986).

En el genoma de *Arabidopsis* se han identificado 75 genes putativos que codifican para proteínas bZIP, las cuales se han agrupado en 10 grupos basándose en la región básica y los dominios conservados característicos de estas proteínas. El objetivo principal de esta clasificación es reflejar parecidos estructurales, para luego asociarlos a posibles parecidos funcionales entre los miembros que forman cada grupo y realizar así un primer paso en la determinación de las funciones específicas de cada proteína bZIP (Jakoby et al 2002). Las proteínas bZIP se han clasificado también basándose en otros aspectos, como la afinidad por las diferentes secuencias dianas en el DNA (Izawa et al 1993) o la similitud entre los dominios bZIP (Vettore et al 1998).

Los miembros de la familia bZIPs tienen diferentes secuencias de DNA diana. La gran mayoría interactúa con los ACEs (*ACGT-Elements*), también llamados secuencias *G-box-like*. Los ACEs se pueden subdividir en cuatro tipos:

A-box :TACGTA

C-box :GACGTC

G-box :CACGTG

T-box :AACGTT

El elemento ABRE, descrito en el apartado 1.3.2, es un elemento *G-box*. A las proteínas bZIP que interactúan con las cajas *G-box* se las denomina también GBF (*G-box Binding Factor*). Las proteínas GBF se pueden considerar como una subfamilia ya que presentan características estructurales comunes. Se ha descrito otra familia de factores de transcripción que interactúa también con las cajas *G-box*: las proteínas bHLH (basic helix-loop-helix), con una diana consenso CANNTG.

1.4.1. Dominios estructurales y función de cada dominio

Dominio de cremallera de leucinas: permite la dimerización

La dimerización es un paso imprescindible para la unión al DNA y por lo tanto la actividad de las bZIP. Algunas proteínas dimerizan antes de la unión al DNA y otras dimerizan durante la unión al DNA (Ellenberg et al 1992, Metallo and Schepartz 1997, Köhler et al 1999).

La estructura de este dominio se compone de 7 residuos o menos (4 mínimo) de leucinas separados entre ellos por otros 6 residuos, el cual se conforma espacialmente formando una hélice α anfipática. (figura j). Esta hélice se puede conformar en una estructura denominada *supercoil* que alinea todos los residuos de leucina de manera que permitirá que dos monómeros se agreguen a través de interacciones electrostáticas formando un ambiente interior hidrofóbico. Esta conformación se dispone en el surco mayor del DNA de manera perpendicular al eje permitiendo la interacción con el DNA. Algunos de los residuos de leucina se pueden sustituir por aminoácidos hidrofóbicos.

Las proteínas bZIP pueden formar homodímeros y heterodímeros. La heterodimerización es posible entre monómeros que presenten una estructura de *supercoil* con unas determinadas características estructurales compatibles para la dimerización entre ellos. Hay por lo tanto determinados monómeros que no interactúan entre ellos y diferentes afinidades entre los diferentes monómeros, no sólo entre proteínas de esta familia sino también con proteínas de otras familias. La dimerización constituye un mecanismo de control de la actividad de las bZIP, ya que puede determinar cambios en la especificidad de unión al DNA y modificar la interacción con otras proteínas involucradas en la expresión génica.

El dominio de cremallera de leucinas puede regular la unión al DNA. Se han descrito algunas proteínas capaces de interactuar con este dominio y estabilizar la α -hélice favoreciendo así la interacción con el DNA. Unas de estas proteínas son las BEF (*bZIP enhancing factors*) humanas (Virbasius et al 1999) y NPR1 de *Arabidopsis* (Després et al 2000).

El dominio básico: translocación, interacción proteína-proteína y unión al DNA

Este dominio se encuentra unido al dominio de cremallera de leucinas por 6 aminoácidos que forman la denominada región puente o *hinge* (Niu et al 1999).

La translocación del citoplasma al núcleo es esencial para la actividad de los factores de transcripción. En este dominio se localiza una señal de localización nuclear (NLS) con estructura bipartita, que consiste en 2 grupos de aminoácidos básicos separados por unos 10 aminoácidos (van der Krol and Chua 1991). La fosforilación en la NLS o en su proximidad puede regular el importe al núcleo de estas proteínas (Jans 1995).

Estudios de tipo EMSA muestran que de los 26 aminoácidos que forman el dominio básico, solo 6 están implicados en la interacción específica con el DNA a través de interacciones electrostáticas, y sustituciones en estas posiciones pueden alterar la unión y/o la especificidad de unión al DNA (Niu et al 1999). Hay otros residuos que interactúan con los grupos fosfato del DNA independientemente de la secuencia del DNA. Otros residuos no interactúan con el DNA pero son imprescindibles para que pueda tener lugar la interacción, y probablemente su función sea permitir la conformación adecuada del dominio básico (Schindler et al 1992).

La secuencia de aminoácidos que forman el dominio básico y la región puente son los responsables de la especificidad de interacción de las proteínas bZIP con el DNA. La región puente no interactúa específicamente con el DNA y su contribución principal sea probablemente de carácter conformacional (Niu et al 1999).

En el dominio básico se localizan residuos de serina altamente conservados los cuales pueden ser fosforilados, constituyendo la fosforilación un mecanismo de regulación de la interacción con el DNA (Klimczak et al 1992).

El dominio básico de muchas proteínas bZIP contiene la secuencia RKQS, descrita como diana de interacción con las proteínas 14-3-3. Estas proteínas se han encontrado en el citoplasma y en el núcleo y son muy importantes para la transducción de señal. Se las ha relacionado con el calcio, con fenómenos de fosforilación y en la interacción con factores de transcripción. Las proteínas GF14 se han identificado como parte de un complejo de regulación de la expresión génica en el que se encuentran también EmBP-1 α , *VPI* y el elemento *cis* de respuesta a ABA *Em1 α* (Schultz et al 1998).

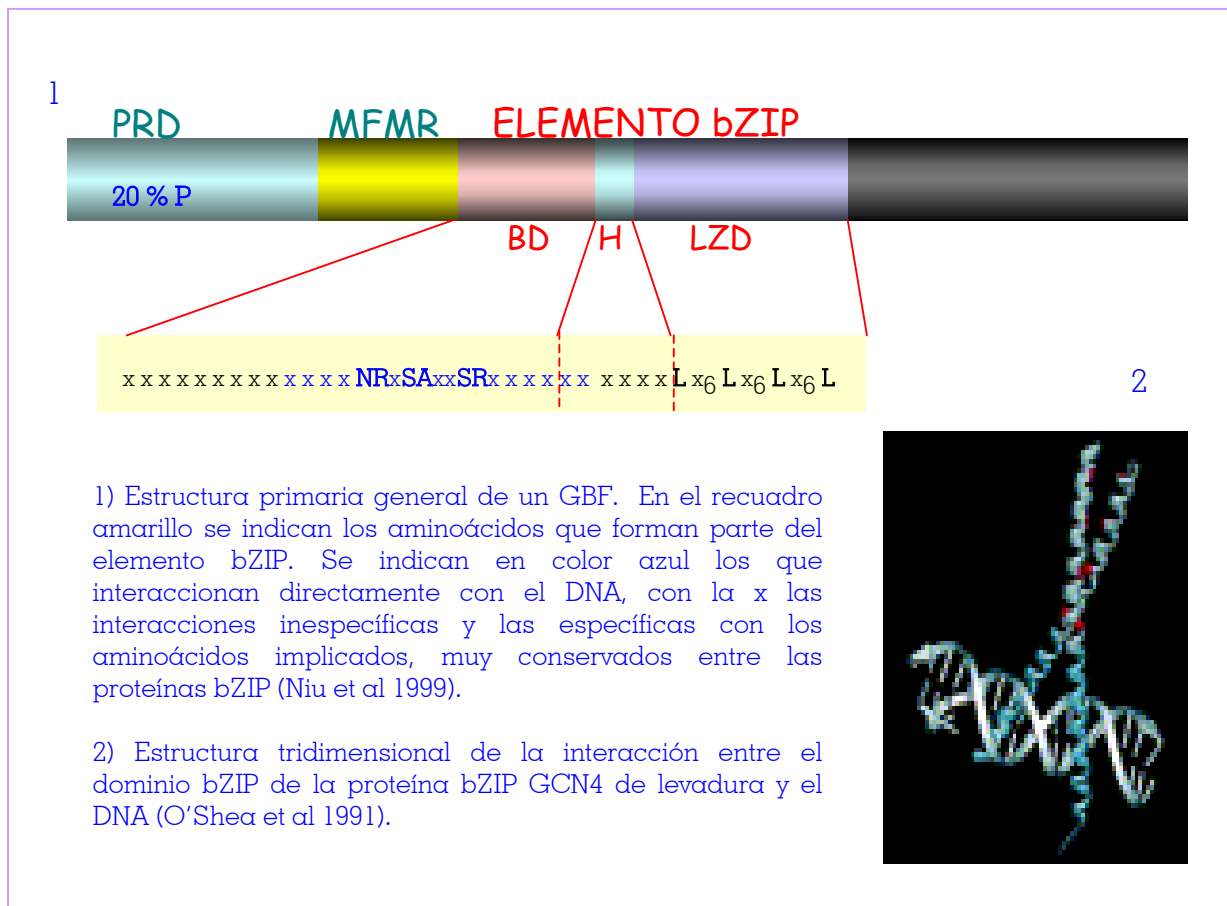


Figura h. Características estructurales de los factores bZIP. 1. Estructura primaria de las proteínas bZIP. El elemento bZIP está formado por el dominio básico (BD), la región puente (H) y el dominio de cremallera de leucinas (LZD). Es característico de los GBF un dominio de activación rico en prolina (PRD, 20% de prolina) y la región mosaico multifuncional (MFMR). 2. Estructura tridimensional de un elemento bZIP interactuando con el DNA. En rojo se indica la posición de los residuos de leucina.

Dominios activadores y represores

Estos dominios se pueden localizar en el lado N terminal o C terminal del elemento bZIP, siendo muy frecuente encontrar dominios activadores en las proteínas bZIP. Se conoce relativamente poco sobre las estructuras de los dominios de activación y de cómo actúan, aunque se sugiere que interactúan con componentes del complejo basal de iniciación de la transcripción.

Los dominios activadores pueden ser de diferentes tipos: ricos en prolina, ricos en glutaminas o dominios ácidos (Schindler et al 1992b, Vettore et al 1998). Los factores GBF se caracterizan por tener dominios de activación ricos en prolina (PRD) localizados en el lado N terminal del elemento bZIP, y contienen un 20 % de prolina. También se ha sugerido que la presencia de aminoácidos aromáticos en este dominio es importante para la activación transcripcional (Williams and Tjian 1991). En algunos casos estos dominios pueden funcionar como represores transcripcionales (Liu et al 1997). Se han hecho estudios delecionando este dominio rico en prolina y el efecto activador

obtenido está relacionado con el fragmento del dominio estudiado, sugiriendo que este dominio tiene una estructura modular. No hay conservación en su secuencia entre las diferentes GBF, aunque la secuencia VYPEWP parece tener un papel significativo en el efecto transregulador del dominio (Nakayama et al 1997). Se ha descrito una interacción por doble híbrido entre el PRD de HBP-1α(17) y los activadores transcripcionales GPR1 y 2 de Arabidopsis (Tamai et al 2002).

Región mosaico multifuncional

Esta región se localiza entre el dominio rico en prolinas y el elemento bZIP de los GBFs, y contiene secuencias de aminoácidos que, al ser conservadas entre diferentes proteínas, se sugiere que participan en la regulación de la actividad de estas proteínas. Se ha localizado en esta región del factor GBF-2 de Arabidopsis señales de retención citoplasmática (Terzaghi et al 1997), que consisten en un grupo de aminoácidos ácidos. Los mecanismos propuestos para esta señal de retención citoplasmática son una posible interacción con proteínas de retención citoplasmática o una interacción del dominio de retención con el dominio básico y la inactivación de la NLS hasta que en respuesta a una determinada señal se produzca la activación del factor.

También se han localizado en esta región señales de localización nuclear, descrita por primera vez en el factor OPAQUE-2 y encontrado después en casi todas los GBF (Varagona et al 1992). Se ha identificado también en esta región unos grupos de aminoácidos conservados entre los GBF, que se han denominado GCB (GBF consensus box), los cuales tienen un fuerte efecto transactivador en experimentos de expresión transitoria (Okanami et al 1996). Esto implica que esta región puede ser importante en la actividad transreguladora de los GBF, juntamente con los dominios ricos en prolinas, como ya se había observado en casos aislados como el factor TAF-1 (Oeda et al 1991).

1.4.2. Modulación de la actividad de las bZIP

Se han involucrado en la regulación de las proteínas de esta familia señales procedentes de las etapas del desarrollo, del medio ambiente y hormonales. La actividad de las bZIP se puede modular a diferentes niveles.

Modulación de la actividad por el nivel de expresión

La cantidad de proteína que encontramos en un tejido constituye un primer nivel de modulación, y depende de su síntesis y de su degradación. Esto se denomina el patrón de expresión del factor. Hay diversas señales que son capaces de inducir la expresión de los genes que las codifican, como la hipoxia induce la expresión de la proteína GBF1, lo que sugiere que GBF1 pueda estar involucrada en la regulación de genes que se induzcan en respuesta a esta señal, como el gen *Adh1* (Vetten and Ferl 1995). El gen que codifica para ABI5 se induce por la hormona ABA y la estabilidad de la proteína aumenta también por la acción de la hormona, ya que cuando disminuye

su concentración ABI5 es rápidamente degradada probablemente a través del proteasoma (López-Molina et al 2001).

Modulación de la actividad por la localización subcelular

Los factores de transcripción tienen como finalidad generalmente la interacción con el DNA. Para ello deben translocarse al núcleo. Su localización intracelular constituye otro nivel de modulación de su actividad. Muchos datos indican que los GBF se localizan predominantemente en el citoplasma y que en respuesta a diferentes estímulos selectivamente se estimule la translocación al núcleo de unos factores determinados. En el apartado anterior se han descrito las señales de localización nuclear y las señales de retención citoplasmática, así como la posible implicación de componentes citosólicos involucrados en el control de la localización intracelular de los factores bZIP.

Modulación de la actividad por modificaciones post-traduccionales

El estado de fosforilación de un factor bZIP es una de las principales modificaciones post-traduccionales implicadas en la modulación de su actividad. La fosforilación en determinadas partes de la proteína puede regular su estabilidad, su localización intracelular e incluso su interacción con otras moléculas y con el DNA. Los factores GBF de perejil (CPRF) tienen una localización intracelular regulada por la luz y se han descrito que tanto actividades enzimáticas quinasas como fosfatasa están involucradas (Harter et al 1994). La proteína CK2 se ha involucrado en la regulación de muchos tipos de factores de transcripción que participan en vías de transducción en respuesta a señales muy diversas, ambientales y del desarrollo de las plantas. Su localización intracelular en el citoplasma y en el núcleo es un indicativo más de su capacidad de regulación. En el dominio básico se localiza en muchas proteínas bZIP una diana teórica de fosforilación por CK2, y la interacción entre esta enzima y el dominio básico de los factores bZIP, preferentemente en forma dimérica, se ha descrito (Yamaguchi et al 1998). El factor GBF1 de *Arabidopsis* cuando es fosforilado por CK2 en estudios *in vitro* incrementa su afinidad por el DNA (Klimczak et al 1995).

Modulación de la actividad por el control combinatorial

El control combinatorial es un mecanismo de regulación de la expresión génica y modula también la actividad de los factores de transcripción. El control combinatorial se define como el uso de un pequeño número de factores de transcripción que, en diferentes combinaciones, proporcionan un amplio espectro de efectos sobre la regulación transcripcional. Hay diferentes tipos de factores de transcripción. Los denominados generales constituyen el complejo de iniciación de la transcripción y los denominados *architectural transcription factors* están involucrados en la remodelación del DNA, para facilitar la interacción de otras proteínas con las secuencias promotoras. Estos dos tipos de factores no son específicos de un determinado gen. Los factores de transcripción denominados activadores y represores se unen a secuencias específicas de DNA solo en determinados

promotores, y constituyen un instrumento importante en la regulación de la expresión de genes concretos. Por último, los factores de transcripción coactivadores y corepresores definen a proteínas que median efectos específicos activadores o represores sobre un determinado promotor, aunque no son capaces de interactuar con el DNA generalmente. Esta especificidad es el resultado de interacciones proteína-proteína con activadores y represores específicos. Debido a la gran diversidad de proteínas que se reúnen en las proximidades de las secuencias reguladoras de un gen en particular, cada combinación de los diferentes factores, lo que se denomina enhanceosoma, tiene un papel muy importante en la regulación de la expresión génica. El porcentaje del genoma dedicado a codificar para factores de transcripción en plantas es muy elevado, y las predicciones en *Arabidopsis* están sobre un 15% de los genes.

Se han descrito en la literatura casos concretos donde la interacción entre determinados factores bZIP regula la expresión génica (Nantel and Quatrano 1996, Bensmihen et al 2002). Debido a que estos factores de transcripción pueden formar homodímeros y heterodímeros con proteínas de la misma o de otras familias, la posibilidad de formar heterodímeros específicos forma parte del control combinatorial. La importancia de la dimerización de las bZIP en el control de la expresión génica reside en una interacción con el DNA con características diferentes según los monómeros que participan, ya sea a nivel de especificidad por diferentes secuencias de DNA o por una interacción específica con otras proteínas del enhanceosoma. La composición del enhanceosoma en un determinado promotor, por tanto, puede cambiar en respuesta al medio ambiente, al desarrollo o a otras señales que puedan activar a determinados miembros de la familia bZIP.

Activación de las bZIP en respuesta a diferentes señales

En muy pocos casos es posible asignar a un factor bZIP una función fisiológica específica, solamente cuando se tiene un mutante es posible estudiar la función *in vivo* de la proteína. A veces es difícil incluso el estudio de los mutantes, debido a la redundancia de función que probablemente tienen estas proteínas que comparten tantas características estructurales.

Se han descrito 4 mutantes de *Arabidopsis* que afectan a genes que codifican para bZIP : HY5, PERIANTHIA, ABI5 y AtbZIP18 (Chattopadhyay et al 1998, Chuang et al 1999, Finkelstein and Lynch 2000, Jakoby et al 2002, respectivamente). Y en maíz OPAQUE-2 y LIGULELESS2 (Vicente-Carbajosa et al 1997, Walsh and Freeling 1999, respectivamente).

HY5 promueve la fotomorfogénesis, y el mutante *HY5* crece en presencia de luz de una manera equivalente a las plantas salvajes en oscuridad. Este crecimiento del mutante se caracteriza por los hipocotilos elongados, poco desarrollo de los cotiledones y una expresión reducida de los genes inducidos por luz. En los promotores de algunos de estos genes hay elementos *G-box* y son regulados directamente por HY5. La actividad de HY5 está modulada por fosforilación por CK2 (la cual aumenta su estabilidad pero disminuye su actividad) y por interacción con COP1 (que la marca para su degradación cuando no está fosforilada) (Hardtke et al 2000). En el mutante *HY5* no está totalmente anulada la fotomorfogénesis. Se ha encontrado en el genoma de *Arabidopsis* otra

proteína bZIP que contiene la diana de fosforilación por CK2 y el dominio de unión α COP1, lo que sugiere que estas 2 proteínas pueden tener funciones redundantes (Jakoby et al 2002). PERIANTHIA también está involucrada en el desarrollo, controlando el número de órganos florales. La proteína LIGULELESS 2 de maíz presenta características estructurales muy parecidas a PERIANTHIA y también participa en el desarrollo, concretamente en la determinación del límite de la vaina de la hoja. La proteína de maíz OPAQUE-2 regula la producción de proteínas de reserva en la semilla, conjuntamente con una proteína de la familia dedo de Zinc, PBF. La actividad de O2 se moluda por mecanismos de fosforilación afectando su unión al DNA (Vicente-Carbajosa et al 1998, Ciceri et al 1997). Hay otros procesos del desarrollo en los que están involucradas las bZIP, como en el desarrollo de los frutos en tomate. En experimentos *in vitro* se ha visto que el gen *Rcbs2* se regula por factores GBF, y que la actividad del gen se correlaciona con la de estos factores y varía en los diferentes estadios del desarrollo del fruto. Pero la expresión génica de los factores GBF es constitutiva durante todo el desarrollo, implicando que la regulación de la actividad involucra mecanismos post-traduccionales.

La proteína ABI5 está involucrada en la vía de transducción en respuesta a ABA y α estrés hídrico, y tiene funciones importantes en el desarrollo embrionario y en la respuesta de los tejidos vegetativos al estrés. También es importante su papel en la etapa siguiente a la germinación donde el desarrollo de la plántula queda detenido si la disponibilidad de agua en el medio ambiente no es la idónea, permitiendo una mayor supervivencia de la planta (López-Molina et al 2001). El ABA controla la actividad de ABI5 induciendo su expresión, aumentando su estabilidad, controlando su estado de fosforilación y su actividad, en la germinación y los primeros momentos del desarrollo de la plántula. Las características del mutante ABI5 ya se han expuesto en el apartado 1.3.2. Hay otras proteínas bZIP involucradas en la regulación de la expresión génica en respuesta a otras hormonas, de las que no se tienen mutantes, como la proteína GmGBF-2 de *Glycine max*, que puede estar involucrada en la regulación por auxinas del gen *Gh3* (Liu et al 1997).

Aunque no hay datos genéticos que lo confirmen, hay proteínas bZIP involucradas en la regulación génica en respuesta a la luz. Son las proteínas de Arabidopsis denominadas GBF y sus homólogos en perejil CPRF. Estas proteínas se pueden unir como homo- o heterodímeros a cajas *G-box* simétricas y asimétricas, constituyendo esta característica un importante punto de control de su actividad, porque algunas de estas bZIP se inducen en respuesta a la luz (GBF3, CPRF1 y CPRF4 α), mientras que otras cambian de compartimento celular en respuesta a la luz (GBF2 y CPRF4 α). Además, el estado de fosforilación de CPRF4 α es dependiente de luz y cambia su actividad de unión al DNA (Schindler et al 1992, Armstrong et al 1992, Kircher et al 1998). La proteína GBF3 se ha involucrado también en la regulación de la expresión génica en respuesta a ABA (Lu et al 1996).

En la figura k se representan esquemáticamente estos posibles mecanismos de regulación de la actividad de las proteínas bZIP. Hay bastantes evidencias que sugieren que la activación de la mayoría de las bZIP ocurre a nivel post-transcripcional sugiriendo que la expresión de los genes

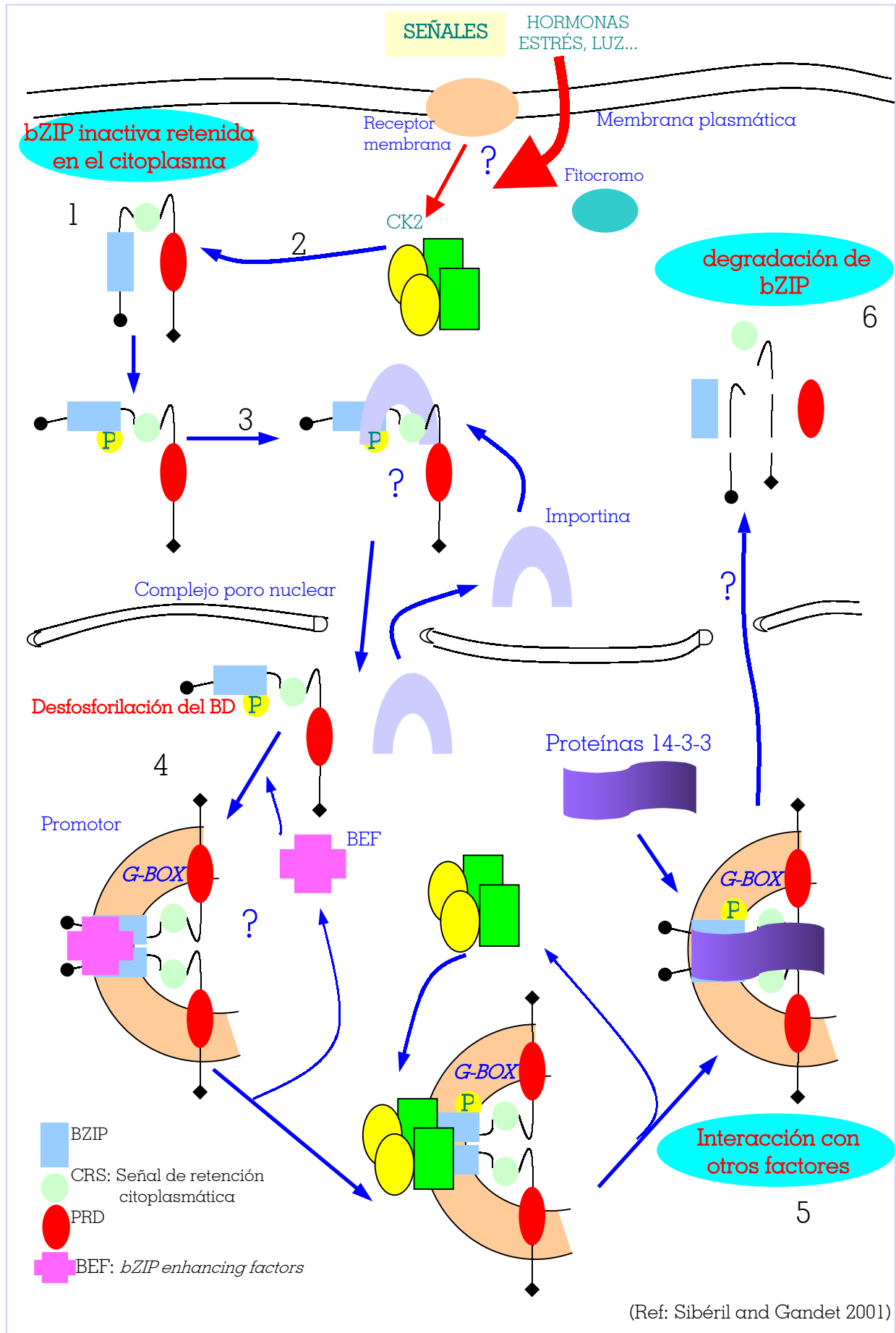


Figura k: Esquema con los posibles mecanismos de activación de las bZIP desde la percepción de una señal por la célula hasta la regulación de la expresión génica por las bZIP. Para las referencias ver texto.

bZIP no es un buen marcador para el estudio de la señal de transducción en la que participan estas proteínas. El estudio de los dominios funcionales específicos de las bZIP nos permitirá entender mejor las etapas que pueden haber desde la síntesis de la proteína hasta la transactivación del gen diana, que pueden incluir cambios conformacionales, fosforilaciones e interacciones proteína-proteína, como ya se ha descrito para algunas proteínas bZIP en sistemas vegetales modelos. Si los datos publicados para una bZIP en particular se pudieran aplicar a otras bZIP, se podría especular esta secuencia de procesos post-transcripcionales para una bZIP: Las bZIP se sintetizan y se encuentra como un *pool* inactivo de diferentes monómeros en el citoplasma. Los monómeros pueden encontrarse interaccionando a través de sus secuencias CRS o NLS con proteínas de retención citoplasmática. De esta manera los monómeros son retenidos en el citoplasma. Con la llegada de un estímulo físico (luz) o fisiológico (ABA) percibido por la célula, las proteínas son fosforiladas por la CK2 y cambian de conformación activando la NLS. Las bZIP modificadas dejan de interaccionar con las proteínas de retención citoplasmática y pueden interaccionar a través de su NLS con una proteína que las permita entrar al núcleo a través del complejo del poro nuclear, como la importina, como ya se ha descrito para otras proteínas y factores de transcripción (Harley et al 1999). Las bZIP en el núcleo son capaces de unirse como dímeros a las cajas *G-box*. Pueden interaccionar con proteínas BEF que las ayudan a adoptar la conformación correcta de su dominio bZIP y así aumentar su afinidad por el DNA. La fosforilación en el dominio básico crea cargas negativas y produce repulsión electrostática entre la proteína y el DNA y por eso se piensa que las proteínas se tienen que desfosforilar en esta posición antes de su unión al DNA. Una vez unidas al DNA pueden interaccionar con otras proteínas como las 14-3-3 o la CK2. La fosforilación de las bZIP por CK2 y la interacción con las proteínas 14-3-3 pueden modular la actividad transreguladora del PRD. Después de la regulación de la expresión génica, el complejo proteína-DNA se disocia y las bZIP se separan en monómeros inactivos que pueden ser accesibles a la ubiquitinación y provocar la degradación específica, como se ha visto para la proteína GCN4 (Meimoun et al 2000).

1.5. Regulación del gen *rab28* de *Zea mays*

Estudios en la regulación de la expresión génica durante la embriogénesis en maíz han mostrado que un grupo de mRNA y proteínas que se acumulan en la embriogénesis tardía se inducen en embriones inmaduros cuando se aplica en el medio de cultivo ABA (Sanchez-Martínez et al 1986). Estos genes se han denominado *lea* (*late embryogenesis abundant*). En nuestro grupo se ha aislado el gen *lea rab28* a partir de un cribado diferencial de dos librerías de cDNA de embrión inmaduro de 20 dap sin tratar y tratado con ABA. El clon genómico codifica para una proteína de 278 aminoácidos con un peso molecular teórico de 27,7 KDa y un pI de 6,07.

Introducción

Se ha estudiado el patrón de inducción del gen *rab28* en embriones y tejido vegetativo salvaje y en los mutantes *vp1* y *vp2* de maíz (*vp* indica *viviparous*). Los mutantes *viviparous* son una fuente importante de información para la regulación de genes involucrados en la respuesta a ABA. En estos mutantes el embrión no presenta dormancia y germina precozmente en la planta madre sin pasar por el periodo de desecación. Hay dos clases de mutantes *vp*, denominados de Clase I y de Clase II. Los mutantes de Clase I incluyen a *vp1* y se caracterizan por contener niveles normales de ABA en el embrión y en las plántulas (Neill et al 1987) aunque en el endospermo tienen reducido contenido en antocianinas. La concentración de ABA en las plántulas de *vp1* incrementa en respuesta a la deshidratación como en las plantas salvajes, pero sus semillas son insensibles a la aplicación de ABA exógeno, y se considera defectivo en la respuesta a esta hormona. Se ha aislado el gen *vp1* y codifica para un factor de transcripción (Robichaud et al 1980, McCarty et al 1991). Los mutantes de Clase II incluye a *vp2* y se caracterizan por ser deficientes en carotenoides y contener un nivel bajo de ABA. Las semillas *vp2* no acumulan ABA en respuesta a la deshidratación pero responden al ABA exógeno entrando en el proceso de la maduración (Neill et al 1986, Robichaud et al 1980).

El mRNA de *rab28* se empieza a acumular en embriones salvajes a los 20 dap aunque a un nivel muy bajo (no hay proteína en este estadio) y aumenta su acumulación hacia el final de la embriogénesis, desapareciendo en la germinación. En embriones de 20 dap se induce tras un tratamiento con ABA (figura I). En cambio, en el mutante *vp1*, el mRNA de *rab28* no se acumula a los 37 dap en niveles significativos comparados con su acumulación en el embrión salvaje. Esto refleja que durante el desarrollo embrionario la proteína *VP1* tiene un papel fundamental en la regulación de *rab28*. Un tratamiento con ABA en el mutante *vp1* induce *rab28* en embriones de 17 dap pero en embriones más viejos, de 37 dap, donde la inducción obtenida es muy pequeña (figura ma). En las plántulas de *vp1* *rab28* no se expresa en condiciones normales, y presenta una inducción en respuesta a ABA muy reducida en comparación con la inducción en respuesta a la deshidratación. La expresión de *rab28* durante la embriogénesis es equivalente en el mutante *vp2* y en el maíz salvaje (figura mb). En tejido vegetativo *rab28* no se induce en respuesta a la deshidratación. Esto refleja que la expresión de *rab28* está regulada positivamente por ABA y que esta regulación es diferente en tejido embrionario que en tejido vegetativo.

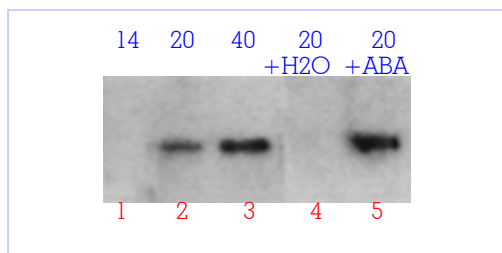


Figura I. Regulación de la expresión de *rab28* durante el desarrollo embrionario. Ensayo Northern blot. En azul se indica la edad de los embriones en dap. En rojo se indican los carriles. Los carriles 4 y 5 contienen embriones de 20 dap tratados durante 24h con H₂O (4) o ABA 20 μ M (5). Referencia Niogret et al 1996.

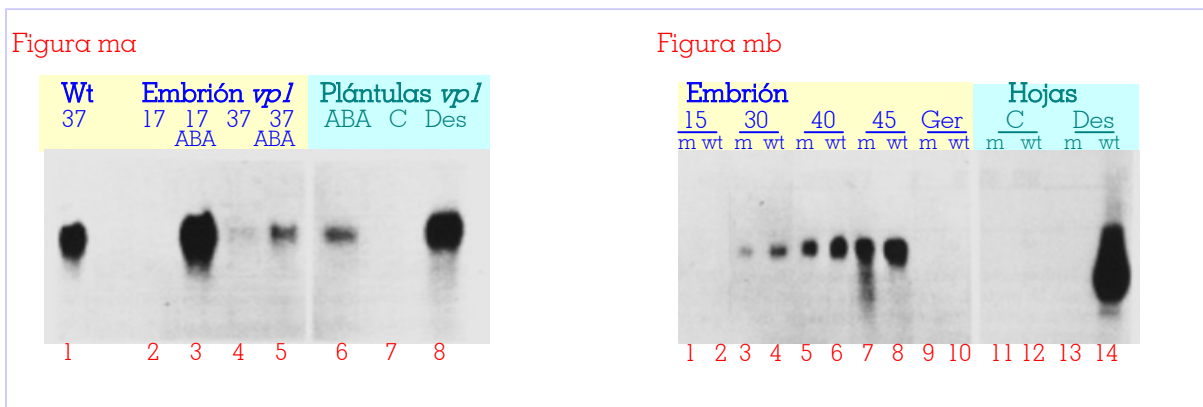


Figura m. Regulación de la expresión de *rab28* durante el desarrollo embrionario y en el tejido vegetativo en maíz salvaje y en los mutantes *vp1* (figura ma) y *vp2* (figura mb). Ensayo Northern blot. La numeración de los carriles se indica en rojo. **Figura ma:** en azul se indica la edad de los embriones en dap. Wt: salvaje. Los carriles 3 y 5 contienen embriones de la edad indicada tratados 24 h con ABA 10 μ M. En verde se indican los carriles que contienen hojas de plántulas de 6 días control (carril 7), tratadas 24 h con ABA 10 μ M (carril 6) o deshidratadas 3h (carril 8). **Figura mb:** en azul se indica la edad de los embriones en dap. m: mutante *vp2*; wt: salvaje; Ger: Embriones secos germinados 48 h. En verde se indican los carriles que contienen hojas de plántulas de 6 días, control (11 y 12) y deshidratadas 3h (13 y 14). Referencia Pla et al 1991.

Ensayos posteriores tipo EMSA (*electrophoretic mobility shift assay*) reafirmaron la hipótesis de la regulación diferencial de *rab28* en tejidos embrionarios y vegetativos, al observarse complejos de movilidad muy diferente en estos tejidos, cuya afinidad por la sonda *rab28* era equivalente (figura n, pla et al 1993). Las posibilidades para explicar esta regulación diferencial son diversas: Las proteínas que se unen al promotor de *rab28* son diferentes en los dos tejidos, son las mismas proteínas con alguna modificación o la diferente movilidad se debe a la intervención de alguna proteína específica de tejido.

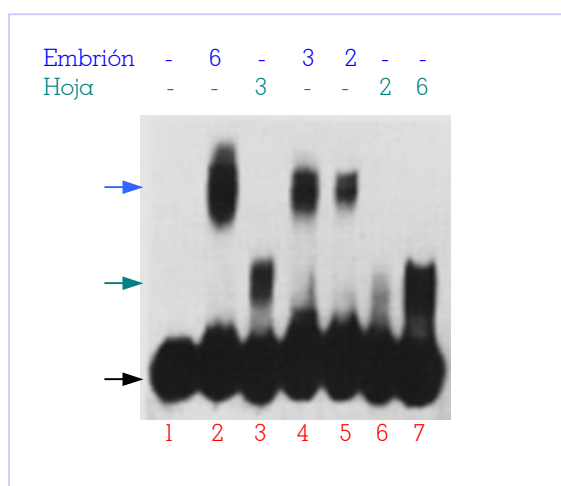


Figura n. Ensayo EMSA con proteínas nucleares de extractos de embrión maduro y de hojas deshidratadas de 7 días, utilizando como sonda el fragmento de promotor *rab28* -393/-60. En azul se indican los μ g de extracto de embrión y en verde los μ g de extracto de hoja deshidratada. Con las flechas se señalan los retardos conseguidos: En azul con las proteínas de embrión y en verde con las de hoja. En negro se indica la sonda libre. Referencia Pla et al 1993.

La caracterización funcional del promotor fue el siguiente paso en el estudio de la regulación de la expresión de *rab28* (Busk and Pages 1997). Se han encontrado en el promotor mínimo inducible por

Introducción

ABA de *rab28* 4 elementos importantes para su regulación por ABA: 2 elementos ABRE, ABRE A y ABRE B, un elemento semejante al GRA descrito en el promotor del gen de *rab17* (Bust et al 1997) y una secuencia CE3 idéntica a la descrita en el promotor del gen *HVA1* de cebada (Shen et al 1996, figura ñ). Estas cajas demostraron ser funcionales en ensayos de expresión transitoria en callos BMS de maíz, en ensayos tipo EMSA con extractos de proteínas nucleares de embrión y en experimentos tipo *footprinting in vivo*. Los resultados de estos experimentos mostraron que VP1 es capaz de transactivar a *rab28*, y que esta activación es cooperativa entre VP1 y ABA. Cuando el gen *rab28* se encuentra inactivo o en el mutante *vp1*, hay proteínas unidas a los ABRE, indicando que su promotor presenta una estructura cromatínica abierta y que VP1 actúa uniéndose a complejos proteína-DNA preformados en el promotor y contactando con la maquinaria basal de transcripción, activando así la expresión de *rab28* (Hill et al 1996). La proteína EmBP-1 interacciona con la histona H1, sugiriendo que esta proteína o otras relacionadas podrían ser las responsables de mantener la estructura de la cromatina abierta en los promotores con cajas ABRE (Niu et al 1996). Las protecciones observadas en las cajas ABRE en los experimentos de *footprinting in vivo* indican que las proteínas unidas son miembros de la familia bZIP.



Figura ñ. Secuencias de los elementos de respuesta a ABA en el promotor de *rab28* mínimo inducible por ABA. Los elementos se señalan con cajas. La numeración es relativa al punto de inicio de la transcripción. Referencia Busk and Pagès 1997.

Se ha descrito en la literatura la importancia del control combinatorial en la expresión de genes inducidos por ABA. El primer ABRE que ha sido identificado se encuentra en el promotor del gen *Em* (Gultinan et al 1990). A este elemento se une específicamente una proteína bZIP llamada EmBP-1, la cual forma parte de un complejo DNA-proteína mayor, que incluye a VP1 y a las proteínas GF14 (proteínas 14-3-3). Aunque VP1 no interacciona directamente con el ABRE es capaz de transactivar el promotor del gen *Em* a través de la interacción con otras proteínas, como EmBP-1 (McCarty et al 1991, Vasil et al 1995). Las proteínas GF14 tampoco interaccionan con el DNA, pero si lo hacen con EmBP-1 y con VP1, y podrían tener una función estructural dentro del complejo DNA-proteína de respuesta al ABA (Shultz et al 1998).

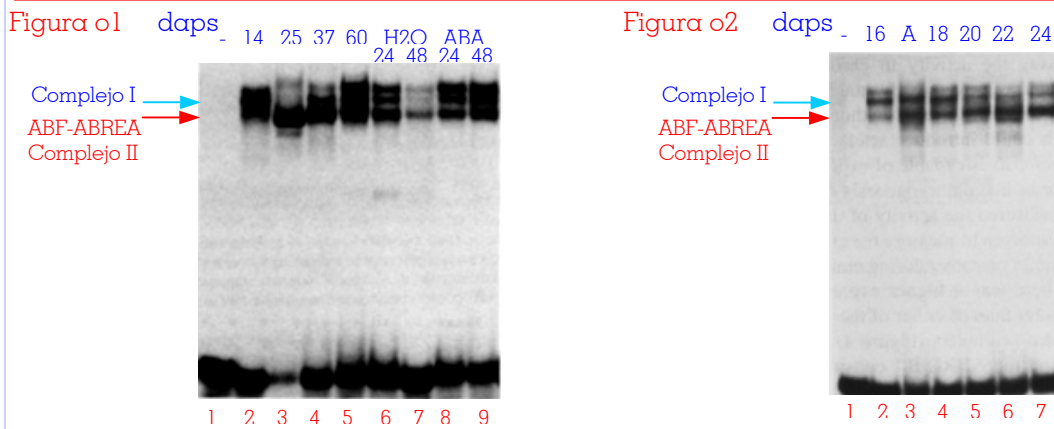
En el apartado 1.3.1 se ha hecho referencia a la regulación de la expresión de los genes *Em* y *rab28* durante el desarrollo embrionario. Los dos genes se regulan de manera muy parecida, y para la expresión génica de *rab28* también se tiene datos de que la proteína VP1 es muy importante. Es posible que el control combinatorial sea muy importante en la regulación de la expresión de *rab28*, y que participen también las proteínas GF14. Los experimentos de *footprinting in vivo* indican que las protecciones observadas en las cajas ABRE corresponden a proteínas bZIP, aunque no sabemos qué proteína o proteínas bZIP participan.

Las observaciones descritas hasta ahora indican que *VP1* es necesario pero no suficiente para la expresión de *rab28* regulada por el desarrollo embrionario. Aunque *VP1* se expresa en el embrión a los 10 dap (McCarty et al 1991), el mRNA de *rab28* no se detecta en el embrión antes de los 20 dap. El ABA está también involucrado en la inducción de *rab28*, pero comparando la expresión del gen en embriones salvajes y en mutantes deficientes de ABA no hay una correlación clara entre los niveles de ABA y la expresión de *rab28* (Pla et al 1991). Todos estos datos sugieren que un factor regulado por el desarrollo es el inductor primario de genes que se expresan durante la embriogénesis tardía. Se ha denominado *postabscission factor* (Hughes and Galau 1991, Giraudat et al 1994). En ensayos con extractos de proteínas nucleares de embriones de diferentes etapas de desarrollo se ha detectado una actividad de unión al ABRE A que se correlaciona con la expresión de *rab28* en la embriogénesis. Esta actividad se ha denominado ABF (*ABRE binding factor*, Busk and Pages 1997), y aparece en extractos de proteínas de embrión de 25 dap, y se mantiene hasta el final de la embriogénesis, desapareciendo durante la germinación aunque se mantiene con un tratamiento con ABA (figura 01 y 02). ABF también se une a ABRE B aunque esta unión es más débil, lo que está de acuerdo con los resultados observados en los *footprints in vivo*, donde la protección en ABRE A era más fuerte.

De acuerdo con los *footprints*, la actividad ABF incluiría proteínas de la familia de factores de transcripción bZIP. La correlación del nivel de mRNA de *rab28* con la actividad de ABF, y no con la actividad de *VP1*, sugiere que la unión de ABF al promotor de *rab28* es un prerequisite para la estimulación de la transcripción por *VP1* (figura 03). La desaparición de ABF en la germinación sugiere que es específico de embrión. Este factor específico de embrión podría ser el homólogo en maíz de la proteína EmBP-1 de trigo. Además, ABF y EmBP-1 de trigo comparten una afinidad mayor por la caja ABRE A que por ABRE B (Niu and Guiltinan 1994). En los ensayos de *footprinting in vivo* realizados con el mutante *vp1* las protecciones en las cajas ABRE obtenidas no cambian cuando se induce la expresión de *rab28* con tratamiento con ABA. Esto sugiere que el ABA y *VP1* regulan la expresión de *rab28* por modificación de un complejo preformado en el promotor. El ABA podría estimular la transcripción de *rab28* activando a un factor de transcripción que participase en el enhanceosoma que regula la expresión de este gen o modificando post-traduccionalmente a las proteínas que lo componen cuando el gen está inactivo. Una modificación post-traduccional podría consistir en cambios en el estado de fosforilación de estas proteínas, ya que tanto fosfatasa como quinasas participan en la cadena de transducción de la señal en respuesta a ABA y afectan la expresión de genes inducidos por esta hormona (figura 03).

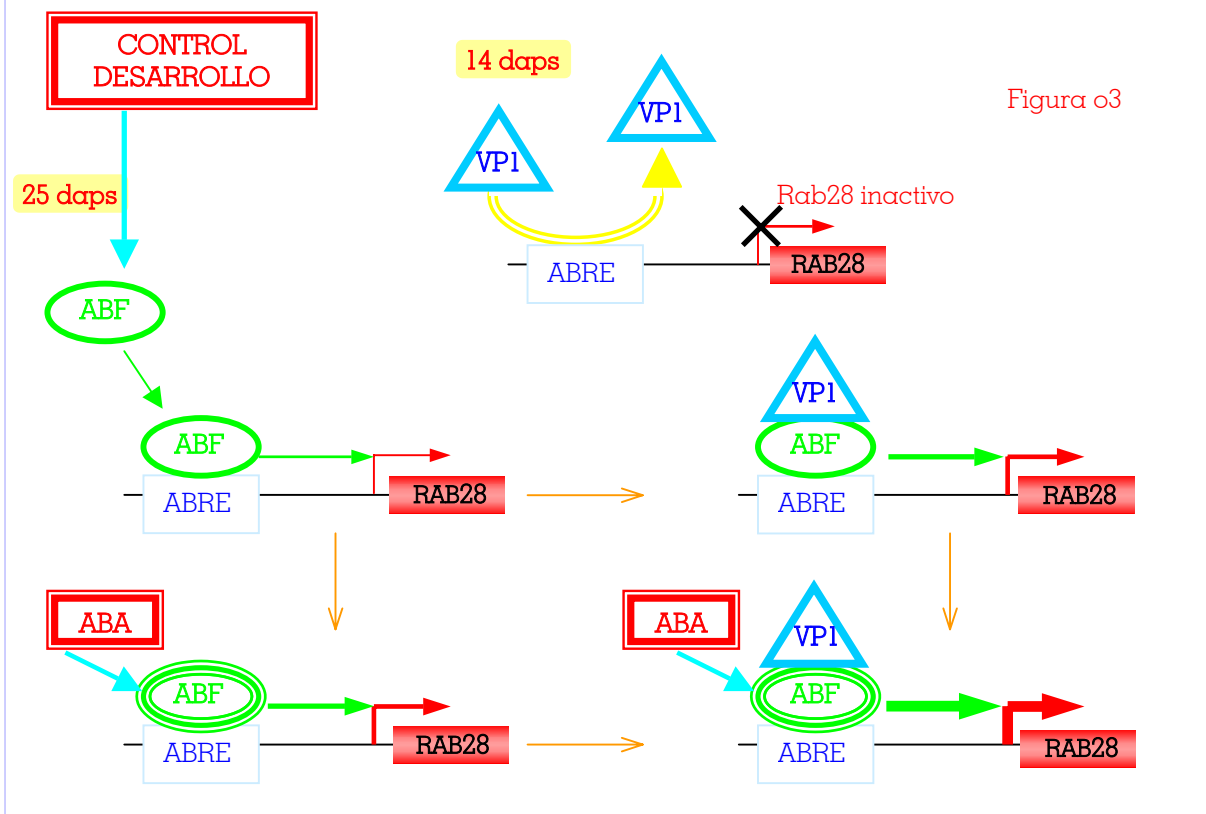
Todos los resultados indican que la modificación de un complejo proteína-DNA preformado en el promotor de *rab28*, que se mantiene durante el desarrollo embrionario independientemente de la actividad transcripcional del gen, es un mecanismo de control importantísimo en la inducción de la transcripción de *rab28* en respuesta al desarrollo embrionario y al ABA.

Figuras o1 y o2. Diferente movilidad de los complejos proteína-ABREA durante el desarrollo embrionario y por tratamiento con ABA. La numeración de los carriles se indica en la parte inferior. **Figura o1:** Los extractos de los carriles 6-10 son de embriones de 60 dap incubados 24 h y 48 h con H₂O o ABA 100 μ M. **Figura o2:** Carril3: Extracto de embriones de 16 dap tratados 24h con ABA 100 μ M.



Las figuras muestran los complejos proteína-ABRE obtenidos antes y después de la inducción de rab28, los cuales tienen diferente movilidad. Una interpretación es que diferentes proteínas forman los complejos cuando el gen está inactivo y cuando está activo. Otra interpretación se basa en que los complejos parecen estar relacionados entre ellos de manera que cuando uno disminuye su intensidad aumenta la intensidad del otro, lo que sugiere que un complejo se forma por modificación del anterior (flechas rojas y azules). El complejo ABF-ABREA se indica con una flecha roja (también denominado complejo II).

Figura o3. Esquema de la activación de rab 28 mediada por el desarrollo y por ABA. VP1 y ABA estimulan la transcripción a través de un complejo DNA-proteína preformado en el ABRE. A los 14 dap VP1 está presente pero no se une a los ABRE y rab28 no se expresa. A los 25 dap ABF se activa por el programa de desarrollo y se une a los ABRE, permitiendo la interacción de VP1 con el promotor de rab28 a través de la interacción con ABF, con otras proteínas que forman parte del enhanceosoma o con el DNA.



Figuras o1-o3. Activación de rab28 por el desarrollo y en respuesta a ABA. (Ref: Busk and Pagès 1997, Busk et al 1999).

Estudios previos definieron 4 elementos *cis* en la región mínima del promotor de *rab28* inducible por ABA involucrados en esta regulación. Estos elementos son ABRE A, GRA, CE3 y ABRE B. Ensayos EMSA utilizando la región citada y extractos embrionarios y vegetativos sugerían una regulación diferencial de *rab28* en ambos tipos de tejidos. Los estudios de expresión de *rab28* en los mutantes *vivíparous-1* y *vivíparous-2* reafirmaban esta posible regulación diferencial. La caracterización funcional del promotor fue el siguiente paso. Ensayos de *footprinting in vivo* en embriones de maíz y en tejido vegetativo indicaron que los 4 elementos *cis* del promotor tenían proteínas unidas de manera constitutiva, y que las protecciones observadas sobre los ABRE correspondían a proteínas de la familia bZIP o *basic leuzine-zipper*.

La actividad de *rab28* durante la embriogénesis se corresponde con la actividad de unión al ABRE denominada ABF (o *ABRE Binding Factor*), en la que posiblemente estén involucradas proteínas de la familia bZIP.

La finalidad de este trabajo es el aislamiento de factores bZIP que pudieran estar involucrados en la regulación de *rab28* en tejidos embrionarios y vegetativos, así como determinar su importancia en la actividad de *rab28* en estos tejidos.

Para ello nos planteamos 4 objetivos:

- 1) Aislamiento de factores bZIP de tejidos embrionarios y vegetativos.
- 2) Estudio del patrón de expresión de estos factores bZIP aislados.
- 3) Análisis de la interacción de estos factores con los elementos ABRE presentes en el promotor del gen *rab28* mediante ensayos *in vitro* e *in vivo*.
- 4) Estudio de los mecanismos de modulación de la actividad de los factores bZIP aislados.

3.1. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE EmBP-2 Y ZmBZ

3.1.1. Aislamiento de Zm1 y Zm2 mediante la técnica de RT-PCR

La estrategia seguida para el aislamiento de los factores de transcripción presentados en este trabajo se basa en la técnica del RT-PCR. Se diseñaron dos oligonucleótidos degenerados, basados en el elemento bZIP muy conservado y característico de los factores de transcripción de esta familia, comparando las secuencias proteicas de los factores EmBP-1 de cebada, EmBP-1 de trigo y OsBZ8 de arroz. Los aminoácidos conservados elegidos para el diseño de los oligonucleótidos fueron aquellos que presentaran la menor variabilidad en los codones que los codificaban. Se tuvo en cuenta además el codón *usage* del genoma de maíz (NcAcRes. 1993, 21, n°23, pg 5297).

En la PCR se ha utilizado como molde el cDNA usado para la elaboración de dos genotecas de maíz, una de embrión seco y otra de hojas de plántulas de 5 días después de la germinación (d.a.g.) estresadas hídricamente durante 3 h. Se obtuvieron 4 secuencias de 90 pb, las cuales se denominaron Zm1-4: Zm1 y Zm2 provienen de embrión seco y Zm3 y Zm4 provienen de hoja estresada. En la figura 1 se indican las secuencias de los oligos degenerados diseñados y las secuencias aisladas en la RT-PCR.

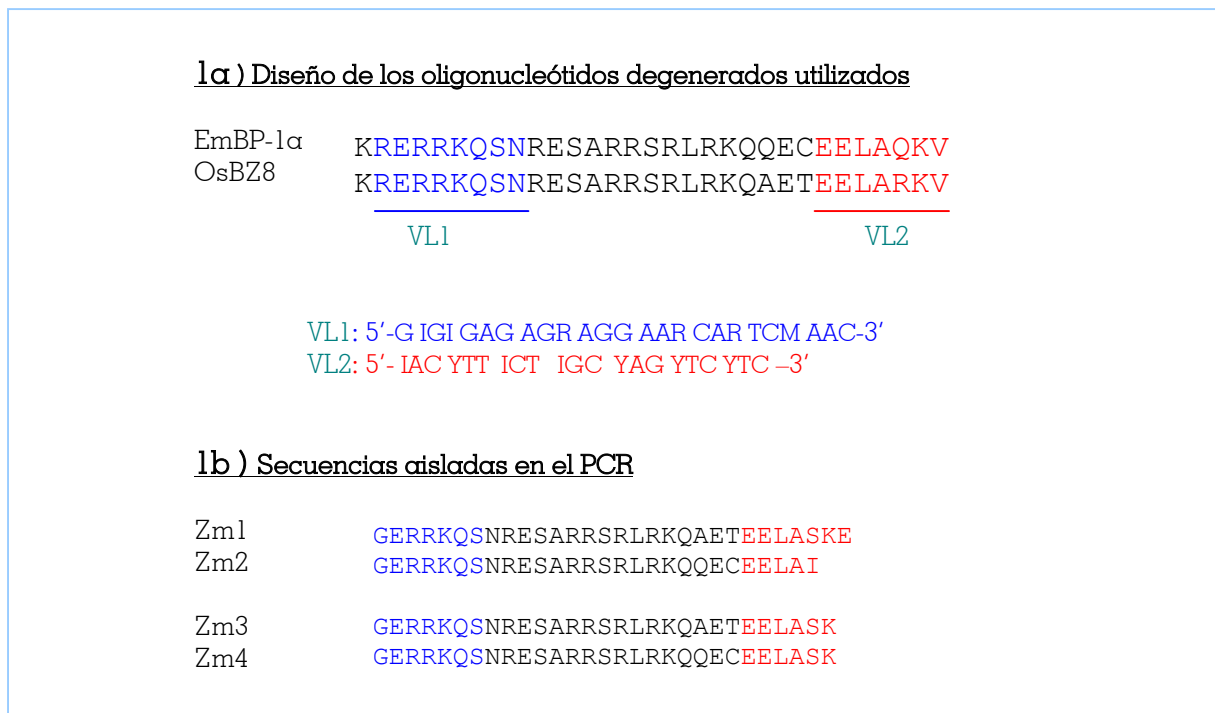


Figura 1. Diseño de los oligonucleótidos degenerados, VL1 y VL2, a partir de los elementos bZIP de las proteínas EmBP-1 y OsBZ8 y secuencias aisladas en el PCR. Zm1 y 2 se han aislado en embrión seco y Zm3 y 4 en hoja estresada. En la figura 1a) las bases de los oligos representan: I=G o C, Y=T o C, R=A o G, M=C o A.

Estas secuencias Zm1-4 se analizaron con el programa informático BLAST, obteniéndose homologías muy altas con los dominios básicos de proteínas de la familia bZIP, indicando que los oligos funcionan correctamente. Debido al alto grado de conservación de este dominio no se pudo

determinar con que miembro de la familia presentaban mayor homología nuestras secuencias, como indican los valores en la tabla I.

Secuencias aisladas de embrión seco

Secuencia Zm1

Organismo	Secuencia	Nº acceso	Identidad	Positivos	Score	Probabilidad
<i>Catharantus roseus</i>	GBF1	AF084971	96%	96%	54	5.00E-07
<i>Brassica napus</i>	GBF1	U27108	96%	96%	54	6.00E-07
<i>Phaseolus vulgaris</i>	ROM2	U41817	96%	96%	54	6.00E-07
<i>Brassica napus</i>	GBF2	U27107	96%	96%	54	6.00E-07
<i>Oryza sativa</i>	OsBZ8	U42208	96%	96%	54	6.00E-07
<i>Glycine max</i>	GBF2b	L01449	96%	96%	54	6.00E-07
<i>Glycine max</i>	GBF2a	L01448	96%	96%	54	6.00E-07
<i>A. thaliana</i>	GBF3	U51850	96%	96%	54	6.00E-07
<i>Zea mays</i>	GBF1	U10270	89%	99%	52	2.00E-06

Secuencia Zm2

Organismo	Secuencia	Nº acceso	Identidad	Positivos	Score	Probabilidad
<i>Triticum aestivum</i>	EmBP1	U07933	100%	100%	54	5.00E-07
<i>Zea mays</i>	EmBP1	Y15165	100%	100%	54	5.00E-07
<i>Hordeum vulgare</i>	EmBP1	X98747	100%	100%	54	5.00E-07
<i>Triticum aestivum</i>	HALF1	D64051	96%	99%	53	1.00E-06

Secuencias aisladas de hoja estresada

Secuencia Zm3

Organismo	Secuencia	Nº acceso	Identidad	Positivos	Score	Probabilidad
<i>Catharantus roseus</i>	GBF	AF084971	96%	96%	54	5,00E-07
<i>Brassica napus</i>	GBF1	U27108	96%	96%	54	6,00E-07
<i>Glycine max</i>	GBF2b	L01449	96%	96%	54	6,00E-07
<i>A. thaliana</i>	GBF3	U51850	96%	96%	54	6,00E-07

Secuencia Zm4

Organismo	Secuencia	Nº acceso	Identidad	Positivos	Score	Probabilidad
<i>Triticum aestivum</i>	EmBP1	M62893	96%	96%	54	6,00E-07
<i>Triticum aestivum</i>	bZIP	U10466	96%	96%	54	6,00E-07
<i>Triticum aestivum</i>	HBP-1a	D12919	96%	96%	54	6,00E-07
<i>Hordeum vulgare</i>	EmBP1	X98747	96%	96%	54	6,00E-07
<i>Zea mays</i>	EmBP1	Y15165	96%	96%	53	8,00E-07
<i>Triticum aestivum</i>	HALF1	D64051	96%	99%	53	1,00E-06

Tabla I. Comparación de las secuencias obtenidas en el PCR con otras proteínas de la familia bZIP. Se indica el organismo, la proteína homóloga y su número de acceso del Genbank, el valor de % de aminoácidos idénticos y % de aminoácidos con cambios conservativos, y valores de *score* y probabilidad. Estos valores los proporciona el programa BLAST y ayudan en la interpretación de las comparaciones de secuencias, siendo más favorables valores altos de *score* y bajos de probabilidad.

Resultados

Las secuencias Zm1-4 se han alineado con las proteínas con las que presentan mayor homología para comprobar que contienen los aminoácidos del dominio básico más conservados en esta familia de factores. En la figura 2 se muestra un alineamiento realizado con el programa ClustalW de comparación de secuencias.

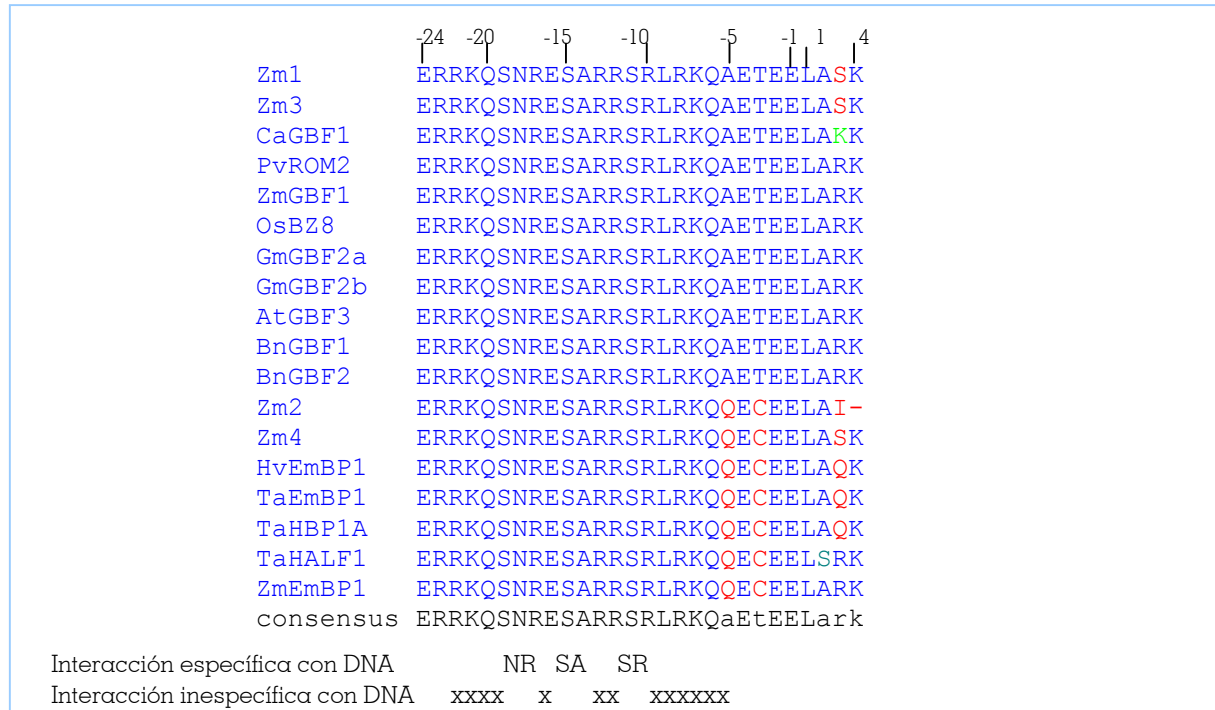


Figura 2. Comparación de los dominios básicos de Zm1-4 con otros de otras proteínas conocidas de la familia de las bZIP. Se ha utilizado para la comparación los dominios básicos y la región puente hasta la primera leucina del dominio LZD (cremallera de leucinas). La nomenclatura utilizada en negro en la parte superior se describió por Suckow et al (1993). Los aminoácidos conservados se indican en azul, los cambios conservativos en verde y los no conservativos en rojo. La secuencia consenso se indica al final en color negro. Los aminoácidos que contactan con el DNA de manera específica e inespecífica se señalan en negro en la parte inferior (ver introducción).

3.1.2. Aislamiento de ZmBZ y EmBP-2 mediante el cribado de una genoteca de embrión seco

Uno de nuestros objetivos era conocer qué factores bZIP regulan la expresión del gen rab28 en tejido embrionario y en tejido vegetativo y por este motivo las secuencias aisladas nos parecieron interesantes. Las diferencias existentes entre las secuencias de embrión y de hoja serán debidas probablemente al carácter degenerado de los oligos. Se utilizaron las secuencias Zm1 y Zm2 como sondas en un cribado de una genoteca de embrión seco. El número de fagos analizados en cada cribado fue del orden de 6×10^5 .

Con esta técnica aislamos dos secuencias:

- ZmBZ con 820 pb, utilizando como sonda Zm1.
- EmBP-2 con 880 pb, utilizando como sonda Zm2.

Análisis posteriores realizados con el programa BLAST indicaron que las proteínas con las que las secuencias aisladas presentaban mayor homología eran OsBZ8 de arroz, con un 68 % homología a nivel de proteína (Nakagawa et al 1996) y EmBP-1a de trigo, con un 64 % homología a nivel de proteína (Gultinan et al 1990), respectivamente. La comparación de las secuencias aisladas con estas proteínas indicó que teníamos proteínas parciales en las que faltaba el extremo N terminal, donde probablemente se localizaría el dominio de activación característico de las proteínas de esta familia.

Para conseguir la secuencia completa de ZmBZ se siguieron dos aproximaciones, un cribado de la genoteca de hoja estresada y el método denominado RACE (*Rapid Amplification of CDNA Ends*). En el cribado de la genoteca de hoja estresada se analizaron 7×10^6 fagos utilizando como sonda la secuencia ZmBZ parcial. Se aisló una secuencia completa, que se denominó ZmBZb, porque era idéntica a ZmBZ con la única diferencia de una inserción de 111 pb en la base 230 de la secuencia ZmBZ. Paralelamente con el RACE se obtuvo el extremo 5' de ZmBZ, aislada del embrión, que resultó ser idéntico a ZmBZb (aislada en el cribado de la genoteca de hoja estresada). El hecho de que las secuencias ZmBZ y ZmBZb fueran idénticas con excepción de la inserción de 111pb nos hizo pensar que podrían estar codificadas por el mismo gen. Apoyando esta hipótesis, el análisis de esta secuencia nucleotídica de 111 pb muestra que está flanqueada por dos residuos de G, lo que se ha descrito como posibles extremos de las secuencias intrónicas. Estas dos posibles variantes de *splicing* podrían encontrarse en el tejido formando parte de la colección de mRNAs de la célula o podría tratarse de un proceso de maduración incompleta del mRNA de ZmBZb. En las figuras 3 y 4 se muestran estas secuencias. La secuencia proteica deducida a partir de la secuencia de DNA de ZmBZb nos muestra una proteína más corta que ZmBZ al encontrarse una señal de stop en la inserción. Hemos utilizado el método RACE para buscar la secuencia completa de EmBP-2, y hemos realizado el mismo cribado en hoja estresada descrito para ZmBZ, pero no hemos conseguido la secuencia completa. El parcial se representa en la figura 5.

En las figuras se señala: el elemento bZIP: En color rojo el dominio básico (con la NLS en un rectángulo rojo); en verde claro la región puente y en verde oscuro el dominio de cremallera de leucinas. Se han señalado también otros dominios hipotéticos (el dominio de activación en azul oscuro subrayado y otra NLS en azul claro), los cuales están ya descritos en otras proteínas de la familia bZIP.

Análisis con el programa GCG muestran que las secuencias nucleotídicas EmBP-2 y ZmBZ presentan una similitud del 43% y una identidad del 43% , y las secuencias proteicas presentan una similitud del 40,8 % y una identidad del 35,6 %. La homología existente entre las dos secuencias proteicas es muy alta en el dominio básico, con una similitud del 90,6 % y una identidad del 84,4 %.

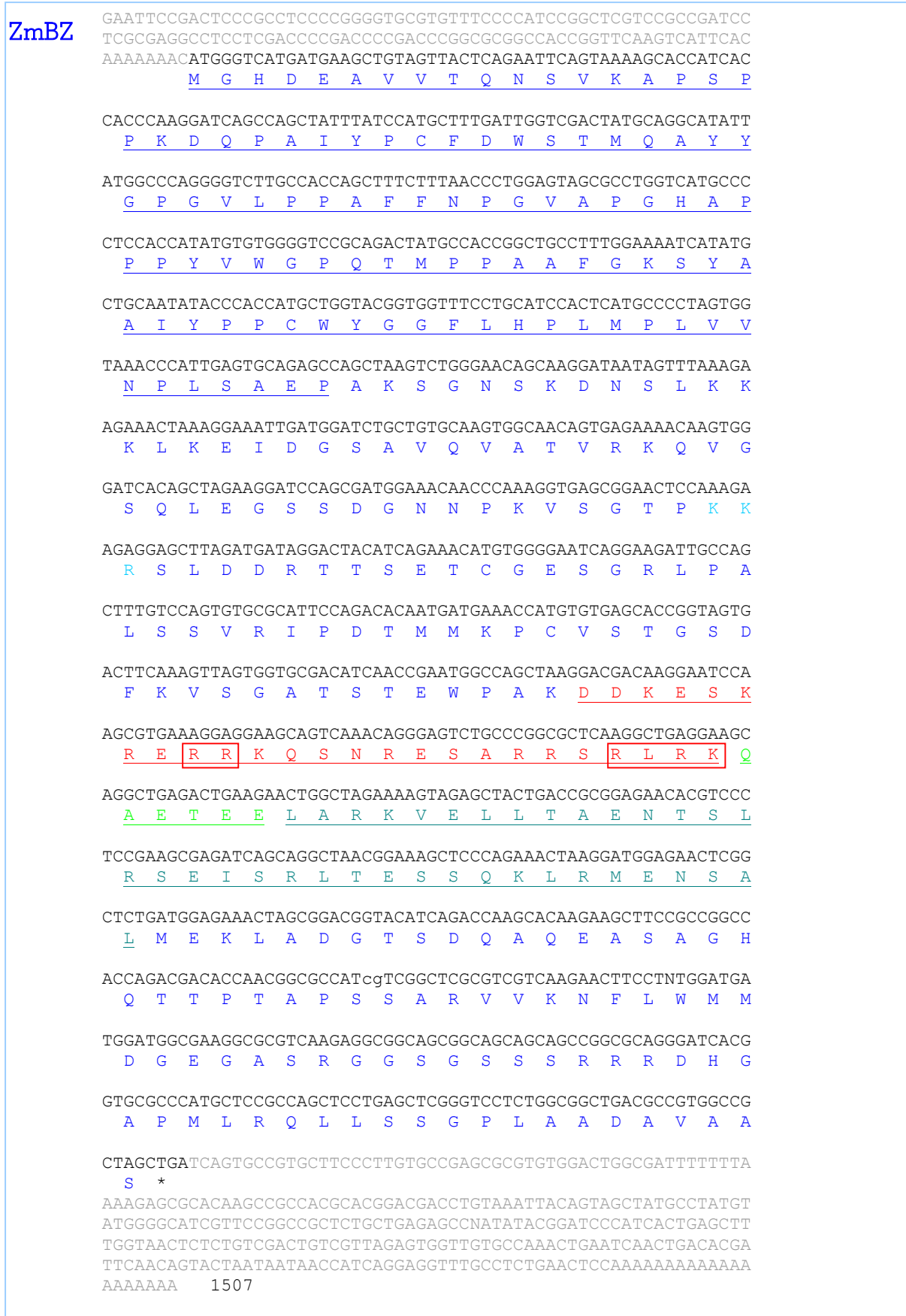


Figura 3. Secuencia nucleotídica y aminoácídica deducida de ZmBZ. El código de colores se explica en el texto.

ZmBZb

GAATTCGACTCCCGCCTCCCGGGGTGCGTGTTCCTCCCATCCGGCTCGTCCGCCGATCC
 TCGCGAGGCCTCCTCGACCCCGACCCCGACCCGGCGCGGCCACCGGTTCAAGTCATTCCAC
 AAAAAAACATGGGTTCATGATGAAGCTGTAGTTACTCAGAATTCAGTAAAAGCACCATCAC
M G H D E A V V T Q N S V K A P S P
 CACCCAAGGATCAGCCAGCTATTTATCCATGCTTTGATTGGTCGACTATGCAGGCATATT
P K D Q P A I Y P C F D W S T M Q A Y Y
 ATGGCCAGGGTCTTGCCACCAGCTTTCTTTAACCTGGAGTAGCGCCTGGTCATGCC
G P G V L P P A F F N P G V A P G H A P
 CTCCACCATATGTGTGGGTCCGCAGACTATGCCACCGGCTGCCTTTGGAAAATCATATG
P P Y V W G P Q T M P P A A F G K S Y A
 CTGCAATATACCCACCATGCTGGTACGGTGGTTTCTGCATCCACTCATGCCCTAGTGG
A I Y P P C W Y G G F L H P L M P L V V
 TAAACCCATTGAGTGCAGAGCCAGCTAAGTCTGGGAACAGCAAGGATAATAGTTTAAAGA
N P L S A E P A K S G N S K D N S L K K
 AGAACTAAAGGAAATTGATGGATCTGCTGTGCAAGTGGCAACAGTGAGAAAACAAGTGG
K L K E I D G S A V Q V A T V R K Q V G
 GATCACAGCTAGAAGGATCCAGCGATGGAAACAACCCAAAGGTGAGCGGAACTCCAAGA
S Q L E G S S D G N N P K V S G T P K K
 AGAGGAGCTTAGATGATAGGACTACATCAGAAACATGTGGGAATCAGGAAGATTGCCAG
R S L D D R T T S E T C G E S G R L P A
 CTTTGTCCAGTGTGCGCATTCAGACACAATGATGAAACCATGTGTGAGCACCGGTAGTG
L S S V R I P D T M M K P C V S T G S D
 ACTTCAAAGTTAGTGGTGCACATCAACCGAATGGCCAGCTAAGGACGACAAGGAATCCA
F K V S G A T S T E W P A K D D K E S K
 AGCGTGAAAGGAGGAAGCAGTCAAACAGGGAGTCTGCCGGCGCTCAAGGCTGAGGAAGC
R E R R K Q S N R E S A R R S R L R K Q
 AGGCTGAGACTGAAGAACTGGCTAGAAAAGTAGAGCTACTGACCGCGGAGAACACGTCCC
A E T E E L A R K V E L L T A E N T S L
 TCCGAAGCGAGATCAGCAGGCTAACGGAAGCTCCCAGAACTAAGGATGGAGAACTCGG
R S E I S R L T E S S Q K L R M E N S A
 CTCTGATGGTACTTACATCCTTGAACGGCGGCCATGCATAAACTCTTGTGACGTTCTGT
L M V L T S L N G G H A *
 TTCCTTCGAACAACGAACATGCCCAACCCCTCCCTCACGCCAGTCGCATCGCATCACAGG
 AGAACTAGCGGACGGTACATCAGACCAAGCACAGAAGCTTCCGCCGGCCACCAGACGA
 CACCAACGGCGCCATCGTCCGGTCCGCTCGTCAAGAACTTCTCTGGATGATGGATGGCG
 AAGGCGCGTCAAGAGGCGGCAGCGGCAGCAGCCGGCGCAGGGATCACGGTGCGCCCA
 TGCTCCGCCAGTCTTGAGCTCGGGTCTCTGGCGGCTGACGCCGTGGCCGCTAGCTGAT
 CAGTGCCGTGCTTCCCTTGTGCCGAGCGCGTGTGGACTGGCGATTTTTTTTAAAAGAGCGC
 ACAAGCCGCCACGCACGGACGACCTGTAAATTACAGTAGCTATGCCTATGTATGGGGCAT
 CGTTCGGCCGCTCTGCTGAGAGCCGATATACGGATCCATCACTGAGCTTTGGTAACCTC
 TCTGTGACTGTGCTTAGAGTGGTTGTGCCAACTGAATCAACTGACACGATTTCAGCAGT
 ACTAATAATAACCATCAGGAGGTTTGCCTCTGAACTCCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 1621

Figura 4. Secuencia nucleotídica y aminoacídica deducida de ZmBZb. El código de colores se explica en el texto. Con el recuadro amarillo se señala la inserción de 111 pb con las G flanqueantes.



Figura 5. Secuencia nucleotídica y aminoacídica de EmBP-2. El código de colores se explica en el texto.

3.1.3. Evaluación del número de copias de los genes EmBP-2 y ZmBZ

Hemos estudiado los genes que codifican para las proteínas ZmBZ, ZmBZb y EmBP-2 así como la existencia de genes relacionados que podrían formar parte de una familia multigénica, mediante el análisis tipo Southern.

En la figura 6 se muestra un análisis Southern utilizando como sonda una parte de la secuencia de ZmBZ, que incluye el final de la zona codificante y el 3'. El DNA genómico se ha digerido con XhoI, SacI y AccI. Las dianas XhoI y SacI no cortan la parte de la secuencia de cDNA usada como sonda. La diana AccI corta 1 vez en esta parte de la secuencia, pero el corte se localiza muy cerca del extremo 5' y probablemente no sea suficiente el marcaje de estas pocas bases para hibridar con el DNA genómico, pudiéndose considerar que esta diana tampoco corta en esta parte de la

secuencia. La diana *AccI* nos da una única banda, y esto parece indicar que no hay dos genes diferentes. Las dos bandas de *SacI* podrían resultar de una diana interna en algún intrón.

En la figura 7 se muestra un análisis Southern usando como sonda la secuencia ZmBZb. Este Southern se ha realizado en condiciones de alta y de baja astringencia (lavados con 0.2 %SSC a 65°C y con 2% SSC a 55°C, respectivamente), obteniéndose en ambos casos las mismas bandas. La diana *EcoRI* nos da una banda. La diana *HindIII* nos da dos bandas, de acuerdo con la localización de esta diana en la mitad de las secuencias. No encontramos diana *XbaI* en las secuencias y las dos bandas resultantes pueden ser debidas a dianas en intrones. No parece que haya genes relacionados porque los dos lavados realizados dan el mismo patrón de bandas.

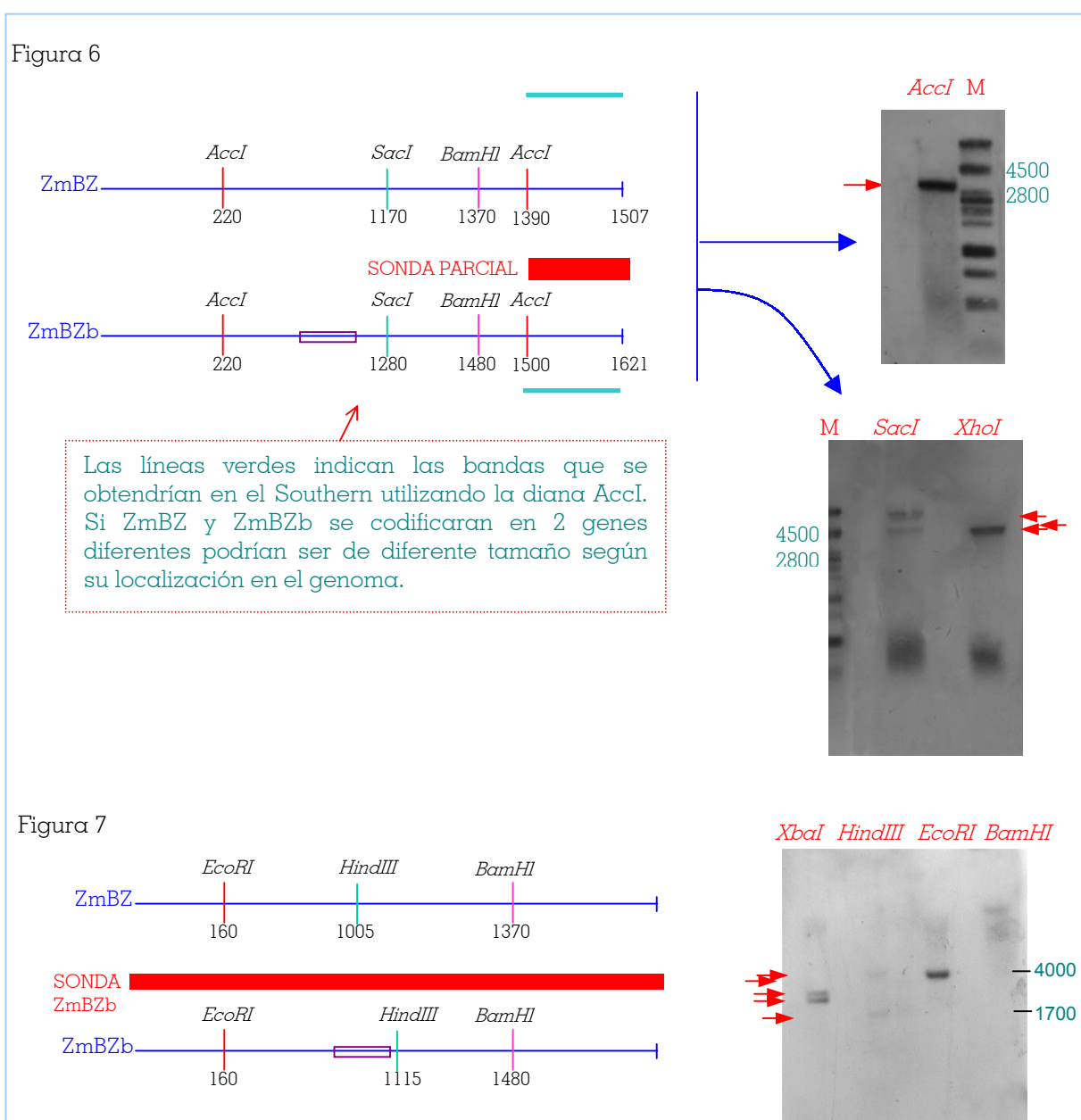


Figura 6 y 7. Ensayos Southern de ZmBZ y ZmBZb. El esquema indica la secuencia de cDNA con la localización de las dianas de restricción utilizadas en las digestiones del DNA genómico. El rectángulo lila de ZmBZb representa la parte de secuencia que no tiene ZmBZ. Las secuencias de cDNA utilizadas como sondas en cada figura se representan con el rectángulo rojo, una parte del codificante y el 3' no codificante de ZmBZ en la figura 6 y toda la secuencia de cDNA de ZmBZb en la figura 7. Los pesos moleculares se indican con números en verde. Las flechas rojas señalan las bandas comentadas en el

Resultados

En la figura 8 se muestra un Southern utilizando la secuencia EmBP-2 como sonda. Se ha realizado también a alta y baja astringencia, obteniéndose el mismo número de bandas. En la figura 9 se muestra un Southern utilizando la secuencia 3' codificante y la 3' UTR de EmBP-2 en condiciones de alta astringencia. Las enzimas utilizadas para la digestión del DNA genómico *EcoRI* y *AccI* cortan una vez el cDNA. Lo que nos sugiere la figura 9 es que EmBP-2 podría estar codificada por un solo gen, aunque lo que esperaríamos es ver 2 bandas, ya que *AccI* corta la secuencia de cDNA. Puede ser que las dos bandas sean de un tamaño muy similar y por eso solo vemos una, o que haya un intrón cerca de la diana *AccI* que contenga otra diana *AccI* con una distancia pequeña entre las dos dianas, originándose un fragmento pequeño de DNA, menor de 500 pb, que podría ser la sombra observada en la figura con ese tamaño. Parece además que existen otros genes relacionados con éste en el genoma de maíz, al observar el patrón de bandas obtenido al utilizar como sonda toda la secuencia EmBP-2.

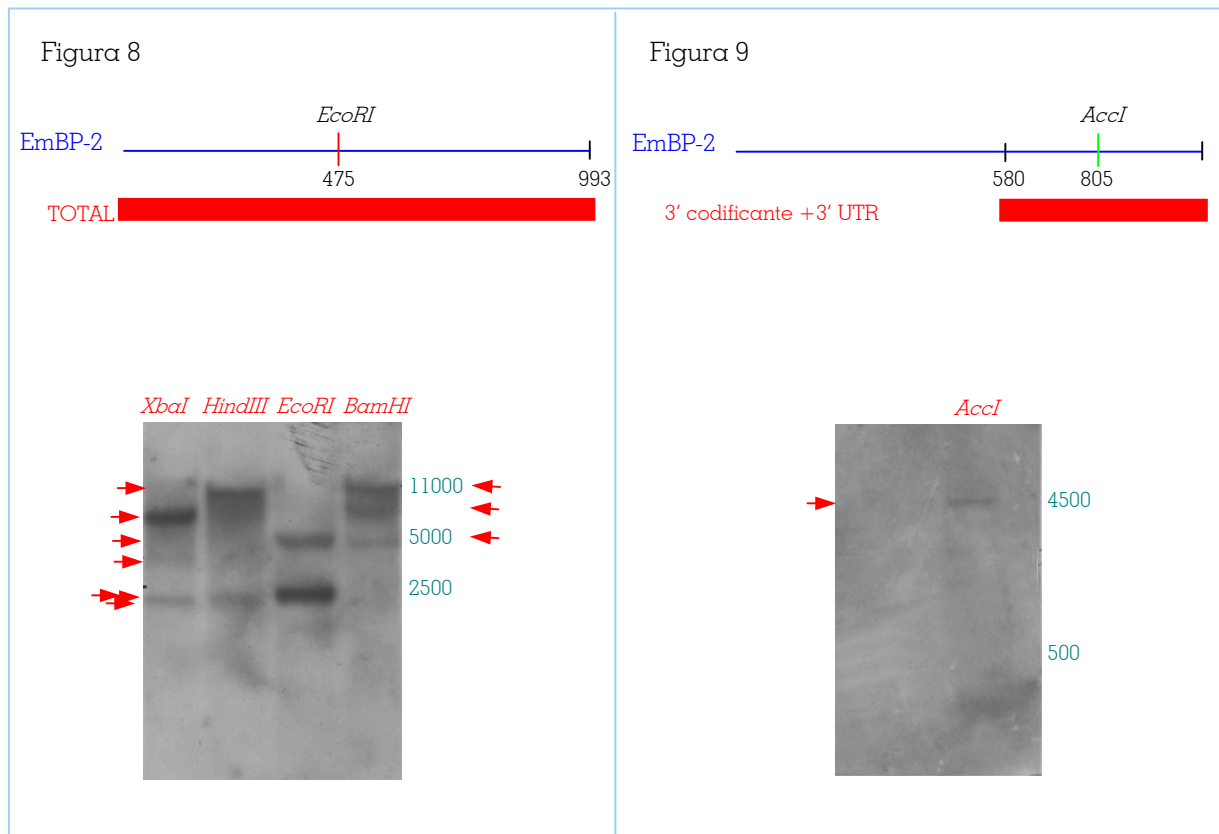


Figura 8 y 9. Ensayos Southern de EmBP-2. El esquema indica la secuencia de cDNA con la localización de las dianas de restricción utilizadas en las digestiones del DNA genómico. Las secuencias de cDNA utilizadas como sondas en cada figura se representan con el rectángulo rojo, toda la secuencia codificante de EmBP-2 en la figura 8 y una parte de la codificante y el 3' no codificante de EmBP-2 en la figura 9. Los pesos moleculares se indican en las imágenes en verde. Las flechas rojas señalan las bandas comentadas en el texto.

Para poder hacer una interpretación de los Southern de las figuras 6 a 9 es necesario realizar más estudios, con el aislamiento de los clones genómicos o mediante una reacción de PCR utilizando oligonucleótidos específicos para estos genes y así conocer su secuencia completa y de manera fiable la existencia o no de otros genes que codifiquen para cada una de los factores.

3.2. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE EmBP-2 Y ZmBZ A NIVEL DE RNA Y PROTEÍNA

3.2.1- Análisis de la transcripción de ZmBZ y EmBP-2 en los diferentes tejidos de maíz

Hemos utilizado la técnica del RT-PCR para determinar el patrón de expresión de los genes que codifican para ZmBZ y EmBP-2. En la reacción de PCR se han utilizado oligonucleótidos específicos para cada factor, localizándose en el caso de ZmBZ en la secuencia de manera que las dos posibles isoformas nos originen bandas de diferente tamaño para así poder diferenciarlas. Se han analizado tejidos de embrión de 20, 30, 40 y 60 dap, y de plántulas de 5 dag (días después de la germinación), en situación control y también sometidas previamente a diferentes tipos de estreses durante 4 horas (ABA 100 μ M, deshidratación, NaCl 250 mM, manitol 400 mM, LiCl 15 mM, 37°C y 4°C). Las condiciones del RT-PCR son semicuantitativas y hay que tenerlo presente en la interpretación del nivel de expresión de los factores en los diferentes tejidos. La figura 10 muestra los resultados obtenidos con este análisis.

Cuando usamos los oligos específicos para EmBP-2 observamos una banda de unos 360pb, que corresponde al tamaño esperado. El gen EmBP-2 se transcribe en tejido embrionario predominantemente, con un ligero aumento de la transcripción hacia el final de la embriogénesis. En el tejido vegetativo se detecta un nivel basal de transcripción, sin observarse ningún incremento significativo cuando la planta está sometida a estrés.

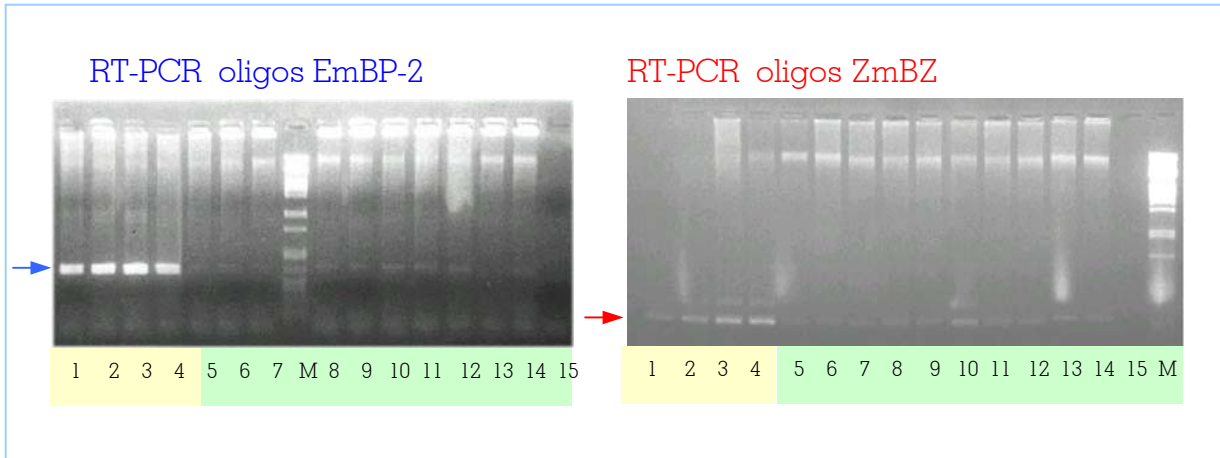


Figura 10. Patrones de transcripción de los dos factores en tejidos embrionarios (fondo amarillo) y vegetativos (fondo verde). Los oligos usados para EmBP-2 son C126 y C128 y para ZmBZ son C19 y C110. Los cDNA moldes de cada PCR son 1: Embrión 20dap; 2: Embrión 30dap; 3: Embrión 40dap; 4: Embrión 60dap; 5: Hoja; 6: Tallo; 7: Raíz; 8: Hoja ABA 100 μ M; 9: Hoja desecada ; 10: Hoja NaCl 250 mM; 11: Hoja manitol 400 mM; 12: Hoja LiCl 15 mM; 13: Hoja 37°C; 14: Hoja 4°C; 15: control negativo; M: marcador λ PstI.

El análisis usando los oligos específicos para ZmBZ tiene como resultado una banda de tamaño de aprox. 300pb. La banda se ha secuenciado y corresponde a ZmBZ. En algunas reacciones se ha obtenido otra banda de 400pb que también hemos secuenciado y ha resultado ser una banda

contaminante. Debido a que el cDNA con el que se ha hecho este análisis ha sido obtenido por transcripción reversa utilizando como iniciador un oligo-dT, encontrar las secuencias ZmBZ y ZmBZb en el tejido nos hubiese indicado la posibilidad de que se tratasen de dos variantes de *splicing* alternativo, pero el no encontrar ZmBZb nos sugiere que la forma ZmBZb obtenida en la librería de hoja estresada era una forma de mRNA inmaduro. El gen ZmBZ se transcribe de manera constitutiva tanto en tejidos embrionarios como vegetativos. En los tejidos embrionarios se produce un ligero incremento en la transcripción hacia el final de la embriogénesis. En el tejido vegetativo no se observa ninguna variación significativa en la expresión de ZmBZ en respuesta a los tratamientos aplicados.

Hemos estudiado también su expresión en la germinación, analizando embriones de 1, 2 y 3 días de germinación (dag). Los embriones de 1 y 2 dag se han tratado 24h con ABA 100 μ M, inhibiendo así el proceso germinativo. Los resultados del PCR se muestran en la figura 11.

La transcripción del gen EmBP-2 disminuye con la germinación. Al tratar las muestras con ABA no se consigue aumentar los niveles de expresión respecto a las muestras control tratadas el mismo tiempo con agua. La transcripción del gen ZmBZ se mantiene constante durante la germinación.

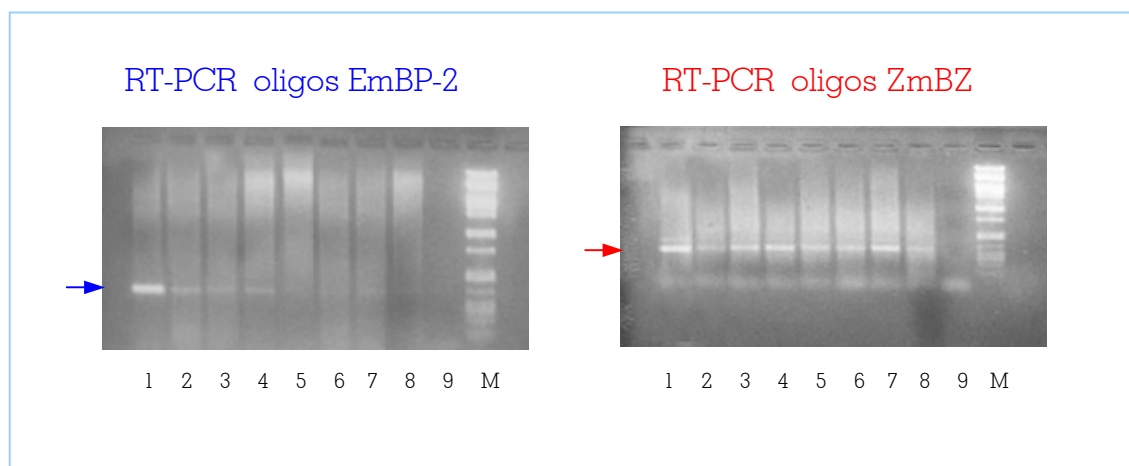


Figura 11. Patrones de transcripción de EmBP-2 y ZmBZ durante la germinación. Los oligos utilizados son los mismos que en la figura 10. Las muestras utilizadas son: 1: Embrión seco; 2: 1 dag; 3: 1 dag+ 24h agua; 4: 1 dag+24h ABA 100 μ M; 5: 2 dag; 6: 2 dag+24h agua; 7: 2 dag+24h ABA 100 μ M; 8: 3 dag; 9: Control negativo; M: marcador λ PstI.

3.2.2- Sobreexpresión de las proteínas EmBP-2 y ZmBZ en E.coli

Con el fin de realizar estudios de acumulación de las proteínas en los diferentes tejidos hemos obtenido anticuerpos contra ellas. Para ello las hemos sobreexpresado y purificado utilizando el vector pET28. Este sistema de sobreexpresión produce proteínas quiméricas añadiendo a la proteína en estudio una cola de 5 histidinas. Los cDNAs parciales de EmBP-2 y ZmBZ aislados de la librería de embrión se clonaron en este vector (tabla 4.4, construcciones 1 y 2). Estas construcciones se utilizaron para transformar células BL21 de E. Coli.

Resultados

La proteína EmBP-2 recombinante consta de 143 aminoácidos que comprenden desde el elemento bZIP hasta su extremo C terminal, a la cual se le han añadido en su extremo N terminal 33 aminoácidos del vector pET28. La proteína resultante tiene 181 aminoácidos y un peso molecular teórico de 20,0 Kda. La proteína ZmBZ recombinante consta de 157 aminoácidos que comprenden desde el elemento bZIP hasta su extremo C terminal, a la cual se han añadido a su extremo N terminal 55 aminoácidos del vector pET28. La proteína quimérica tiene 212 aminoácidos y un peso molecular aproximado de 23,1 Kda.

En la figura 12 se representan los fragmentos de cDNA clonados en los vectores pET28 así como un esquema de las proteínas quiméricas obtenidas.

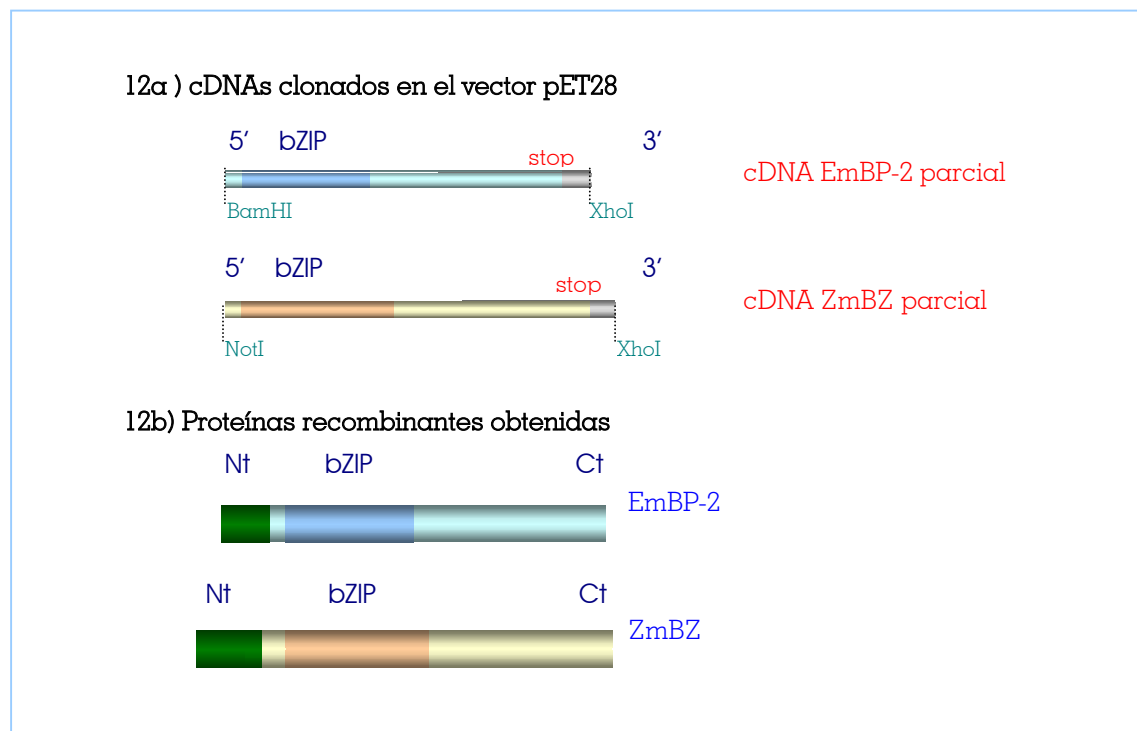


Figura 12. Representación esquemática de las construcciones generadas para la sobreexpresión de las proteínas (figura 12a) y de las proteínas recombinantes (figura 12b). En la representación se señalan los dominios bZIP de las proteínas. 12a) El cDNA de EmBP-2 digerido con BamHI-XhoI se clonó en el vector pET28c digerido con las mismas dianas; El cDNA de ZmBZ digerido con NotI-XhoI se clonó en el vector pET28a digerido con las mismas dianas. 12b) En color verde se señalan los aminoácidos provenientes del vector pET28 (que incluyen las 5 Histidinas).

La inducción de la expresión de las proteínas se realizó a 37°C mediante la adición al medio de cultivo de 1 mM de IPTG. Se analizaron muestras de proteína total del cultivo a diferentes tiempos de inducción mediante Western blot con una sonda comercial específica contra la cola de histidinas conjugada con una peroxidasa denominada *His probe* (Novagen). A las 3 horas se producía una buena inducción, como se puede ver en la figura 13.

El análisis de los extractos proteicos de BL-21 transformadas con la construcción pET28-EmBP2 crecidas 3 y 4 horas con IPTG muestran la inducción de una proteína de un tamaño de 20Kda, que se corresponde con el tamaño teórico esperado para la proteína EmBP-2 recombinante. Esta

banda no se encuentra en las muestras analizadas en paralelo con células BL21 transformadas con el vector pET28 vacío, que se usan como control negativo. En los extractos de células transformadas con la construcción pET28-EmBP-2 sin añadir IPTG al medio se puede observar también la misma proteína. El hecho de que haya inducción antes de la adición de IPTG puede ser debido a un fallo en el mecanismo de represión del promotor del vector. En el Western blot utilizando como sonda el *His probe* se detecta otra banda de 15 Kda que puede ser un producto de degradación de la EmBP-2 recombinante o una reacción del anticuerpo con una proteína de E.coli.

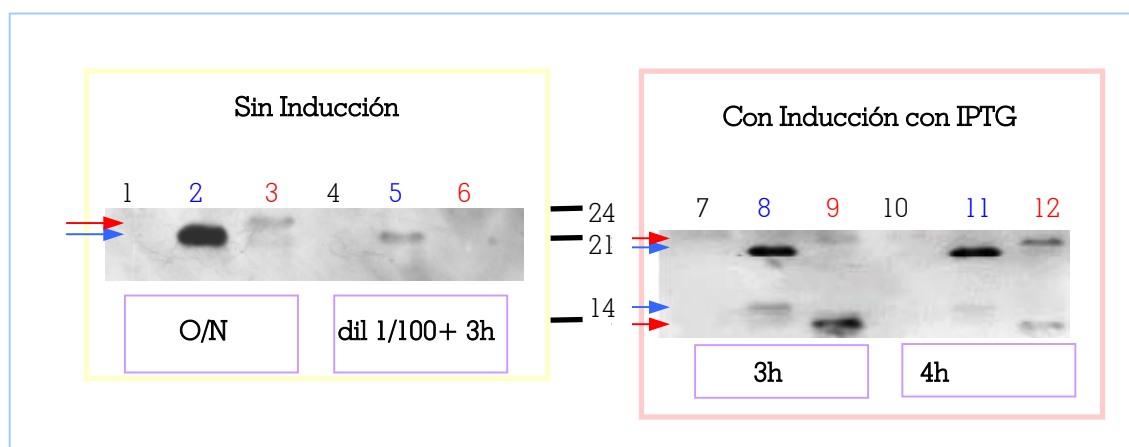


Figura 13. ECL de Western blots de extractos de proteína de E.coli sobreexpresando las proteínas recombinantes EmBP-2 (numeración en azul) y ZmBZ (numeración en rojo). El cuadro amarillo incluye los extractos de E.coli sin inducir y el rosa los inducidos con IPTG 1mM. En el centro se indican los pesos moleculares en Kda. Los números indicados en negro corresponden a los extractos del control negativo. El tiempo de crecimiento de los cultivos se indica en el recuadro lila. Las muestras 4-6 corresponden a una dilución 1/100 del cultivo O/N y 3 horas de crecimiento. Las muestras inducidas son diluciones 1/100 del cultivo O/N crecidas durante 3 horas, y además crecidas con IPTG durante los tiempos de inducción indicados.

Analizando los extractos proteicos de BL-21 transformadas con la construcción pET28-ZmBZ crecidos 3 y 4 horas con IPTG se observa la inducción de 2 proteínas, de 22 y 14 Kda aproximadamente. El tamaño esperado para la proteína recombinante ZmBZ es de 21 Kda, lo que nos sugiere que corresponde a la banda de 22Kda. La proteína de 14 Kda posiblemente sea un producto de degradación, aunque no se puede descartar que también sea alguna reacción cruzada con una proteína de E. coli. Se han realizado ensayos de inducción a 30°C, con diferentes concentraciones de IPTG y a diferentes tiempos de inducción, pero no se ha conseguido evitar lo que parece una degradación de ZmBZ producida por la bacteria. En el cultivo O/N también hay algo de proteína ZmBZ. Estas señales no aparecen en los controles negativos.

Una vez determinadas las condiciones idóneas para la inducción de EmBP-2 y ZmBZ, se procedió a su purificación por cromatografía de afinidad con una resina tipo Sephadex con níquel. El níquel tiene afinidad por los residuos de histidina, y esta afinidad disminuye cuando en el medio hay imidazol. Cuando se pasan por una columna extractos totales de cultivos de BL-21 en los que se han inducido EmBP-2 y ZmBZ recombinantes, éstas interaccionan por la cola de histidinas con el

níquel, quedando así separadas del resto de las proteínas del extracto. La elución de las proteínas se realizó con soluciones con diferente concentración de imidazol. Utilizando la técnica de Western blot de iguales características descritas anteriormente se determinó que las proteínas habían eluido con una concentración de imidazol de 200mM y 250 mM, como se puede observar en la figura 14.

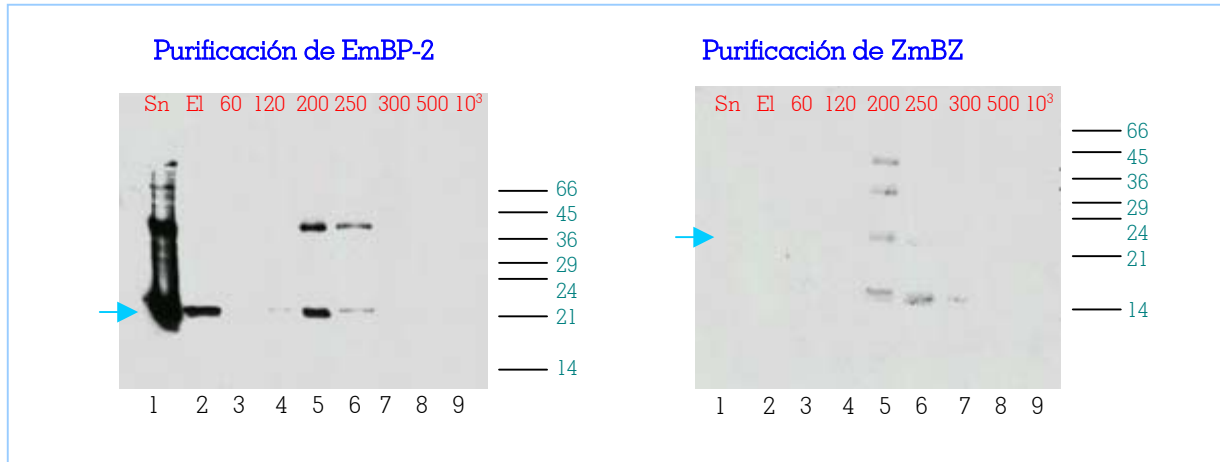


Figura 14. ECL de Western blots de la purificación de las dos proteínas recombinantes. Sn: Solución a purificar en la columna; El: Primer eluyente. Los números superiores indican la concentración de imidazol en mM aplicados a la columna para la elución de las proteínas. Los marcadores de peso molecular se indican en verde en KDa. En las líneas Sn (números 1) se aplicaron 5 μ l de 10 ml totales de solución a purificar. En las demás 15 μ l de 5 ml totales de cada eluyente.

En el Western blot de EmBP-2 aparecen 2 bandas, una de 20 Kda que se corresponde con el tamaño esperado y otra banda de 40 Kda. Debido a que el tamaño de la mayor es del doble de la esperada, se puede pensar que seguramente se trata de la forma dímera que resiste a las condiciones desnaturalizantes del gel.

En el caso de ZmBZ en la fracción de 200 mM de imidazol se observan 4 bandas de tamaños 42, 35, 22 y 14 Kda. El tamaño de las bandas que habíamos observado en la inducción de la proteína eran 22 y 14 Kda, y seguramente que las bandas superiores detectadas en esta fase de la columna corresponden a agregados con diferente número de moléculas. En la fracción de 250 mM detectamos en el Western las bandas de 22 y 14 Kda únicamente.

3.2.3. Características estructurales de las proteínas recombinantes

Utilizando el programa GCG hemos realizado una predicción de la estructura secundaria y perfil hidrofóbico y antigénico de las proteínas recombinantes obtenidas. Los resultados del análisis se muestran en las figuras 15 y 16.

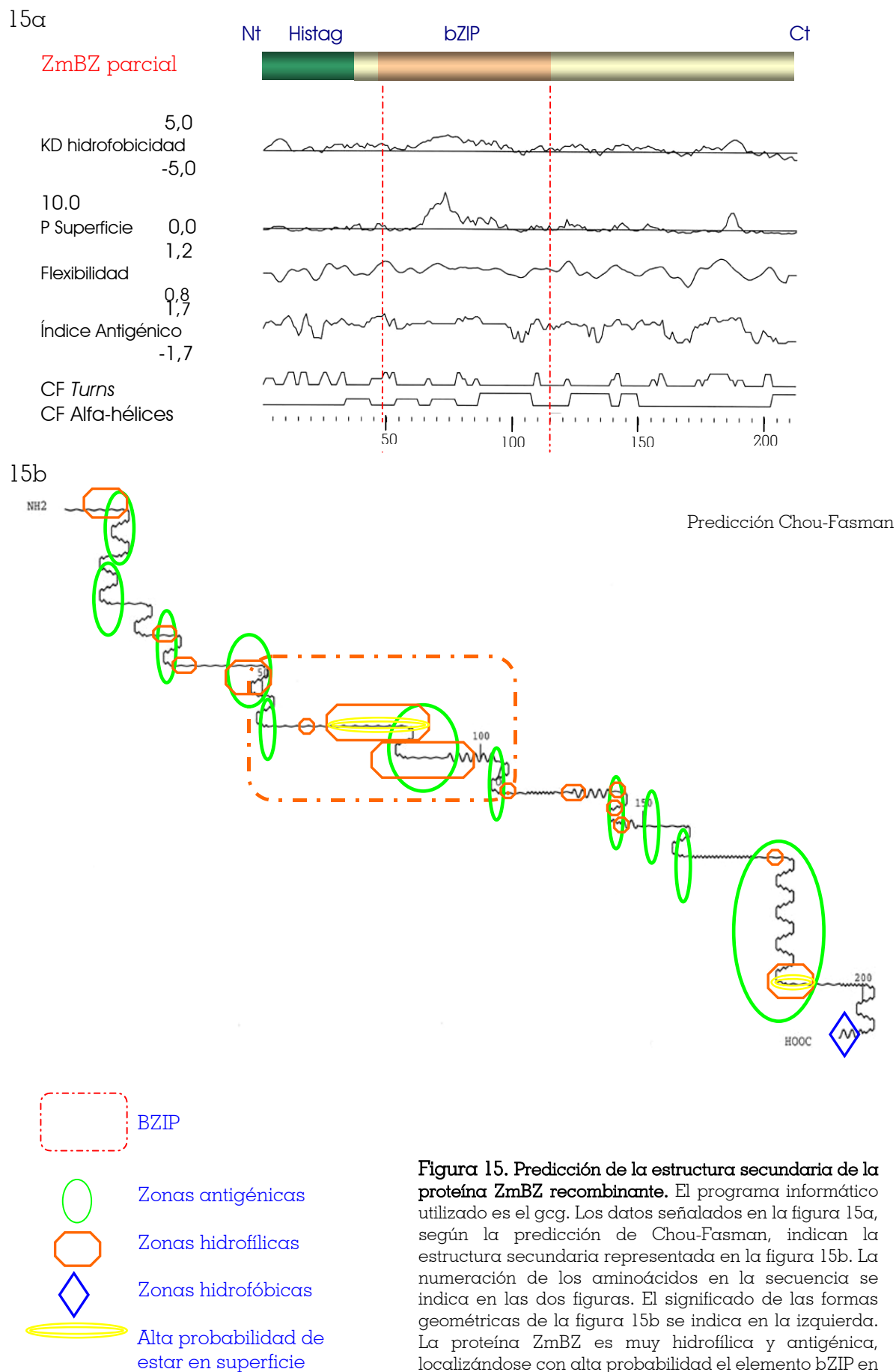


Figura 15. Predicción de la estructura secundaria de la proteína ZmBZ recombinante. El programa informático utilizado es el gcg. Los datos señalados en la figura 15a, según la predicción de Chou-Fasman, indican la estructura secundaria representada en la figura 15b. La numeración de los aminoácidos en la secuencia se indica en las dos figuras. El significado de las formas geométricas de la figura 15b se indica en la izquierda. La proteína ZmBZ es muy hidrofílica y antigénica, localizándose con alta probabilidad el elemento bZIP en la superficie.

16a

EmBP-2 parcial

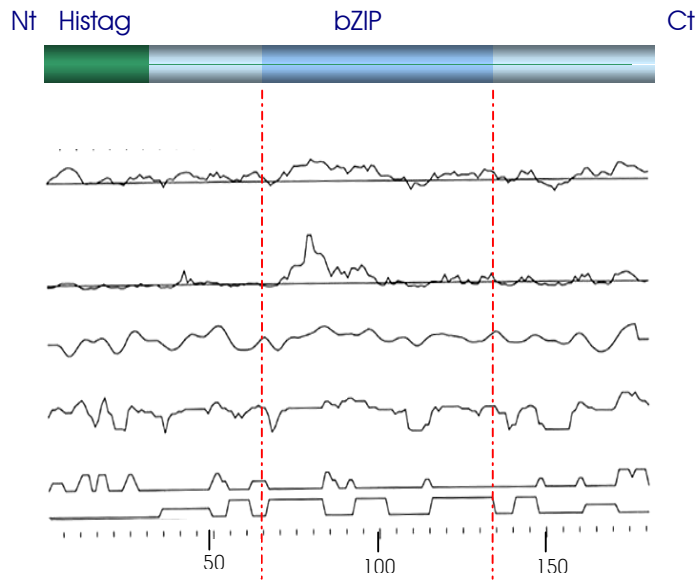
KD hidrofobicidad 5,0
-5,0

10,0
P Superficie 0,0

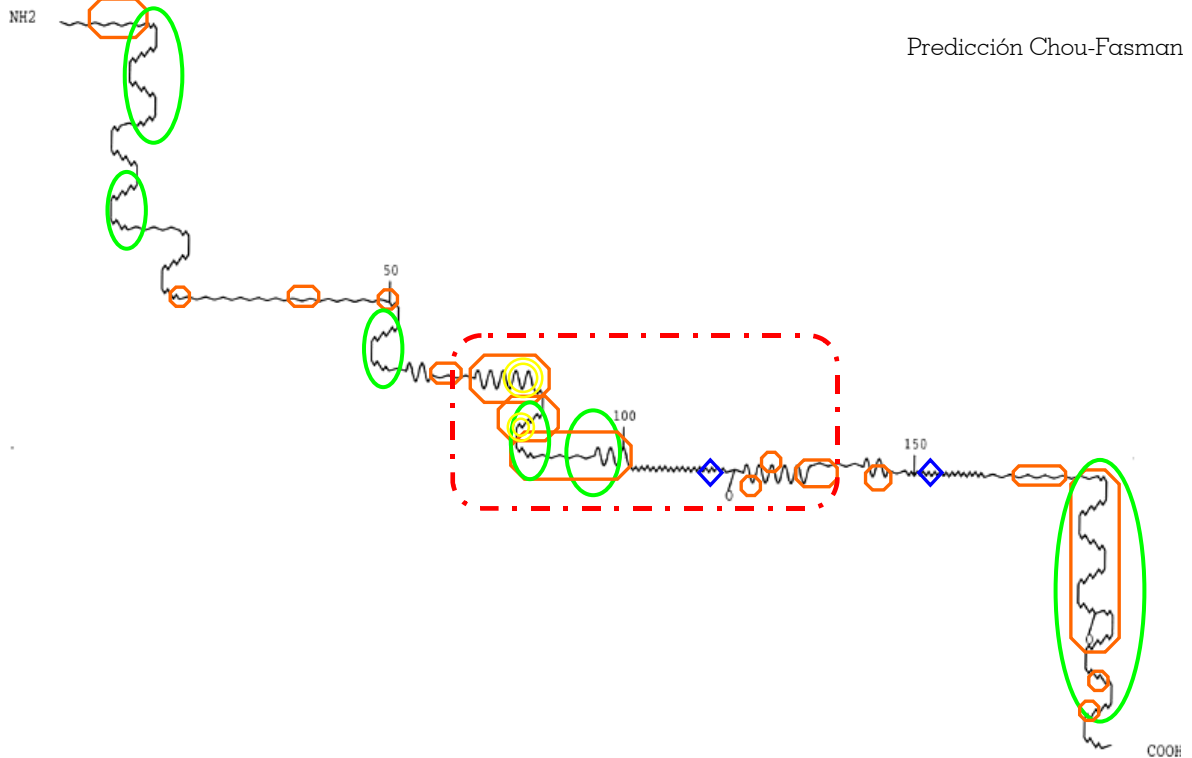
Flexibilidad 1,2

Índice Antigénico 0,8
1,7
-1,7

CF Turns
CF Alfa-hélices



16b



Predicción Chou-Fasman

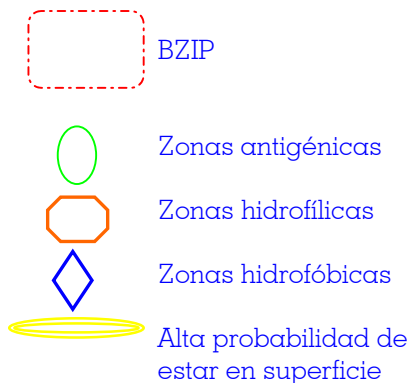


Figura 16. Predicción de la estructura secundaria de la proteína EmBP-2 recombinante. El programa informático utilizado es el gcg. Los datos señalados en la figura 16a, según la predicción de Chou-Fasman, indican la estructura secundaria representada en la figura 16b. La numeración de los aminoácidos en la secuencia se indica en las dos figuras. El significado de las formas geométricas de la figura 16b se indica en la izquierda. La proteína EmBP-2 es muy hidrofílica y antigénica, aunque menos que ZmBZ, localizándose con alta probabilidad el elemento bZIP en la superficie.

3.2.4. Estudio de la expresión de las proteínas EmBP-2 y ZmBZ en los tejidos de maíz

Estas proteínas se utilizaron para la obtención de anticuerpos policlonales en conejo. Una vez generados los sueros inmunes contra las dos proteínas recombinantes, se utilizaron para la detección de las proteínas EmBP-2 y ZmBZ en extractos de proteínas de diferentes tejidos embrionarios y vegetativos de maíz. Nuestro objetivo era determinar si en los tejidos donde se produce la transcripción de los genes también se encuentran las proteínas.

Mediante ensayos de Western blot se determinó que cada suero inmune reconocía a la proteína recombinante correspondiente, y los sueros preinmunes no. Una vez realizadas estas pruebas se analizaron tejidos de maíz. La figura 17 muestra un ensayo de reacción cruzada entre los 2 anticuerpos, para determinar si los anticuerpos generados son específicos de las proteínas usadas como antígenos o si al contrario, debido a que ambas contienen el elemento bZIP muy conservado entre los miembros de esta familia, son reconocidas por el anticuerpo generado contra la otra proteína. El extracto proteico utilizado en todos los pocillos es de embrión seco. Una vez acabada la electroforesis se transfirieron las proteínas a una membrana de nitrocelulosa, que se dividió en 2 partes después de la transferencia cortando en medio de uno de los pocillos. Cada parte se incubó con cada uno de los anticuerpos independientemente y se volvieron a alinear y se revelaron simultáneamente por ECL. El resultado muestra que las proteínas reconocidas por los 2 sueros son diferentes y que no hay un reconocimiento cruzado inespecífico entre las proteínas bZIP.

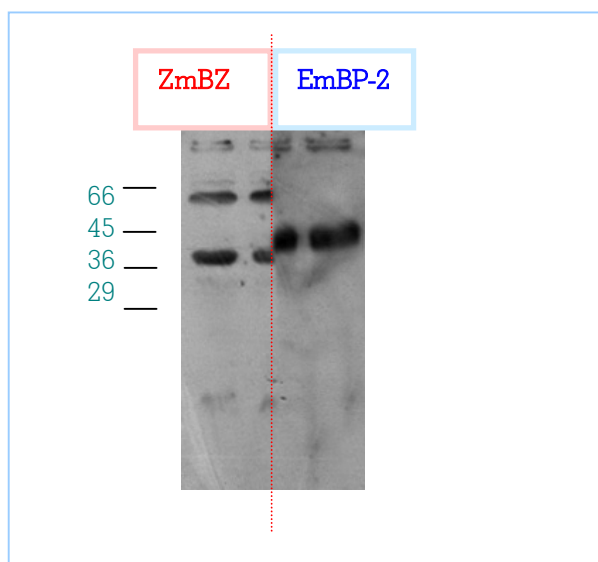


Figura 17. ECL de un Western blot de un ensayo de hibridación cruzada de los dos anticuerpos. En cada pocillo hay 100 µg de extracto de proteínas de embrión seco. Los marcadores de peso molecular se señalan en verde en KDa. En la izquierda se ha hibridado con el anticuerpo generado contra ZmBZ y a la derecha con el anticuerpo generado contra EmBP-2. Los dos anticuerpos no reconocen a las mismas proteínas.

Resultados

El anticuerpo contra EmBP-2 reconoce a una proteína de un tamaño aparente de 45 Kda. El tamaño teórico de la proteína EmBP-2 no lo conocemos, pero el de la proteína EmBP-1 de trigo es de 36 KDa. Nosotros esperamos que el tamaño de la proteína de maíz sea parecido al de la proteína de trigo. El anticuerpo contra ZmBZ reconoce a 2 proteínas de tamaños aparentes de 36 y 60 Kda. El tamaño teórico de ZmBZ es de 38.6 Kda, indicando que la banda de 36 podría ser la proteína ZmBZ endógena. No conocemos si la otra banda de 60 Kda corresponde a una proteína de la familia de las bZIP o a otra proteína no relacionada.

Las figuras 18 y 19 muestran los resultados obtenidos mediante Western blot sobre extractos de proteína totales de diferentes tejidos embrionarios y vegetativos, y en el proceso de la germinación. Se han analizado embriones de 15, 30, 40 y 60 dap. Los embriones de 15, 30 y 40 dap se trataron con ABA 100 μ M con el objetivo de determinar si se producía alguna variación en la acumulación de las proteínas. Se han analizado también hojas de plántulas de 5 dag en situación control y tratadas con estrés hídrico lento (3 días en atmósfera de glicerol 25%), estrés hídrico rápido (24h sobre papel de filtro a 26 °C) y 24h de ABA 100 μ M.

La proteína EmBP-2 se acumula en embrión desde los 15 dap hasta el embrión seco, sin variaciones en las muestras tratadas con ABA. En tejido vegetativo no detectamos la proteína en situación control, aunque aumenta su acumulación en el tejido al someter la plántula a un estrés hídrico. No se observa inducción con tratamiento con ABA. Durante la germinación la proteína desaparece. Cuando tratamos los embriones de 2 dag con ABA 24 h se consigue un incremento en la acumulación de la proteína. A partir de los 2 dag se observa al sobreexponer el Western bandas que podrían representar formas degradadas de la proteína.

El anticuerpo generado contra ZmBZ reconoce a una proteína de 36 Kda en el embrión desde los 15 dap hasta el embrión seco, la cual se induce en embriones de 15 dap tras un tratamiento con ABA. En la embriogénesis se produce un incremento en la acumulación de la proteína en los estadios tardíos. En la germinación la proteína desaparece después de un día de germinación y no se acumula tras un tratamiento con ABA. En las hojas de plántulas de 5 dag controles ni tras un tratamiento con ABA ni desecación detectamos la banda de 36 Kda. En el embrión también se detecta una proteína de 29 Kda, la cual también se induce por ABA en embriones de 15 dap y se presenta con un nivel basal durante la embriogénesis y la germinación. Esta banda puede tratarse de una reacción cruzada del anticuerpo con otra proteína no relacionada con ZmBZ. La proteína de 60 Kda también se detecta en la embriogénesis y en tejido vegetativo.

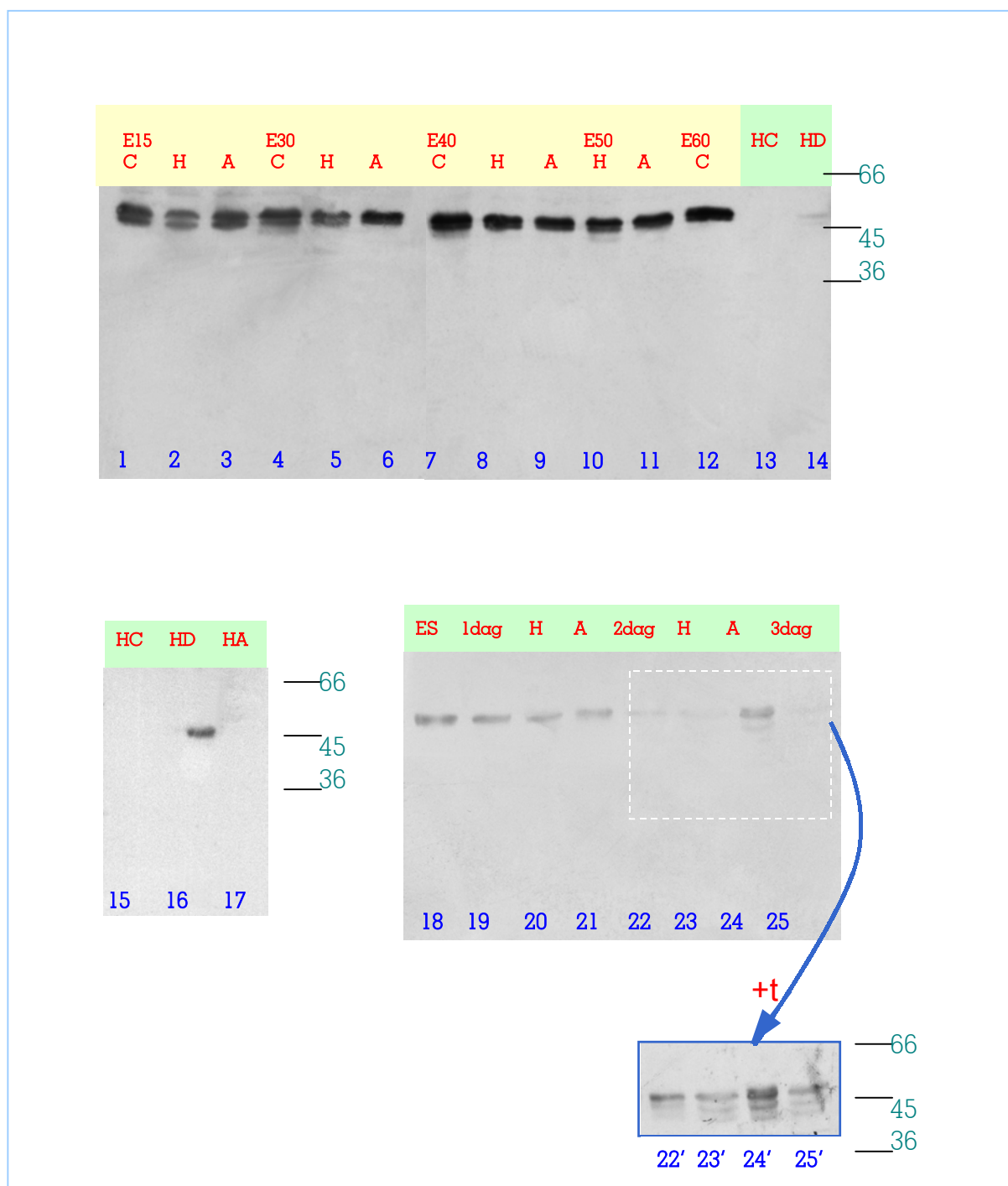


Figura 18. Acumulación de la proteína EmBP-2 durante el desarrollo embrionario y en tejido vegetativo. Western blot hibridado con el anticuerpo contra EmBP-2 y revelado por ECL. Los marcadores de peso molecular se indican en verde en KDa. Las muestras analizadas son:

1. EMBRIÓN 15dap; 2. EMBRIÓN 15dap 24h H₂O; 3. EMBRIÓN 15dap 24h ABA 0,1mM;
 4. EMBRIÓN 30dap; 5. EMBRIÓN 30dap 24h H₂O; 6. EMBRIÓN 30dap 24h ABA 0,1 mM;
 7. EMBRIÓN 40dap; 8. EMBRIÓN 40dap 24h H₂O; 9. EMBRIÓN 40dap 24h ABA 0,1 mM;
 10. EMBRIÓN 50dap 24h H₂O; 11. EMBRIÓN 50dap 24h ABA; 12. EMBRIÓN SECO
 13. HOJA 5DAG; 14. HOJA 5 dag DESECADA
 15. HOJA 5DAG; 16. HOJA 5DAG DESECADA; 17. HOJA 5DAG ABA 0,1 mM
 18. EMBRIÓN SECO; 19. 1 DAG; 20. 1 DAG + 24hAGUA; 21. 1 DAG + 24hABA
 22. 2 DAG; 23. 2 DAG + 24hAGUA; 24. 2 DAG + 24hABA; 25. 3 DAG
 (22'-25' es una exposición más larga).

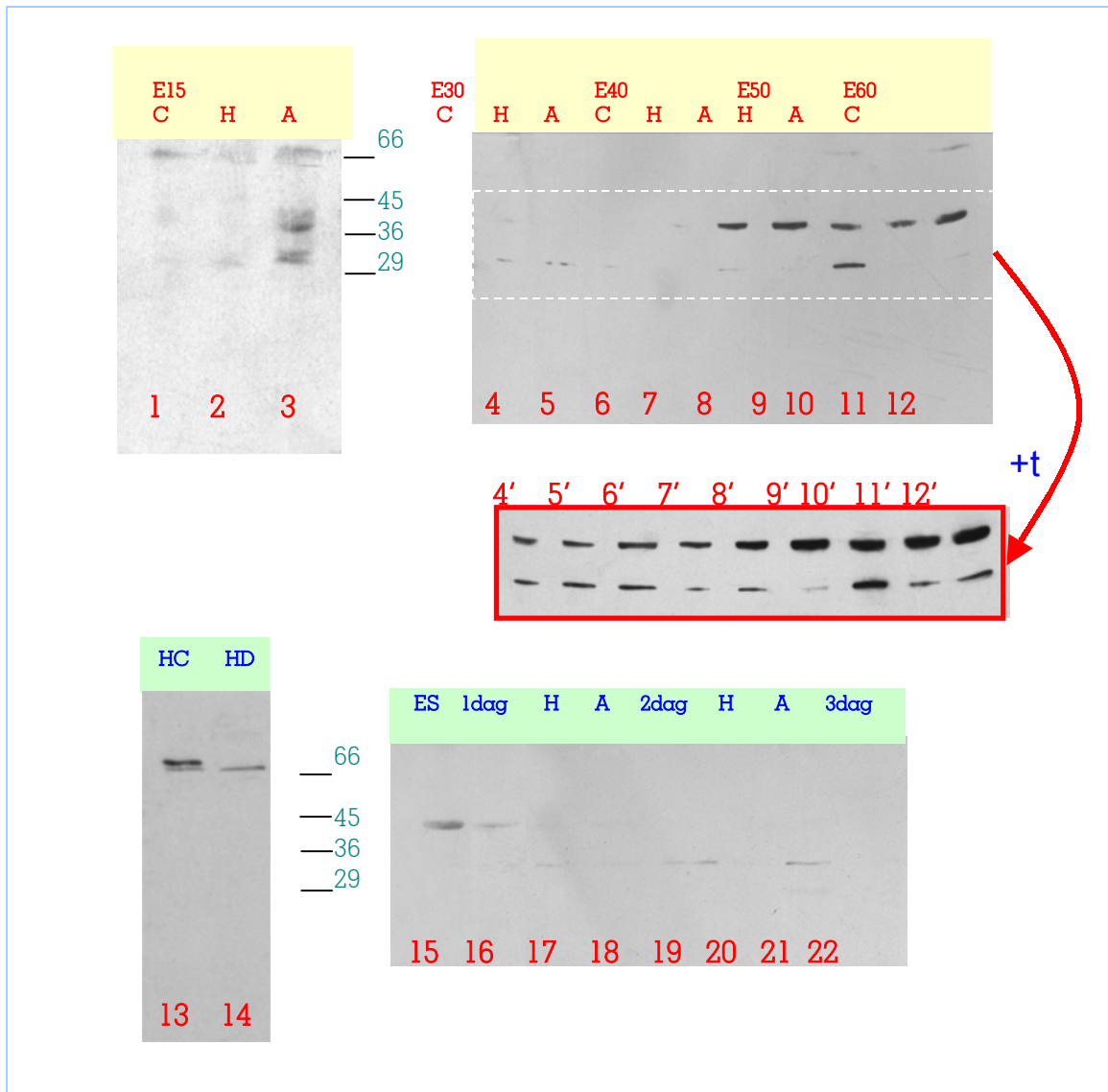


Figura 19. Acumulación de la proteína ZmBZ durante el desarrollo embrionario y en tejido vegetativo. Western blot incubado con el anticuerpo contra ZmBZ y revelado por ECL. Los marcadores de peso molecular se indican en verde en KDa. Las muestras analizadas son:

1. EMBRIÓN 15dap; 2. EMBRIÓN 15dap 24h H₂O; 3. EMBRIÓN 15dap 24h ABA 0,1mM;
4. EMBRIÓN 30dap; 5. EMBRIÓN 30dap 24h H₂O; 6. EMBRIÓN 30dap 24h ABA 0,1 mM;
7. EMBRIÓN 40dap; 8. EMBRIÓN 40dap 24h H₂O; 9. EMBRIÓN 40dap 24h ABA 0,1 mM;
10. EMBRIÓN 50dap 24h H₂O; 11. EMBRIÓN 50dap 24h ABA; 12. EMBRIÓN SECO (4'-12' es una exposición más larga).
13. HOJA 5DAG; 14. HOJA 5 dag DESECADA
15. EMBRIÓN SECO; 16. 1 DAG; 17. 1 DAG + 24hAGUA; 18. 1 DAG + 24hABA
19. 2 DAG; 20. 2 DAG + 24hAGUA; 21. 2 DAG + 24hABA; 22. 3 DAG

3.3. FUNCIONALIDAD BIOLÓGICA DE EmBP-2 Y ZmBZ

3.3.1. Análisis de la interacción de EmBP-2 y ZmBZ con el DNA en estudios *in vitro*

En el capítulo anterior hemos determinado el patrón de expresión de las proteínas EmBP-2 y ZmBZ. El ABA es un regulador de la expresión génica en la embriogénesis tardía a través del elemento ABRE (*Aba Responsive Element*), por lo que proteínas bZIP que se expresan en esta etapa del desarrollo son potenciales reguladoras de la expresión génica a través de este elemento. Debido a que las dos se expresan en la embriogénesis, hemos diseñado ensayos de movilidad electroforética (EMSA) utilizando las proteínas parciales recombinantes EmBP-2 y ZmBZ (descritas en el apartado 2.2.3) y hemos evaluado su afinidad por los diferentes elementos ABRE presentes en los promotores de los genes *Rab28*, *Rab17* y *LPT-1*, y un elemento G-Box. Las proteínas parciales tienen el elemento bZIP responsable de la interacción con el DNA. En la figura 20 se muestra un ensayo con la proteína EmBP-2 donde se puede observar que la afinidad por el elemento ABRE A del promotor *rab28* era muy superior respecto a los otros elementos *cis*. El siguiente paso fue el estudio de la especificidad de esta interacción.

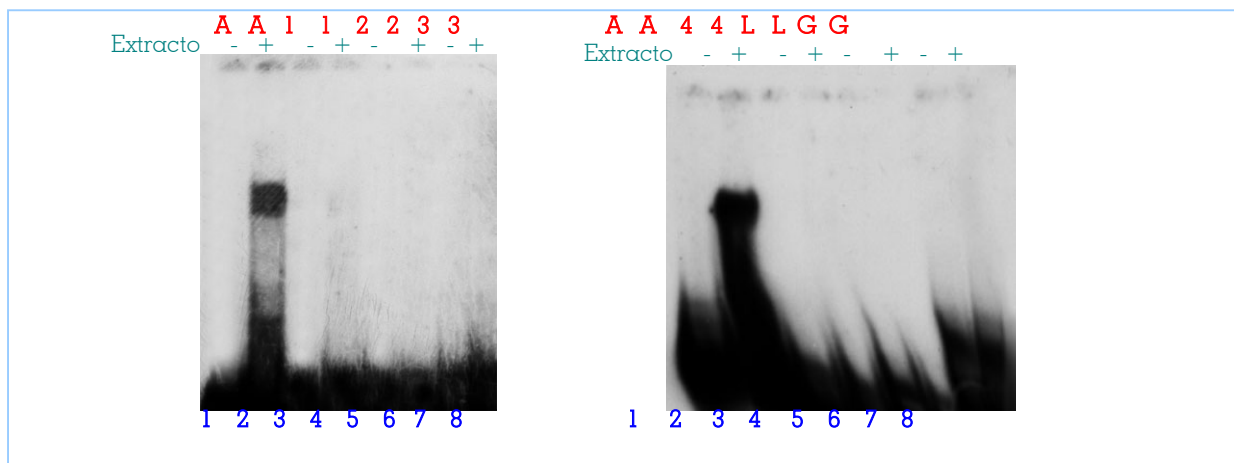


Figura 20. Ensayos EMSA de la proteína recombinante EmBP-2 y diferentes elementos *G-box*. En letras rojas se indican las sondas usadas en cada carril: A: ABRE A; 1: ABRE 1; 2: ABRE 2; 3: ABRE 3; 4: ABRE 4; L: ABRE promotor LPT1; G: G-box. En azul se indica la numeración de los carriles.

En la figura 21 se evalúa la especificidad de interacción de la proteína EmBP-2 con el ABRE A mediante un ensayo de competición con DNA sin marcar radiactivamente, así como la afinidad relativa de ésta por el elemento ABRE A respecto a ABRE B, ambos presentes en el promotor del gen *rab28*. La interacción de EmBP-2 por el ABRE A se compite utilizando cantidades crecientes de los oligos sin marcar ABRE A y ABRE B, pero no cuando la competición se realiza con el oligo ABRE A mutado. Este resultado indica que la interacción de EmBP-2 por el ABRE A es específica. Por otra parte, la competición en las líneas 3-4 con ABRE A es mayor que la que se obtiene en las líneas 5-6 con ABRE B. Esto nos sugiere que la afinidad de EmBP-2 por ABRE A es mayor que por ABRE B. Esto también se comprobó en un ensayo paralelo utilizando como sonda ABRE B (no mostrado).

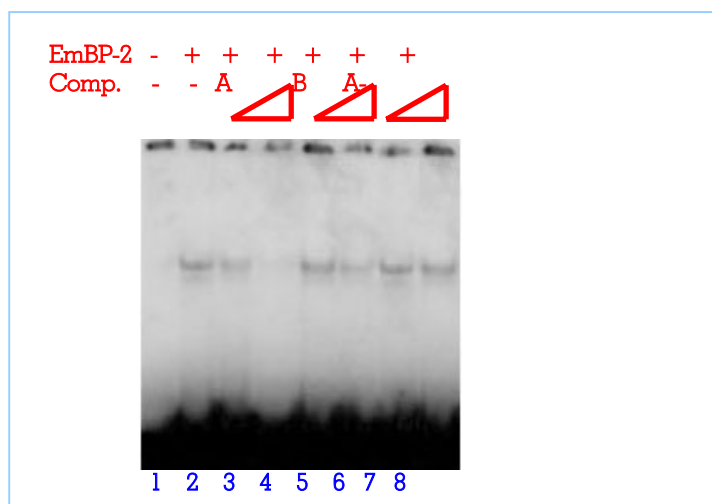


Figura 21. Especificidad en la interacción de la proteína EmBP-2 recombinante con el ABRE A. Ensayo de competición en el que se ha usado como sonda el ABRE A. Las competiciones (Comp.) se han realizado 100x y 1000x con los oligos ABRE A, ABRE B y ABRE A mutado, indicados en la figura como A,B y A- respectivamente. El carril 1 es el control negativo y es el único carril sin proteína recombinante.

La figura 22 nos muestra la especificidad de ZmBZ por el ABRE A en un ensayo igual que el descrito para EmBP-2. La afinidad de ZmBZ por el ABRE A es menor que la de EmBP-2 porque para tener este resultado se necesitó una exposición de 1 semana mientras que para EmBP-2 12 horas fueron suficientes. ZmBZ interacciona con ABRE A de una manera específica, competida con exceso de ABRE A y ABRE B sin marcar pero no con exceso de ABRE A mutado. Para ZmBZ la afinidad por ABRE A también es mucho mayor que por ABRE B.

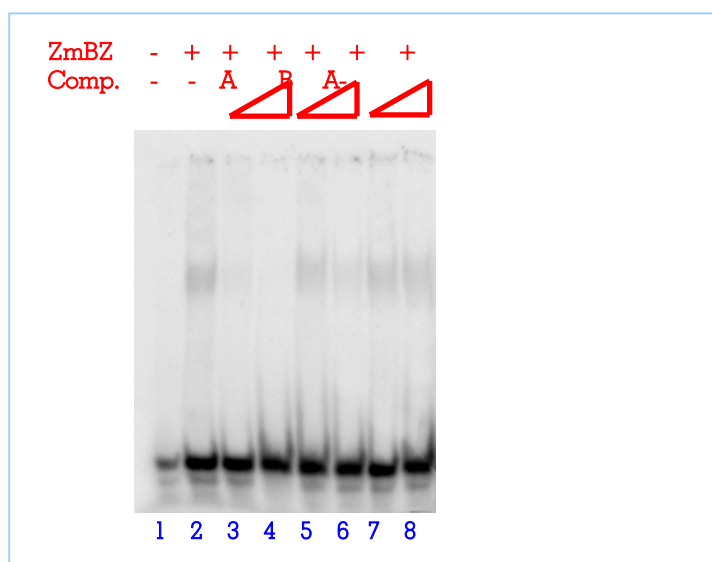


Figura 22. Especificidad en la interacción de la proteína ZmBZ recombinante con el ABRE A. Ensayo de competición de iguales características que las descritas en la figura 21. Las indicaciones en la figura son iguales que las de la figura 21.

3.3.2. Evaluación del efecto de la sobreexpresión de EmBP-2 y ZmBZ sobre la actividad del promotor *rab28* en maíz

Hemos estudiado el efecto de la sobreexpresión de EmBP-2 y ZmBZ sobre la actividad del promotor *rab28* mediante la transformación transitoria de células de callos de la línea *Black mexican Sweet*

(BMS), embriones de 23 y 17 dap de la línea homocigota silvestre W64A, embriones de 23 y 17 dap del mutante *viviparous1* (*vp1*) y coleoptilos de plántulas de 2 días después de la germinación (2 d.a.g). La técnica utilizada ha sido la biolística. El objetivo era conocer si la sobreexpresión de EmBP-2 y ZmBZ podía activar la transcripción del gen *rab28* a través de los ABREs que se encuentran en su promotor, ABRE A y ABRE B, después de comprobar mediante ensayos *in vitro* que las proteínas son capaces de interaccionar con ellos. Debido a que la fitohormona ABA estimula la transcripción de *rab28* a través de los ABRE, estábamos también interesados en conocer el efecto del ABA sobre EmBP-2 y ZmBZ y la actividad de *rab28*. Otro de nuestros objetivos era comparar el efecto de las dos proteínas bZIP sobre la actividad de *rab28* en tejidos embrionarios y en tejidos vegetativos, ya que en los dos tipos de tejido creemos que participan diferentes factores de transcripción (ensayos EMSA realizados previamente en el laboratorio lo sugieren, como se presenta en la introducción de esta tesis). Finalmente estábamos interesados en conocer como afecta la presencia del factor VP1 en el efecto de los factores EmBP-2 y ZmBZ sobre la actividad del promotor *rab28*, utilizando el mutante de maíz *vp1* (*viviparous-1*). Estudios previos con este mutante indican que este factor de transcripción participa en la regulación de *rab28* en el embrión. Toda esta información nos permite conocer si EmBP-2 y ZmBZ participan en la regulación de la transcripción del gen *rab28* y si el ABA y VP1 tienen algún efecto en la regulación de la actividad de este gen por estos factores de transcripción. Entonces será posible una evaluación de la aplicación de EmBP-2 y de ZmBZ para generar plantas transgénicas con una mayor tolerancia a la desecación.

Como construcciones *reporter* hemos usado una fusión de una parte del promotor *rab28* capaz de conferir respuesta al ABA al promotor 35S, fusionado al gen GUS. Como control interno se ha usado una construcción que expresa el gen luciferasa (LUC) de forma constitutiva, y que nos permitía conocer la eficiencia de cada experimento. Como construcciones efectoras hemos usado los cDNA que codifican para el factor ZmBZb y EmBP-2 clonados en el vector de expresión pPK100 bajo el control del promotor doble 35S. También como construcción efectora se ha usado el factor VP1 clonado bajo el control del promotor 35S (figura 23). Los resultados se presentan como actividades relativas GUS/LUC.

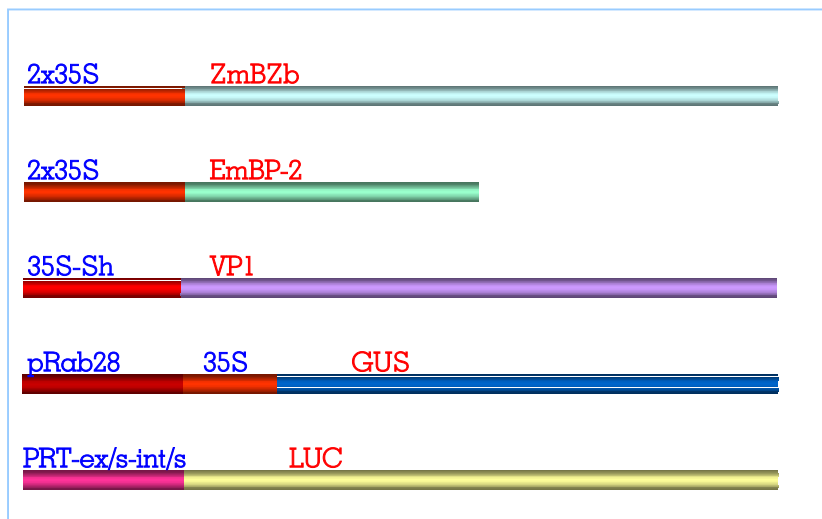


Figura 23. Esquema de las construcciones utilizadas en los experimentos de transformación transitoria. El promotor *rab28* comprende la región -393 a -60, en versión salvaje y mutada en los ABREs. El cDNA de EmBP-2 es parcial y no codifica un dominio de activación. Sh es un intrón del gen *Sh1* de maíz que aumenta la expresión (Vasil et al 1989).

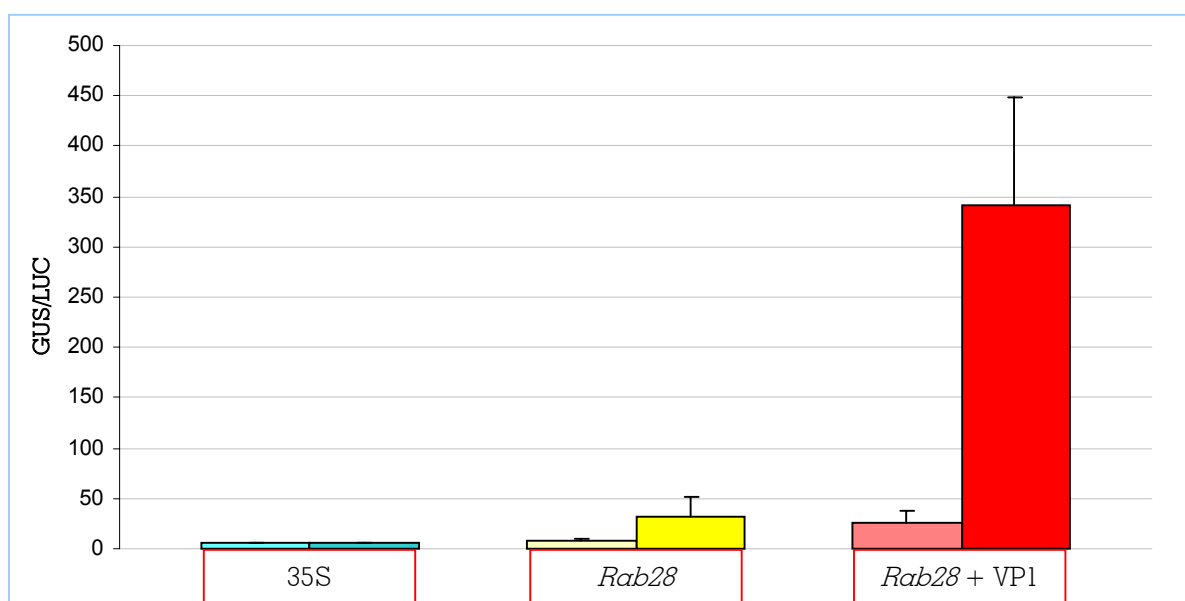
En todos los experimentos se ha utilizado 2 μg de la construcción *reporter* y 2 μg del control interno. En los experimentos con construcciones efectoras se indicará en cada caso la cantidad de DNA usada, utilizando la misma cantidad de plásmido pPK100 vacío en las muestras sin efector. No se sobrepasa el total de 6 μg en cada disparo.

Cada muestra transformada se ha considerado como un experimento, y era dividida en 2 mitades después de la transformación. Una de las mitades se sometía a tratamiento con ABA y la otra mitad servía como control.

3.3.3. Evaluación del efecto de la sobreexpresión de EmBP-2 y ZmBZ sobre la actividad del promotor *rab28* en células de callos BMS

Las células de callos BMS se seleccionaron como sustrato de la transformación porque es un tejido de fácil manipulación del cual podíamos disponer durante todo el año. En este tejido el gen *rab28* se encuentra inactivo en condiciones control y se induce cuando se le aplica un tratamiento con ABA.

En la figura 24 se presentan los resultados de una transformación en la que se ha usado como control negativo el promotor 35S. En la tabla se muestran los valores obtenidos en los diferentes experimentos. El código de los colores de la gráfica se indica a la izquierda en la tabla numérica. La finalidad de estos experimentos era el control del material de partida y del efecto obtenido por la aplicación del ABA. El resultado fue el esperado. No se obtuvo inducción por ABA sobre la actividad del promotor constitutivo 35S y la inducción sobre el promotor *rab28* correspondía con resultados obtenidos anteriormente en el grupo. VP1 transactiva a *rab28*, incrementado su actividad en 3 veces sin ABA y casi 50 veces con ABA respecto al valor basal.



		GUS/LUC	Promedio	D.Est
Reporter: 35S Sin efector ni ABA	Exp1	3,5	5,1	1,5
	Exp2	6,7		
	Exp3	5,0		
Reporter: 35S Sin efector con ABA	Exp1	6,5	5,7	0,8
	Exp2	5,8		
	Exp3	4,9		
Reporter: <i>Rab28</i> Sin efector ni ABA	Exp1	5,5	7,3	2,3
	Exp2	10,0		
	Exp3	6,4		
Reporter: <i>Rab28</i> Sin efector con ABA	Exp1	25,9	32,3	19,7
	Exp2	16,6		
	Exp3	54,5		
Reporter: <i>Rab28</i> Efector: VP1 sin ABA	Exp1	22,4	25,1	12,1
	Exp2	38,4		
	Exp3	14,5		
Reporter: <i>Rab28</i> Efector:VP1 con ABA	Exp1	249,6	341,9	106,3
	Exp2	458,2		
	Exp3	318,1		

Figura 24. Representación gráfica de los valores de actividad GUS/LUC de una transformación en callos BMS de maíz con los promotores 35S y *rab28*. Junto a la representación gráfica se muestra una tabla con el significado de los colores de las barras de la gráfica, y los valores GUS/LUC de 3 experimentos, el promedio de los 3 y los valores de desviación estándar, con los que se ha realizado la gráfica. Este patrón se repetirá en todas las figuras de este capítulo. La cantidad de plásmido efector utilizada es de 1 µg.

En la figura 25 se presentan unos experimentos en los que hemos estudiado el efecto de la cantidad de proteína ZmBZ sobre la actividad del promotor *rab28*, utilizando diferentes cantidades relativas de las construcciones *reporter* y efectora. Los primeros valores de la gráfica corresponden a una transformación con solo el gen *reporter*. Por lo tanto, los valores de actividad vienen dados por los factores de transcripción endógenos. La activación por ABA es de 6,5 veces el valor basal. Cuando ponemos la construcción con ZmBZ podemos observar que sin el tratamiento con ABA prácticamente no hay variación en la actividad de *rab28*. Los valores con ABA muestran que cuando la cantidad de *reporter* usada es tres veces la de efector (2 µg:0,67 µg) la actividad de *rab28* respecto al valor basal es 10 veces superior y respecto al valor sin efector y con ABA es 1,5 veces. El efecto del ABA sobre el valor con efector sin ABA es 6 veces mayor. Cuando hay más proteína ZmBZ acumulada dentro de la célula, se produce en la muestra tratada con ABA una disminución en la actividad de *rab28* respecto al valor sin efector. En estas cantidades ZmBZ tiene un efecto negativo sobre la actividad de *rab28*. Hemos probado con cantidades menores de ZmBZ, y aunque con 0,25 µg obteníamos una transactivación igual que utilizando 0,67 µg, consideramos que era más seguro trabajar con esta segunda cantidad para facilitar tener resultados más reproducibles. En todos los experimentos de este capítulo se ha utilizado 0,67 µg de plásmido efector ZmBZ.

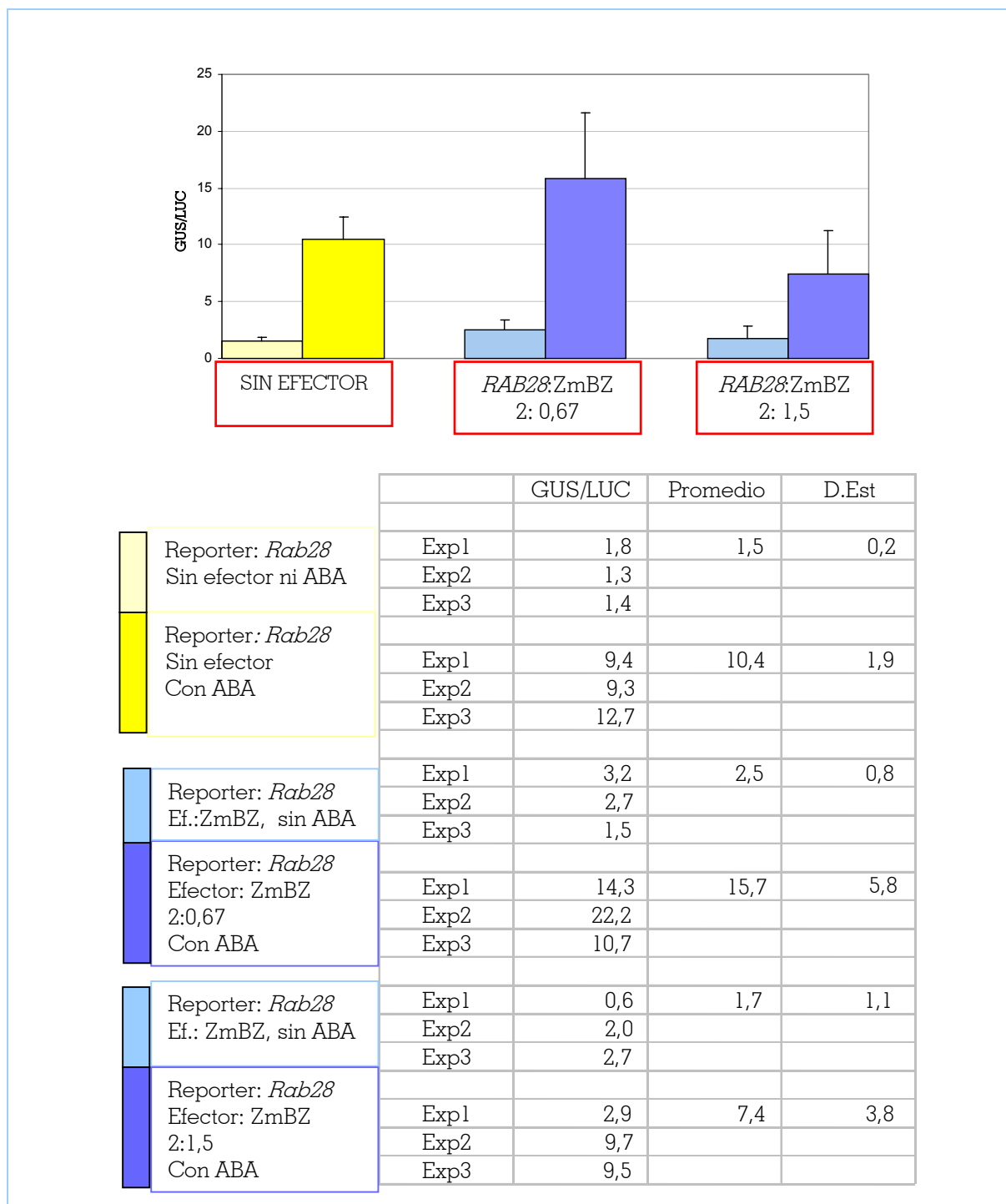


Figura 25. Representación gráfica de los valores de actividad GUS/LUC de una cotransformación en callos BMS de maíz con el promotor *rab28* y el factor ZmBZ. En la gráfica se indica la relación en masa de las construcciones de efector y *reporter* utilizadas: 2:0,67 y 2:1,5.

Resultados

En la figura 26 se muestran los resultados de una transformación en la que se han usado como construcciones *reporter* el promotor *rab28* en versión salvaje y mutada en la caja ABRE A. Nuestro interés era conocer si este efecto de ZmBZ mostrado en la figura 25 es dependiente de la caja ABRE A. En la gráfica se puede observar que cuando el promotor está en su versión salvaje el efecto del ABA es claro respecto a los valores de actividad basal del promotor (de 2,6 sin el efector y de 3,5 con ZmBZ). En cambio, al mutar la caja ABRE A los valores de actividad obtenidos son equivalentes al basal y no se ven afectados por la hormona aplicada. Esto nos indica que el efecto observado en la versión salvaje es dependiente de una caja ABRE A activa.

		GUS/LUC	Promedio	D.Est
Reporter: <i>Rab28</i> Sin efector	Exp1	2348,4	2598,6	1518,0
	Exp2	4226,0		
	Exp3	1221,3		
Reporter: <i>Rab28</i> Sin efector Tratamiento ABA	Exp1	6743,5	6814,6	612,0
	Exp2	6241,2		
	Exp3	7459,0		
Reporter: <i>Rab28</i> Efector: ZmBZ	Exp1	1960,0	3097,4	1300,0
	Exp2	3061,3		
	Exp3	4925,3		
	Exp4	2443,1		
Reporter: <i>Rab28</i> Efector: ZmBZ Tratamiento ABA	Exp1	9297,9	10814,5	1237,8
	Exp2	10880,0		
	Exp3	12327,2		
	Exp4	10753,1		
Reporter: <i>Rab28 A</i> Sin efector	Exp1	1564,1	1247,8	684,6
	Exp2	1254,2		
	Exp3	1880,7		
	Exp4	295,2		
Reporter: <i>Rab28 A</i> Sin efector Tratamiento ABA	Exp1	2381,0	2425,3	1601,0
	Exp2	2712,8		
	Exp3	4250,0		
	Exp4	357,3		
Reporter: <i>Rab28 A</i> Efector: ZmBZ	Exp1	11671,7	1972,2	479,3
	Exp2	1457,8		
	Exp3	2348,9		
	Exp4	2410,7		
Reporter: <i>Rab28 A</i> Efector: ZmBZ Tratamiento ABA	Exp1	2221,6	3004,9	1800,8
	Exp2	2511,6		
	Exp3	5650,2		
	Exp4	1636,0		

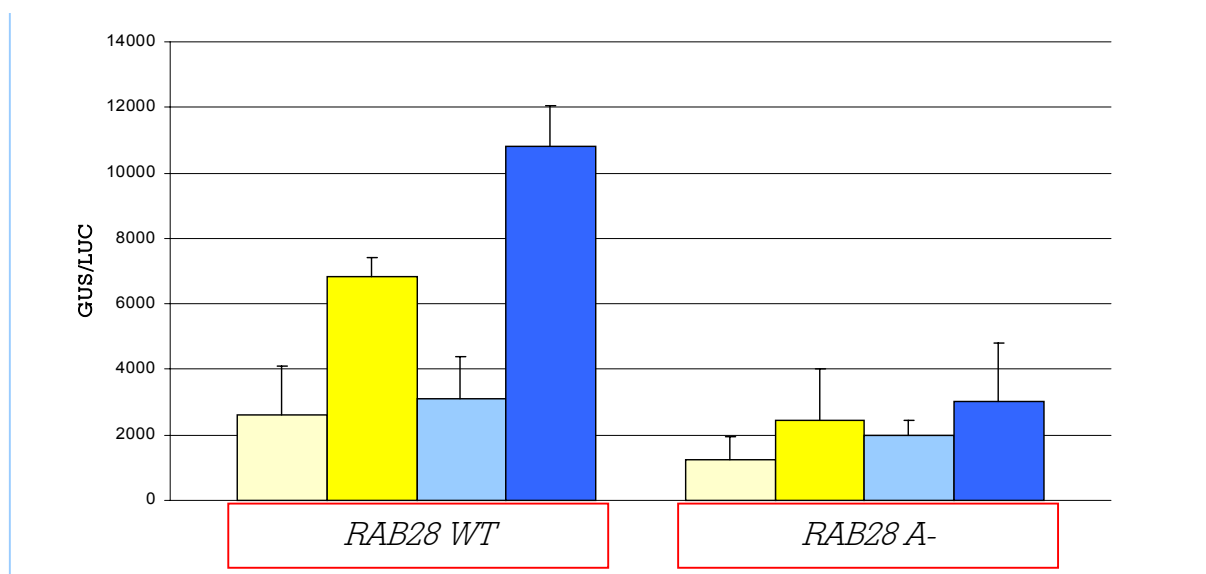
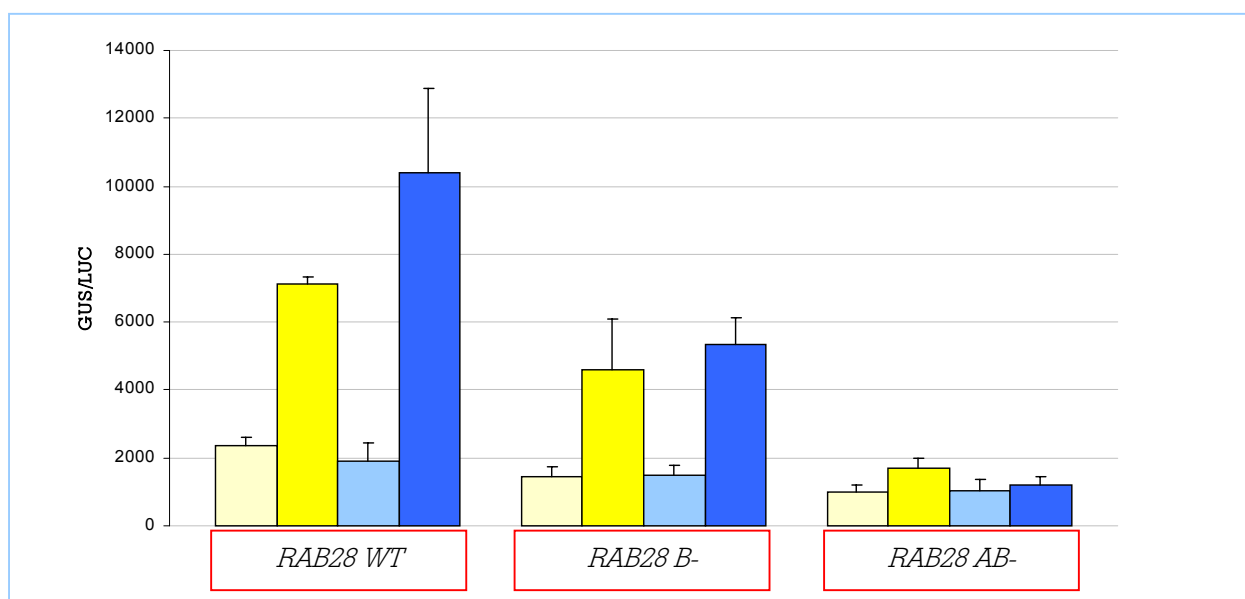


Figura 26. Representación gráfica de los valores de actividad GUS/LUC de una cotransformación de callos BMS de maíz con los promotores *rab28* salvaje o *rab28* mutado en la caja ABRE A y el factor ZmBZ. En la gráfica se indican los dos promotores utilizados.

En la figura 27 se muestran los resultados de una transformación en la cual se ha evaluado la importancia de la caja ABRE B en la actividad del promotor *rab28*, así como la importancia de las 2 cajas ABRE utilizando una construcción efectora en la cual se han mutado los dos elementos *cis*. El resultado nos muestra que cuando la caja ABRE B está mutada el efecto sobre la actividad es menor que cuando se muta la caja ABRE A. Se observa que al aplicar la hormona existe una inducción en la actividad de *rab28*, aunque ésta es menor que cuando la caja ABRE B se encuentra activa. La contribución de ABRE B en la actividad de *rab28* es minoritaria. En el mismo experimento hemos sido capaces de reducir la activación de *rab28* hasta los niveles basales mutando a la vez las dos cajas ABRE, obteniéndose un resultado muy parecido al visto en la figura 26 mutando solo la caja ABREA. Los valores de transactivación obtenidos no son muy importantes pero son muy reproducibles.

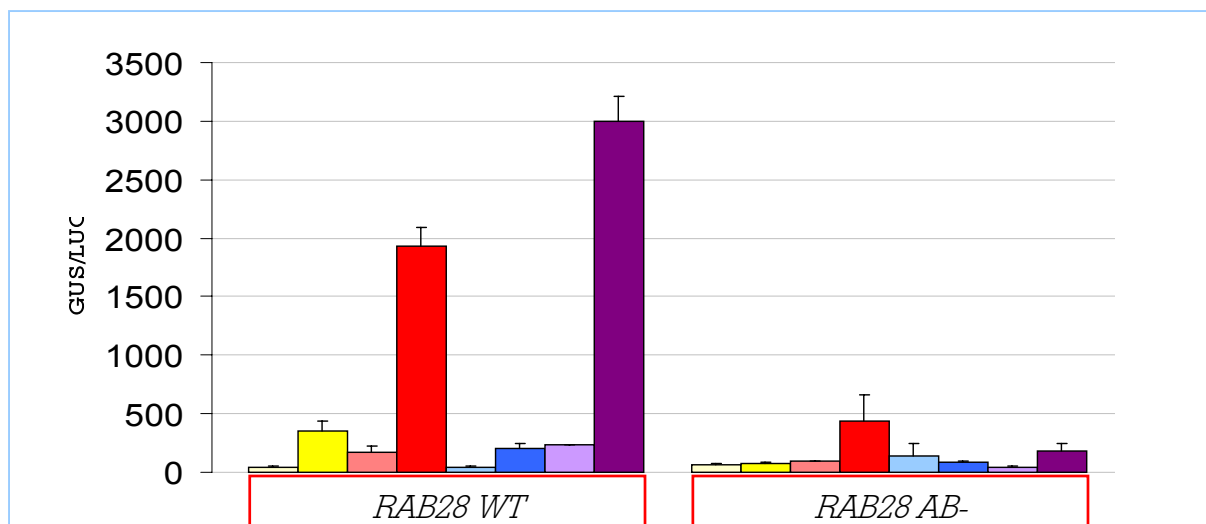


		GUS/LUC	Promedio	D.Est
Reporter: <i>Rab28WT</i> Sin efector	Exp1	2094,1	2369,9	256,8
	Exp2	2602,3		
	Exp3	2413,2		
Reporter: <i>Rab28WT</i> Sin efector Tratamiento ABA	Exp1	6976,8	7124,1	212,8
	Exp2	7368,1		
	Exp3	7027,3		
Reporter: <i>Rab28WT</i> Efector: ZmBZ	Exp1	1324,1	1909,1	527,9
	Exp2	2350,2		
	Exp3	2052,9		
Reporter: <i>Rab28WT</i> Efector: ZmBZ Tratamiento ABA	Exp1	7812,5	10387,8	2501,1
	Exp2	12807,7		
	Exp3	10543,1		
Reporter: <i>Rab28B</i> Sin efector	Exp1	1174,8	1431,6	293,9
	Exp2	1752,2		
	Exp3	1367,9		
Reporter: <i>Rab28B</i> Sin efector Tratamiento ABA	Exp1	3421,6	4602,5	1497,6
	Exp2	6287,0		
	Exp3	4098,8		
Reporter: <i>Rab28B</i> Efector: ZmBZ	Exp1	1221,9	1509,9	261,1
	Exp2	1731,3		
	Exp3	1576,4		
Reporter: <i>Rab28B</i> Efector: ZmBZ Tratamiento ABA	Exp1	4615,6	5323,4	819,8
	Exp2	6221,8		
	Exp3	5132,7		
Reporter: <i>Rab28AB</i> Sin efector	Exp1	1204,9	1011,9	182,2
	Exp2	842,8		
	Exp3	987,9		
Reporter: <i>Rab28AB</i> Sin efector Tratamiento ABA	Exp1	2021,7	1685,1	299,9
	Exp2	1445,9		
	Exp3	1587,9		

	GUS/LUC	Promedio	D.Est	
Reporter: <i>Rab28AB</i> - Efector: ZmBZ	Exp1	1405,3	1046,9	325,9
	Exp2	768,2		
	Exp3	967,3		
Reporter: <i>Rab28AB</i> - Efector: ZmBZ Tratamiento ABA	Exp1	1432,2	1206,0	244,1
	Exp2	947,1		
	Exp3	1238,5		

Figura 27. Representación gráfica de los valores de actividad GUS/LUC de una cotransformación en callos BMS de maíz con los promotores *rab28* salvaje, *rab28* ABRE A- o *rab28* ABRE AB- y el factor ZmBZ. En la gráfica se señalan los promotores utilizados.

En la figura 28 se muestran los resultados de otra transformación, en la cual se ha utilizado también como efector el factor VP1. En los experimentos anteriores se ha estudiado si la transactivación observada por ZmBZ era dependiente de la hormona ABA y de las cajas ABRE, y los resultados sugieren que para que ZmBZ tenga efecto sobre el promotor de *rab28* son necesarias las cajas ABRE y también la hormona. Experimentos previos en el laboratorio han demostrado que el factor VP1 también tiene un efecto transactivador sobre *rab28* el cual es dependiente de las cajas ABRE, que incrementa de manera sinérgica tras un tratamiento ABA. El objetivo de este experimento era conocer si el efecto de ZmBZ sobre *rab28* observado estaba influenciado por el factor VP1. Se ha utilizado el promotor salvaje de *rab28* para analizar la influencia del factor VP1 sobre ZmBZ y el promotor *rab28* con los ABRE mutados para controlar que la activación observada es dependiente de los ABRE. El resultado nos indica que el factor VP1 transactiva a *rab28* sin necesidad de un tratamiento con ABA, aunque con ABA el efecto es sinérgico. Cuando en la célula se sobreexpresan ZmBZ y VP1 y se trata la muestra con ABA se puede observar un incremento en la activación de *rab28* respecto a los experimentos sin ZmBZ (de un incremento de 43 veces a un incremento de 66 respecto al valor basal). Al mutar las cajas ABRE esta activación no se observa. Esto nos indica que Vp1 y ZmBZ probablemente interactúan en el promotor de *rab28* y con los ABRE, aunque el aumento en la transactivación no sea muy grande.

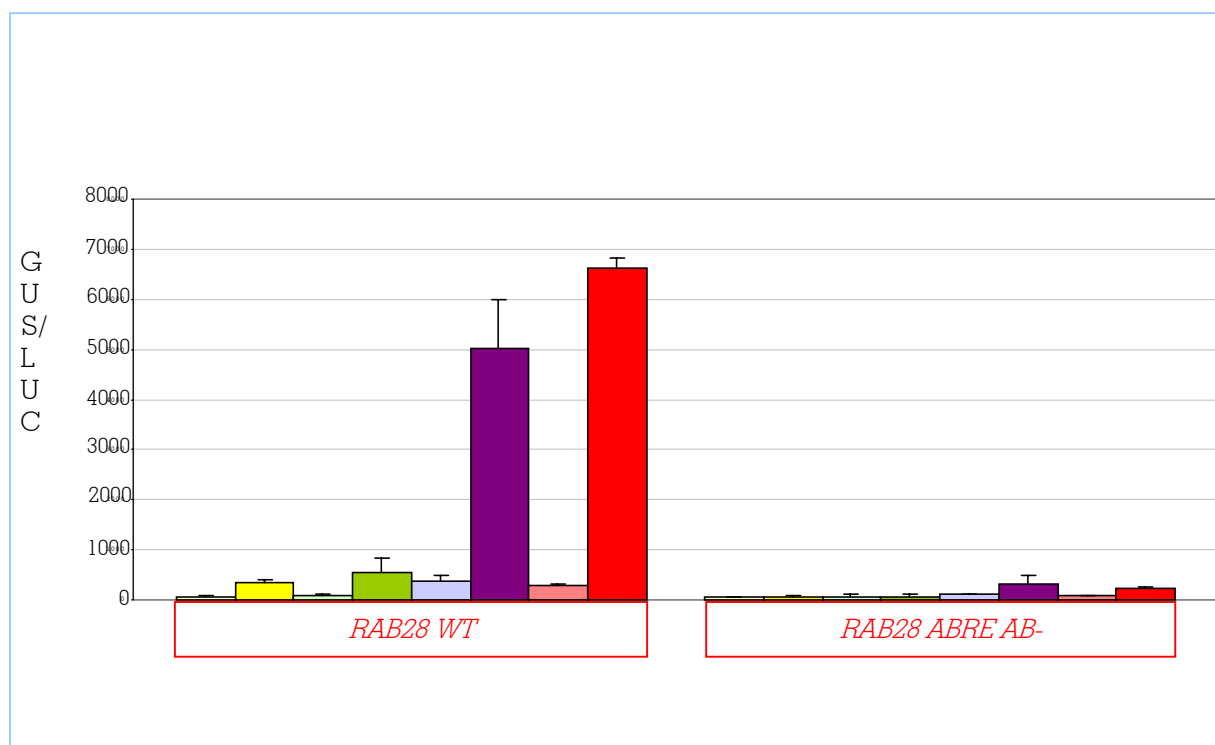


		GUS/LUC	Promedio	D.Est
Reporter: <i>rab28WT</i> Sin efector y sin ABA	Exp1	42,9	44,9	5,0
	Exp2	41,2		
	Exp3	50,7		
Reporter: <i>rab28WT</i> Sin efector con ABA	Exp1	296,3	353,3	80,9
	Exp2	317,6		
	Exp3	446,0		
Reporter: <i>rab28WT</i> Efector VP1, sin ABA	Exp1	108,1	167,6	58,5
	Exp2	225,2		
	Exp3	169,6		
Reporter: <i>rab28WT</i> Efector VP1, con ABA	Exp1	1858,4	1932,4	159,1
	Exp2	1823,8		
	Exp3	2115,1		
Reporter: <i>rab28WT</i> Ef. ZmBZ sin ABA	Exp1	55,1	37,6	15,1
	Exp2	28,9		
	Exp3	28,8		
Reporter: <i>rab28WT</i> Ef. ZmBZ, con ABA	Exp1	186,5	207,0	36,6
	Exp2	185,2		
	Exp3	249,3		
Reporter: <i>rab28WT</i> Efectores VP1 y ZmBZ Sin ABA	Exp1	230,7	231,6	7,9
	Exp2	224,2		
	Exp3	240,0		
Reporter: <i>rab28WT</i> Efectores VP1 y ZmBZ Con ABA	Exp1	3201,5	3000,8	207,0
	Exp2	3013,2		
	Exp3	2787,9		
Reporter: <i>rab28AB</i> - Sin efector y sin ABA	Exp1	54,4	62,7	8,2
	Exp2	63,0		
	Exp3	70,8		
Reporter: <i>rab28AB</i> - Sin efector con ABA	Exp1	88,5	77,8	10,2
	Exp2	68,1		
	Exp3	76,8		
Reporter: <i>rab28AB</i> - Efector VP1, sin ABA	Exp1	88,9	94,7	5,1
	Exp2	98,4		
	Exp3	97,0		
Reporter: <i>rab28AB</i> - Efector VP1, con ABA	Exp1	432,0	439,4	224,9
	Exp2	218,2		
	Exp3	668,0		
Reporter: <i>rab28AB</i> - Ef. ZmBZ, sin ABA	Exp1	103,4	135,6	111,7
	Exp2	43,6		
	Exp3	260,0		
Reporter: <i>rab28AB</i> - Ef. ZmBZ, con ABA	Exp1	85,7	87,1	5,5
	Exp2	93,3		
	Exp3	82,4		
Reporter: <i>rab28AB</i> - Efectores VP1 y ZmBZ Sin ABA	Exp1	39,5	41,2	12,2
	Exp2	54,3		
	Exp3	30,0		
Reporter: <i>rab28AB</i> - Efectores VP1 y ZmBZ Con ABA	Exp1	154,7	179,5	66,5
	Exp2	255,0		
	Exp3	129,0		

Figura 28. Representación gráfica de los valores de actividad GUS/LUC de una cotransformación en callos BMS de maíz con los promotores *rab28* salvaje o *rab28* con los dos ABRE mutados y los factores ZmBZ y VP1. Los promotores utilizados se indican en la gráfica. De plásmido VP1 se ha utilizado 1 µg.

En la figura 29 se muestra una transformación de iguales objetivos que la representada en la figura 28, con la única diferencia que se ha analizado la sobreexpresión de EmBP-2. El resultado obtenido nos indica que EmBP-2 tiene un efecto activador sobre *rab28* aproximado a ZmBZ, solo cuando se aplica un tratamiento de ABA a la muestra, pero este efecto no se ve modificado cuando en la célula se ha sobreexpresado también VP1. Aparentemente no hay interacción entre VP1 y EmBP-2, aunque hay que tener en cuenta que en el experimento EmBP-2 es un parcial y que no se puede descartar una interacción *in vivo* en la cual sea importante el dominio de activación de EmBP-2, ausente en la proteína sobreexpresada. Los resultados de activación de *rab28* son en todos los casos dependientes de las cajas ABRE.

Figura 29. Representación gráfica de los valores de actividad GUS/LUC de una cotransformación en callos BMS de maíz con los promotores *rab28* salvaje o *rab28* con los dos ABRE mutados y los factores EmBP-2 y VP1. Los promotores utilizados se indican en la gráfica. De plásmido VP1 se ha utilizado 1 µg.

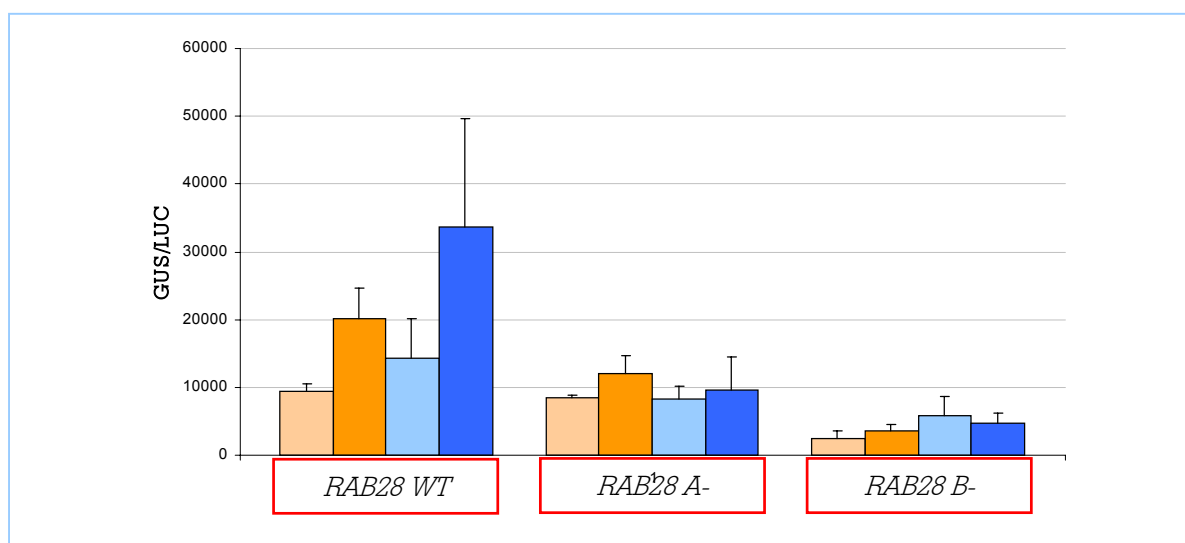


	GUS/LUC	Promedio	D.Est	
Reporter: <i>rab28WT</i> Sin efector y sin ABA	Exp1	57,8	65,8	22,7
	Exp2	48,1		
	Exp3	91,5		
Reporter: <i>rab28WT</i> Sin efector con ABA	Exp1	308,8	331,7	65,7
	Exp2	405,8		
	Exp3	280,5		
Reporter: <i>rab28WT</i> Ef. EmBP-2 sin ABA	Exp1	112,6	96,4	16,7
	Exp2	79,2		
	Exp3	97,4		
Reporter: <i>rab28WT</i> Ef. EmBP-2 con ABA	Exp1	773,8	556,0	263,7
	Exp2	262,8		
	Exp3	631,4		
Reporter: <i>rab28WT</i> Efectores VP1 y EmBP-2 Sin ABA	Exp1	239,3	375,9	125,2
	Exp2	403,2		
	Exp3	485,3		
Reporter: <i>rab28WT</i> Efectores VP1 y EmBP-2 Con ABA	Exp1	4183,7	5017,4	976,8
	Exp2	4776,3		
	Exp3	6092,3		
Reporter: <i>rab28WT</i> Efector VP1, sin ABA	Exp1	304,6	275,3	41,4
	Exp2	293,4		
	Exp3	227,9		
Reporter: <i>rab28WT</i> Efector VP1, con ABA	Exp1	6773,0	6620,1	216,3
	Exp2	6467,1		
	Exp3			
Reporter: <i>rab28AB</i> - Sin efector y sin ABA	Exp1	28,7	45,0	14,4
	Exp2	56,5		
	Exp3	49,8		
Reporter: <i>rab28AB</i> - Sin efector con ABA	Exp1	78,4	62,2	21,5
	Exp2	37,8		
	Exp3	70,6		
Reporter: <i>rab28AB</i> - Ef. EmBP-2 sin ABA	Exp1	28,6	67,6	37,9
	Exp2	69,9		
	Exp3	104,4		
Reporter: <i>rab28AB</i> - Ef. EmBP-2 con ABA	Exp1	78,9	64,6	12,3
	Exp2	57,8		
	Exp3	57,1		
Reporter: <i>rab28AB</i> - Efectores VP1 y EmBP-2 Sin ABA	Exp1	98,6	111,8	29,1
	Exp2	145,3		
	Exp3	91,6		
Reporter: <i>rab28AB</i> - Efectores VP1 y EmBP-2 Con ABA	Exp1	490,4	324,9	155,8
	Exp2	303,3		
	Exp3	181,1		
Reporter: <i>rab28AB</i> - Efector VP1, sin ABA	Exp1	75,5	85,4	15,3
	Exp2	103,0		
	Exp3	77,7		
Reporter: <i>rab28AB</i> - Efector VP1, con ABA	Exp1	204,2	231,5	24,3
	Exp2	250,7		
	Exp3	239,6		

3.3.4. Evaluación del efecto de la sobreexpresión de ZmBZ sobre la actividad del promotor *rab28* en embriones W64A de 17 y de 23 dap

En embriones W64A el gen *rab28* se empieza a transcribir a los 20 dap. Experimentos previos tipo EMSA en el laboratorio mostraron que había una actividad ABF (ABRE Binding Factor) en los extractos proteicos nucleares que se correlacionaba con la activación de *rab28*. ABF no se encuentra en extractos de proteínas nucleares de embrión de 14 dap, cuando el gen *rab28* no se transcribe, pero en muestras de extractos de proteínas nucleares de embrión de 25 dap aparece unida al ABRE A. Esto sugería que podía ser la actividad que ponía en marcha la transcripción del gen. Con la finalidad de conocer si ZmBZ o EmBP-2 están relacionados con el ABF hemos realizado ensayos de transformación sobre embriones de 17 dap y de 23 dap, antes y después de la activación de *rab28* en respuesta al desarrollo embrionario, respectivamente.

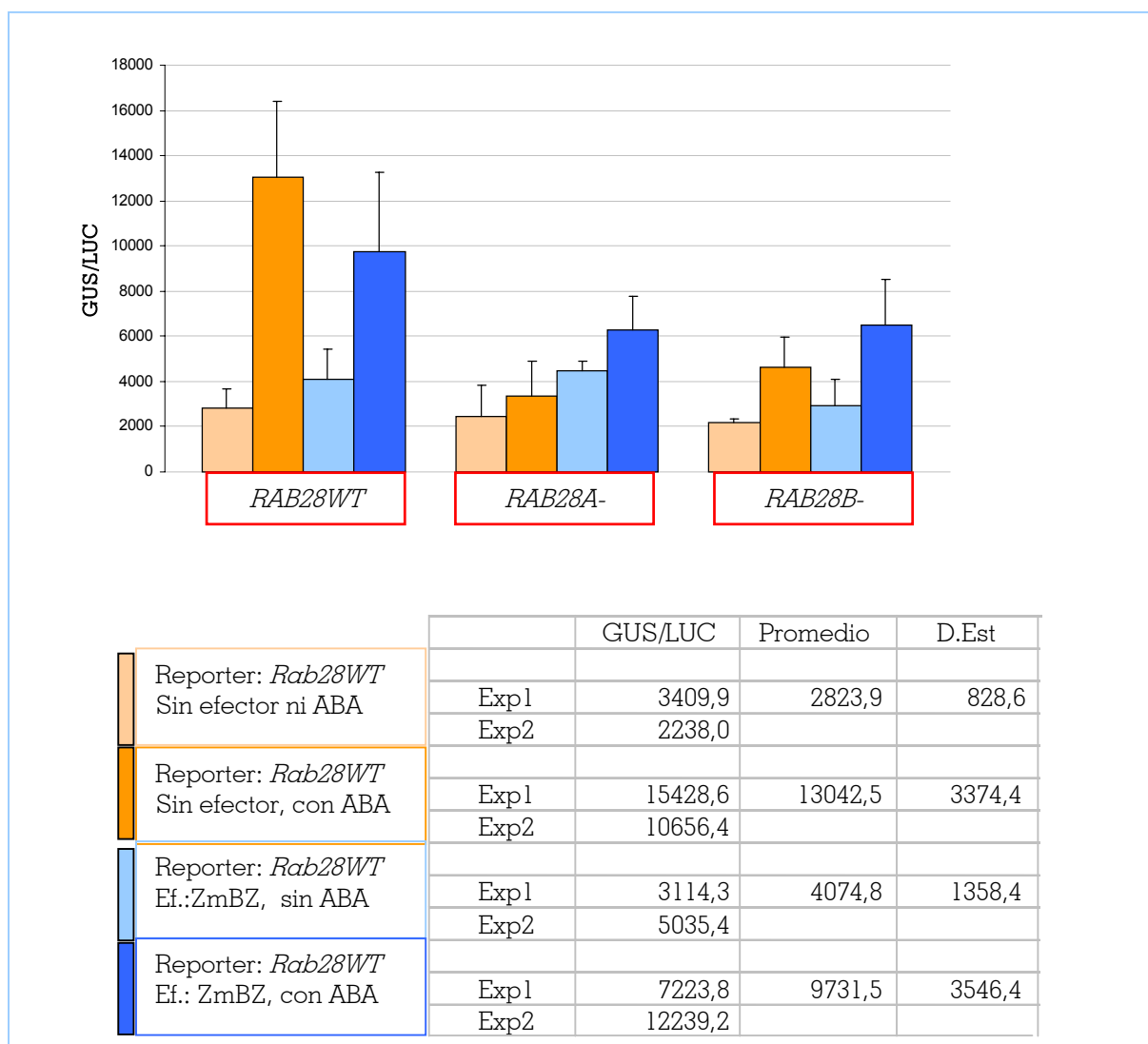
En la figura 30 se muestran los resultados de una transformación de embriones de 23 dap con ZmBZ utilizando como construcciones *reporter* el promotor *rab28* en versión salvaje y con las cajas ABRE A mutada y ABRE B mutada. En el embrión encontramos unas actividades del promotor mayores que en los callos. El primer valor que encontramos corresponde a la activación producida por los factores endógenos. Cuando se le aplica un tratamiento con ABA, esta actividad se duplica. Cuando se sobreexpresa ZmBZ el efecto es una pequeña pero reproducible transactivación (de 1,5 veces) sobre el valor basal, la cual es mayor cuando tratamos con ABA la muestra (de 3,6 veces). Estas actividades observadas son dependientes de las cajas ABRE A y ABRE B, debido a que cuando se muta alguna de las cajas los valores de actividad caen a los niveles basales, sin observarse inducción por ABA. Curiosamente en el embrión el efecto observado al mutar la caja ABRE B es mayor que el observado al mutar la caja ABRE A.



		GUS/LUC	Promedio	D.Est
Reporter: <i>Rab28WT</i> Sin efector ni ABA	Exp1	8643,2	9377,0	1148,6
	Exp2	10700,8		
	Exp3	8787,1		
Reporter: <i>Rab28WT</i> Sin efector Con ABA	Exp1	15250,2	20065,2	4496,9
	Exp2	24156,4		
	Exp3	20789,1		
Reporter: <i>Rab28WT</i> Ef.: ZmBZ, sin ABA	Exp1	20802,0	14266,9	5784,0
	Exp2	12193,3		
	Exp3	9805,5		
Reporter: <i>Rab28WT</i> Efector: ZmBZ Con ABA	Exp1	49783,7	33615,2	15946,7
	Exp2	33161,8		
	Exp3	17900,0		
Reporter: <i>Rab28A</i> - Sin efector ni ABA	Exp1	7768,8	8373,6	542,8
	Exp2	8818,9		
	Exp3	8533,0		
Reporter: <i>Rab28A</i> - Sin efector Con ABA	Exp1	13089,7	12119,9	2622,9
	Exp2	14119,8		
	Exp3	9150,1		
Reporter: <i>Rab28A</i> - Ef.: ZmBZ, sin ABA	Exp1	6513,9	8299,5	1870,1
	Exp2	10244,1		
	Exp3	8140,6		
Reporter: <i>Rab28A</i> - Efector: ZmBZ Con ABA	Exp1	4820,2	9528,3	4932,5
	Exp2	14658,3		
	Exp3	9106,6		
Reporter: <i>Rab28B</i> - Sin efector ni ABA	Exp1	1407,4	2531,2	1020,4
	Exp2	2786,3		
	Exp3	3399,9		
Reporter: <i>Rab28B</i> - Sin efector Con ABA	Exp1	3697,4	3574,5	982,1
	Exp2	2536,7		
	Exp3	4489,4		
Reporter: <i>Rab28B</i> - Ef.: ZmBZ, sin ABA	Exp1	4847,7	5808,2	2821,4
	Exp2	3592,4		
	Exp3	8984,5		
Reporter: <i>Rab28B</i> - Efector: ZmBZ Con ABA	Exp1	2942,4	4734,1	1555,0
	Exp2	5527,0		
	Exp3	5732,9		

Figura 30. Representación gráfica de los valores de actividad GUS/LUC de una cotransformación en embriones W64A de 23 dap con el promotor *rab28* salvaje, *rab28* ABRE A- o *rab28* ABRE B- y el factor ZmBZ. En el gráfico se indican los promotores usados.

En la figura 31 se muestran los resultados de una transformación de embriones de 17 dap con ZmBZ utilizando las mismas construcciones *reporter* que en la transformación anterior. Los valores de actividad de *rab28* son menores que en embriones de 23 dap, posiblemente porque el gen está inactivo a los 17 dap. El primer valor que encontramos son valores basales debidos a los factores endógenos, entre los que no está presente la actividad ABF. Al tratar las muestras con ABA, se observa un incremento de la actividad de *rab28* de 4,6 veces. Al sobreexpresar ZmBZ tiene un pequeño efecto transactivador (de 1,4 veces) sobre el nivel basal. Cuando tratamos la muestra con ABA nos encontramos con un efecto de ZmBZ no transactivador, ya que no aumenta la actividad respecto a la muestra tratada con ABA sin sobreexpresar ZmBZ. En embriones de 17 dap ZmBZ tiene muy poco efecto sobre *rab28*. Cuando mutamos la cajas ABRE A se pierde la activación por la hormona, pero los valores basales se mantienen muy parecidos a los del *rab28* salvaje. Esto posiblemente nos indique que los factores endógenos que nos dan la actividad no son tan específicos para el ABRE como los que encontramos a los 23 dap, o que los valores del promotor salvaje ya son muy bajos. Al mutar la caja ABRE B el resultado es equivalente al observado al mutar ABRE A.



		GUS/LUC	Promedio	D.Est
Reporter: <i>Rab28A</i> - Sin efector ni ABA	Exp1	1436,7	2439,2	1417,8
	Exp2	3441,8		
Reporter: <i>Rab28A</i> - Sin efector, con ABA	Exp1	2259,1	3358,8	1555,2
	Exp2	4458,5		
Reporter: <i>Rab28A</i> - Ef.:ZmBZ, sin ABA	Exp1	4157,6	4462,7	431,5
	Exp2	4767,9		
Reporter: <i>Rab28A</i> - Ef.: ZmBZ, con ABA	Exp1	5272,4	6305,0	1460,3
	Exp2	7337,6		
Reporter: <i>Rab28B</i> - Sin efector ni ABA	Exp1	2304,9	2180,9	175,2
	Exp2	2057,0		
Reporter: <i>Rab28B</i> - Sin efector, con ABA	Exp1	5575,2	4630,1	1336,5
	Exp2	3685,1		
Reporter: <i>Rab28B</i> - Ef.: ZmBZ sin ABA	Exp1	3769,6	2931,4	1185,3
	Exp2	2093,3		
Reporter: <i>Rab28B</i> - Ef.:ZmBZ, con ABA	Exp1	7907,0	6489,4	2004,7
	Exp2	5071,8		

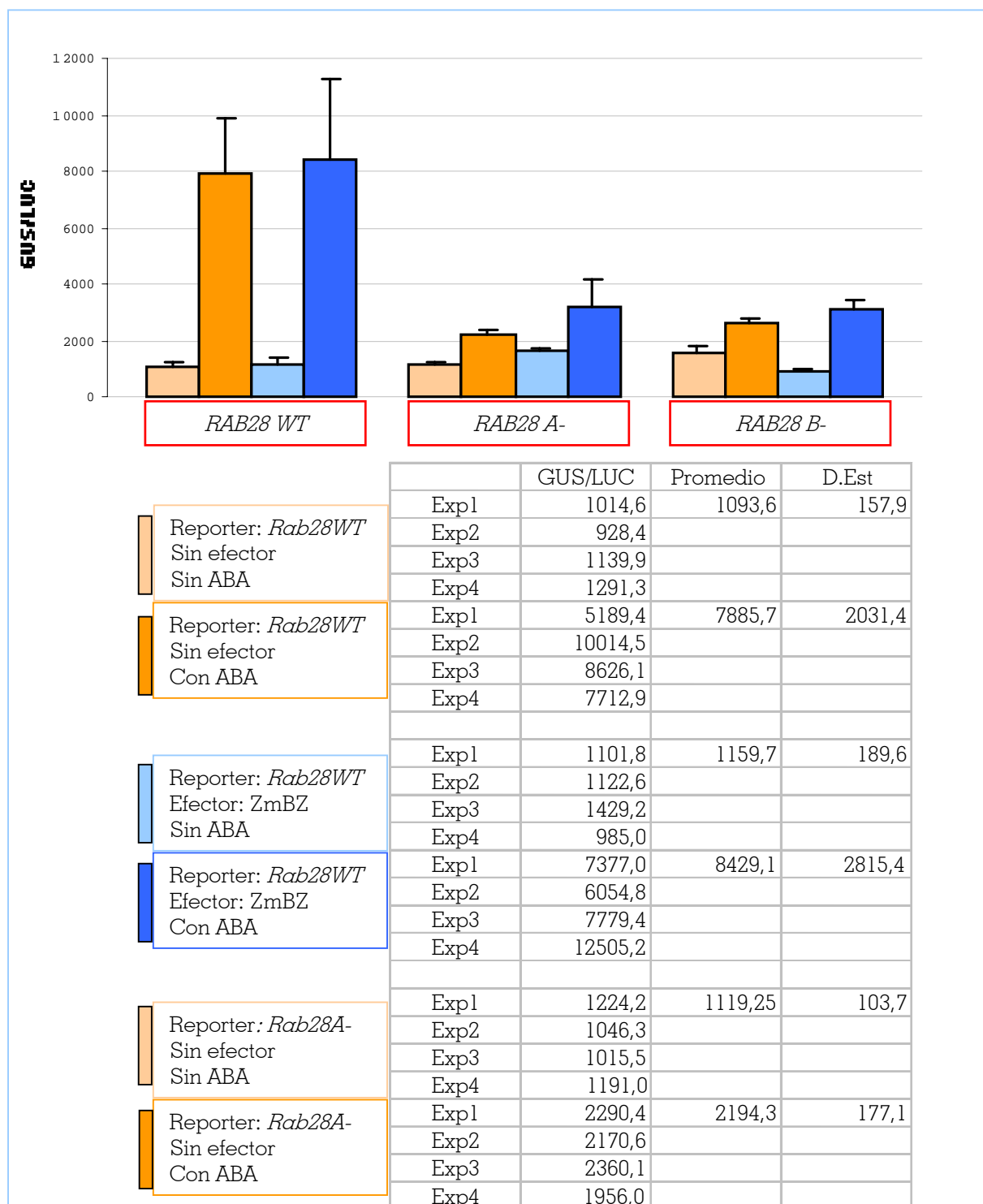
Figura 31. Representación gráfica de los valores de actividad GUS/LUC de una cotransformación en embriones W64A de 17 dap con el promotor *Rab28* salvaje, *rab28* ABREA- o ABREB- y el factor ZmBZ. En la gráfica se indica el promotor usado.

3.3.5. Evaluación del efecto de la sobreexpresión de ZmBZ sobre la actividad del promotor *rab28* en embriones *vp1* de 17 y de 23 dap

Estudios genéticos han mostrado que los mutantes *vp1* tienen una menor sensibilidad al ABA y no son capaces de expresar muchos genes inducibles por ABA en un nivel normal. Estos mutantes se caracterizan porque no tienen el factor de transcripción VP1. La transcripción del gen *rab28* en el embrión es dependiente de VP1 en condiciones normales, pero puede ser inducido en los mutantes *vp1* cuando se aplica ABA exógenamente. Es por este motivo que estos embriones *vp1* se han utilizado con la finalidad de evaluar la relación existente en el embrión entre VP1 y ZmBZ. Hemos analizado también embriones de 17 y 23 dap para comparar los resultados con los obtenidos con los embriones W64A.

En la figura 32 se muestran los resultados obtenidos con la transformación de embriones de 23 dap con ZmBZ. Los valores de actividad del gen *rab28* son menores que los obtenidos en los embriones W64A. Se ha analizado la actividad sobre el promotor salvaje y las versiones mutadas en ABRE A y

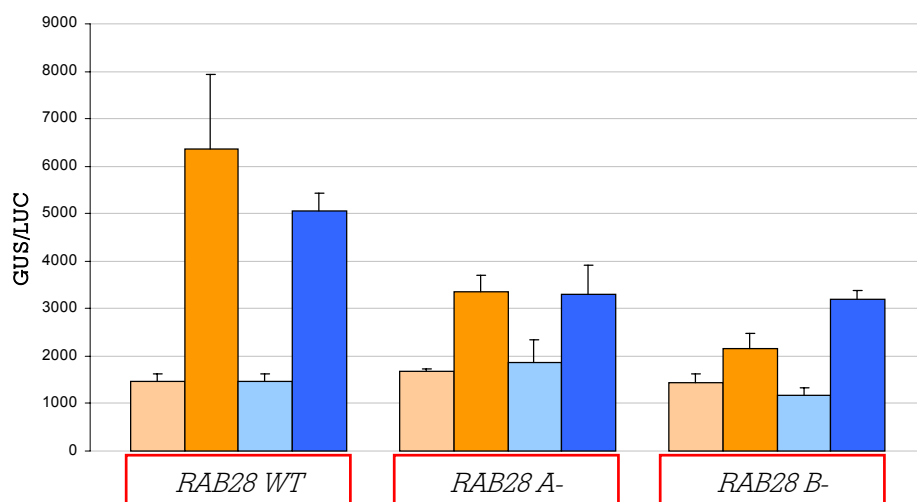
en ABRE B. El primer valor corresponde, como en las transformaciones anteriores, al valor basal en respuesta a los factores endógenos en el tejido. La activación producida por el tratamiento con ABA es de 7 veces el valor basal. La sobreexpresión de ZmBZ no tiene efecto sobre *rab28*. Cuando mutamos las cajas ABRE perdemos la inducción de *rab28* por ABA, sugiriendo que el efecto observado en el promotor salvaje es dependiente de los ABRE. Podemos observar que en este sustrato las dos cajas ABRE tienen igual importancia en la actividad del promotor. Estos resultados sugieren que el efecto transactivador del factor ZmBZ depende de la presencia de VP1.



		GUS/LUC	Promedio	D.Est
Reporter: <i>Rab28A</i> - Efector: ZmBZ Sin ABA	Exp1	1705,7	1621,9	110,8
	Exp2	1458,7		
	Exp3	1664,9		
	Exp4	1658,3		
Reporter: <i>Rab28A</i> - Efector: ZmBZ Con ABA	Exp1	2456,3	3170,1	957,3
	Exp2	2796,1		
	Exp3	4258		
	Exp4			
Reporter: <i>Rab28B</i> - Sin efector Sin ABA	Exp1	1977,6	1515	277,4
	Exp2	1227,8		
	Exp3	1481,3		
	Exp4	1450,9		
Reporter: <i>Rab28B</i> - Sin efector Con ABA	Exp1	2691,4	2625,5	181,5
	Exp2	2595,3		
	Exp3	2392		
	Exp4	2823,2		
Reporter: <i>Rab28B</i> - Efector: ZmBZ Sin ABA	Exp1	800,4	867,9	105,1
	Exp2	820,7		
	Exp3	825,7		
	Exp4	1024,6		
Reporter: <i>Rab28B</i> - Efector: ZmBZ Con ABA	Exp1	2830,1	3140,1	274,1
	Exp2	3087,3		
	Exp3	3147,4		
	Exp4	3495,6		

Figura 32. Representación gráfica de los valores de actividad GUS/LUC en una cotransformación de embriones *vp1* de 23 dap con el promotor *rab28* salvaje, *rab28* ABRE A- o *rab28* ABRE B- y el factor ZmBZ. En la gráfica se indican los promotores utilizados.

En la figura 33 se muestran los resultados obtenidos al transformar embriones de 17 dap con ZmBZ. Los valores de activación de *rab28* en esta muestra son del mismo orden que los obtenidos con los embriones de 23 dap, posiblemente debido a que *rab28* en estos embriones *vp1* no se transcribe. Al aplicar la hormona, se produce una activación de 4 veces sobre el nivel basal. Al sobreexpresar ZmBZ se puede observar que en condiciones basales no tiene ningún efecto, a diferencia de lo que pasaba en los embriones W64A de la misma edad. Al aplicar la hormona, no vemos tampoco efecto. Al mutar tanto la caja ABRE A como la caja ABRE B, en ambos casos se observa una disminución en la activación producida por ABA, aunque no se llega a anular. Este patrón nos recuerda al observado en la figura 32 y podría tener la misma explicación que en embriones W64A, es decir, que los factores que participan en la activación de *rab28* a los 17 dap tienen menos especificidad para los ABRE que los que participan a los 23 dap o que los bajos valores del promotor salvaje no pueden disminuir más, aunque mutemos los ABREs.



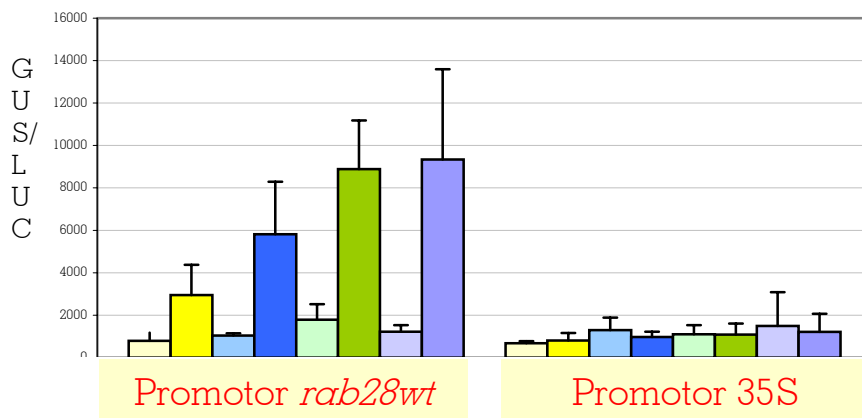
		GUS/LUC	Promedio	D.Est
Reporter: <i>Rab28WT</i> Sin efector Sin ABA	Exp1	1456,0	1462,8	155,1
	Exp2	1278,0		
	Exp3	1657,8		
	Exp4	1459,6		
Reporter: <i>Rab28WT</i> Sin efector Con ABA	Exp1	4276,6	6369,3	1569,6
	Exp2	8064,9		
	Exp3	6738,9		
	Exp4	6396,8		
Reporter: <i>Rab28WT</i> Efector: ZmBZ Sin ABA	Exp1	1451,4	1457,9	163,7
	Exp2	1309,9		
	Exp3	1382,6		
	Exp4	1687,8		
Reporter: <i>Rab28WT</i> Efector: ZmBZ Con ABA	Exp1	4497,3	5061,8	381,1
	Exp2	5194,4		
	Exp3	5333,0		
	Exp4	5222,8		
Reporter: <i>Rab28A-</i> Sin efector Sin ABA	Exp1	1728,7	1687,1	37,3
	Exp2	1638,0		
	Exp3	1688,3		
	Exp4	1693,4		
Reporter: <i>Rab28A-</i> Sin efector Con ABA	Exp1	3329,4	3364,5	332,2
	Exp2	3546,4		
	Exp3	2913,0		
	Exp4	3669,4		
Reporter: <i>Rab28A-</i> Efector: ZmBZ Sin ABA	Exp1	1187,0	1850,8	479,5
	Exp2	2181,4		
	Exp3	1812,0		
	Exp4	2222,9		
Reporter: <i>Rab28A-</i> Efector: ZmBZ Con ABA	Exp1	2445,8	3313,3	598,3
	Exp2	3758,7		
	Exp3	3654,7		
	Exp4	3394,2		

		GUS/LUC	Promedio	D.Est
Reporter: <i>Rab28B</i> - Sin efector Sin ABA	Exp1	1260,8	1447,3	173,1
	Exp2	1591,9		
	Exp3	1339,2		
	Exp4	1597,6		
Reporter: <i>Rab28B</i> - Sin efector Con ABA	Exp1	2277,1	2161,6	321,2
	Exp2	1867,0		
	Exp3	2562,3		
	Exp4	1940,3		
Reporter: <i>Rab28B</i> - Efector: ZmBZ Sin ABA	Exp1	992,1	1178,3	159,6
	Exp2	1376,7		
	Exp3	1206,4		
	Exp4	1138,3		
Reporter: <i>Rab28B</i> - Efector: ZmBZ Con ABA	Exp1	2932,7	3189,1	193,6
	Exp2	3201,4		
	Exp3	3219,6		
	Exp4	3402,7		

Figura 33. Representación gráfica de los valores de actividad GUS/LUC en una cotransformación de embriones *vpl* de 17 dap con el promotor *rab28* salvaje, *rab28* ABRE A- o *rab28* ABRE B- y el factor ZmBZ. En la gráfica se indican los promotores utilizados.

3.3.6. Evaluación del efecto de la sobreexpresión de EmBP-2 sobre la actividad del promotor *rab28* en embriones W64A de 23dap

En la figura 34 se muestran los resultados de una transformación en embriones W64A de 23 dap con EmBP-2. Como reporter se ha usado la construcción con el *rab28* salvaje, y como control negativo el promotor del gen constitutivo 35S fusionado al GUS. El valor de activación que se obtiene con el tratamiento con ABA es de 2,6 veces el valor basal. El factor EmBP-2 sin tratamiento con ABA tiene un pequeño efecto activador de 1,6 el valor basal y al tratar con la hormona la muestra la activación es de casi 8 veces el valor basal. Hemos sobreexpresado en este experimento las dos bZIPs juntas. Los valores de activación obtenidos solamente con ZmBZ es de 5 veces el valor basal al tratar con ABA. No hay activación con las dos bZIP juntas sin tratamiento con ABA. Al tratar las muestras con la hormona no se observa ningún cambio significativo respecto al valor obtenido con EmBP-2 sola. Esto parece indicar que en el embrión en la regulación de *rab28* no hay cooperación de las dos proteínas. Los valores resultantes de la transformación con el promotor 35S se corresponden con el basal sin obtenerse regulación por ABA, indicando que las activaciones anteriores son específicas. Hemos realizado otros experimentos en callos BMS sobreexpresando las dos bZIP juntas y tampoco en este tejido muestran cooperación en la regulación de *rab28* (resultado no mostrado). EmBP-2 tiene en embriones de 17 dap el mismo efecto que tenía ZmBZ (resultado no mostrado).



	GUS/LUC	Promedio	D.Est
Reporter: <i>rab28WT</i> Sin efector y sin ABA	Exp1	1151,1	795,0
	Exp2	838,2	
	Exp3	397,7	
Reporter: <i>rab28WT</i> Sin efector Con ABA	Exp1	2027,8	2953,5
	Exp2	2237,2	
	Exp3	4595,6	
Reporter: <i>rab28WT</i> Con ZmBZ sin ABA	Exp1	1159,6	1039,1
	Exp2	938,2	
	Exp3	1019,5	
Reporter: <i>rab28WT</i> Con ZmBZ Con ABA	Exp1	4191,6	5821,2
	Exp2	4616,8	
	Exp3	8655,3	
Reporter: <i>rab28WT</i> Con EmBP-2 sin ABA	Exp1	1296,4	1791,7
	Exp2	1447,3	
	Exp3	2631,4	
Reporter: <i>rab28WT</i> Con EmBP-2 Con ABA	Exp1	6256,3	8886,3
	Exp2	9963,7	
	Exp3	10439,0	
Reporter: <i>rab28WT</i> Con ZmBZ y EmBP-2 Sin ABA	Exp1	910,4	1225,8
	Exp2	1520,1	
	Exp3	1246,8	
Reporter: <i>rab28WT</i> Con ZmBZ y EmBP-2 Con ABA	Exp1	4426,7	9337,3
	Exp2	11863,0	
	Exp3	11722,2	
Reporter: 2x35S Sin efector y sin ABA	Exp1	574,0	680,9
	Exp2	765,1	
	Exp3	703,6	
Reporter: 2x35S Sin efector Con ABA	Exp1	116,0	810,3
	Exp2	462,3	
	Exp3	800,5	
Reporter: 2x35S Con ZmBZ sin ABA	Exp1	998,8	1296,1
	Exp2	912,4	
	Exp3	1977,1	

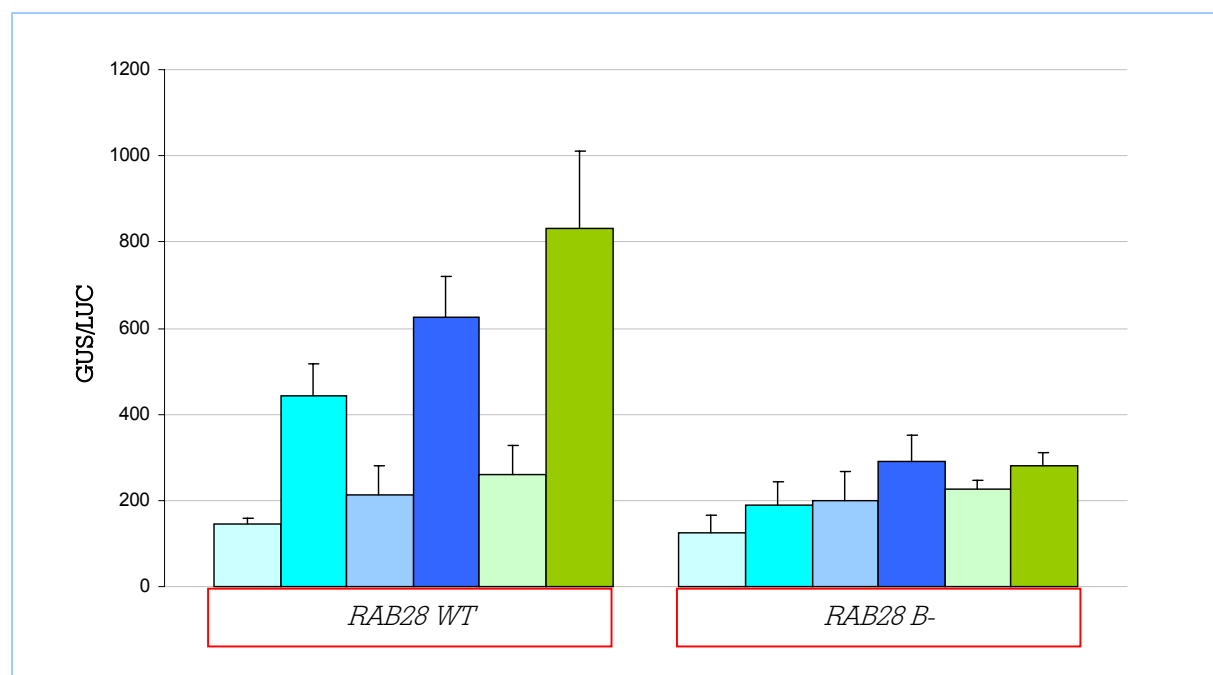
		GUS/LUC	PROMEDIO	D.Est
Reporter: 2x35S Con ZmBZ Con ABA	Exp1	1205,7	976,4	244,6
	Exp2	1004,7		
	Exp3	718,9		
Reporter: 2x35S Con EmBP-2 sin ABA	Exp1	1175,4	1104,0	429,8
	Exp2	1493,6		
	Exp3	642,9		
Reporter: 2x35S Con EmBP-2 Con ABA	Exp1	1517,7	1089,1	519,6
	Exp2	511,1		
	Exp3	1238,6		
Reporter: 2x35S Con ZmBZ y EmBP-2 Sin ABA	Exp1	460,1	1495,5	1594,9
	Exp2	3332,2		
	Exp3	694,1		
Reporter: 2x35S Con ZmBZ y EmBP-2 Con ABA	Exp1	912,2	1213,6	858,3
	Exp2	2182,0		
	Exp3	546,6		

Figura 34. Representación gráfica de los valores de actividad GUS/LUC de una cotransformación de embriones W64A de 23 dag de maíz con el promotor *rab28* salvaje y los factores ZmBZ y EmBP-2. En la gráfica se indican los promotores utilizados. En la tabla se indica el código de los colores y los valores utilizados para la elaboración de la gráfica. Se ha utilizado 0,67 µg de plásmido de cada efector.

3.3.7. Evaluación del efecto de la sobreexpresión de EmBP-2 y ZmBZ sobre la actividad del promotor *rab28* en coleoptilos de plántulas de 2 dag

Estábamos interesados en comparar el efecto de nuestras bZIPs sobre la actividad de *rab28* en tejido embrionario y vegetativo, para poder evaluar si interaccionaban con diferentes factores en los dos tipos de tejidos. Datos previos indican que los factores de transcripción que regulan la expresión de *rab28* en tejidos vegetativos y embrionarios son diferentes (o forman parte de diferentes enhanceosomas) al haberse obtenido en experimentos de tipo EMSA bandas retardadas de diferente movilidad en ambos tipos de tejido. Hemos transformado coleoptilos de plántulas de 2 dag, en las que el gen *rab28* se encuentra inactivo pero es posible su inducción con ABA. Aunque los resultados obtenidos en ensayos EMSA con extractos de embrión germinado durante 48h en agua o tratado 48h con ABA 100µM nos muestran unos complejos proteicos muy similares a los obtenidos con extractos de embrión seco, las plántulas de 2 dag tienen características de tejido embrionario y de tejido vegetativo. Hemos utilizado los coleoptilos de 2 dag porque tienen características intermedias entre tejido vegetativo y se transforman fácilmente, a diferencia de las hojas de plántulas de más edad.

En la figura 35 se muestran los resultados obtenidos en la transformación de coleoptilos por ZmBZ y EmBP-2. Se ha utilizado como *reporter* el promotor *rab28* salvaje y el promotor con la caja ABRE B mutada. Los valores de actividad de *rab28* son más bajos en relación a las anteriores transformaciones, aunque esto es debido en parte a un menor tiempo de reacción GUS. El ABA activa al gen *rab28* 3 veces sobre el valor basal. Al sobreexpresar ZmBZ y EmBP-2 se puede observar que en condiciones basales hay una pequeña transactivación, que es mayor en el caso del factor EmBP-2 (1,5 y 1,8 respectivamente). Cuando se tratan las muestras con la hormona, los 2 factores tienen un efecto transactivador, que sigue siendo mayor para EmBP-2 (4,4 y 5,8 veces el valor basal respectivamente). Al mutar la caja ABRE B se pierde la activación por ABA, sugiriendo que ésta era específica de la caja ABRE B. En cuanto a la actividad en las muestras sin ABA, no se ven afectadas al mutar la caja ABRE B, sugiriendo que la actividad observada no es dependiente del ABRE B. Este experimento se ha realizado mutando la caja ABRE A y el resultado es el mismo (resultado no mostrado). Esto nos indica que el efecto transactivador producido por las bZIPs en ausencia de ABA es independiente de las cajas ABRE. Esto lo habíamos visto en embriones W64A de 17 dap para ZmBZ, y podía tener la misma explicación, es decir, que estén participando para producir esta actividad factores endógenos poco específicos del ABRE que interaccionan con las bZIP, pero que en el tejido no producen la activación del gen *rab28* endógeno. También puede ser por los bajos niveles del promotor salvaje.



		GUS/LUC	Promedio	D.Est
Reporter: <i>Rab28WT</i> Sin efector Sin ABA	Exp1	146,5	144,2	15,8
	Exp2	158,8		
	Exp3	127,4		
Reporter: <i>Rab28WT</i> Sin efector Con ABA	Exp1	526,1	442,1	73,7
	Exp2	412,5		
	Exp3	387,9		
Reporter: <i>Rab28WT</i> Efector: ZmBZ Sin ABA	Exp1	152,9	213,9	65,8
	Exp2	205,1		
	Exp3	283,8		
Reporter: <i>Rab28WT</i> Efector: ZmBZ Con ABA	Exp1	604,8	626,9	93,1
	Exp2	546,8		
	Exp3	729,1		
Reporter: <i>Rab28WT</i> Efector: EmBP-2 Sin ABA	Exp1	322,9	259,0	67,7
	Exp2	187,9		
	Exp3	266,3		
Reporter: <i>Rab28WT</i> Efector: EmBP-2 Con ABA	Exp1	846,9	830,7	180,2
	Exp2	642,9		
	Exp3	1002,3		
Reporter: <i>Rab28B</i> Sin efector Sin ABA	Exp1	104,2	124,8	40,8
	Exp2	171,9		
	Exp3	98,4		
Reporter: <i>Rab28B</i> Sin efector Con ABA	Exp1	250,2	187,9	55,5
	Exp2	169,9		
	Exp3	143,6		
Reporter: <i>Rab28B</i> Efector: ZmBZ Sin ABA	Exp1	263,8	200,4	66,8
	Exp2	130,6		
	Exp3	206,8		
Reporter: <i>Rab28B</i> Efector: ZmBZ Con ABA	Exp1	268,2	290,7	59,5
	Exp2	245,7		
	Exp3	358,3		
Reporter: <i>Rab28B</i> Efector: EmBP-2 Sin ABA	Exp1	209,7	226,8	19,6
	Exp2	222,5		
	Exp3	248,2		
Reporter: <i>Rab28B</i> Efector: EmBP-2 Con ABA	Exp1	284,8	280,8	29,0
	Exp2	250,0		
	Exp3	307,6		

Figura 35. Representación gráfica de los valores de actividad GUS/LUC en una cotransformación de coleoptilos de 2 dag con el promotor *rab28* salvaje o *rab28* ABRE B- y los factores ZmBZ y EmBP-2. En la gráfica se indican los promotores utilizados.

3.4. ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN DE LAS PROTEÍNAS PRESENTES EN EXTRACTOS NUCLEARES DE EMBRIÓN CON LOS ABREs

3.4.1. Análisis de la interacción entre las proteínas nucleares de embrión y los ABRE presentes en el promotor de *Rab28*

Experimentos de *footprinting in vivo* realizados en nuestro laboratorio muestran que hay proteínas unidas a las cajas ABRE A y ABRE B antes de que se produzca la activación del gen *rab28* mediada por el desarrollo embrionario. Las protecciones observadas sobre estos elementos no difieren significativamente cuando el *footprint* se realiza con muestras en las que el gen *rab28* se encuentra activo. Por otra parte, ensayos tipo EMSA con extractos de proteínas nucleares de embriones de diferentes edades muestran la formación de complejos DNA-proteína con diferente movilidad electroforética, que podrían estar relacionados entre ellos de manera que se formarían por modificación del complejo del estadio de desarrollo anterior, debido a un cambio de las proteínas que los forman o a modificaciones post-traduccionales sobre las mismas proteínas.

Nuestro objetivo en estos experimentos es el análisis de la composición de los complejos proteína-DNA que se forman con los extractos nucleares de embrión y que regulan la expresión de *rab28* a través del elemento ABRE A. Para ello, en primer lugar hemos analizado los efectos producidos por la adición de las proteínas EmBP-2 y ZmBZ recombinantes a los extractos nucleares sobre la formación de los complejos proteína-ABRE A. En segundo lugar hemos analizado el efecto de la adición de los anticuerpos generados contra EmBP-2 y ZmBZ en los extractos nucleares sobre la formación de los complejos proteína-ABRE A.

3.4.2. Análisis de la formación de las bandas retardadas en presencia de EmBP-2 y ZmBZ.

Cuando incubamos extractos nucleares de embrión de 60 dap con las sondas ABRE A y ABRE B obtenemos bandas retardadas en ambos casos aunque la señal obtenida con el ABRE A es más intensa, como ya se había visto en experimentos con embriones de 37 dap previamente, tal y como se muestra en la figura 36. Por este motivo hemos realizado todos los ensayos con este elemento.

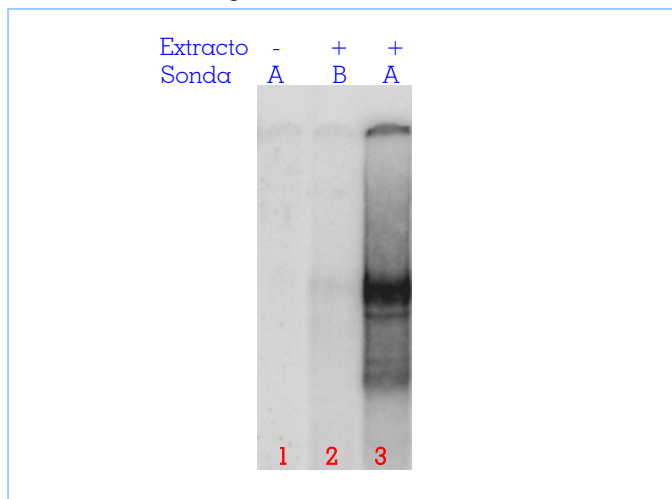


Figura 36. Ensayo EMSA con extractos proteicos nucleares de embrión de 60 dap y las sondas ABRE A y ABRE B. Se han utilizado 50 µg de extracto. En la figura se señala en qué carriles hay extracto y las sondas utilizadas: A para ABRE A y B para ABRE B. El carril 1 es el control negativo.

En la figura 37 se muestra un primer experimento en el que se pretendía evaluar la movilidad electroforética relativa entre las proteínas recombinantes (hemos analizado EmBP-2, puesto que ya conocemos que ZmBZ presenta igual movilidad), las proteínas purificadas de extractos nucleares de embriones de 20 dap y de 60 dap. Esto es importante porque si vamos a añadir la proteína recombinante al extracto tenemos que conocer que movilidad tiene respecto a los otros complejos.

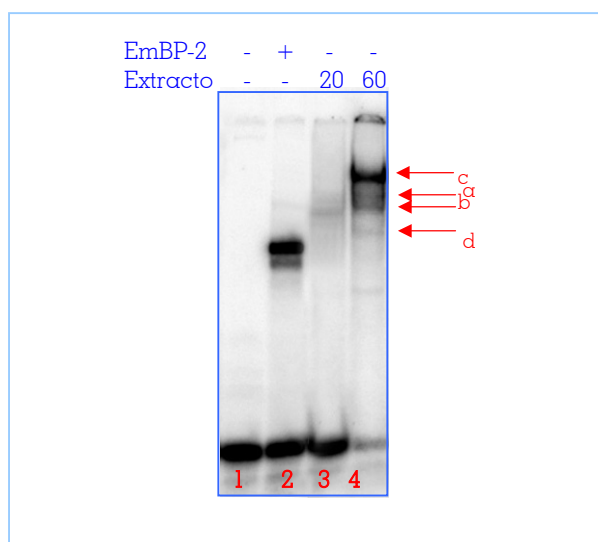


Figura 37. Experimento EMSA que muestra las movilidades electroforéticas relativas de las proteínas recombinantes y las proteínas nucleares de extractos de 20 y 60 dap utilizando la sonda ABRE A. Se ha realizado el ensayo con 600ng de proteína EmBP-2 recombinante o 45 µg de extracto. En la figura se indican los carriles con proteína recombinante (2), extracto de 20 dap (3) y extracto de 60 dap (4). El carril 1 es el control negativo. Con las flechas rojas se señalan las bandas que se van a analizar. La banda a se resolverá en dos bandas cuando aumentemos el tiempo de electroforesis, en la figura 38.

En la figura 38 se muestran ensayos de competición con extractos de proteínas nucleares de embriones de 60 dap y diferentes competidores. El carril 1 es el control del ensayo, donde no se han adicionado competidores. En los carriles 2-6 se han realizado ensayos de competición con 2 µg de poli-dIdC (carril 2), 100x y 1000x de ABRE A mutado frío (carriles 3 y 4) y 100x y 1000x de ABRE A frío (carriles 5 y 6). Los resultados indican que la interacción entre las proteínas y el ABRE A es específica, ya que no se modifica por la presencia de competidores específicos o no específicos (como el ABRE A mutado o el poli-dIdC). El mayor tiempo de electroforesis resuelve a) en a) y a').

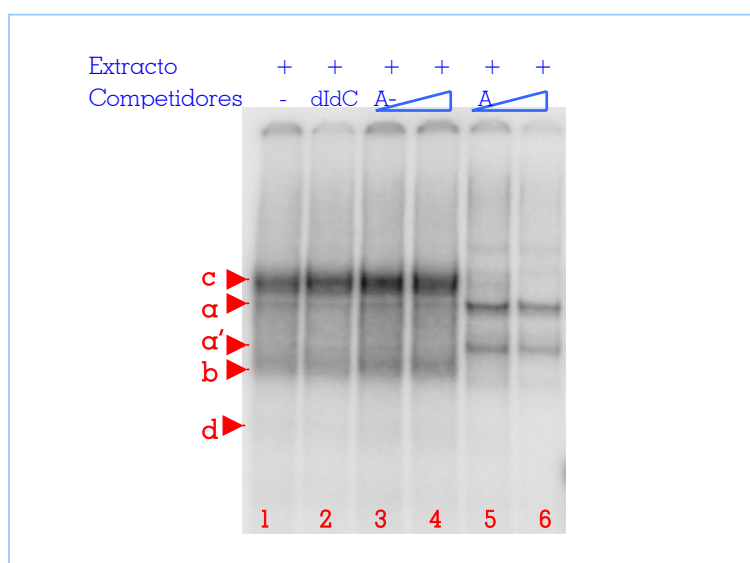


Figura 38. Ensayo de competición de un extracto de 60 dap. Los competidores utilizados y señalados en la figura son: 2: dIdC, 2 µg polidIdC; 3: ABRE A- 100x; 4: ABRE A- 1000x; 5: ABRE A 100x; 6: ABRE A 1000x. Las bandas retardadas principales se han señalado con las letras c, a, a' y b.

Resultados

Al competir con ABRE A el resultado nos sugiere que hay 2 tipos de interacciones entre los complejos proteicos y el DNA. Las bandas b), c) y d) disminuyen su intensidad y las bandas a) y a') aumentan su intensidad. Esto sugiere que las interacciones entre las proteínas y el DNA presentan más afinidad en el caso de las bandas b), c) y d) que en el caso de las bandas a) y a'). Hemos aumentado la cantidad de competidor hasta 100.000x ABRE A consiguiendo que las bandas a) y a') se compitan totalmente (no se muestra).

Con la finalidad de obtener más información sobre las proteínas del extracto que interaccionan con el ABRE A, hemos realizado un ensayo de desfosforilación del extracto con fosfatasa alcalina previo a la reacción de unión al DNA. Este tratamiento nos permite alterar el estado de fosforilación que presentan las proteínas del extracto nuclear *in vivo*. Cuando comparamos la señal obtenida con proteínas de un extracto nuclear control con aquella obtenida tras un tratamiento con fosfatasa alcalina podemos evaluar la importancia del estado de fosforilación de las proteínas que forman parte de los complejos proteicos que se unen al ABRE A. En la figura 39 se muestra este ensayo. Al comparar los carriles 1 y 2 podemos ver que la banda c) ha disminuido mucho su señal, mientras que el resto de las bandas prácticamente no se ha alterado. Esto nos sugiere que esta banda está formada por proteínas que requieren estar fosforiladas para unirse al DNA con mayor afinidad. El ensayo se ha repetido 3 veces obteniéndose el mismo efecto sobre la banda c).

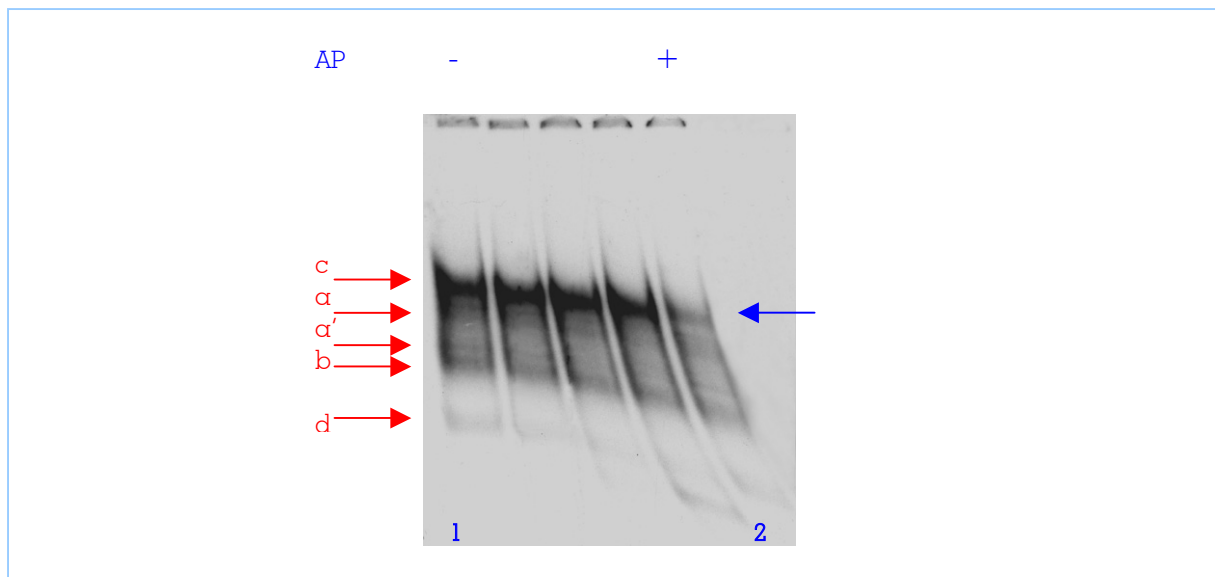


Figura 39. Ensayo de desfosforilación del extracto de proteínas nucleares. Se han utilizado 45 μg de extracto. El carril 1 es el extracto control y el 2 contiene la muestra tratada con fosfatasa alcalina (AP). Las bandas retardadas se señalan con las flechas rojas. La flecha azul señala la banda retardada que disminuye su intensidad con la desfosforilación.

Hemos realizado ensayos EMSA con extractos de proteínas nucleares de embriones de 20 dap. En la figura 40 se presenta un ensayo de competición con las proteínas EmBP-2 y ZmBZ recombinantes. En el carril 1 solamente hay extracto de 20 dap. En los carriles 2-4 se han realizado competiciones con EmBP-2 (20, 60 y 100 ng respectivamente) y en los carriles 5-7 se ha competido con ZmBZ (200, 600 y 1000ng respectivamente). Se ha utilizado más proteína ZmBZ porque las electroforesis y tinciones con coomasie realizadas con esta muestra indican que está más degradada que EmBP-2. El resultado indica que la banda del extracto de 20 dap no se compete con la adición de las proteínas recombinantes. Esto nos sugiere que la afinidad por el ABRE A de las proteínas endógenas en el embrión de 20 dap que forman esta banda retardada es mayor que la afinidad de las proteínas recombinantes. El experimento se ha realizado por triplicado.

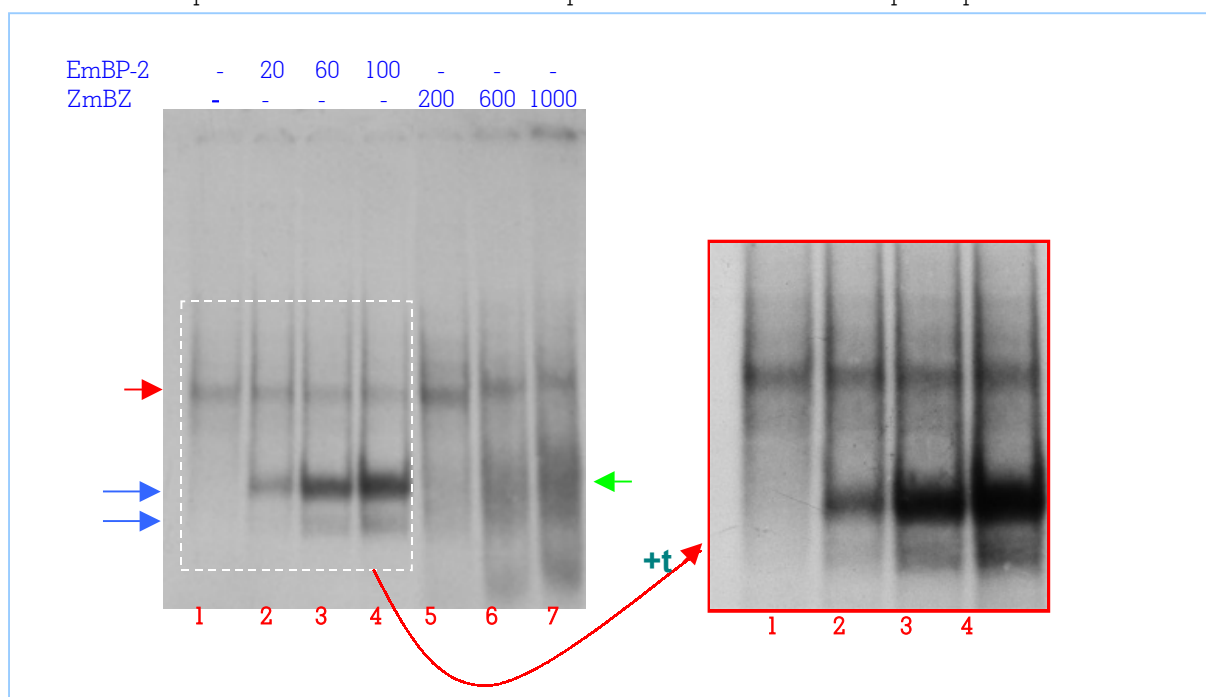


Figura 40. Ensayo de competición de un extracto de proteínas nucleares de embrión de 20 dap con las proteínas recombinantes EmBP-2 y ZmBZ. En todos los carriles se ha utilizado 5 µg de extracto y 45 µg de BSA. En la figura se indica la cantidad de proteína recombinante utilizada en la competición en ng. El cuadro blanco señala la parte de la imagen que se muestra después de una mayor exposición de la película. La doble banda que forma la proteína recombinante EmBP-2 se señala con 2 flechas azules. La flecha verde señala el retardo que nos da la proteína ZmBZ recombinante. La flecha roja señala las proteínas endógenas del extracto. La mayor exposición de los carriles 5-7 no aumenta la información y no se muestra.

3.4.3. Análisis de la formación de las bandas retardadas en presencia de los anticuerpos generados contra EmBP-2 y ZmBZ.

En estos experimentos hemos buscado si existe alguna interferencia en la formación de las bandas retardadas por la presencia de los anticuerpos contra EmBP-2 y contra ZmBZ en los extractos. En la figura 41 se muestra un ensayo de *supershift* con las proteínas recombinantes y sus anticuerpos,

donde se puede ver que la presencia del anticuerpo impide la interacción de las proteínas con el DNA, posiblemente debido a que éste interacciona con los elementos bZIP, interfiriendo así en su unión con el DNA. Esta parte de la proteína es muy antigénica, sobretodo el LZD (figuras 15 y 16).

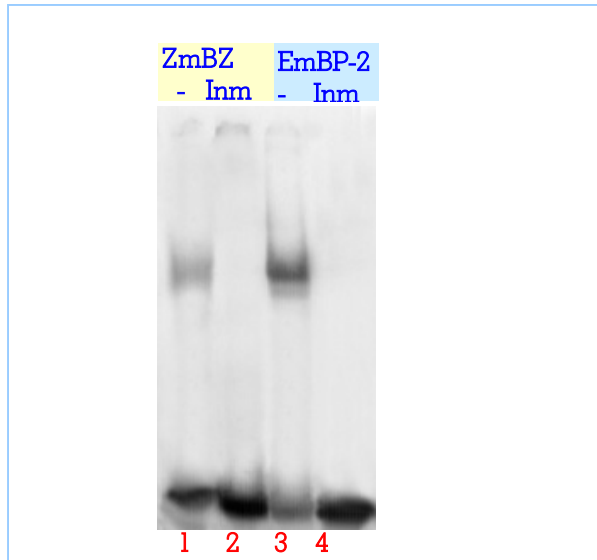


Figura 41. Ensayo *supershift* de las proteínas recombinantes con los anticuerpos generados contra ellas. Se han analizado 400 ng de cada proteína y se han utilizado 0,5 μ l de cada anticuerpo. La sonda marcada es el ABRE A. En la figura se indica con Inm el suero inmune. La numeración de los carriles se indica en la base de la imagen y contienen: 1: proteína ZmBZ, 2: proteína ZmBZ y anticuerpo contra ZmBZ; 3: proteína EmBP-2; 4: proteína EmBP-2 y anticuerpo contra EmBP-2.

Una vez visto que los anticuerpos interfieren en la unión de las proteínas recombinantes con el DNA, hemos realizado un ensayo de *supershift* con los extractos de proteínas nucleares de embriones de 60 dap y los dos anticuerpos. El ensayo se muestra en la figura 42. En el carril 1 se puede observar el extracto sin los anticuerpos. En los carriles 2 y 3 hemos añadido sueros preinmune e inmune generados contra EmBP-2, respectivamente. En los carriles 4 y 5 hemos añadido sueros preinmune e inmune generados contra ZmBZ, respectivamente. La figura muestra como el anticuerpo contra EmBP-2 hace disminuir la interacción entre las proteínas que forman la banda retardada d) y el ABREA. Esto sugiere que este complejo contiene alguna proteína que reacciona con el anticuerpo contra EmBP-2. Con el otro anticuerpo no se observan diferencias respecto al control. El experimento se ha repetido 4 veces de forma independiente. La bajada de intensidad no es muy pronunciada y se discutirá más adelante los posibles motivos.

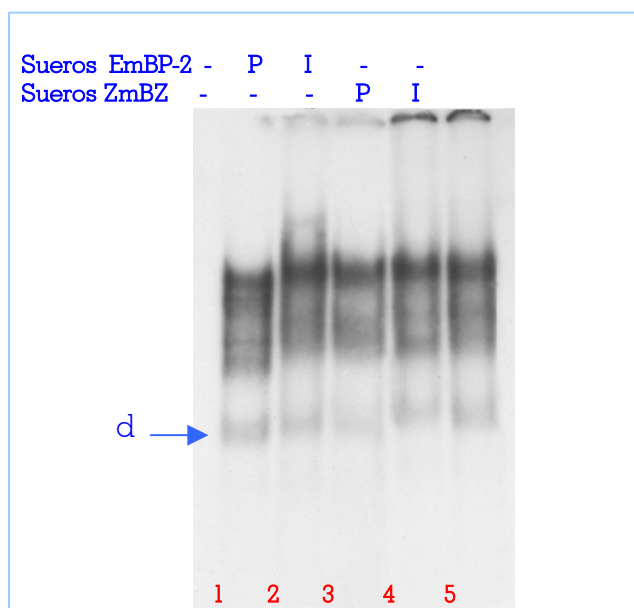


Figura 42. Ensayo *supershift* con extractos de proteínas nucleares de embriones de 60 dap y los sueros preinmunes e inmunes generados contra las proteínas recombinantes. En cada carril se han analizado 50 μ g de extracto y se han utilizado 3 μ l de cada suero. La sonda utilizada es el ABRE A. En la figura se indica en la parte superior lo que contiene cada línea: 1: sólo extracto; 2: extracto y suero preinmune de EmBP-2; 3: extracto y suero inmune de EmBP-2; 4: extracto y suero preinmune de ZmBZ; 5: extracto y suero inmune de ZmBZ. La banda señalada con una flecha y la letra d es la que disminuye su unión al DNA debido a la presencia del anticuerpo.

Con la finalidad de tener más información sobre esta interacción entre el anticuerpo contra EmBP-2 y proteínas de la banda retardada d), hemos eliminado a las proteínas del extracto nuclear que interaccionan con este anticuerpo mediante una inmunoprecipitación (inmunodeplección) con él. Posteriormente hemos realizado dos ensayos. El primero es un ensayo EMSA utilizando el extracto proteico obtenido después de la inmunoprecipitación. Este ensayo se muestra en la figura 43. En el carril 1 se puede observar el extracto sin inmunoprecipitar. En el carril 2 se muestra una competición de un extracto de 60 dap con la proteína EmBP-2 recombinante. Observamos que, a diferencia de su adición a extractos de 20 dap donde no veíamos efecto, en embriones de 60 dap EmBP-2 compite por la unión al ABRE A con las proteínas que forman la banda retardada d). Esto parece indicar que la afinidad por la sonda es semejante entre las proteínas endógenas y la proteína EmBP-2. En el carril 3 y 4 el extracto utilizado es el obtenido después de la inmunoprecipitación, en el carril 3 él solo y en el 4 competido con la proteína EmBP-2 recombinante. En el carril 3 se puede ver que la banda d) ha desaparecido después de la inmunoprecipitación del extracto con el anticuerpo. Esto reafirma que el anticuerpo interacciona con alguna de las proteínas del extracto que constituyen la banda retardada d). Creemos que esta proteína tiene que estar muy relacionada con EmBP-2, porque este anticuerpo ha demostrado siempre una alta especificidad para reaccionar con EmBP-2 y diferenciarla claramente de otra proteína de la familia, ZmBZ.

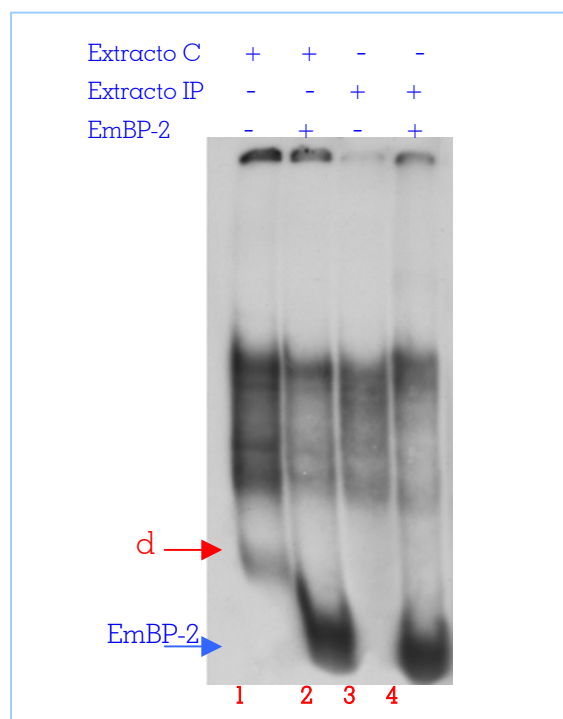


Figura 43. Comparación entre dos ensayos EMSA realizados con extractos proteicos nucleares de embrión de 60 dap antes y después de una inmunoprecipitación con el anticuerpo generado contra EmBP-2. La sonda utilizada ha sido el ABRE A. En cada carril se han analizado 50 µg de extracto. Se han añadido a los carriles 2 y 4 600 ng de proteína EmBP-2 recombinante. En la figura se indica en la parte superior lo analizado en cada línea: 1: Extracto antes de la inmunoprecipitación; 2: extracto antes de la inmunoprecipitación y proteína EmBP-2; 3: extracto después de la inmunoprecipitación; 4: extracto después de la inmunoprecipitación y proteína EmBP-2. Con una flecha roja se indica la banda que desaparece tras la inmunoprecipitación. Con una flecha azul se indica la proteína EmBP-2.

El segundo ensayo que hemos realizado ha sido una reacción de unión al DNA utilizando como sustrato proteico las proteínas del extracto nuclear que quedaron unidas a las *dynabeds* durante la inmunoprecipitación con el anticuerpo contra EmBP-2 y como sonda el ABRE A (ver apartado 5.18). En paralelo se ha realizado la inmunoprecipitación del mismo extracto utilizando el suero preinmune, como control del anticuerpo. La reacción de unión a DNA se ha realizado en paralelo

Resultados

con la sonda ABRE A mutado, como control de la especificidad por el ABRE A de las proteínas inmunoprecipitadas. El resultado se muestra en la figura 44. Las muestras han sido tratadas después de la reacción de unión proteína-DNA con proteinasa K, de manera que en el resultado vemos el DNA retenido en las *dynabeads*. En los carriles 1 y 2 vemos los *inputs* de las sondas radiactivas utilizadas, ABRE A mutado y ABRE A respectivamente. En los carriles 3 y 4 vemos el resultado de la inmunoprecipitación y reacción de unión al ABRE usando el suero preinmune. En los carriles 5 y 6 vemos el resultado de la inmunoprecipitación y reacción de unión al ABRE usando el anticuerpo contra EmBP-2. En los carriles 3 y 5 se ha usado la sonda ABRE A mutada y en los carriles 4 y 6 la sonda ABRE A. El resultado indica que las proteínas inmunoprecipitadas por el anticuerpo unen al ABRE A pero no al ABRE A mutado. En el carril 3 se puede ver una débil reacción entre las proteínas inmunoprecipitadas por el suero preinmune y el ABRE A, probablemente debido a interacciones inespecíficas, producto posiblemente de la gran cantidad de extracto y anticuerpo usados en el ensayo. En experimentos EMSA no se ha detectado esta reacción del suero preinmune nunca.



Figura 44. Autoradiografía de una electroforesis en gel de acrilamida 15% donde detectamos el DNA marcado retenido mediante una reacción de unión proteína-DNA, utilizando las proteínas inmunoprecipitadas por los sueros preinmune (cuadro amarillo) e inmune (cuadro azul) de un extracto de embrión seco. Después de la reacción de unión al DNA se trataron las muestras con proteinasa K. En las líneas 1 y 2 se muestra 2 μ l de la sonda utilizada en la reacción de unión. En las líneas 3 y 4 se muestra el DNA retenido (3: ABRE A mutado; 4: ABRE A) por las proteínas inmunoprecipitadas con el suero preinmune. En las líneas 5 y 6 se muestra el DNA retenido (5: ABRE A mutado; 6: ABRE A) por las proteínas inmunoprecipitadas con el suero inmune.

Hemos realizado ensayos *supershift* con los anticuerpos contra EmBP-2 y ZmBZ en extractos de proteínas nucleares de embriones de 20 dap, pero no hemos detectado ninguna alteración de las bandas retardadas, reafirmando la no interacción obtenida con las proteínas recombinantes.

3.5. MECANISMOS DE MODULACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE EmBP-2 Y ZmBZ

3.5.1. Regulación de la actividad de EmBP-2 y ZmBZ por mecanismos de fosforilación/desfosforilación

Hemos estudiado la expresión de los factores EmBP-2 y ZmBZ durante el desarrollo embrionario y en tejido vegetativo en condiciones control y bajo el efecto de diversos estreses abióticos. Pero en la bibliografía encontramos datos que nos sugieren que la transcripción de los genes que codifican para proteínas de la familia de las bZIPs no es un buen marcador para estudiar su función biológica en estos tejidos. Para entender mejor el papel funcional de estas proteínas tenemos que estudiar los mecanismos que llevan a su activación, como cambios conformacionales, producidos por modificaciones post-traduccionales, e interacciones con otras proteínas, en el citoplasma y en el núcleo. Las proteínas bZIP se sintetizan y se mantienen retenidas en el citoplasma formando un grupo de monómeros inactivo. Cuando la célula detecta algún cambio físico o fisiológico se activan cascadas de transducción de señal que incluyen fenómenos de fosforilación y desfosforilación, que pueden afectar a estas bZIP inactivas provocando cambios conformacionales en su estructura. Estos cambios de conformación pueden alterar su interacción con otras proteínas provocando su translocación al núcleo, donde pueden interactuar con el DNA, con igual o diferente afinidad según su estado de fosforilación, para participar en la transcripción génica.

2.5.1.1. Determinación del estado de fosforilación de EmBP-2 mediante electroforesis en dos dimensiones

Se han descrito algunos factores de transcripción de la familia de las bZIP en los que su actividad está regulada por fosforilación. Con el objetivo de conocer el estado de fosforilación de la proteína EmBP-2 durante la embriogénesis hemos realizado ensayos de Western blot en dos dimensiones utilizando como sustratos extractos de proteínas de embriones desde 15 dap hasta el final de la embriogénesis. Los embriones jóvenes se trataron además con la hormona ABA, con la finalidad de conocer si este tratamiento inducía algún cambio en el estado de fosforilación de EmBP-2. Todas las muestras se dividieron en dos partes iguales y una de ellas se trató antes de la electroforesis con fosfatasa alcalina con la finalidad de conocer el estado de fosforilación de la proteína en cada extracto. En la figura 45 se muestra el resultado de una electroforesis en doble dimensión realizada con extractos de embriones de 50 dap. El anticuerpo reconoce a una proteína con un punto isoeléctrico ácido de 6. Cuando la muestra se trata con fosfatasa alcalina la banda migra hacia el lado básico, hasta un punto isoeléctrico de 7, lo que indica que EmBP-2 estaba fosforilada y que el tratamiento con fosfatasa ha eliminado grupos fosfato. Para conocer mejor los puntos isoeléctricos de EmBP-2 en estas situaciones se ha utilizado como control interno la proteína RAB17, ya que conocemos su comportamiento en estos experimentos de electroforesis en doble dimensión.

Los mismos resultados se han obtenido con EmBP-2 con muestras de embriones de 15 dap y de 30 dap, lo que indica que la proteína está fosforilada desde los 15 dap. Los tratamientos de los embriones con ABA no modifican tampoco su estado de fosforilación.

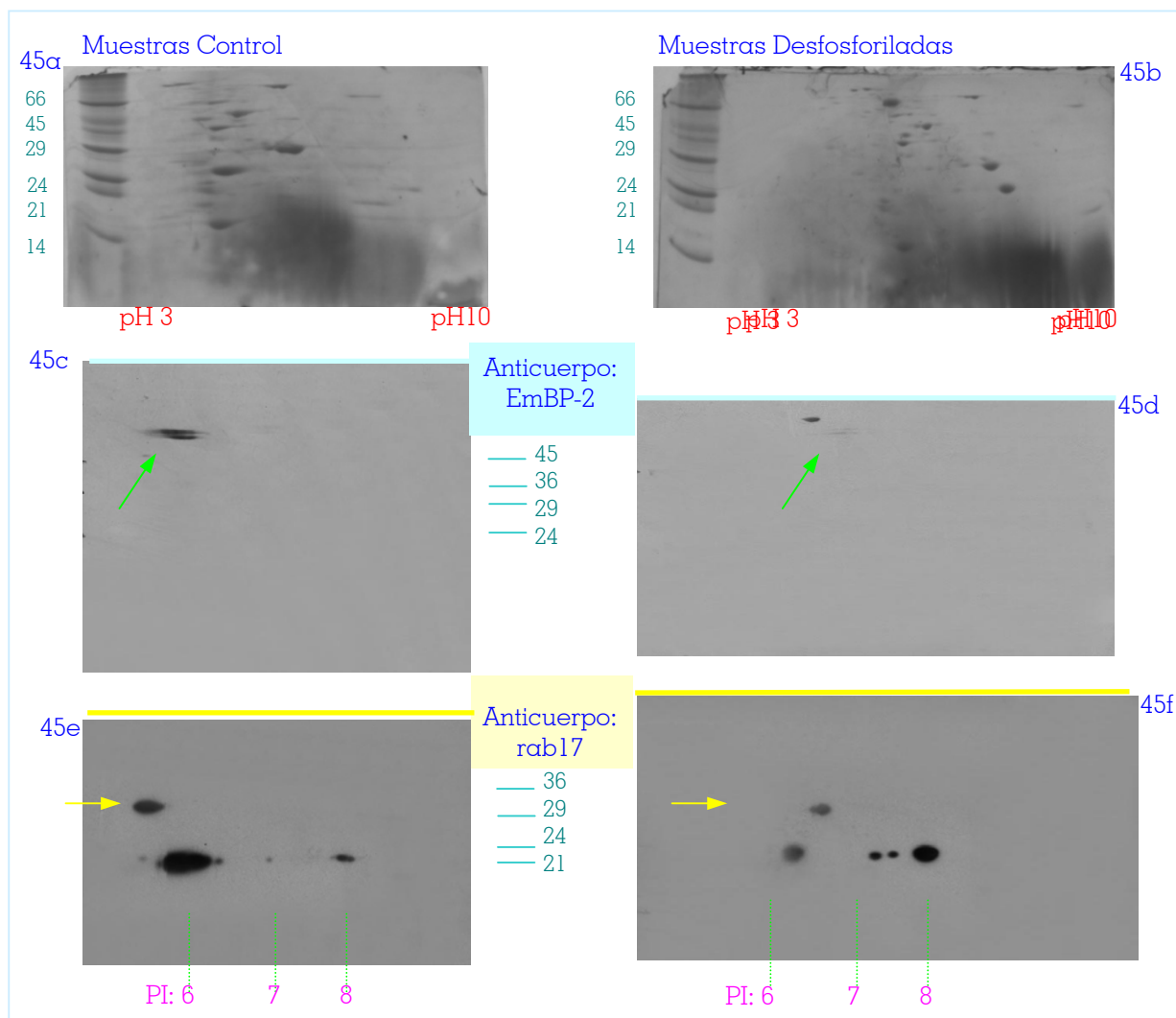


Figura 45. Electroforesis de dos dimensiones de EmBP-2. Las figuras a y b son tinciones de coomasie de los gels y las demás figuras ensayos de ECL sobre membranas de nitrocelulosa transferidas de estos gels. El gel a muestra el extracto control y el gel b el extracto tratado con fosfatasa alcalina. Los pesos moleculares se indican en verde. Las anfolinas utilizadas comprenden los valores de pH de 3-10, los cuales se indican en las figuras a y b. La misma membrana se incubó con el anticuerpo contra EmBP-2 primero y luego con el control interno RAB17. La flecha verde señala la proteína que reconoce el anticuerpo contra EmBP-2. El desplazamiento de esta proteína es equivalente al de la proteína marcada con la flecha amarilla en el control interno. Los puntos isoeléctricos (PI) de las diferentes formas fosforiladas de la proteína RAB17 se han determinado previamente en nuestro laboratorio, y se indican en las figuras e y f.

3.5.1.2. Análisis de las secuencias proteicas de EmBP-2 y ZmBZ: Determinación de posibles dianas de fosforilación por CK2

La proteína CK2 se ha descrito ampliamente en la literatura como reguladora de la actividad de muchos factores de transcripción involucrados en la regulación génica en respuesta a diversos estímulos. Utilizando el programa PROSITE hemos analizado las secuencias aminoacídicas de EmBP-2 y ZmBZ con la finalidad de conocer las dianas de fosforilación teóricas para CK2 que contienen. En la figura 46 se muestra un esquema de las proteínas donde se han señalado las posibles dianas de fosforilación. Está descrito que dianas de fosforilación localizadas en las NLS o cerca de ellas son puntos de regulación de la actividad de estas proteínas, debido a que pueden estar modulando su translocación al núcleo. La translocación citoplasma-núcleo de factores de

transcripción es un punto clave de control de la expresión génica. Existen quinasas capaces de regular el importe nuclear de determinadas proteínas a través de la fosforilación de las NLS (Zhang et al 1993). Otro punto de regulación de la actividad de las bZIP mediante fenómenos de fosforilación se localiza en el dominio básico. La fosforilación en los aminoácidos que forman este dominio está directamente relacionada con su interacción con el DNA. Estudios con diversos factores bZIP han mostrado efectos contrarios en cuanto al efecto de la fosforilación en esta interacción proteína-DNA. EmBP-2 presenta una diana teórica de fosforilación muy cerca de su NLS. El dominio básico presenta dos dianas teóricas de fosforilación y el dominio de cremallera de leucinas contiene otra. Un cambio en el estado de fosforilación en este dominio puede modular la interacción con otros monómeros en la dimerización, ya que la conformación de la α -hélice es esencial para ésta. ZmBZ presenta cuatro dianas teóricas de fosforilación de CK2 cerca de la NLS, así como también dos en el dominio básico.

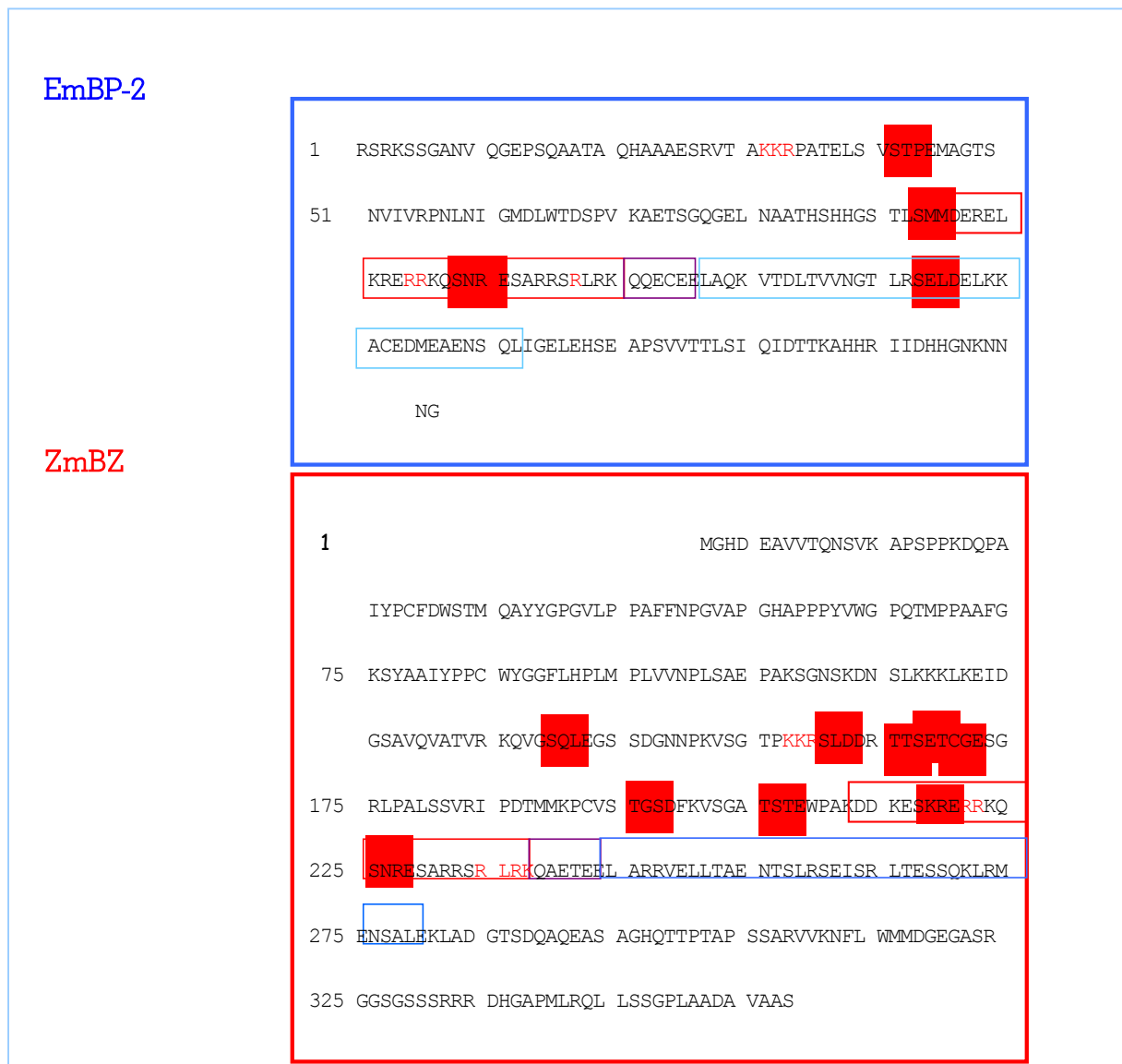


Figura 46. Dianas teóricas de fosforilación por CK2 en las secuencias proteicas de EmBP-2 y ZmBZ. Las cajas rojas indican las dianas de fosforilación. En rojo se indican los aminoácidos que forman parte de las posibles NLS. En los rectángulos rojos se incluye el dominio básico, en lila la región puente y en azul la cremallera de leucinas, componentes del elemento bZIP.

3.5.1.3. Ensayos de fosforilación *in vitro* de EmBP-2 y ZmBZ por la proteína quinasa CK2.

Hemos visto en el apartado anterior que la fosforilación por CK2 podría ser un mecanismo de regulación de la actividad de las dos proteínas debido a la localización en la secuencia de las dianas teóricas de fosforilación. La interacción entre los factores bZIP y la CK2 se produce principalmente a través del dominio básico. Hemos realizado ensayos de fosforilación *in vitro* con las proteínas recombinantes y las enzimas CK2 de maíz y humana, utilizando como fuente de fosfato el $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP. En la figura 47 se muestra el resultado del ensayo de fosforilación con la CK2 humana. Esta quinasa es capaz de fosforilar tanto a EmBP-2 como a ZmBZ, como se puede observar en los carriles 3 y 4, donde se han marcado las bandas con una flecha. En los carriles 1 y 2 están los controles del ensayo. El control positivo en el carril 1 es la proteína RAB17, que es fosforilada por la CK2. El carril 2 es el control negativo y muestra la autofosforilación de la CK2 en su subunidad beta. Este resultado se ha obtenido también utilizando la CK2 de maíz. La proteína ZmBZ es más fosforilada que EmBP-2 *in vitro*.

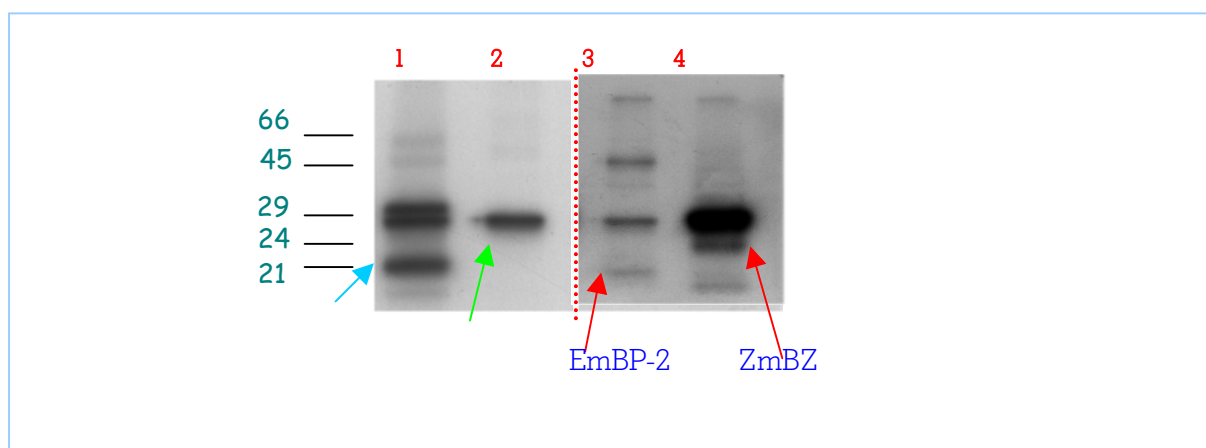


Figura 47. Reacción de fosforilación *in vitro* de las proteínas recombinantes EmBP-2 y ZmBZ por la quinasa CK2. El carril 1 muestra la fosforilación de la proteína RAB17, usada como control positivo (señalada por la flecha azul); El carril 2 muestra la autofosforilación de la quinasa en su subunidad β (señalada por la flecha verde clara); En los carriles 3 y 4 se señalan con flechas rojas la fosforilación de las proteínas EmBP-2 y ZmBZ (para esta señal se ha necesitado una mayor exposición de la película).

3.5.1.4. Modulación *in vitro* de la actividad de EmBP-2 y ZmBZ mediada por la fosforilación por la proteína quinasa CK2.

Hemos estudiado como afecta a las proteínas EmBP-2 y ZmBZ su estado de fosforilación en la interacción con el DNA mediante ensayos tipo EMSA. Las proteínas ZmBZ y EmBP-2 recombinantes fueron fosforiladas en un ensayo en paralelo al mostrado en la figura 47, utilizando ATP no radiactivo. Con estas proteínas fosforiladas hemos realizado ensayos EMSA, utilizando como sonda el ABRE A. En la figura 48 se muestra este ensayo EMSA. La proteína EmBP-2 fosforilada incrementa su afinidad por el ABRE A, como se puede observar al comparar la señal de los carriles 1 y 2. La

proteína ZmBZ en cambio pierde su capacidad de interacción con el ABRE A, como muestran los carriles 4 y 6 si los comparamos con la señal obtenida en los carriles 3 y 5. Estos efectos observados en experimentos *in vitro* son muy importantes en el control de la actividad de estos factores de transcripción, ya que generalmente este tipo de proteínas tienen como finalidad interactuar con el DNA y regular la transcripción génica. Hemos repetido el experimento 3 veces con igual resultado.

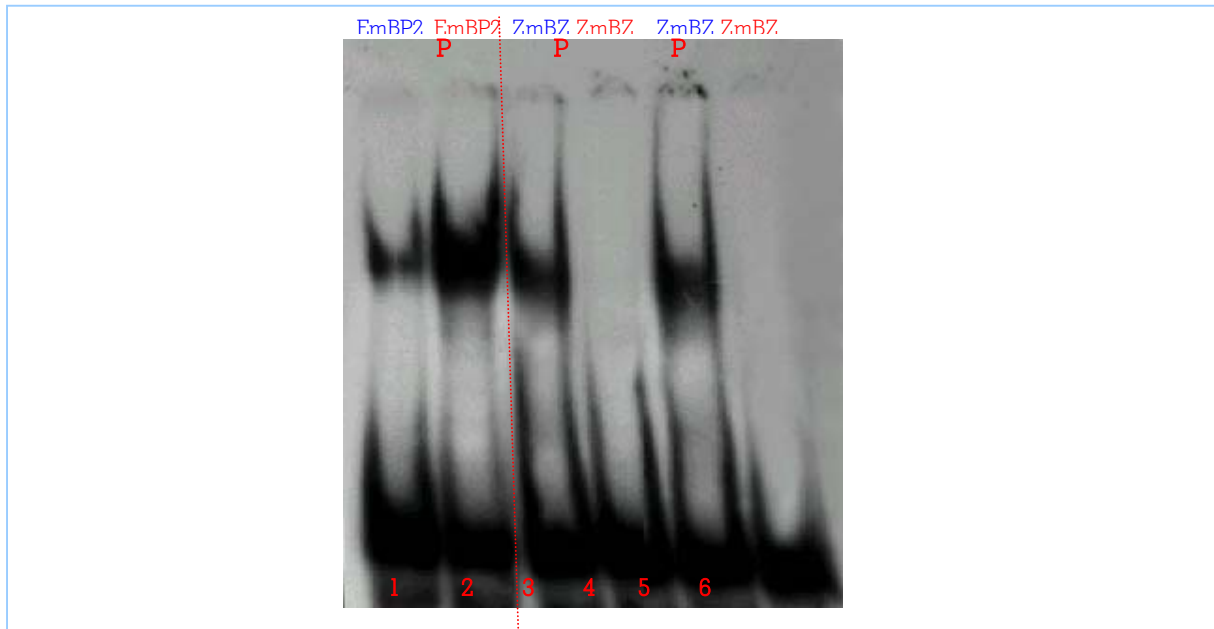


Figura 48. Comparación entre la interacción de las proteínas recombinantes EmBP-2 y ZmBZ con el ABRE A antes y después de su fosforilación por CK2. Los carriles numerados del 1-6 en la parte inferior de la imagen en rojo son los comentados en el texto. En la parte superior de la figura se indica la proteína analizada en cada carril, el color azul cuando no está fosforilada y en rojo cuando está fosforilada. Se han utilizado 600 ng de EmBP-2 recombinante, 2 µg de ZmBZ recombinante en los carriles 3-4 y 4 µg de ZmBZ recombinante en los carriles 5-6.

3.5.2. Estudio de la modulación *in vivo* de la actividad de ZmBZ mediada por la localización subcelular

Existen evidencias que sugieren que la activación de la mayoría de las proteínas de la familia bZIP ocurre a nivel post-traducciona. Así, las proteínas se sintetizarían y se acumularían en el citoplasma formando un conjunto de monómeros sin actividad, y con la llegada de un estímulo físico (como la luz blanca o UV) o fisiológico (fitohormonas), se produciría a través de diversos mecanismos un cambio en la conformación de estas proteínas, que las liberaría de su retención citoplasmática, permitiendo su entrada en el núcleo donde pueden interactuar con el DNA. Para estudiar si la localización subcelular de la proteína ZmBZ se modifica por la presencia de la fitohormona ABA o por un cambio en su nivel de fosforilación, es muy interesante poder usar células vivas a las que se les pueda aplicar diferentes tratamientos y luego comprobar si éstos han provocado un cambio en su localización.

La estrategia que hemos seguido comienza con la fusión al extremo 3' de la secuencia ZmBZb el cDNA que codifica para la proteína marcadora GFP (*green fluorescent protein*), utilizando un vector de expresión que dirige a través del promotor 2x35S la expresión de esta proteína quimérica (construcción 4, tabla V). La proteína marcadora GFP tiene un tamaño relativamente pequeño, sobre los 20 Kda, por lo que es probable que la proteína quimérica se comporte igual que la proteína ZmBZ nativa. Mediante la técnica de la biolística se han transformado diferentes tipos de célula, en las cuales es posible visualizar la localización de la proteína quimérica utilizando un microscopio confocal, debido a que emite fluorescencia verde cuando incide sobre ella luz UV. Como control se ha usado la proteína GFP expresada con el mismo vector. En la preparación de las muestras antes de la transformación y su tratamiento posterior con la hormona ABA se ha seguido el mismo protocolo ya utilizado en los ensayos de funcionalidad biológica. Las muestras se transforman en placas de *petri* con medio MS y después de la transformación se mantienen en placas de *petri* con medio MS o MS con ABA 100 μ M durante 24 horas a 26 °C en la oscuridad.

En la figura 49 se puede ver la localización subcelular de la proteína ZmBZ en células epidérmicas de cebolla. Se ha utilizado este sistema heterólogo debido a que la cebolla es una especie monocotiledónea y sus células epidérmicas se disponen formando una capa unicelular, a diferencia de las preparaciones de maíz donde las células se disponen en multicapas, y esto hace que la transformación en cebolla sea más eficiente. El objetivo de este experimento era determinar si la célula expresa la proteína de fusión ZmBZ-GFP con esta construcción.

El control realizado con la proteína GFP muestra que esta proteína se distribuye por toda la célula, y esto es debido a que presenta difusión pasiva a través de la membrana nuclear por su pequeño tamaño molecular. La proteína ZmBZ-GFP se acumula en el citoplasma y en el núcleo. A diferencia de la proteína GFP, la proteína de fusión no se puede translocar al núcleo por difusión pasiva, sino que seguramente la translocación a núcleo se produzca por las señales de localización nuclear que se encuentran en su secuencia, ya descritas para las proteínas de esta familia y señaladas en las figuras 3 y 46 de este trabajo.

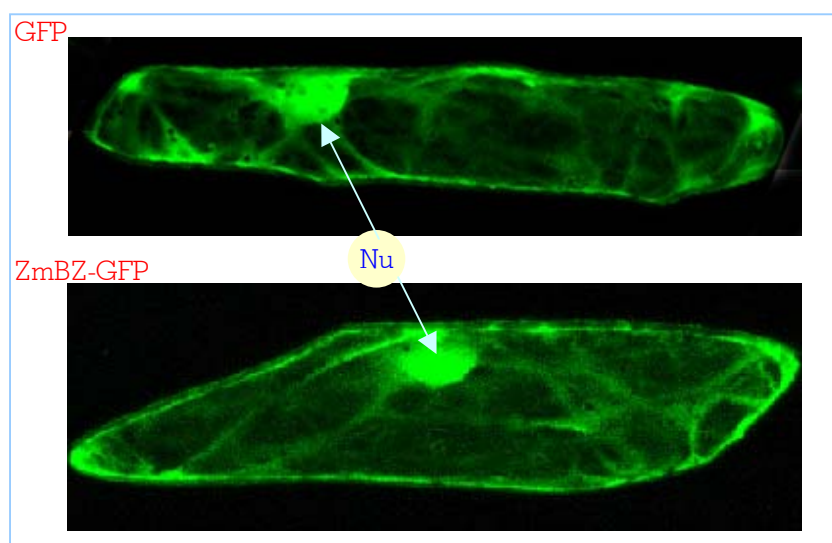


Figura 49. Imágenes de microscopía confocal de la localización subcelular de la proteína de fusión ZmBZ-GFP en células epidérmicas de cebolla. La imagen superior corresponde a la distribución subcelular de la proteína GFP y la inferior corresponde a la distribución subcelular de la proteína de fusión ZmBZ-GFP. Con las flechas azules se señalan los núcleos de las células.

Resultados

En paralelo se han tratado muestras con ABA durante 24h, pero no se ha observado ningún cambio en la localización subcelular del factor.

En la figura 50 se puede observar el mismo experimento realizado con células de callo tipo *Black Mexican Sweet* (BMS) de maíz. En este caso se trata de un sistema homólogo a la proteína ZmBZ y nos interesaba contrastar los resultados obtenidos en cebolla, aunque la eficiencia es mucho más baja y es la limitación de estos experimentos. El número de células transformadas visualizadas con el microscopio en cada experimento y para cada construcción y tratamiento oscila entre 5 y 10. Se ha observado una variabilidad muy pequeña en la cantidad de fluorescencia total presente en cada

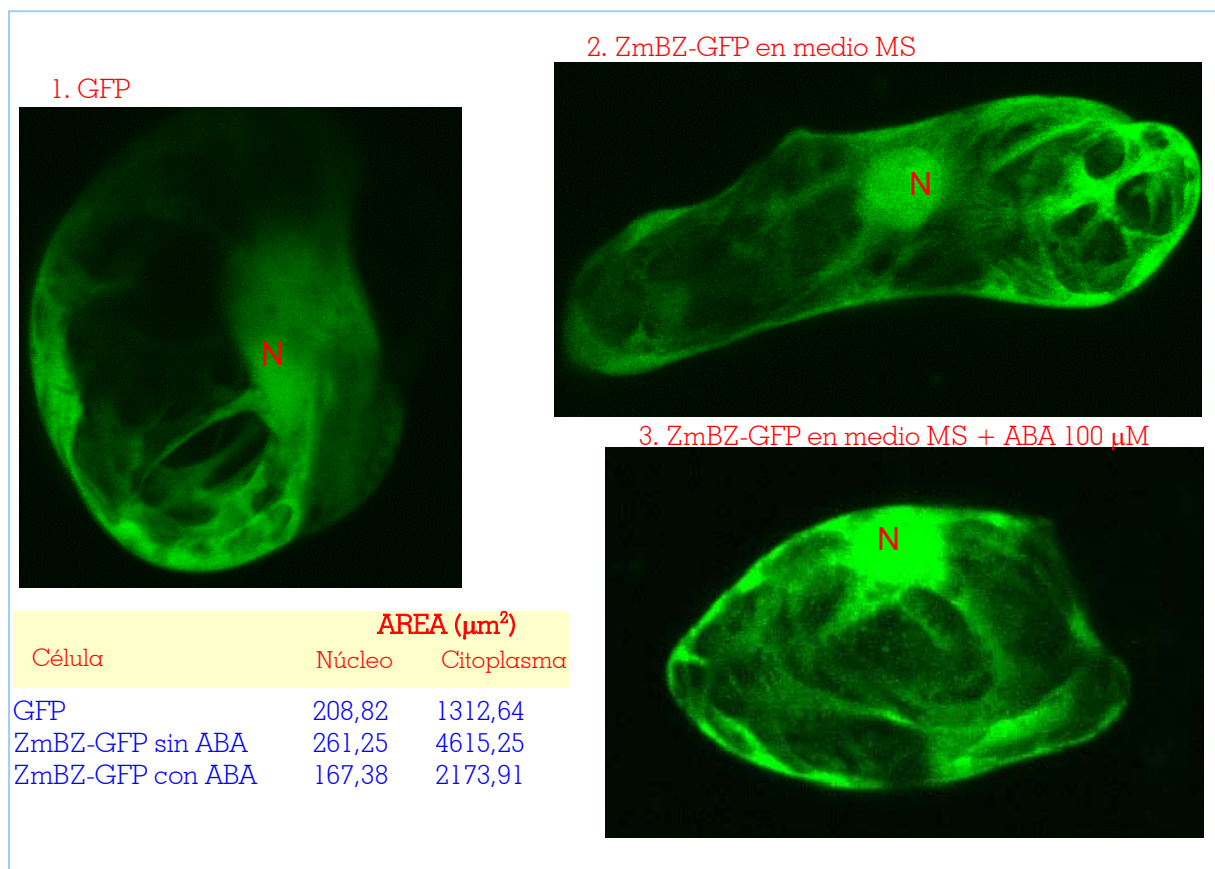


Figura 50. Imágenes de microscopía confocal de la localización subcelular de la proteína de fusión ZmBZ-GFP en células de callos BMS. La imagen 1 corresponde a la distribución subcelular de la proteína GFP.; Las imágenes 2 y 3 corresponden a la distribución subcelular de la proteína de fusión ZmBZ-GFP sin tratamiento y con tratamiento con ABA respectivamente. La N señala los núcleos. Los valores de la tabla indican las áreas de los núcleos y los citoplasmas de las células, mostrando la gran heterogeneidad de tamaño de este material biológico.

La proteína GFP se distribuye por toda la célula. La proteína ZmBZ-GFP también se localiza en el citoplasma y en el núcleo, y esta localización es prácticamente invariable cuando la célula se trata con ABA. En alguna célula tratada con ABA parece que la fluorescencia es mayor en el núcleo, y este efecto es mayor a menor tamaño de la célula. Pero los experimentos están limitados en el

número de células transformadas y esto no nos ha permitido la realización de un estudio estadístico con estas observaciones.

Hemos transformado transitoriamente células en suspensión obtenidas a partir de callos BMS con las mismas construcciones. La ventaja de estas células sobre las células de callo BMS es su homogeneidad de tamaño. Como se puede observar en las imágenes del microscopio confocal de la figura 51, no se produce ninguna variación en la localización subcelular de la proteína ZmBZ por tratamiento con ABA. Con la finalidad de conocer si la distribución intracelular de ZmBZ-GFP está influenciada por su estado de fosforilación, hemos tratado estas células con DRB, producto descrito como inhibidor de la fosforilación por CK2 (aunque posteriormente se ha visto que también puede inhibir la fosforilación por otras quinasas). No se produjo ningún cambio en la localización subcelular de ZmBZ-GFP en respuesta al tratamiento con DRB, lo que parecía indicar que su localización no se veía afectada por este tratamiento, en las condiciones utilizadas.

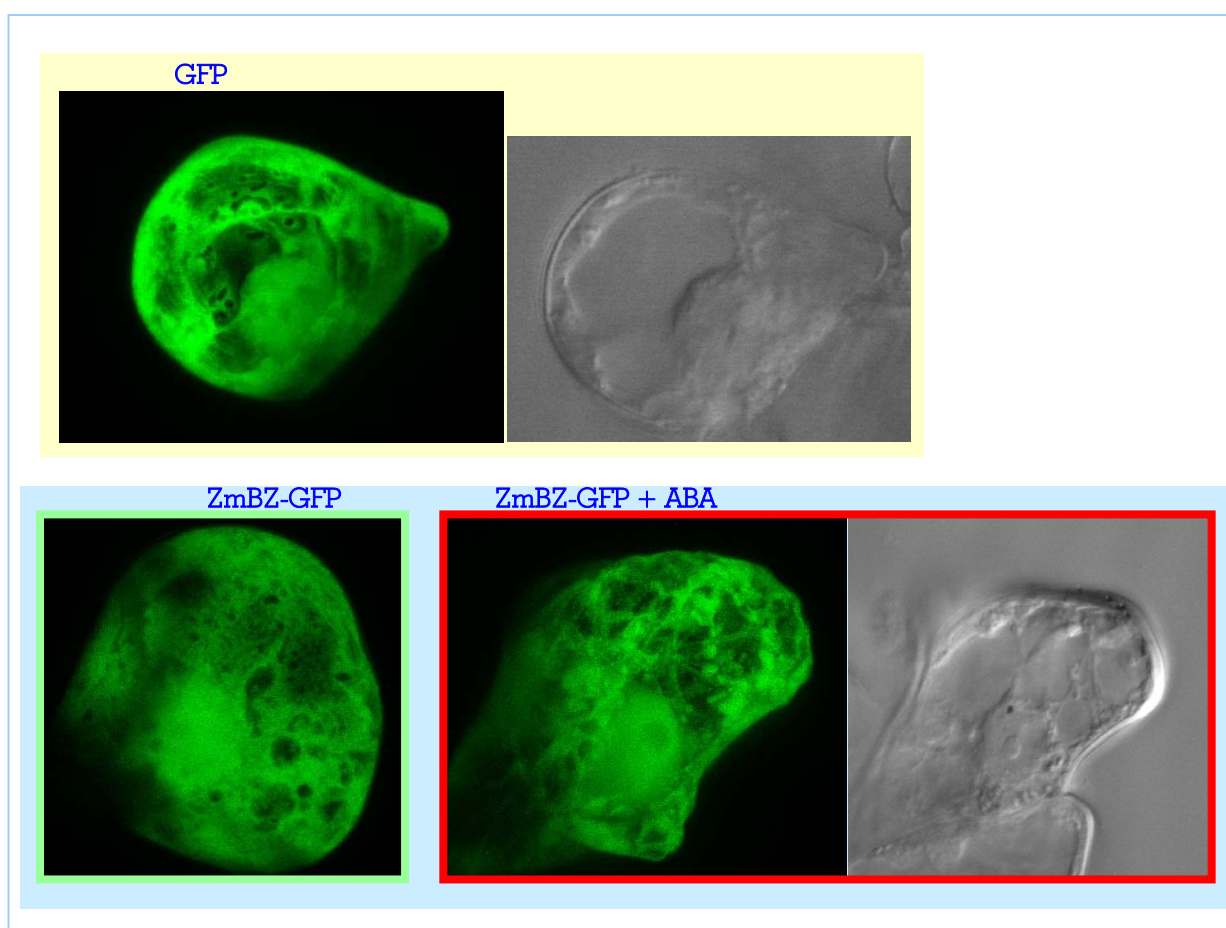


Figura 51. Imágenes de microscopía confocal con luz UV y proyección de Normansky de células en suspensión BMS que sobreexpresan GFP (recuadro amarillo) o la proteína de fusión ZmBZ-GFP (recuadro azul). El tratamiento mostrado es con ABA 100 μ M y DRB 100 μ M. No se han observado diferencias en ninguna de las células a causa de los diferentes tratamientos. La célula transformada con ZmBZ-GFP control tiene un marco verde y la tratada con ABA un marco rojo.

Estudio de la localización subcelular de EmBP-2 y ZmBZ por microscopía electrónica

Se han realizado estudios de inmunolocalización mediante microscopía electrónica para confirmar la localización nuclear y citoplasmática de la proteína ZmBZ. También se ha analizado la localización subcelular de la proteína EmBP-2. Esta parte del trabajo ha sido realizado en el laboratorio de la Dra. Risueño, en el CIB-CSIC en Madrid.

Se han utilizado los anticuerpos generados contra EmBP-2 y ZmBZ, así como sus sueros preinmunes como controles negativos. Estos anticuerpos nos dan una señal intensa y muy específica cuando realizamos ensayos de Western blot en embriones secos, y por esto se ha seleccionado este material biológico para la inmunolocalización.

Los resultados obtenidos con los anticuerpos se presentan en las figuras 52 y 53. El marcaje de los dos anticuerpos se produce en citoplasma y en núcleo. Éste es específico porque los sueros preinmunes no proporcionan señal alguna. Este resultado con el anticuerpo contra ZmBZ confirma los resultados obtenidos en los experimentos de transformación transitoria con la proteína ZmBZ-GFP. Dentro del núcleo los factores se localizan en el espacio intercromatínico y en la capa externa de la cromatina.

Figura 52. Inmunolocalización de la proteína ZmBZ en la cofia (A) de embriones de maíz sin germinar y control negativo (B). Las partículas de oro se localizan fundamentalmente en el núcleo, específicamente en la periferia de las masas de cromatina condensada (CR) y en la región intercromatínica (RI). El citoplasma (CT) presenta algunas partículas de oro aisladas. EN: envoltura nuclear. Las barras representan 0,5 μm . La señal no se encuentra en el control negativo.

Figura 53. Inmunolocalización de la proteína EmBP-2 en la cofia (A) y en la raíz (B) de embriones de maíz sin germinar. Las partículas de oro se localizan fundamentalmente en el núcleo, específicamente en la periferia de las masas de cromatina condensada (CR) y en la región intercromatínica (RI). El citoplasma (CT) presenta algunas partículas de oro aisladas. EN: envoltura nuclear. Las barras representan 0,5 μm .

3.5.3. Modulación de la actividad de ZmBZ y EmBP-2 mediada por el control combinatorial: Estudio de la interacción entre EmBP-2 y ZmBZ

Debido a que EmBP-2 y ZmBZ son factores de transcripción que se expresan de manera simultánea en el embrión interactúan *in vitro* con ABRE A y ABRE B, es posible que estén involucradas en la regulación de los mismos genes *in vivo*. Un mecanismo mediante el cual distintos factores bZIP cooperan en la regulación génica es formando heterodímeros. Esto permite una regulación génica más precisa debido a que con pocos elementos de regulación son posibles muchas interacciones entre ellos que presentan distintas afinidades por los elementos cis reguladores. Este mecanismo de control se ha denominado control combinatorial.

3.5.3.1. Estudio de la interacción *in vitro* entre EmBP-2 y ZmBZ

Hemos realizado ensayos de *pull-down* para estudiar si existe una interacción *in vitro* entre EmBP-2 y ZmBZ. Las dos proteínas recombinantes se inmovilizaron en resinas de Sephadex con Ni, y EmBP-2 se marcó con ^{35}S mediante una reacción de transcripción-traducción *in vitro*. En la figura 54 se muestra el resultado obtenido, donde se puede observar que la proteína EmBP-2 es capaz de interactuar con ZmBZ (carril 4) pero no con el control negativo, un factor de transcripción de tomate de carácter básico. El resultado indica que EmBP-2 y ZmBZ interactúan *in vitro*.

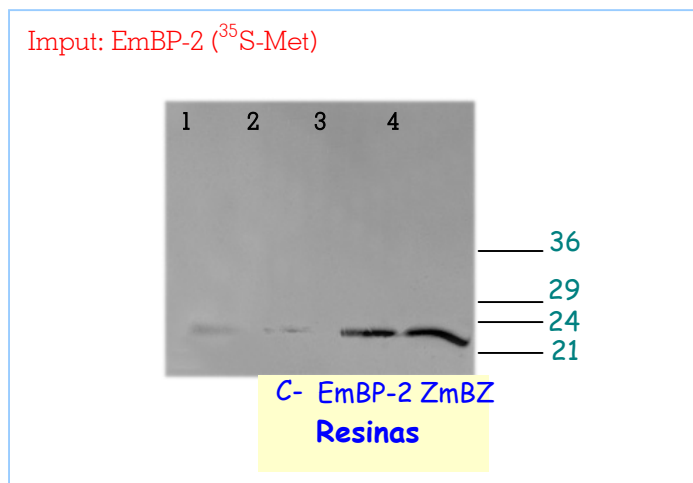


Figura 54. Autoradiografía de un ensayo de *pull-down* con las proteínas recombinantes EmBP-2 y ZmBZ. La proteína EmBP-2 se marcó con ^{35}S -metionina en una reacción de transcripción-traducción *in vitro*. Las proteínas EmBP-2 y ZmBZ recombinantes se inmovilizaron en columnas de Sephadex-Ni, así como un control negativo. En la figura se indican con un recuadro amarillo las resinas con las diferentes proteínas inmovilizadas : carril 2: control negativo; carril 3: EmBP-2; carril 4: ZmBZ. El carril 1 muestra un 10% del total de la reacción de marcage de EmBP-2. Los pesos moleculares se indican en verde y en Kda.

Esta interacción se ha intentado comprobar mediante ensayo 2-híbridos en levadura, pero no hemos conseguido ver claramente las proteínas de fusión expresadas en el tejido ni la interacción.

3.5.3.2. Estudio de la interacción *in vitro* entre el heterodímero EmBP-2-ZmBZ con el ABRE A.

El ensayo de *pull-down* nos indica que EmBP-2 y ZmBZ interactúan, y una posibilidad de interacción es que formen un heterodímero. Nuestro objetivo siguiente ha sido estudiar si este heterodímero se forma y es capaz de interactuar con el ABRE A mediante ensayos tipo EMSA. En los ensayos anteriores en los que se ha analizado la interacción de los homodímeros de las dos proteínas con el DNA, hemos comprobado que la movilidad electroforética de los dos es muy parecida, por lo que no esperábamos poder diferenciar los homodímeros del heterodímero por un cambio de movilidad. Por este motivo hemos realizado ensayos de competición para saber si el heterodímero es capaz de unirse al ABRE A, buscando diferencias en la interacción con el ABRE A entre los diferentes dímeros.

En la figura 55 se muestra un experimento de competición de la unión de las proteínas con el ABRE A mediante la adición de oligo ABRE A sin marcar en exceso. El resultado nos sugiere que el heterodímero es capaz de interactuar con el ABRE A (carriles 9 y 10), y que esta interacción presenta una competición más lenta que los homodímeros: Con una competición de 1000x ABRE A la banda retardada formada por los homodímeros EmBP-2 y ZmBZ se compete totalmente (carriles 3 y 6) mientras que el heterodímero necesita una competición de 10000x ABRE A (carriles 9 y 10). Esto sugiere que la interacción del heterodímero con el DNA presenta diferente afinidad que la de los homodímeros.

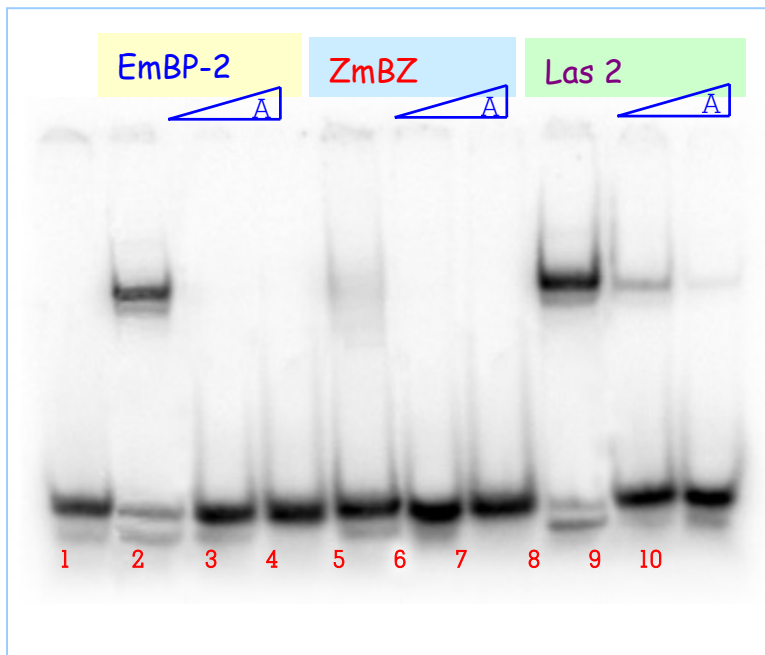


Figura 55. Estudio de la interacción de las dos proteínas recombinantes con el ABRE A mediante un ensayo de competición. En la figura el recuadro amarillo indica los carriles en los que se analiza EmBP-2, el recuadro azul indica los carriles en los que se analiza ZmBZ y el recuadro verde indica los carriles en los que se analizan las dos proteínas juntas. La cantidad utilizada de cada proteína en cada carril es de 600 ng. Los triángulos indican la presencia de oligo ABRE A frío: 1.000x en los carriles 3, 6 y 9; 10.000x en los carriles 4, 7 y 10. En el carril 1 no hay proteína y es el control negativo.

Las plantas han desarrollado diferentes estrategias para responder a los cambios del medio ambiente y este proceso de adaptación les ha permitido su supervivencia. En situaciones adversas las plantas responden con cambios en su desarrollo, como la reducción del crecimiento, y con cambios morfológicos y fisiológicos, como el cierre de los estomas y la disminución de la transpiración en situación de déficit hídrico. Estas respuestas son el resultado de la integración de todos los mecanismos de adaptación que se producen en las células que forman el organismo. Las fitohormonas tienen un papel muy importante en esta adaptación de las plantas al medio, y entre ellas el ácido abscísico tiene un papel esencial en las situaciones de estrés ambiental abiótico y biótico. El mecanismo de actuación principal del ácido abscísico en estas situaciones es la modificación de la expresión génica. Muchas respuestas fisiológicas requieren la expresión génica *de novo* inducida por ABA de proteínas reguladoras, entre ellas quinasas, fosfatasa y factores de transcripción, y de proteínas funcionales, entre las que se encuentran las LEA.

Este trabajo tiene como objetivo el estudio de los mecanismos de respuesta en la adaptación a la deshidratación mediante el estudio de los factores de transcripción involucrados en la regulación del gen *lea* de maíz *rab28*. Trabajos previos de nuestro grupo han descrito una regulación de la expresión de este gen mediada por el ácido abscísico y se han caracterizado funcionalmente los elementos *cis* reguladores responsables de esta respuesta a la fitohormona. Estos estudios indicaban que los factores de transcripción involucrados en su regulación pertenecen a la familia bZIP (*basic leuzine-zipper*).

El trabajo presentado se puede dividir en dos partes diferentes:

- 1) El aislamiento de los factores de transcripción EmBP-2 y ZmBZ
- 2) La caracterización funcional de los dos factores.

4.1. AISLAMIENTO DE LOS FACTORES EmBP-2 Y ZmBZ DE MAIZ

El propósito de este trabajo es el aislamiento y el estudio de factores bZIP involucrados en la regulación de la transcripción del gen *rab28*. Estudios previos indican que este gen está regulado de manera diferencial en tejidos embrionarios y en tejidos vegetativos. El primer objetivo ha sido la elección de un sistema eficiente de clonaje que permitiese el aislamiento de factores bZIP en ambos tipos de tejidos. Posteriormente sobre estos factores se ha hecho un estudio de su expresión (a nivel transcripcional y traduccional), su interacción con los elementos ABRE del promotor del gen *rab28*, reguladores de su respuesta al ABA, y posteriormente su papel en la regulación de la expresión de este gen.

-> Aislamiento de Zm1-Zm4

El sistema seleccionado ha sido la RT-PCR. Se han utilizado como moldes cDNA de embrión seco y de hojas de plántulas de 5 dag deshidratadas durante 3h, tejidos donde *rab28* se transcribe. Los oligonucleótidos son degenerados y para su diseño se han alineado las secuencias de las proteínas EmBP-1 α de trigo y OsBZ8 de arroz y se han utilizado los aminoácidos más conservados que forman parte de los elementos bZIP. Estaba descrita la participación de la proteína EmBP-1 α en la regulación del gen *Em* de trigo entre otros genes *lea*. Los genes *Em* y *rab28* están regulados en el embrión de manera similar con la participación del factor VP1, y por este motivo nos pareció interesante incluir en nuestro estudio a esta proteína. El factor OsBZ8 estaba descrito como posible regulador de la expresión de genes *lea* en arroz. Ambos factores se unen a los mismos elementos ABRE y se expresan simultáneamente en el embrión, y por esto pueden estar involucrados en la regulación *in vivo* de los mismos genes. Los dos factores presentan diferencias en su regulación transcripcional en suspensiones celulares derivadas de embrión de cebada. hvEmBP-1 (homóloga de la proteína de trigo) se induce con estrés osmótico y la homóloga de OsBZ8 de arroz en cebada se induce con ABA. Esto sugiere que, aunque ambas proteínas están involucradas en la regulación de genes *lea*, participan en diferentes vías de transducción de señal relacionadas con el estrés osmótico y el ABA.

Se han aislado 4 secuencias de 90 bp (ver figura 1). Comparándolas con las secuencias del alineamiento inicial, las secuencias aisladas presentan variabilidad. Cuando se aislaron posteriormente las secuencias parciales de la genoteca de embrión seco se han encontrado en todos los casos los aminoácidos conservados en las otras secuencias. Esta variabilidad puede ser debida a las características degeneradas de los oligonucleótidos. Las secuencias aisladas Zm1-4 tienen una homología muy elevada con las proteínas bZIP de la subfamilia de factores IIa, definida por Vettore et al (1998). Esta subfamilia se caracteriza por un dominio de cremallera de leucinas formado por 6 repeticiones de este aminoácido, y por un dominio rico en prolinas en el extremo N terminal descrito como activador transcripcional. El alineamiento presentado en la figura 2 refleja la alta conservación de los aminoácidos del dominio básico y la región puente entre las diferentes proteínas. Dentro de esta subfamilia se pueden observar dos grupos de proteínas que presentan mayor homología entre ellas, y Zm1 y Zm3 pertenecen a uno de estos grupos y Zm2 y Zm4 al otro. Estos aminoácidos que varían constituyen cambios no conservativos y no interaccionan específicamente con el DNA aunque si interaccionan de manera inespecífica la glutamina o la arginina de la posición -5 en el dominio básico y la cisteína o la treonina de la posición -3 en la región puente (ver introducción). Debido a estos cambios en las bases que interaccionan con el DNA, la especificidad de unión de estas proteínas con éste será seguramente diferente. Las proteínas de esta familia tienen una gran preferencia por los elementos *G-box*. Un estudio realizado por Niu et al. (1999) indica que la proteína EmBP-1 de trigo es la que tiene mayor afinidad por las cajas tipo *G-box* respecto a las *C-box*. Este resultado obtenido con el PCR indica que el método

elegido para el aislamiento de los factores bZIP ha funcionado correctamente y que posiblemente las proteínas aisladas presentarán diferente especificidad de unión al DNA.

-> Cribados de genotecas: Aislamiento de ZmBZ y EmBP-2

Las secuencias aisladas en el embrión se han usado como sondas en un cribado de una genoteca de cDNA de embrión seco con la finalidad de aislar los clones completos. El cribado se ha realizado a alta astringencia, obteniéndose muchos positivos con cada una de las sondas (entre 200-300 calvas hibridadas con diferente intensidad de señal). Probablemente la sonda utilizada estaba hibridando con diferente grado de especificidad, al contener la secuencia una parte muy conservada entre las proteínas de esta familia. Las secuencias aisladas son ZmBZ con la sonda Zm1 y EmBP-2 con la sonda Zm2. Los clones aislados eran parciales y se utilizaron como sondas para el cribado de otra genoteca de hojas de plántulas de 5 dag deshidratadas durante 3 horas. La sonda parcial ZmBZ hibrida en condiciones de alta astringencia con algunos fagos, entre 25-50, mientras que no se obtiene ningún positivo con la sonda EmBP-2, ni a alta ni a baja astringencia. Esto indica que el RT-PCR es una técnica más sensible para el aislamiento de las bZIP, al menos para EmBP-2, un factor que parece ser muy poco transcrito en tejido vegetativo. Se han secuenciado 10 clones que hibridan con ZmBZ y se ha obtenido un único positivo, una secuencia completa que se ha denominado ZmBZb. Su secuencia es idéntica a ZmBZ parcial, aunque con la particularidad de tener una secuencia de 111 pb adicional insertada en la base 230 de la secuencia parcial de embrión ZmBZ. Se ha aislado la secuencia completa de ZmBZ mediante la técnica RACE (*rapid amplification of the cDNA ends*). Una de las reacciones de amplificación del 5' cDNA de EmBP-2 con esta técnica ha funcionado correctamente y así hemos obtenido 200 pb más de su secuencia, aunque no la tenemos completa.

La secuencia aminoacídica deducida de ZmBZb resulta en una proteína más corta que ZmBZ al encontrarse un codón stop en la secuencia adicional. Las bases que flanquean esta secuencia adicional constituyen una posible entrada y salida de una secuencia intrónica. Esto nos hizo pensar en la posibilidad de que las dos secuencias fuesen isoformas originadas por un fenómeno de *splicing* diferencial y se codificasen en un único gen. Aunque también había la posibilidad de que se encuentren dos genes distintos en el genoma. En ambos casos se abría la posibilidad de un mecanismo de regulación diferencial en tejidos embrionario y vegetativo de dos proteínas prácticamente idénticas, basado en el *splicing* diferencial o en la regulación transcripcional diferencial entre dos genes específicos de tejido. En la literatura se ha descrito la modulación de la actividad de algunos factores de transcripción a través de un mecanismo que incluye el *splicing* diferencial.

La proteína Pit-1 de rata presenta una estructura con homeodominio y tiene una isoforma, Pit-1a, originada por *splicing* diferencial, con una inserción de 26 aminoácidos en su dominio de transactivación. La relación entre las 2 en los tejidos es de 7/1 (Pit-1/Pit-1a). La inserción no modifica

su interacción con el DNA, pero Pit-1a no tiene capacidad para transactivar (Morris et al 1992). Otra proteína que presenta regulación por *splicing* diferencial es la Pax-8 humana. Pertenece a la familia de proteínas con dominio de interacción con el DNA *paired-box*. Este gen presenta 8 isoformas, las cuales se regulan durante el desarrollo y tienen diferentes propiedades transactivadoras (Kozmik et al 1993). Por último, la proteína ATF3 de mamíferos pertenece a la familia ATF/CREB y tiene una isoforma, ATF3ΔZip2, a la que le falta el dominio cremallera de leucinas y por esto no tiene capacidad de unirse al DNA. Se ha comprobado que ATF3ΔZip2 se induce en varias situaciones de estrés y modula así la actividad de ATF3 en la respuesta de la célula frente a estas situaciones (Hashimoto et al 2002). No se han descrito isoformas originadas por *splicing* diferencial en proteínas de la familia de las bZIP en plantas. Sin embargo, igual que en animales, este puede ser un mecanismo de regulación en plantas.

-> Genes que codifican para ZmBZ, ZmBZb y EmBP-2

Los factores ZmBZ y ZmBZb parecen estar codificados por un solo gen en maíz (ver figuras 6 y 7). Para poder confirmar esta hipótesis es necesario el aislamiento del clon o los clones genómicos, y ver la situación de sus intrones. Sin este resultado no podemos descartar la idea de que cada una de las proteínas esté codificada por un gen diferente, con una posible regulación de la transcripción diferente para cada una. Se ha descrito una bZIP en tabaco, *tbzF*, que está codificada por un gen que presenta distintos elementos *cis* reguladores de la transcripción en las hojas senescentes y en las flores que se requieren para la plena activación transcripcional (Yang et al 2002). El factor OsBZ8 de arroz, el más homólogo a ZmBZ que hay en las bases de datos (con un 65% de homología a nivel de proteína) está codificado por un único gen (Nakagawa et al 1996).

El factor EmBP-2 parece estar codificado por un solo gen (ver figuras 8 y 9). Cuando la hibridación se hace con la secuencia parcial entera se obtienen múltiples bandas. Esto indica que hay genes relacionados en el genoma de maíz. Este resultado está de acuerdo con los datos que hay en la literatura, donde se describe el aislamiento en maíz de la proteína mEmBP-1, denominada así por su alta homología con la proteína EmBP-1 de trigo (Carlini et al 1999). Los análisis realizados por este grupo muestran que hay dos genes que codifican para mEmBP-1 y los denominaron mEmBP-1a (localizado en el cromosoma 7) y mEmBP-1b (localizado en el cromosoma 2). Hay mucha variabilidad en el número de genes que codifican para EmBP-1 en las diferentes especies. EmBP-1 de trigo forma parte de una familia multigénica de al menos 7 miembros, en cambio, EmBP-1 de cebada está codificada por un único gen.

4.2. ESTUDIO DEL PATRÓN DE TRANSCRIPCIÓN DE LOS FACTORES AISLADOS

El patrón de transcripción de los dos genes que codifican las bZIPs EmBP-2 y ZmBZ ha sido estudiado en tejidos embrionarios, tejidos vegetativos y durante el proceso germinativo, así como en tejido vegetativo sometido a diferentes tipos de estreses que producen deshidratación celular. El nivel de transcripción génica de los factores bZIP no es un marcador determinante de las vías de transducción de señal en las que puedan estar involucrados, aunque es de gran ayuda conocer qué situaciones producen su inducción.

El ABA es un regulador de la expresión génica en el embrión a través del elemento ABRE. Los factores bZIP que se expresan durante la embriogénesis son potencialmente reguladores de la expresión génica mediada por esta hormona.

La expresión del gen *rab28* está regulada en el embrión por ABA, comenzando su transcripción a partir de los 20 dap y aumentando hacia el final de la embriogénesis. En el tejido vegetativo, *rab28* se induce por tratamiento con ABA y deshidratación. Éstas han sido las condiciones en las que se ha estudiado la transcripción de los genes EmBP-2 y ZmBZ, con la finalidad de conocer si estos factores están involucrados en la regulación de *rab28*. Ambos factores se transcriben en todos los tejidos estudiados (ver figura 10).

-> Embriogénesis y tejidos vegetativos en situación control

Observamos los transcritos de ZmBZ y EmBP-2 a los 20 dap, y su concentración aumenta ligeramente con la maduración del embrión, de manera más pronunciada para ZmBZ. En el tejido vegetativo observamos un nivel de transcripción basal en hojas, tallos y raíces de plántulas de 5 dag. Este patrón de expresión está de acuerdo con los resultados obtenidos en los experimentos de *footprinting in vivo* del promotor de *rab28*, donde las cajas ABRE están protegidas antes y después de su activación, en el embrión (Busk et al 1999) y en tejido vegetativo (no publicado). Estos datos nos indican que ZmBZ y EmBP-2 podrían estar involucradas en la regulación de *rab28*, aunque la presencia de los mRNA en un tejido no siempre se acompaña de la acumulación de las proteínas.

El incremento de la transcripción durante la embriogénesis de EmBP-2 y ZmBZ puede ser debido, en parte, a un fenómeno de expresión autorregulada, que se ha descrito para los factores OsBZ8 de arroz y EmBP-1 de trigo (Nakagawa et al 1996 y Guiltinan et al 1990, respectivamente).

-> Tejidos vegetativos deshidratados

Cuando las plántulas de 5 dag se someten a diferentes tipos de estrés que producen deshidratación celular o a un tratamiento con ABA, no se observa un aumento de la transcripción en ningún caso. Este hecho no excluye una participación en la regulación de *rab28* porque la

Discusión

regulación de los factores bZIP, como ya se ha comentado, se produce principalmente a nivel post-transcripcional.

En la literatura se encuentran datos de la transcripción de los genes homólogos a EmBP-2 y ZmBZ en otras especies de cereales. El gen que codifica OsBZ8 de arroz se transcribe en tejido embrionario y vegetativo, aumentando la transcripción con la maduración del embrión (Nakagawa et al 1996). La transcripción del gen OsBZ8 de cebada se ha estudiado en embrión inmaduro y presenta un nivel bajo de expresión (Hollung et al 1997). Estos datos son equivalentes a los encontrados para ZmBZ.

La regulación de la transcripción de EmBP-1 varía según la especie que se está estudiando. En cebada y en trigo la expresión de EmBP-1 coincide con la de EmBP-2, detectándose mRNA en la semilla durante todo el desarrollo y también en hojas y raíces (Hollung et al 1997 y Eckardt et al 1998, respectivamente). En cambio mEmBP-1a de maíz se transcribe en semilla, raíz y tallo pero no en hoja (Carlini et al 1999). En cambio EmBP-2 se detecta en hoja. Esto podría representar un mecanismo de regulación de la transcripción específica de tejido para dos genes que codifican dos proteínas que presenta un alto grado de similitud, las cuales podrían tener funciones comunes en el embrión, el tallo y la raíz, pero EmBP-2 podría ser específica de hoja. Una consecuencia de esta distribución espacial de la expresión de estos genes podría ser la regulación diferencial del gen *rab28* observada en tejidos vegetativos y embrionarios en trabajos previos de nuestro grupo (Pla et al 1993).

-> Germinación

La transcripción de EmBP-2 disminuye rápidamente cuando un embrión seco se hidrata (figura 11). El tratamiento con ABA durante la germinación detiene el proceso germinativo, pero el resultado obtenido indica que este tratamiento no ayuda a mantener los niveles de transcripción de EmBP-2.

El patrón de transcripción de ZmBZ es más constitutivo y no se observan variaciones significativas en el nivel de mRNA, teniendo en cuenta las características semicuantitativas del PCR. El mRNA de ZmBZ se detecta hasta los 3 dag con unos niveles tejido semejantes a los obtenidos en el embrión seco, y este nivel no se ve afectado por el tratamiento con ABA.

El patrón de transcripción del gen *rab28* durante la germinación es diferente que el observado para los factores bZIP. La germinación detiene la transcripción de *rab28* y el tratamiento con ABA la vuelve a poner en marcha. No conocemos la importancia de estas diferencias en el nivel de transcripción hasta que no conozcamos los mecanismos de regulación post-transcripcional que actuarán sobre los mRNA de EmBP-2 y ZmBZ y las proteínas traducidas, que en última instancia determinan las proteínas activas que encontramos en los tejidos.

La disminución del nivel de mRNA observada para EmBP-2 sugiere que este factor podría formar parte del programa de maduración específico del embrión, el mismo que permite la activación de *rab28* mediada por el desarrollo. Por otra parte, el nivel de transcripción constitutivo de ZmBZ está en concordancia con los resultados de *footprinting in vivo* realizados sobre el promotor de *rab28*.

El patrón de expresión del gen de arroz OsBZ8 durante la germinación es diferente del patrón observado para ZmBZ. El mRNA de OsBZ8 disminuye al hidratar el embrión seco pero se recupera el nivel de transcripción con un tratamiento con ABA. Esta diferencia entre las dos especies indica un posible control de la transcripción de los dos genes diferente, que puede relacionarse con funciones diferentes para cada proteína durante la germinación. Por otro lado, el gen EmBP-1 de cebada tiene un patrón de expresión igual que el obtenido para EmBP-2.

La banda obtenida en la reacción de RT-PCR para ZmBZ se ha secuenciado y corresponde a ZmBZ. El cDNA utilizado en estas reacciones se ha obtenido por retrotranscripción a partir de RNA total de los diferentes tejidos utilizando como oligonucleótido el polydT. De esta manera está asegurada la retrotranscripción únicamente de los mRNA maduros. El no encontrar la secuencia ZmBZb en el tejido nos permite pensar que esa secuencia es un artefacto del proceso de clonaje y que posiblemente se trata de un mRNA que no ha finalizado el proceso de maduración. De todas maneras no se puede descartar que esta putativa isoforma se encuentre en los tejidos pero que no se pueda detectar en estas reacciones de PCR por falta de sensibilidad. Se ha comentado que para el caso del factor Pit-1 y su isoforma Pit-1a, la abundancia relativa de ambas en el tejido es de 7/1 (Morris et al 1992). Si la abundancia relativa entre ZmBZ y ZmBZb fuese similar, probablemente no se podría detectar ZmBZb. Una observación a tener en cuenta es que la RT-PCR nos ha resultado siempre una técnica más sensible que el cribado de una genoteca, y este resultado no apoya este posible problema de falta de sensibilidad.

La transcripción de los dos genes bZIP se ha estudiado a nivel de órganos enteros. Es posible que haya una regulación de la transcripción de ambos factores específica de tejido o incluso específica a nivel celular. Para estudiar esta posibilidad es necesario realizar ensayos de hibridación *in situ*. En la literatura se describe el patrón de transcripción de OsBZ8 en diferentes tejidos de arroz mediante esta técnica (Miyoshi et al 1999). El mRNA de OsBZ8 se detecta en el embrión a los 3 dag, cuando aún no se ha diferenciado ningún órgano. A los 15 dag se establece una especificidad de tejido con fuerte hibridación en la radícula, los tejidos vasculares, el epitelio del escutelo y los órganos del tallo, excepto en los coleótilos. A los 20 dag la señal se hace más débil. Esta expresión en arroz tan temprana nos indica que OsBZ8 puede tener un papel funcional en la embriogénesis temprana y media en arroz, además de su función en la maduración de la semilla. Su expresión en etapas tan tempranas probablemente no depende de la concentración de ABA, que no alcanza el nivel máximo hasta los 20 dag. Para este factor se había descrito en tejido

vegetativo un nivel basal de transcripción, el cual era independiente de ABA (además de su inducción mediada por esta hormona).

La acumulación de mRNA de *rab28* está muy ligada al tipo de tejido estudiado. Se detecta a partir de los 20 dap en el embrión. En estadios más tardíos del desarrollo embrionario se localiza su mRNA en los elementos vasculares, como se ha descrito también para OsBZ8 de arroz.

4.3. ESTUDIO DEL PATRÓN DE ACUMULACIÓN DE LAS PROTEÍNAS AISLADAS

Sobreexpresión de las proteínas recombinantes

El patrón de transcripción prácticamente constitutivo obtenido para los factores ZmBZ y EmBP-2 no implica que haya traducción y acumulación de las proteínas en los diferentes tejidos de manera constitutiva. El nivel de proteína es el que va a determinar si estos factores están relacionados con la regulación de la transcripción de *rab28*.

El estudio del patrón de acumulación de las proteínas aisladas se ha realizado utilizando dos anticuerpos específicos generados contra ellas. Las proteínas se han sobreexpresado mediante el sistema pET en *E. coli*, generándose proteínas recombinantes. Se ha seleccionado este sistema porque la purificación de las proteínas recombinantes es sencilla y porque a las proteínas sobreexpresadas se le añaden un bajo número de aminoácidos (entre los que se encuentra un marcador de 5 histidinas), que permiten su purificación y su detección durante todo el proceso.

La purificación de las proteínas se realiza en una columna de afinidad con níquel (que tiene afinidad por las histidinas). El eluyente usado es el imidazol, que hace que la afinidad entre las histidinas y el níquel de la columna disminuya. Así se consiguieron las fracciones con las proteínas recombinantes purificadas, como se observa en el ECL de la figura 14.

Las proteínas recombinantes son bastante antigénicas, sobretodo en los dominios bZIP. Se han inmunizado conejos con ellas y obtenido los anticuerpos policlonales y los sueros preinmunes. Se ha comprobado su especificidad y la dilución del anticuerpo adecuada para la detección de las proteínas utilizando las proteínas recombinantes. El anticuerpo generado contra EmBP-2 se ha usado a una dilución 1/1500, y el anticuerpo generado contra ZmBZ a 1/750.

Estudio del patrón de acumulación en los tejidos de las proteínas ZmBZ y EmBP-2

Estos anticuerpos se utilizaron para el estudio del patrón de acumulación de las proteínas aisladas en tejidos de maíz. El hecho de que los anticuerpos hayan sido generados contra proteínas de una familia con un dominio tan conservado ha hecho necesario realizar un ensayo de especificidad de

hibridación de los anticuerpos, para comprobar si reconocen las mismas proteínas o son específicos de cada bZIP. El resultado claramente indica que no hay reconocimiento cruzado entre los dos anticuerpos (ver figura 17).

-> **EmBP-2 durante la embriogénesis**

El anticuerpo contra EmBP-2 detecta una señal con un tamaño aparente similar al esperado para la proteína EmBP-2. Esta proteína presenta un patrón de acumulación en el embrión que se correlaciona con el patrón de transcripción (figura 18). Podemos detectarla a los 15 dap y su nivel se mantiene de manera constitutiva hasta el final de la embriogénesis, con una ligera tendencia a aumentar su nivel hacia el final de la maduración. A los 15 dap el nivel de ABA no ha llegado al máximo que se alcanza durante la embriogénesis. Aún así detectamos una alta acumulación de la proteína, que no varía al aplicar ABA exógenamente. La acumulación de EmBP-2, por tanto, no responde al nivel de ABA en el embrión. Lo que sí que se detecta a una menor exposición el ECL (no mostrado) es una tendencia de esta señal a disminuir cuando los embriones de 15 y 30 dap se tratan 24 horas con agua. La acumulación de EmBP-2 parece responder al programa de desarrollo embrionario, sugiriendo un papel funcional de EmBP-2 en este proceso.

-> **EmBP-2 durante la germinación**

En la germinación el nivel de proteína disminuye de manera equivalente a la observada para el nivel de mRNA. A partir de los 2 dag es posible observar unas bandas muy claras de menor tamaño de EmBP-2, que podrían interpretarse como bandas de degradación de EmBP-2. El sistema del proteasoma es la vía mayoritaria por la cual las proteínas, marcadas previamente con moléculas de ubiquitina, se degradan en el citoplasma y en el núcleo. Este sistema es el responsable del *turnover* o recambio rápido de proteínas reguladoras importantes, como el factor Gcn4 de levadura (Meimoun et al 2000) y los factores bZIP c-Fos de mamífero (He et al 1998), y HY5 (Hardtke et al 2000) y ABI5 de Arabidopsis (López-Molina et al 2000).

Cuando observamos el patrón de acumulación de la proteína EmBP-2 durante el proceso germinativo, vemos claramente que en las muestras de 2 y 3 dag hay una bajada muy importante de su acumulación, que puede ser debida a un incremento en su degradación observado con la exposición mayor y también al descenso de la transcripción que se observaba en la figura 11 a partir de 2 dag (carriles 5-8). Es sorprendente el incremento de la acumulación de proteína observado en respuesta al tratamiento con ABA en embriones germinados 48 horas.

El ABA regula la concentración de la proteína ABI5 durante una etapa muy concreta del desarrollo que constituye el paso de la ruptura de la dormancia al inicio del crecimiento vegetativo. Esta hormona aumenta la transcripción del gen *abi5*. A nivel de proteína, ABI5 se degrada rápidamente por el proteasoma cuando disminuye la concentración de ABA. La degradación de ABI5 coincide con el inicio del crecimiento vegetativo, siendo ABI5 necesaria para mantener los embriones ya

germinados en un estado quiescente, protegiendo de esta manera las plantas de la sequía. El ABA, en cambio, no parece aumentar la estabilidad de EmBP-2 en la germinación. Aunque aumenta su concentración tras el tratamiento con la hormona, se observa también degradación.

-> EmBP-2 en el tejido vegetativo

En el tejido vegetativo el nivel de proteína no se correlaciona con los niveles de transcripción constitutivos observados en la figura 10. En las hojas de 5 dag en situación control no hemos podido detectar la proteína EmBP-2, pero si vemos una inducción cuando deshidratamos la plántula. En cambio, un tratamiento con ABA no induce la acumulación de la proteína, como sucedía en la germinación.

-> ZmBZ durante la embriogénesis

El anticuerpo contra ZmBZ reconoce una proteína con un tamaño aparente de 36 KDa a partir de los 15 dag y se acumula fuertemente hacia el final de la embriogénesis (figura 19). El nivel de proteína se correlaciona con el nivel de mRNA observado durante la embriogénesis (figura 10). A los 15 dag detectamos un nivel muy bajo de proteína, el cual se induce claramente por un tratamiento con ABA. En el embrión de 15 dag no se ha llegado a la concentración máxima de ABA durante la embriogénesis y el nivel de proteína detectado es muy bajo. La acumulación de esta proteína podría estar regulada por el nivel de ABA en el embrión, como sucede con su homólogo de arroz OsBZ8. La acumulación de la proteína en embriones de 15 dag tratados con ABA puede ir acompañada de un aumento de la transcripción o ser consecuencia únicamente de un incremento de la traducción o estabilidad de la proteína.

-> ZmBZ durante la germinación

En la germinación el nivel de proteína no se correlaciona con el nivel de transcripción de ZmBZ, sugiriendo un posible control post-transcripcional en la acumulación de la proteína. Aunque el nivel de mRNA detectado hasta los 3 dag es muy parecido al observado en el embrión seco (figura 11), a partir de 1 dag la proteína desaparece y no se induce por ABA.

-> ZmBZ en tejido vegetativo

En tejido vegetativo el anticuerpo no detecta ninguna proteína con el tamaño esperado, sugiriendo otra vez un posible control post-transcripcional (figura 11). Aunque este anticuerpo es menos efectivo que el generado contra EmBP-2, y puede ser que este sistema sea suficientemente sensible para detectar ZmBZ en el tejido vegetativo. Las bandas de mayor tamaño que se observan podrían representar alguna modificación post-traduccional de EmBP-2 o ser reacciones cruzadas del anticuerpo con otras proteínas.

4.4 ANÁLISIS DE LA INTERACCIÓN DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES CON EL DNA *IN VITRO*

El estudio del patrón de acumulación de las proteínas EmBP-2 y ZmBZ en los tejidos de maíz nos indica que se encuentran en el embrión durante la embriogénesis tardía. El ABA es un regulador de la expresión génica en el embrión en esta etapa del desarrollo, y por este motivo nuestras proteínas bZIP son candidatas reguladoras de la expresión génica a través del elemento ABRE. Se han realizado ensayos tipo EMSA para conocer cuales son las secuencias de DNA con las cuales presentan mayor afinidad de interacción. La interacción de las proteínas recombinantes con el DNA nos indica que son capaces de homodimerizar *in vitro*. La estructura de las proteínas recombinantes se describe en el apartado 3.2.3.

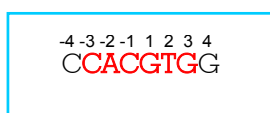
-> Interacción de EmBP-2 con el DNA

La proteína EmBP-2 recombinante interacciona con las cajas ABRE A (*rab28*); ABRE B, ABRE 1 y ABRE 4 (*rab28, rab17, rab17* respectivamente); ABRE 2 y ABRE 3 (*rab17, rab17*). Estos elementos se enumeran agrupados y secuencialmente de mayor a menor afinidad de interacción.

Las secuencias de DNA de los elementos *cis* utilizados en el ensayo y los genes donde se encuentran son:

ABRE A ABRE B	CCACGTGG CCACGTCT	Rab 28	<i>Maíz</i>
ABRE 1 ABRE 4 ABRE 2 ABRE 3	AGACGTGG CCACGTAC ACACGTCC GTACGTGT	Rab17	<i>Maíz</i>
LPT-1	TGACGTTT	<i>LPT-1</i>	<i>Maíz</i>
<i>G-box</i>	TCACGTGG	<i>PIN2</i>	Tomate

La afinidad de la interacción entre la proteína EmBP-1a de trigo y diferentes secuencias de DNA se ha estudiado, y la secuencia con la que presenta una afinidad mayor es



Al variar las bases que están en color rojo la afinidad de la proteína por el DNA disminuye mucho, en cambio las otras bases más externas hacen disminuir menos la afinidad (-4 y 4). La proteína EmBP-2 tiene una preferencia equivalente por las diferentes secuencias de DNA, ya que tiene

mayor afinidad por el ABRE A (como EmBP-1) y al variar alguna de las bases flanqueantes al núcleo ACGT central, se produce un gran descenso en la afinidad de la interacción. El motivo por el cual la afinidad por ABRE B, ABRE 1 y ABRE 4 es algo mayor que por ABRE 2 y ABRE 3 puede ser porque aunque varía la base flanqueante de uno de los extremos del núcleo ACGT, en el extremo opuesto se conservan las dos bases, lo que puede suponer un refuerzo de la interacción. Esto no pasa con los ABRE 2 y ABRE 3, donde se mantiene solamente una de las 2 bases que flanquean el núcleo ACGT y únicamente en uno de los dos lados. La caja G-box (del gen *PIN2*) aparentemente debería interactuar con EmBP-2. En este caso las bases que flanquean esta caja en el oligo posiblemente estén determinando esta no interacción. Esta coincidencia en la preferencia por las diferentes secuencias de DNA entre EmBP-2 y EmBP-1 es muy esperable, ya que estas dos proteínas tienen una homología del 100% en el dominio básico y región puente, responsables de la especificidad de interacción con el DNA.

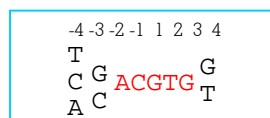
-> Interacción de ZmBZ con el DNA

Los ensayos realizados con ZmBZ en paralelo no han sido informativos debido a la baja señal obtenida. El ABRE A está descrito como un ABRE muy fuerte, y la interacción de ZmBZ con este elemento es débil. Esto puede ser debido a que esta proteína recombinante se degrada y aglomera con mucha facilidad, de manera que hay menos proteína monomérica libre para la interacción con el DNA. Se ha evaluado únicamente su interacción con las cajas ABRE del gen en estudio *rab28* (figura 22). ZmBZ interacciona con ABRE A y con ABRE B, y tiene una mayor afinidad por ABRE A.

En la literatura se encuentran descritas algunas de las preferencias de unión al DNA de OsBZ8 de arroz. Esta proteína se une tanto a cajas híbridas *C-box/G-box* como a cajas *G-box*. Algunas de las secuencias estudiadas y los genes donde se encuentran son:

<u>Híbridas C-box/G-box</u>		
Hex motif: TGACGTGG	gen de la Histona H3	Trigo
<i>OsEm</i> : CGACGTGT	gen <i>Em</i>	Arroz
<u>G-box</u>		
Em1A: ACACGTGG	gen <i>Em</i>	Trigo
G-1A : CCACGTGG	gen Rbcs 1A	Arabidopsis

La proteína OsBZ8 interacciona con cajas de secuencia:



La proteína ZmBZ muestra una preferencia equivalente por las diferentes secuencias de DNA. La caja con la que más afinidad muestra es ABRE A, de igual secuencia que G-1A, y también

interacciona con ABRE B, secuencia que mantiene igual uno de los dos lados del núcleo central ACGT. La homología de secuencia del 100% que presentan estas proteínas en el dominio básico y región puente nos permite predecir la interacción entre ZmBZ y ABRE 1, ABRE 4, ABRE 2 y LPT, basándonos en la interacción entre OsBZ 8 y los elementos *cis* indicados arriba.

La interacción entre las proteínas recombinantes y el ABRE A son específicas, como se muestra en las figuras 21 y 22 en ensayos de competición. La interacción entre EmBP-2 y el ABRE B también es específica, como se ha comprobado en ensayos de competición equivalentes al de la figura 21 (resultado no mostrado).

-> **Secuencia del elemento bZIP y especificidad por las diferentes secuencias de DNA**

La especificidad de interacción de las proteínas bZIP con el DNA está determinada por la secuencia del dominio básico y la región puente del factor bZIP. Mediante experimentos de mutación dirigida en esta región se ha conseguido variar la afinidad de las proteínas EmBP-1a de trigo y TGA 1a de tabaco por las diferentes secuencias de DNA (Niu et al 1999).

Se ha realizado recientemente una clasificación de las 75 proteínas bZIP que se han descrito en el genoma de Arabidopsis, basándose en los dominios conservados compartidos por las diferentes secuencias. Su objetivo es asociar una estructura determinada con las posibles funciones fisiológicas de la proteína, agrupando las bZIP en 10 grupos, y que considera a los miembros de cada uno relacionados funcionalmente (Jakoby et al 2002). Esta clasificación muestra que no todas las bZIP tienen iguales exigencias respecto a las bases centrales ACGT ni respecto al carácter palindrómico de la secuencia de DNA. En la clasificación se refleja una afinidad de las proteínas que forman cada grupo por las mismas secuencias de DNA, indicando la estrecha relación que hay entre secuencia del elemento bZIP y la secuencia nucleotídica con la que interacciona. Por ejemplo, el grupo denominado con la letra G incluye las proteínas GBFs de Arabidopsis y CPRFs de perejil, las cuales tienen en común la posibilidad de interactuar tanto con cajas *G-box* simétricas como asimétricas. Por otro lado, las proteínas del grupo denominado con la letra I tienen un aminoácido del dominio básico, altamente conservado entre las proteínas bZIP, diferente. En la posición -10 (ver nomenclatura en la figura 2) tienen una lisina en lugar de una arginina. Este cambio se correlaciona con una mayor afinidad por secuencias no palindrómicas (Fukazawa et al 2000).

-> **Dimerización y especificidad por las diferentes secuencias de DNA**

La consecuencia que se puede extraer de la relación que existe entre la secuencia del dominio básico (y la región puente) y la afinidad por las secuencias de DNA, es la diferente afinidad por una misma secuencia de DNA que tendrán los dímeros formados entre diferentes proteínas bZIP. Esta capacidad de formar heterodímeros que tienen estas proteínas permite una mayor especificidad en la interacción con el DNA determinada por el control combinatorial. Esto permite que un número

bajo de elementos (proteínas bZIP diferentes) se combinen de diferente manera y den lugar a un gran espectro de interacciones con diferentes afinidades por una misma secuencia de DNA. Esto permite una regulación de la transcripción génica muy controlada, al depender en todo momento de las diferentes proteínas bZIP que se encuentran en el núcleo de la célula, de su abundancia relativa, de su actividad en esas condiciones (controlada por modificaciones post-traduccionales, entre otros mecanismos), de la afinidad de cada proteína por la secuencia de DNA, de la posibilidad de formar dímeros entre ellas y de la afinidad por la secuencia de DNA entre los diferentes heterodímeros.

La heterodimerización es un fenómeno selectivo, ya que aunque dos proteínas bZIP interactúen con la misma secuencia de DNA como homodímeros, no todas las bZIPs pueden combinarse y formar un heterodímero. Existe cierta selectividad y en algunos casos imposibilidad, como en el caso de las proteínas de maíz O2 y mEmBP-1 (Carlini et al 1999).

Una consecuencia que se deduce de esta complejidad en el control de la expresión de un gen *in vivo* es que un ensayo *in vitro* con una proteína bZIP nos da una información muy limitada a esas condiciones experimentales, y que la no interacción *in vitro* del homodímero no implica que no pueda estar involucrada en la regulación *in vivo* del gen regulado por esta secuencia, ya que la heterodimerización puede provocar un cambio de su afinidad por la secuencia de DNA. De igual manera, la interacción *in vitro* del homodímero no implica participación de la bZIP en la regulación *in vivo* de la transcripción del gen en estudio, porque es posible que haya en el núcleo otras proteínas bZIP, con una mayor afinidad por la secuencia de DNA, y que la desplazan del promotor. Los resultados que hemos obtenido nosotros *in vitro* con las dos proteínas juntas en la misma reacción de interacción con el DNA nos indican que la afinidad por el ABRE A de los homodímeros respecto al heterodímero ZmBZ-EmBP-2 es diferente (figura 55).

La mayor afinidad en la interacción con la caja ABRE A que con la caja ABRE B que muestran las dos proteínas recombinantes *in vitro* está de acuerdo con los experimentos de *footprinting in vivo* realizados en el promotor del gen *rab28*, indicando que las proteínas endógenas pueden estar involucradas en mantener la estructura de la cromatina en el promotor abierta, al menos en el embrión, donde su patrón de expresión es constitutivo.

4.5. ESTUDIO DEL PAPEL FUNCIONAL DE ZmBZ Y EmBP-2 EN LA REGULACIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN *IN VIVO* DE *Rab28*

Los datos que tenemos sobre la expresión del gen *rab28* en los diferentes tejidos provienen de ensayos tipo Northern blot, EMSA y *footprinting in vivo*. *Rab28* empieza a transcribirse en embriones de 20 daps, aumentando su expresión hacia el final de la embriogénesis. En embriones germinados y en tejido vegetativo no se expresa, pero se induce con un tratamiento con ABA. Igual sucede en callos BMS (resultado no publicado). En embriones mutantes *vp1* prácticamente no se expresa, pero es inducible con ABA exógeno (figuras l) y ma) de la introducción).

Los estudios de *footprinting in vivo* en embriones salvajes W64A, embriones mutantes *vp1*, tejido vegetativo y callos BMS muestran que los elementos ABRE A, GRA, CE3 y ABRE B que se encuentran en el promotor de *rab28* están protegidos de manera constitutiva, indicando su participación en la regulación de la transcripción. No se aprecian cambios significativos en las protecciones de estos elementos en los diferentes tejidos, lo que sugiere que pueden estar implicados los mismos factores.

Los ensayos EMSA indican que cuando el gen está activo en embriones W64A y en embriones germinados 2 días en un medio con ABA hay una actividad ABF de una movilidad electroforética muy parecida. ABF es una actividad específica de embrión, que se puede mantener activa durante la germinación con un tratamiento con ABA. En embriones *vp1* también se observa ABF. En cambio en tejido vegetativo deshidratado y callos BMS tratados con ABA se observan complejos DNA-proteína con diferente movilidad que en el embrión, lo que nos indica una regulación diferencial del gen en estos tejidos (figura n) de la introducción).

El estudio del efecto de la sobreexpresión de los factores ZmBZ y EmBP-2 sobre la actividad de *rab28* se ha realizado en estos tejidos, excepto en vegetativo. La diferente movilidad electroforética de los extractos de proteínas nucleares embrionarias y de tejido vegetal podría ser consecuencia de un solo cambio en los factores involucrados. El ambiente concreto de factores de transcripción que se encuentra en un tejido determinado y en unas condiciones determinadas es el determinante principal de la actividad transcripcional de un gen determinado. Se ha realizado el estudio en los diferentes tejidos porque un efecto de los factores en uno de ellos no implica que en otro tejido tenga que ser el mismo. Hay que tener en cuenta que los resultados de estos experimentos se deben interpretar con cuidado, debido precisamente a que al sobreexpresar un factor de transcripción estamos alterando la situación real que hay *in vivo* en el tejido.

La técnica utilizada ha sido la transformación transitoria de los tejidos comentados mediante la técnica de la biolística. Como construcción *reporter* se ha usado el promotor mínimo *rab28*

inducible por ABA (en versión salvaje o mutada en los ABRE) fusionado al gen gus (ver figura 23). Debido a la gran variabilidad en la eficiencia de transformación de cada disparo es necesario el uso de un control interno, de expresión constitutiva, que permita comparar la eficiencia de transformación de cada disparo. Se ha usado el gen de la luciferasa como control interno. Los valores de actividad son el cociente de los valores gus/luc. Las construcciones efectoras usadas sobreexpresan las proteínas ZmBZ, EmBP-2 parcial y VP1.

El cDNA usado para sobreexpresar ZmBZ ha sido ZmBZb, el clon completo aislado de tejido vegetativo. La fusión al extremo 3' de esta secuencia el cDNA que codifica para la proteína marcadora GFP (*green fluorescent protein*) y transformación de callos BMS ha permitido observar fluorescencia. Esto confirma que en el tejido se produce el *splicing* que elimina la secuencia que contiene la señal de stop.

La proteína EmBP-2 sobreexpresada es parcial y no tiene dominio de activación. La proteína endógena es muy probable que tenga este dominio porque pertenece a la subfamilia IIa, que se caracteriza porque sus miembros tienen un dominio rico en prolina en el extremo N terminal, que es transactivador. Cuando una proteína bZIP que no tiene dominio de activación se utiliza en estos experimentos, la heterodimerización puede suplir la falta de dominio de activación, y el dímero formado utiliza el dominio de activación del otro componente.

Los ensayos de titración han definido la concentración óptima de las construcciones efectora y *reporter* a utilizar, para ver el máximo efecto del factor de transcripción. Cuando se utilizan cantidades superiores de efector se produce una inhibición de la actividad de *rab28*, debida al fenómeno denominado *sqelching*, que se debe a un secuestro de los factores involucrados en la transcripción por la proteína sobreexpresada (figura 25).

EFFECTO DE LA SOBREENPRESIÓN DE ZmBZ

Callos BMS

En callos BMS *rab28* no se transcribe pero se puede inducir con un tratamiento con ABA. La sobreexpresión de ZmBZ en callos BMS no produce ningún cambio en la actividad de *rab28* (figuras 26 y 27). Cuando se activa el gen con el tratamiento con ABA observamos transactivación por ZmBZ. El ABA puede regular la actividad de la proteína ZmBZ o puede activar (o inducir la síntesis *de novo*) a otros factores de transcripción de la familia bZIP o de otras familias, que interaccionen con ZmBZ, produciéndose entonces como consecuencia la transactivación por ZmBZ.

En la vía de transducción de la señal del ABA hay implicadas cascadas de fosforilación y desfosforilación (ver introducción), y una de las proteínas diana puede ser ZmBZ. Un cambio en el estado de fosforilación puede modular la actividad de un factor bZIP y dependiendo de la parte de la molécula donde se produce, puede provocar un cambio de localización subcelular o un cambio en su actividad de unión al DNA.

El efecto de ZmBZ observado es específico y dependiente del elemento ABRE funcional (figuras 26 y 27). Es más importante la caja ABRE A que la ABRE B. Los valores obtenidos con estas dos cajas mutadas a la vez son equivalentes a cuando se muta solo la caja ABRE A. Estos resultados están en concordancia con los ensayos de *footprinting in vivo* nuevamente.

Embriones W64A

En el embrión de 20 daps *rab28* se transcribe, aunque esta transcripción es más activa a los 23 daps. En los ensayos EMSA en estos embriones (ver introducción, figuras o1) y o2)) se observa la formación de dos complejos, complejos I y II (o ABF), la suma de los cuales en extractos desde 16 a 24 daps es prácticamente constante, habiendo un pico en la concentración del complejo II a los 22 daps. Esto sugiere que un complejo se podría formar por modificación del otro (Busk et al 1999).

La sobreexpresión del factor ZmBZ en embriones W64A tiene igual efecto sobre la actividad de *rab28* a los 17 daps que a los 23 daps, observándose un efecto transactivador que, aunque es pequeño, es muy reproducible (figuras 30 y 31). Cuando se tratan los embriones con ABA, el efecto de ZmBZ es diferente en las dos edades, y sólo se observa un efecto transactivador a los 23 daps.

La diferencia entre los embriones de 17 daps y de 23 daps respecto a ABF es cuantitativa, de manera que a los 17 daps se encuentra en el embrión pero a los 23 daps es prácticamente la actividad de interacción con el ABRE A mayoritaria.

El efecto transactivador observado en ausencia del tratamiento con ABA podría reflejar que la vía de transducción que conduce a la activación de la transcripción de *rab28* mediada por el desarrollo embrionario se empieza a activar antes de que se detecte su mRNA en el tejido, y que va aumentando su actividad progresivamente. Esta transactivación mediada por ZmBZ observada en ambas edades sugiere que esta proteína es una de las dianas de la vía de activación de *rab28*. En los callos BMS no se obtiene nunca transactivación sin tratamiento con ABA, y puede ser porque ni *rab28* ni la vía de transducción de señal que conduce a su activación se encuentran activos en este tejido.

El diferente efecto de la sobreexpresión de ZmBZ sobre la transcripción de *rab28* cuando activamos al gen con ABA en embriones de 23 y 17 daps puede ser debida a que en el núcleo hay diferentes factores de transcripción a las dos edades, como ABF, que va aumentando su actividad a partir de

Discusión

los 16 dap, o otros factores que faciliten su interacción con el DNA (como factores tipo BEF, introducción 1.4.1, Virbasius et al 1999).

Las conclusiones que se pueden extraer de esta transformación de embriones W64A son dos. En primer lugar, la actividad de ZmBZ podría estar modificada de alguna manera por algún componente de la vía de transducción de señal que conduce a la activación de la transcripción de *rab28*, y por esto tenemos un pequeño efecto transactivador en muestras sin tratamiento con ABA. En segundo lugar, ZmBZ podría interaccionar con otras proteínas del núcleo que varían su concentración o su actividad en embriones de 23 dap respecto a embriones de 17 dap (mediante la formación de heterodímeros o interacciones con otras proteínas de otras familias). ABF podría ser uno de los *enhanceosomas* con los que ZmBZ interacciona, ya que aumenta su actividad en embriones de 23 dap, y se podría obtener este efecto transactivador cuando se encuentra en el núcleo con mayor actividad.

Los valores de actividad de *rab28* obtenidos en la transformación de embriones de 17 dap y de 23 dap reflejan la actividad del gen endógeno, mayor a los 23 dap, cuando los valores son superiores. Esto refleja la importancia que tiene la actividad ABF en la activación de *rab28*. La activación de *rab28* mediada por el tratamiento con ABA respecto al valor basal es mucho mayor en embriones de 17 dap, reflejando un nivel de actividad de *rab28* antes de la activación inferior. Aunque los valores absolutos de actividad conseguidos a los 17 dap son muy inferiores a los obtenidos en los embriones de 23 dap. Ya se había descrito que la concentración de ABA no es el determinante más importante para la activación de *rab28*, cuando se estudió la expresión de este gen en el desarrollo embrionario en los mutantes *viviparous-2*, deficientes en ABA endógeno, donde el gen *rab28*, aunque menos que en los embriones salvajes, también se transcribe.

Los valores de actividad de *rab28* obtenidos con las cajas ABRE mutadas son menores que los obtenidos con las cajas salvajes. Debido a los valores tan bajos que se encuentran en los embriones de 17 dap, el efecto de la mutación de los elementos ABRE no es tan importante como el encontrado en embriones de 23 dap. Se podría deducir de esta observación que los factores de transcripción involucrados en la activación de *rab28* en las dos edades son diferentes, y que los que participan a los 17 dap tienen menos especificidad en la unión a las cajas ABRE (no tendrían que participar diferentes proteínas, podrían ser las mismas con un diferente grado de afinidad modulado por modificaciones post-traduccionales).

Estudio de la interacción entre VP1 y ZmBZ

El factor de transactivación VP1 (*viviparousus-1*) de maíz es un regulador esencial de la expresión génica específica del programa de maduración de la semilla. Se han descrito sus homólogos en diversas especies, y todos comparten una estructura modular con 4 dominios conservados: Un dominio ácido transactivador en el extremo N terminal y 3 dominios básicos, B1, B2 y B3, que se localizan a continuación del dominio ácido en este orden hacia el extremo C terminal. Hay un mutante que presenta un factor VP1 truncado que no tiene el dominio B3, y esta proteína es capaz de activar algunos genes embrionarios únicamente, indicando que en la interacción de VP1 con los diferentes genes diana están involucrados diferentes dominios de la proteína (McCarty et al 1989). Se han descrito diferentes mecanismos de regulación de la expresión génica por VP1, a través de las cajas *G-box* (en los genes *Em* de trigo y *rab28* de maíz) y a través de la caja *sph I* (en los genes *C1* de maíz y *NapA* de *Brassica napus*).

El factor VP1 participa en la regulación de *rab28*. Su efecto es sinérgico con el efecto del ABA aplicado exógenamente (ver figura 24), y dependiente de las cajas ABRE funcionales (Busk et al 1997). La regulación del gen *Em* de trigo presenta estas características, aunque los mecanismos de regulación de ambos genes por VP1 son diferentes. El gen *Em* necesita para su expresión VP1 y ABA, en cambio *rab28* sólo necesita ABA aunque su expresión se potencia por VP1. Así, en los mutantes *viviparousus-1* (*vp1*) *rab28* no se expresa, pero se puede inducir con un tratamiento con ABA. No se induce en cambio el gen *Em*. Esta diferencia podría estar relacionada con la expresión de *Em* específica de embrión, mientras que *rab28* se induce también en tejido vegetativo. Cuando sobreexpresamos el factor ABI3, homólogo de VP1, en tejido vegetativo de *Arabidopsis*, se produce la inducción de *AtEm* en respuesta a un tratamiento con ABA. *Rab28* en cambio se puede inducir en ausencia de VP1, y este hecho seguramente se relaciona con la diferente movilidad electroforética de los *enhanceosomas* de embrión y tejido vegetativo. Los ensayos de *footprinting in vivo* de *rab28* en embriones W64A y *vp1* no muestran grandes diferencias, lo que sugiere que VP1 transactiva a *rab28* interaccionando con un complejo proteína-DNA preformado en el promotor (ver introducción, figura 03)).

Con la finalidad de conocer el mecanismo por el cual VP1 transactiva a través del ABRE, se han realizado ensayos *in vitro* de tipo EMSA con la proteína EmBP-1 de trigo y la proteína VP1. La proteína VP1 incrementa la unión de EmBP-1 al ABRE, ya sea la proteína completa o un parcial que contiene el elemento bZIP. Este efecto no es específico para las proteínas de esta familia, sino que se extiende a otros factores de transcripción y a la interacción de éstos con sus cajas específicas (Hill et al 1996).

La cotransformación de VP1 y ZmBZ en callos BMS indica que puede haber una interacción entre los dos factores en la regulación de *rab28*, dependiente de los ABRE funcionales (figura 28). La

Discusión

transactivación por ZmBZ ya se ha descrito como moderada, y tampoco observamos un gran aumento por la presencia de VP1.

Los experimentos realizados con mutantes *vp1* refuerzan esta posible interacción. Se ha sobreexpresado ZmBZ en embriones *vp1* de 23 dap y de 17 dap (figuras 32 y 33) para comparar los resultados con los obtenidos con embriones W64A. Los valores gus/luc de actividad son muy bajos en ambos casos respecto a los obtenidos en embriones W64A de 23 daps. El efecto del ABA en la actividad de *rab28* en este mutante en ambas edades es muy importante, como sucedía en los embriones W64A de 17 daps, reflejando en el mutante la inactividad del promotor *rab28* endógeno en condiciones basales.

La sobreexpresión de ZmBZ en embriones *vp1* no tiene ningún efecto sobre la actividad de *rab28*. Esto refuerza la interacción entre los factores VP1 y ZmBZ, la cual es necesaria para la transactivación de *rab28* mediada por ZmBZ en el embrión. Si es tan importante el factor VP1 en la transactivación por ZmBZ de *rab28*, puede ser debido a que VP1 posibilita la interacción *in vivo* entre ZmBZ y los ABRE (porque *in vitro* ya hemos visto esta interacción). Los ensayos de footprinting *in vivo* de embriones W64A y *vp1* indican que, aunque las protecciones de los ABRE no son significativamente diferentes, la intensidad de las protecciones sí lo es. Esto sugiere que VP1 potencia las interacciones entre ABRE y ABF (*enhanceosomas* ya preformado).

Aunque no es lo que muestran los ensayos de *footprint in vivo* y EMSA con extractos nucleares (ver principio de este apartado 3.4), el efecto transactivador de ZmBZ obtenido en embriones W64A podría ser debido a interacciones con factores de transcripción que no participan en la activación de *rab28* por ABA en embriones *vp1*. Esto implicaría que la actividad ABF en los dos embriones está formada por dos *enhanceosomas* diferentes, y que en presencia de VP1 se favorecería la interacción de uno de ellos con el ABRE A. Estas putativas actividades ABF diferentes tendrían una movilidad electroforética muy similar. Aunque en tejido vegetativo no encontramos el factor VP1, la movilidad electroforética del *enhanceosoma* en este tejido es diferente del formado en el embrión *vp1* (resultados no publicados).

Para interpretar el efecto de la sobreexpresión de ZmBZ observado en los diferentes tejidos podríamos pensar en la existencia de diferentes actividades ABF en embriones *vp1*, en embriones W64A antes de la activación de *rab28* y en embriones W64A después de la activación de *rab28*. Comparando la expresión del gen *rab28* con la del gen Em, se encuentra la base de esta idea, porque *rab28* se puede inducir en presencia y en ausencia de VP1.

El gen *rab28* se podría inducir en respuesta al programa de desarrollo del embrión y en respuesta a ABA. Esta inducción de diferente origen podría involucrar diferentes *enhanceosomas*. El descrito durante el desarrollo embrionario de W64A, ABF, estaría involucrado únicamente en la regulación

mediada por el desarrollo, a partir de los 18 daps. Este podría ser el motivo de que la transformación de embriones W64A de 17 dap no alcance los valores de actividad de *rab28* alcanzados en los embriones de 23 dap aunque activemos su expresión con ABA y de que ZmBZ no tenga un efecto transactivador en embriones de 17 dap.

El factor VP1 se encuentra en el tejido a los 10 dap pero no es capaz de inducir la expresión de *rab28* hasta que no se alcanza un momento en el desarrollo concreto, definido por la aparición de ABF. Por lo tanto, en la inducción de *rab28* mediada por ABA en los embriones jóvenes no tiene por qué estar involucrado VP1, inducción menos potente que la mediada por el desarrollo en los experimentos realizados.

En trabajos previos ya se comentaba alguna diferencia en los EMSA realizados con extractos nucleares embrionarios antes y después de la activación de *rab28* (figura o2) en la introducción, Busk et al 1999). Mientras que en extractos mayores de 16 dap aparecen dos complejos mayoritarios que van cambiando de intensidad a medida que avanzaba el desarrollo, la activación de *rab28* por ABA en embriones de 16 dap se correlaciona con el incremento del complejo II únicamente (ABF), y no hay un descenso en la intensidad del complejo I.

La ausencia de transactivación por ZmBZ de *rab28* en embriones *vp1* coincide con el obtenido en los embriones de 17 dap, apoyando la idea de que puedan haber dos *enhanceosomas* en el embrión, que participan en la activación de *rab28* mediada por ABA y por el desarrollo. Los resultados sugieren que ZmBZ participa o interacciona con el *enhanceosoma* correspondiente al desarrollo embrionario únicamente, y no lo hace con el que media la activación de *rab28* en embriones jóvenes tratados con ABA.

El efecto transactivador que se observa en embriones de 17 dap y de 23 dap W64A sin tratamiento con ABA no contradice esta hipótesis, porque ya se ha comentado que lo que puede estar ocurriendo es una modificación post-traducciona de ZmBZ, posiblemente necesaria para su activación, mediada por algún componente de la vía de transducción activada por el desarrollo, que ya se ha activado. La actividad de ZmBZ parece estar modulada por modificaciones post-transcripcionales y por control combinatorial.

Coleoptilos de 2 dag

Los resultados obtenidos en coleoptilos reafirman esta hipótesis de la interacción de ZmBZ con el *enhanceosoma* ABF formado por el desarrollo embrionario, si consideramos que el tratamiento con ABA activa la transcripción de *rab28* recuperando este *enhanceosoma* que se ha mantenido hasta el final de la embriogénesis. En los ensayos EMSA realizados con extractos de coleoptilos de 2 dag no aparecen otras bandas retardadas de diferente movilidad formadas por factores no

embrionarios (introducción figura 01). El valor de activación de *rab28* por ABA es semejante al obtenido en embriones, y es dependiente de las cajas ABRE (figura 35).

En coleoptilos hay una pequeña activación de *rab28* debida a la sobreexpresión de ZmBZ, pero no parece específica de los ABRE. En cambio, cuando hay un tratamiento con ABA, se obtiene un patrón de activación equivalente al visto en embriones de W64A específico de los ABRE.

El factor endógeno ZmBZ desaparece durante la germinación y no se induce por ABA ni en coleoptilos de 2 dag ni en tejido vegetativo (figura 19). Cuando se sobreexpresa el factor en los coleoptilos no observamos un efecto transactivador específico de las cajas ABRE sin ABA, y esto nos puede reflejar la falta de actividad de *rab28* en este tejido y de factores de transcripción específicos de embrión, como ABF.

EFFECTO DE LA SOBREEXPRESIÓN DEL FACTOR EmBP-2

Callos BMS e interacción con el factor VP1

Los ensayos realizados en la proteína EmBP-2 en callos BMS no muestran efecto transactivador en ausencia de tratamiento con ABA y muy poca transactivación cuando tratamos con ABA, como pasaba con ZmBZ. Al tratarse de una proteína parcial, ya hemos comentado la importancia de la heterodimerización en el efecto transactivador observado.

A diferencia de lo que pasaba con ZmBZ, en los ensayos de cotransformación con VP1 no se aprecia interacción entre los dos factores. Aunque EmBP-2 sea una proteína parcial, los ensayos *in vitro* con la proteína EmBP-1 de trigo indican que VP1 se comporta igual con la proteína completa que con una parcial que solo constaba del elemento bZIP. Sin embargo, el experimento *in vivo* nos muestra un efecto sobre la actividad del *rab28* mediado por la posible interacción de los factores y es posible que aunque para la interacción *in vitro* no sea necesario el dominio de activación de EmBP-2, para ver un efecto transactivador *in vivo* se requiera la proteína EmBP-2 completa.

Embriones W64A

La sobreexpresión del factor EmBP-2 en embriones W64A de 23 dap (figura 34) y de 17 dap (no mostrado) presenta iguales características que la del factor ZmBZ. Tiene un pequeño efecto transactivador cuando no hay tratamiento con ABA y cuando se trata con la hormona se obtiene una transactivación (mayor que la de ZmBZ) en los embriones de 23 dap pero no en los de 17 dap. Este efecto, en este caso, será debido principalmente a la heterodimerización con una proteína endógena, que podría ser un componente del *enhanceosoma* ABF formado por el programa de desarrollo.

Debido a la posibilidad de la heterodimerización entre las proteínas bZIP, se han sobreexpresado las dos proteínas bZIP juntas, para ver si eran capaces de regular la actividad de *rab28* conjuntamente, mediante la formación de un heterodímero. Los resultados indican que el efecto transactivador de las 2 proteínas juntas es equivalente al obtenido únicamente con EmBP-2, lo que sugiere que EmBP-2 y ZmBZ no colaboran en la transactivación de *rab28*.

Coleoptilos de 2 dag

La sobreexpresión de EmBP-2 en coleoptilos germinados 2 días tiene un efecto similar en la actividad de *rab28* al visto en los otros tejidos (figura 36). EmBP-2 sigue siendo más transactivadora que ZmBZ cuando tratamos con ABA.

La proteína EmBP-2 endógena ha desaparecido prácticamente a los 2 dag, aunque se recupera con un tratamiento con ABA (figura 18). El efecto de EmBP-2 es equivalente al visto en embrión de 23 daps, indicando la posible interacción entre EmBP-2 y alguna proteína del *enhanceosoma* ABF formado por el desarrollo embrionario. La transactivación obtenida es menor que en el embrión, y esto puede ser debido a que también lo es la actividad ABF.

Para completar el estudio del papel de las bZIP en la regulación de la actividad de *rab28* hemos realizado estudios EMSA con extractos embrionarios, buscando entre las proteínas que interaccionan con el ABRE A a nuestras bZIP. Los resultados obtenidos con la sobreexpresión de las bZIP sobre la actividad de *rab28* en los diferentes tejidos nos indican que los mecanismos de modulación de su actividad parecen ser muy importantes, como modificaciones post-traduccionales mediadas por el ABA (o por el programa de desarrollo del embrión), o como el control combinatorial, mediado por la heterodimerización con otras bZIP (o proteínas de otras familias) o la interacción con otros factores de transcripción, entre ellos VP1. Estos aspectos serán discutidos más adelante.

4.6. ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE LOS EXTRACTOS NUCLEARES DE EMBRIÓN CON LOS ABRE

En esta parte del trabajo nuestro objetivo es el análisis de la composición de los complejos proteína-ABRE A que se forman con los extractos proteicos nucleares de embrión (figuras o1) y o2) de la introducción). Este análisis pretende conocer la regulación de *rab28* a través del elemento ABRE A, determinada por la aparición de la actividad ABF, que en los extractos de 25 dap es el complejo mayoritario detectado de unión al ABRE A. La estructura abierta del promotor, con interacciones de proteínas con los ABRE antes de su activación transcripcional, es la clave para el estudio del mecanismo de activación de este gen. Los ensayos EMSA realizados en trabajos

anteriores nos han dado mucha información sobre la regulación transcripcional de *rab28*, así como los estudios de *footprinting in vivo*, pero aún quedan bastantes preguntas por resolver: En los complejos proteína-ABRE A antes y después de la activación de *rab28*, ¿Están involucradas las mismas proteínas o proteínas diferentes? ¿Son las mismas proteínas con diferentes modificaciones post-traduccionales? ¿Tienen estas proteínas la misma afinidad por el ABRE A?

La estrategia principal seguida para intentar responder a estas preguntas ha sido la adición a los extractos nucleares de las proteínas recombinantes y los anticuerpos específicos generados contra ellas, con la finalidad de analizar los cambios que se producían en la formación de los *enhanceosomas* endógenos y en su interacción con el ABRE. Se ha seleccionado la caja ABRE A porque en el *footprinting in vivo* muestra protecciones más fuertes, y porque en los ensayos EMSA se confirma la mayor interacción entre las proteínas del extracto y esta caja respecto al ABRE B (figura 36). Para poder analizar mejor los posibles cambios en los extractos se han realizado electroforesis más largas que las que se realizaron en estudios anteriores, para aumentar la resolución de las bandas retardadas. Era necesario relacionar las bandas obtenidas con las descritas en los trabajos anteriores, para conocer como es su regulación durante toda la embriogénesis. Con esta finalidad se ha realizado un experimento donde se puede ver la movilidad electroforética relativa de las proteínas recombinantes, las proteínas de un extracto de 20 dap y las de un extracto de embrión seco (figura 37). La movilidad de la proteína EmBP-2 recombinante (igual que la proteína ZmBZ recombinante) es mayor que la de los complejos que se forman con los extractos nucleares, indicando que en la interacción entre las proteínas endógenas y el ABRE A posiblemente están involucradas más proteínas.

Del *enhanceosoma* que regula la expresión génica a través del ABRE se conocen algunas proteínas (Schultz et al 1998). Se ha descrito que en la regulación del gen *Em* de trigo, a través del elemento ABRE Em1a, participan VP1, EmBP-1 y las proteínas GF14 (homólogas en plantas de las proteínas 14-3-3 de mamífero). El elemento ABRE A se regula a través de VP1 y de proteínas bZIP también, y posiblemente el mecanismo de regulación de estos dos elementos *cis* sea muy similar (resultados no publicados de nuestro grupo indican que los complejos formados entre extractos nucleares embrionarios de maíz y el ABRE A se compiten totalmente con el oligonucleótido Em1a). Las proteínas GF-14 no se unen al DNA y su participación en el *enhanceosoma* se produce aparentemente a través de interacciones proteína-proteína. Ensayos de doble híbrido muestran que GF-14 interacciona con VP1 y ensayos de inmunoprecipitación *in vivo* muestran una interacción entre GF-14 y EmBP-1. Para la interacción es necesaria la dimerización de GF-14 y que determinados residuos de serina en las proteínas que interaccionan con las proteínas GF-14 estén fosforilados. La vía de transducción de señal en respuesta al ABA incluye cambios en el estado de fosforilación de algunas proteínas, y las proteínas GF-14 pueden estar involucradas en facilitar la interacción específica entre VP1 y proteínas bZIP según su estado de fosforilación.

Estudios de *supershift* con anticuerpos generados contra diferentes partes de las proteínas GF-14 han dado información sobre la composición y conformación del *enhanceosoma*. Las GF14 no interactúan con el DNA y su participación en la regulación génica es a través de contactos proteína-proteína. En los extractos proteicos de maíz W64A y *vpl* se encuentran las proteínas GF-14, indicando que no es imprescindible la interacción con VP1, siendo los complejos DNA-proteína de ambos extractos indistinguibles (Schultz et al 1998). Cuando se utilizan diferentes anticuerpos contra las diferentes partes de GF-14 en el ensayo, hay algunos que no son capaces de dar un *supershift* (aunque si reconocen a las proteínas en el extracto nuclear en ensayos Western). Esto indica que la conformación que adoptan las proteínas en el *enhanceosoma* puede ser determinante de que haya o no interacción con el anticuerpo. La adición de la proteína GF-14 al extracto nuclear hace aparecer nuevas bandas de menor movilidad, indicando que se está incorporando al *enhanceosoma*.

Análisis de las bandas retardadas utilizando competidores y cambios del estado de fosforilación

Las interacciones ABRE A-proteínas nucleares de embrión seco son específicas y no se compiten ni con competidores inespecíficos (poli dIdC) ni específicos (ABRE A mutado) (figura 38). Cuando a la reacción de *binding* se le añade un exceso de oligonucleótido ABRE A sin marcar, hay un comportamiento diferente entre las diferentes bandas retardadas. Las denominadas c), b) y d) se compiten rápidamente y las bandas a) y a') aumentan su intensidad, y tienen una competición más lenta (desaparece la señal con una competición 100.000x de oligonucleótido ABRE A sin marcar).

Las diferencias entre el ensayo con competidor y sin competidor es únicamente el aumento la relación [DNA]/[proteína]. Debido a que esto produce un aumento de la intensidad de las bandas a) y a') se puede pensar que las proteínas que participan en este complejo de interacción con el ABRE A son muy abundantes en el extracto, pero a la vez tienen menos afinidad por el ABRE A que las otras que forman las bandas c), b) y d). Esto podría explicar que en un extracto sin competidor no se observen tanto, puesto que se forman principalmente otros *enhanceosomas*. Esta menor afinidad se relaciona con un bajo coeficiente de recambio, una vez unidas al DNA, esta unión es fuerte y cuesta el intercambio con otra molécula de DNA.

Analizando el comportamiento de las bandas a) y a') a lo largo del desarrollo embrionario respecto a la actividad de *rab28*, se observa que en los extractos con menor tiempo de electroforesis su movilidad se puede corresponder con una única banda, denominada complejo I (Busk et al 1999, introducción figuras o1) y o2). Esta banda parece estar relacionada con la activación de *rab28* de manera que cuando disminuye su intensidad aumenta la intensidad de la banda b) y se activa *rab28*. No sabemos si el complejo proteico que forma la banda a) está compuesto por las mismas proteínas antes y después de la activación de *rab28*.

El ensayo de competición presentado en la figura 38 sugiere que hay unas proteínas, que pueden ser muy abundantes en el extracto, que presentan una interacción mayoritaria con el ABRE A cuando el gen está inactivo, que se caracteriza por ser de baja afinidad. Si aparecen en el núcleo otras proteínas con mayor afinidad por el ABRE A, pueden ser desplazadas de la caja ABRE A, ocurriendo así la activación de la transcripción. El complejo II o ABF parece ser la actividad que podría desplazarlas del promotor, porque cuando aumenta su unión al ABRE A disminuye la intensidad del complejo I. También es posible que estos dos complejos DNA-proteína que aparecen más intensos tengan solo igual movilidad que las proteínas de las bandas α) y α'), pero que sean un artefacto del ensayo, una unión no específica al ABRE A.

La activación del gen *rab28* en un momento determinado del desarrollo parece reflejar un cambio de los factores de transcripción que se encuentran en el núcleo. Este momento se relaciona con la aparición de una actividad denominada ABF, un componente de la cual es una proteína bZIP. Este complejo se podría activar como consecuencia de una modificación post-traducciona sobre una proteína que lo constituya, que ya estuviera presente en el núcleo de la célula de manera constitutiva. También la translocación al núcleo o un incremento en la actividad de unión al DNA de esta proteína puede ser la clave de la activación de ABF. El ABA seguramente estará involucrado, porque para la activación de *rab28* se requiere la presencia de ABA en la célula.

El cambio del estado de fosforilación de las proteínas del extracto no parece afectar demasiado a su interacción con el ABRE A. El tratamiento con fosfatasa alcalina disminuye la interacción de las proteínas de la banda c) con el ABRE A (figura 39). Este tratamiento cambia el estado de fosforilación de las proteínas *in vivo* en el extracto, y el ensayo EMSA indica que una desfosforilación no afecta en la interacción con el ABRE A a la mayoría de los complejos, implicando que no hay un cambio en la afinidad de las proteínas por el DNA cuando cambia su estado de fosforilación o que las proteínas ya estaban desfosforiladas. Reacciones de fosforilación del extracto proteico, añadiendo al extracto ATP solamente o ATP y la quinasa CK2 (muy involucrada en la regulación post-traducciona de muchos factores de transcripción), no produce ningún cambio en las interacciones proteína-DNA, ni en extractos de embrión seco ni de 20 dap (resultados no mostrados).

Efecto de la adición de las proteínas recombinantes al extracto de proteínas nucleares

La adición un extracto de 20 dap de las proteínas recombinantes no provoca ningún cambio en la interacción de las proteínas endógenas con el ABA (figura 40), aunque la proteína recombinante represente el 2% del total de proteínas de la reacción de *binding*. La actividad de unión al ABRE A que observamos es probablemente el complejo II (ABF), si tenemos en cuenta la movilidad relativa de las proteínas de los extractos de 20 y 60 dap (figura 37). Estas competiciones con proteína

recombinante nos indican que la afinidad de las proteínas endógenas por el ABRE A es muy superior a la afinidad de las proteínas recombinantes, y por eso no hay una competición por la sonda en el ensayo.

Si las proteínas ZmBZ y EmBP-2 endógenas formasen parte del complejo ABF de interacción con el ABRE *in vivo*, podríamos esperar que la banda retardada incrementase su intensidad o hubiese la formación de otras bandas de menor movilidad, como se ha descrito para las proteínas GF14 anteriormente (Schultz et al 1998). Pero hay una diferencia, al menos, entre las proteínas endógenas y las recombinantes, y es que las recombinantes son proteínas parciales. Además es posible que las proteínas que están interaccionando con el ABRE A hayan sufrido alguna modificación post-traducciona que aumente su actividad. El hecho de que las proteínas no aparezcan como componentes del complejo ABF sin haber sufrido ninguna modificación post-traducciona no contradice los resultados obtenidos con la transformación transitoria.

La proteína EmBP-2 compite por la sonda ABRE A con las proteínas endógenas que forman la banda retardada d) cuando se añade a un extracto de 60 daps, donde *rab28* está transcripcionalmente activo (figura 43, carriles 1 y 2). Estos resultados podrían indicar que en el extracto hay alguna proteína de unión al ABRE A, con una afinidad muy parecida a EmBP-2 recombinante, que participa en el *enhanceosoma* que forma la banda d). El motivo por el cual EmBP-2 recombinante compite por la sonda en lugar de incorporarse a los complejos de unión al ABRE del extracto, si realmente forma parte de él, podría ser el mismo comentado ya en los extractos de 20 dap.

La adición de la proteína ZmBZ recombinante no modifica la formación de las bandas retardadas (resultado no mostrado), como pasaba en los extractos de 20 daps. Puede ser que *in vivo* no se encuentre formando parte de los *enhanceosomas* que interaccionan con ABRE A, al menos en los 4 complejos DNA-proteína mayoritarios. Si hubiese una competición o un refuerzo de la intensidad en alguna de las bandas minoritarias no lo podríamos detectar.

Efecto de la adición de los anticuerpos específicos al extracto de proteínas nucleares

Experimentos de *supershift* han determinado que la proteína bZIP TGA2.2 de tabaco es un componente principal de la actividad ASF-1 de unión al elemento as-1 (Niggeweg et al 2000). En este trabajo el anticuerpo utilizado reconocía el extremo Nterminal de la proteína, y en ensayos *in vitro* de *supershift* se obtenía una banda de movilidad electroforética diferente cuando se añadía el anticuerpo.

Discusión

Los anticuerpos específicos para cada proteína recombinante impiden su interacción con el DNA en ensayos *supershift*. Posiblemente esto sucede porque la interacción del anticuerpo con la proteína supone un problema estérico y de conformación del elemento bZIP que impide su unión al DNA (figura 41). Este efecto solo se produce entre una bZIP y su anticuerpo específico y no con los sueros preinmunes ni con el anticuerpo generado contra la otra bZIP (resultados no mostrados). Los anticuerpos vuelven a mostrar su capacidad para diferenciar a dos proteínas de la familia de las bZIP.

En los ensayos de *supershift* diseñados se buscaba una disminución en la intensidad de interacción entre el ABRE A y las proteínas endógenas. Según la situación espacial de las proteínas en el *enhanceosoma* había la posibilidad de que el dominio bZIP no quedara accesible al anticuerpo, con la posible generación de bandas diferentes de menor movilidad al interaccionar el anticuerpo con otras partes de la molécula. Este efecto no se podría detectar si el anticuerpo no reconocía a alguna proteína de las bandas retardadas mayoritarias (debido al gran número de bandas obtenidas).

El efecto de la adición de los anticuerpos a la reacción de unión de las proteínas recombinantes con el ABRE A es la desaparición de la interacción. En el extracto encontramos a las proteínas endógenas completas, donde el elemento bZIP puede no estar tan accesible, además de que la posición de las proteínas en el *enhanceosoma* también puede limitar el acceso de los anticuerpos. Es por esto muy posible que el anticuerpo no sea tan efectivo en los extractos y que se obtengan *supershifts* más discretos que los obtenidos con las proteínas recombinantes.

Los resultados indican que el anticuerpo contra EmBP-2 reacciona con alguna proteína de la banda d) del extracto, porque se aprecia una disminución en su intensidad, muy reproducible en los diferentes experimentos realizados (figura 42). Este efecto no se obtenía con ningún otro suero, ni el preinmune de EmBP-2 ni los inmune y preinmune de ZmBZ. Este resultado parece indicar que el anticuerpo contra EmBP-2, que siempre ha mostrado ser muy específico, reacciona con una proteína del *enhanceosoma* de unión a ABRE A que forma la banda d).

Experimentos de inmunodeplección del extracto con este anticuerpo reafirman la interacción (figura 43). Las proteínas retenidas por el anticuerpo se utilizaron en una reacción de *binding in vitro* y fueron capaces de retener a la sonda ABRE A, en cambio no retuvieron la sonda ABRE A mutada, utilizada como control negativo de la reacción (figura 44). Estos resultados con los extractos nucleares indican que en el *enhanceosoma* de unión al ABRE A hay una proteína muy relacionada con EmBP-2, en relación a estructura y afinidad por el ABRE A.

4.7. ESTUDIO DE LOS MECANISMOS DE MODULACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE EmBP-2 Y ZmBZ

La activación de la mayoría de las proteínas bZIP se produce a nivel post-transcripcional, y se observa en los resultados discutidos que las proteínas bZIP EmBP-2 y ZmBZ también pueden estar moduladas por alguno de estos mecanismos.

El patrón de acumulación del mRNA muestra que estos factores son bastante constitutivos en los diferentes tejidos, sin observarse inducción por ninguno de los tratamientos estudiados. En cambio, el nivel de proteína en el tejido vegetativo y en la germinación no se corresponde con la acumulación de mRNA. Esto sugiere un posible control post-transcripcional, como pueden ser mecanismos de control de la estabilidad del mRNA, o a nivel de traducción de los mRNA y estabilidad de las proteínas en los tejidos. Este control se ha descrito en la traducción de la proteína O2 (Lohmer et al 1993), así como en la eficiencia de traducción del factor osZIP-1a de arroz, mediado por la presencia de 3 pequeñas ORFs en la región 5'UTR de su secuencia (Nantel and Quatrano 1996). El nivel basal de transcripción de los dos factores en tejido vegetativo no se corresponde con un nivel de proteína basal, ya que ninguna de las dos proteínas se ha detectado por Western en condiciones control. En condiciones de estrés hídrico observamos una inducción de EmBP-2, que no vemos a nivel de transcripción. El patrón de expresión de la proteína EmBP-2 durante la germinación muestra que a partir de los 2 dag se produce una degradación muy marcada de la proteína, edad a la que también un tratamiento con ABA aumenta su acumulación. En cambio el mRNA no se modificaba por este tratamiento. Por otro lado, ZmBZ presenta durante la germinación unos niveles de mRNA y de proteína totalmente diferentes, ya que el mRNA es muy constitutivo en cambio la proteína desaparece con 1 dag.

Además de los mecanismos que pueden controlar la acumulación de las proteínas en los tejidos, los resultados indican que pueden haber mecanismos de regulación de la actividad de las proteínas EmBP-2 y ZmBZ, como en los experimentos de transformación transitoria, donde podría haber un mecanismo de control de la actividad transactivadora de los factores regulado por ABA. No sabemos si este control se basa en modificaciones post-traduccionales sobre estas proteínas o en mecanismos de control combinatorial e interacciones con otros factores. Podría ser que ambos estuviesen implicados, como ya se ha discutido en el apartado 4.5.

El objetivo de la última parte de este trabajo ha sido el estudio de los mecanismos que podrían estar involucrados en la modulación de la actividad de los factores EmBP-2 y ZmBZ. Se ha estudiado la influencia del estado de fosforilación en su actividad, su localización subcelular y finalmente la posibilidad de que EmBP-2 y ZmBZ formen un heterodímero capaz de interactuar con el ABRE A.

Modulación de la actividad de ZmBZ y EmBP-2 mediante mecanismos de fosforilación y desfosforilación

La proteína EmBP-2 se encuentra en el embrión, desde los 15 daps hasta embrión seco, en un estado fosforilado (figura 45). Los experimentos de electroforesis en doble dimensión no permiten definir si en todos los estadios estudiados los aminoácidos fosforilados son los mismos, y por esto podría ser que la proteína, que aparece fosforilada a los 15 daps, se mantuviese igual durante toda la embriogénesis o que la fosforilación constituyese un mecanismo de control más dinámico, con fosforilaciones y desfosforilaciones que controlasen la estabilidad y la actividad de la proteína. El factor TRAB1 de arroz, homólogo de ABI5, se encuentra también fosforilado de manera constitutiva en callos de arroz transgénicos por sobreexpresión, además de ser fosforilado en respuesta al ABA. Aunque no se ha descrito el significado funcional de esta fosforilación constitutiva, debe estar relacionada con otras vías de regulación en las que pueda estar involucrado TRAB1 (Kagaya et al 2002).

El hecho de que EmBP-2 esté fosforilada ya a los 15 daps probablemente indica que esta fosforilación no es dependiente de ABA, porque en esta edad aún el ABA no ha alcanzado su concentración máxima. Cuando realizamos tratamientos con ABA de embriones jóvenes no observamos un cambio en el estado de fosforilación de EmBP-2, aunque no conocemos si los aminoácidos fosforilados antes y después del tratamiento con ABA son los mismos. Hemos realizado el mismo experimento para ZmBZ, pero no hemos sido capaces de detectar señal, probablemente por el menor título del anticuerpo.

Los experimentos de transformación transitoria de embriones de 23 daps parecen indicar que el ABA puede modular la actividad de EmBP-2 y ZmBZ, y está muy descrito que en la ruta de transducción del ABA los mecanismos de fosforilación /desfosforilación tienen mucha importancia. Los factores de *Arabidopsis* AREB1 y AREB2 requieren ABA para su activación, porque sus actividades transactivadoras sobre el gen *rd29B* disminuyen en los mutantes *aba2* y *abi1* pero aumentan en el mutante *era1*. Su activación además se inhibe con tratamientos con inhibidores de quinasas. Esto indica que para su activación necesitan modificaciones post-transcripcionales dependientes de ABA, probablemente por fosforilación (Uno et al 2000).

-> Secuencias teóricas de fosforilación de EmBP-2 y ZmBZ

Es interesante conocer las dianas teóricas de fosforilación presentes en la secuencia de las 2 proteínas bZIP con la finalidad de hacer hipótesis sobre las consecuencias de un posible cambio de fosforilación en esas posiciones. Se ha descrito que en las NLS o cerca de ellas un cambio del estado de fosforilación, y el posible cambio de conformación de la proteína como consecuencia, podría afectar a su localización intracelular. Las proteínas se pueden encontrar retenidas en el citoplasma mediante la interacción con otras proteínas que las mantienen ancladas,

interaccionando con ellas bloqueando sus secuencias NLS, y un cambio de conformación puede deshacer esta interacción. También puede ser que las NLS no sean totalmente funcionales si no están fosforiladas (Jans 1995).

Otro lugar clave en el control de la actividad de estas proteínas es el elemento bZIP. Dianas de fosforilación localizadas aquí pueden regular la interacción con el DNA. Se ha descrito que la fosforilación de algunos factores en el dominio básico elimina su capacidad de interaccionar con el DNA, y también se ha descrito el efecto contrario en otros factores, es decir, que aumentan su afinidad por el DNA una vez fosforilados. El factor AtGBF1, el más homólogo de Arabidopsis a EmBP-2, aumenta su capacidad de interaccionar *in vitro* con el DNA después de ser fosforilado *in vitro* por CK2 (Klimczak et al 1995). También se ha descrito que fosforilaciones en determinadas serinas del dominio básico disminuyen la interacción del factor TaHBP-1a(17) de trigo con el DNA (Meshi et al 1998).

La fosforilación de ciertos dominios puede regular la interacción con otras proteínas, como las GF-14, como ya se comentó anteriormente, afectando de esta manera la formación del *enhanceosoma* que controla la transcripción de un determinado gen.

Las proteínas EmBP-2 y ZmBZ tienen dianas de fosforilación por PKC y CK2 (análisis realizado con el programa PROSITE). La quinasa PKC no se ha encontrado en plantas, aunque se postula la posibilidad de que haya otra quinasa que haga las mismas funciones que ésta. Se han considerado los lugares de fosforilación teórica para CK2 por la importancia que tiene esta quinasa en el control de la actividad de muchos factores de transcripción, involucrados en procesos fisiológicos muy diversos (Riera et al 2001). Las dianas de fosforilación teóricas se localizan cerca de las NLS y en el dominio básico de las dos proteínas (figura 46).

Los resultados indican que las proteínas EmBP-2 y ZmBZ se fosforilan *in vitro* por CK2. Esta quinasa tiene capacidad de autofosforilarse. En la reacción de fosforilación de la proteína EmBP-2 la autofosforilación de CK2 disminuye (figura 47). Este mismo efecto se ha visto en el laboratorio cuando la proteína sustrato de la CK2 es la proteína RAB17 mutada en el consenso de fosforilación para esta quinasa. El motivo de este descenso de autofosforilación puede ser una interacción entre estas proteínas y la quinasa fuerte, de igual manera que actúan los inhibidores competitivos de las enzimas. La interacción entre RAB17 y CK2 se ha visto en ensayos de doble híbrido, pero entre EmBP-2 o ZmBZ y CK2 no se ha podido detectar. Está descrito que la interacción entre bZIP y CK2 se produce a través del dominio básico (Yamaguchi et al 1998). En el ensayo se ha utilizado la fosforilación de RAB17 como control positivo y como control negativo la autofosforilación de CK2. La fosforilación de RAB17 es más intensa que la fosforilación de las proteínas recombinantes, lo que refleja el mayor número de aminoácidos fosforilados en rab17 por la quinasa. Se fosforilan 9 serinas en RAB17. En las proteínas recombinantes hay 3 dianas teóricas en EmBP-2 (proteína que

comprende los aminoácidos 58 a 201) y 5 dianas en ZmBZ (proteína que comprende los aminoácidos 168 a 325) (ver figura 46).

El cambio de fosforilación de las proteínas recombinantes modula su interacción con el DNA en ensayos EMSA. La fosforilación de EmBP-2 potencia su interacción con el ABRE A, en cambio la fosforilación de ZmBZ anula esta interacción. Ambos efectos se han descrito para las proteínas bZIP, y podrían constituir un mecanismo de modulación de la actividad, y está de acuerdo con nuestra teoría sobre el control de la activación de *rab28*. En el embrión las proteínas EmBP-2 y ZmBZ se encuentran de manera constitutiva, pero un cambio del estado de fosforilación en su dominio básico podría cambiar su afinidad por el DNA. Estas proteínas pueden participar en mantener la estructura de la cromatina abierta en el promotor y en la activación de la transcripción de *rab28*. La activación de la transcripción podría significar simplemente el desplazamiento de una proteína unida a las cajas ABRE con menor afinidad por otra bZIP modificada post-traduccionalmente con más afinidad.

Estudio de la modulación de la actividad de las bZIP mediada por localización subcelular

Es característico de las células eucariotas el tener compartimentos en el citoplasma separados por membranas plasmáticas, donde se producen las diferentes funciones esenciales. Las proteínas que están destinadas a un compartimento determinado deben contener en su estructura señales apropiadas para entrar.

La comunicación entre el núcleo y el citoplasma es un proceso bidireccional y selectivo que ocurre a través de los NPCs (*Nuclear Pore Complex*), que se encuentran embebidos en la membrana nuclear. Se han identificado numerosas señales NLS (*Nuclear Localization Signal*) que marcan el importe y exporte de proteínas al núcleo. Las proteínas importinas facilitan este transporte a través del NPC mediado por las NLS (Görlich 1997). No hay una secuencia consenso para las NLS, pero tienen unas características comunes; son ricas en aminoácidos básicos y no se escinden de la secuencia después del importe. Su función es independiente de su posición y algunas proteínas pueden contener múltiples NLS (Smith and Raikhel, 1999).

El importe de proteínas a través de la NLS está regulado por diversas vías de transducción de señal. Después de la síntesis la translocación a núcleo de la proteína puede estar regulada a nivel de anclaje a estructuras celulares (como el citoesqueleto) o mediante inhibición de la interacción entre la importina y la NLS. Esta regulación es clave en el control de la expresión génica. Aunque siempre se necesitan las importinas, el gen que codifica para la importina α se induce en arroz por luz, constituyendo otro nivel de control en el importe nuclear, que puede reflejar una mayor necesidad durante el día de la entrada de proteínas al núcleo (Shoji et al 1998). No se conoce el

mecanismo que lleva a las proteínas desde el citoplasma hasta el NPC, pero algunas observaciones indican que la importina α se asocia con el citoesqueleto en las plantas (Smith and Raikhel 1998).

Las proteínas bZIP involucradas en vías de transducción en respuesta a la luz están muy reguladas a nivel de localización intracelular, habiéndose determinado que la luz provoca una translocación del citoplasma al núcleo. Este es el caso de los factores GBFs de *Arabidopsis* y los CPRFs de perejil (Terzaghi et al 1997, Kircher et al 1999, respectivamente). Muchos de estos factores que se translocan al núcleo en respuesta a la luz presentan una unión al DNA regulada por fosforilación. Por esto se ha postulado que el cambio de fosforilación provoca un cambio conformacional que activa a la NLS además de modular la unión al DNA (Wellmer et al 2001, Jans 1995). Se ha descrito ya en otros factores de transcripción una localización subcelular dependiente del estado de fosforilación, como es el caso del factor AFX humano, que se encuentra en un estado fosforilado en el citoplasma y en cambio en el núcleo se encuentra no fosforilado (Takaishi et al 1999).

El análisis de la localización subcelular de ZmBZ y EmBP-2 indica que se localizan en el citoplasma y en el núcleo. Este resultado se ha obtenido mediante técnicas de inmunolocalización y microscopía electrónica (figuras 52 y 53). Dentro del núcleo la proteína se localiza en la masa intercromatínica así como en el espacio intercromatínico. Esta localización subcelular abre la posibilidad de una modulación de la actividad de los factores mediada por la translocación al núcleo.

Con la finalidad de analizar las condiciones que podrían inducir un cambio en la localización subcelular de ZmBZ, hemos realizado estudios de transformación transitoria con una construcción que sobreexpresaba la proteína quimérica ZmBZ-GFP (tabla V, construcción 4). La mayor ventaja de este sistema es que las células se pueden analizar vivas, y se puede estudiar el efecto de la aplicación de un tratamiento en la localización de la proteína quimérica. En células de epidermis de cebolla y BMS de maíz la localización de la proteína ZmBZ-GFP sigue siendo citoplasmática y nuclear (figuras 49-51).

El tratamiento de las muestras con ABA no induce ningún cambio evidente en esta localización subcelular (figuras 50 y 51). Aunque la proteína se encuentra distribuida por toda la célula, no se conoce si dentro y fuera del citoplasma la proteína tiene el mismo estado de fosforilación. Esto implicaría a mecanismos de fosforilación/desfosforilación en el cambio de localización subcelular. Para analizar esta posibilidad se realizaron experimentos donde se trataron las muestras con DRB, descrito inicialmente como un inhibidor específico de la quinasa CK2, aunque se ha visto que también inhibe la actividad de otras quinasas. El tratamiento con este producto no desencadena un cambio en la localización de la proteína ZmBZ, indicando que esta hipótesis de los dos estados de fosforilación diferentes en núcleo y en citoplasma no sucede en la realidad.

Modulación de la actividad de las bZIP mediada por el control combinatorial: Estudio de la heterodimerización entre EmBP-2 y ZmBZ

La heterodimerización entre factores bZIP es un mecanismo de control de la actividad muy estudiado. Es muy selectivo y se relaciona con la estructura y la localización del elemento bZIP, aspectos muy importantes para que dos proteínas puedan dimerizar. Se han descrito interacciones imposibles, heterodimerizaciones que impiden la interacción con el DNA, control en la formación de determinados heterodímeros formados entre proteínas expresadas de manera constitutiva y otras inducidas en respuesta a algunas señales específicas... Todos estos mecanismos controlan una regulación más fina de la expresión génica, y para la célula constituye un ahorro de energía sintetizar pocos elementos (proteínas bZIP) que en diferentes combinaciones (heterodimerización) presenten diferente afinidad por el DNA, y como consecuencia una gran diversidad de respuestas de expresión génica. Muchos promotores de genes en plantas que contienen elementos con el núcleo ACGT responden a señales diferentes, sugiriendo que las combinaciones entre diferentes proteínas bZIP y otras proteínas reguladoras se requieren para una expresión específica.

Los factores osZIP-2 α y osZIP-2 β de arroz pertenecen a la familia bZIP, pero no son capaces de reconocer al elemento G-box (esto puede ser debido a algunos cambios en aminoácidos de sus elementos bZIP, que son muy conservados entre las proteínas bZIP). Cuando heterodimerizan con la proteína EmBP-1 de trigo impiden su unión al DNA en ensayos EMSA. Sin embargo no son capaces de heterodimerizar con osZIP-1 α , de la misma familia que EmBP-1, y se postula que estos factores osZIP-2 están involucrados en la inactivación selectiva de determinados miembros GBF mediante la heterodimerización (Nantel and Quatrano, 1996). En este caso se muestra la heterodimerización como un mecanismo selectivo, pero hay otros ejemplos descritos, como la heterodimerización preferente entre osZIP-1 α y EmBP-1, la no homodimerización entre osZIP-2 β . La proteína EmBP-1 de maíz no heterodimeriza con la proteína O2 (Carlini et al 1999), pero O2 y OHP-1 heterodimerizan preferentemente (Pysh et al 1993).

Otro mecanismo de control combinatorial a través de la heterodimerización se ha descrito para las proteínas GBF de Arabidopsis. GBF-1, -2, -3 heterodimerizan y son capaces de unirse así a elementos G-box. La particularidad de estas proteínas es que como homodímeros interaccionan de diferente manera con el DNA: GBF1 y GBF3 se unen de una manera simétrica a la secuencia palindrómica, mientras que GBF2 se une de manera asimétrica. Esto, además de que GBF-1 y GBF-2 se encuentran en hojas crecidas en luz, pero no GBF-3, sugiere potenciales mecanismos de regulación de la expresión génica a través de la heterodimerización (Schindler et al 1992).

Se han descrito en Arabidopsis interacciones entre diferentes factores bZIP mediante el estudio de sus mutantes. Las proteínas HYH y HY5 son capaces de heterodimerizar *in vivo*. Experimentos de *microarrays* indican que tienen funciones redundantes, ya que solo un 7 % de los genes que regulan

estos factores tienen una expresión diferente en los mutantes *hyh* y *hy5*. Estas proteínas están relacionadas de manera que la estabilidad de HYH depende de la presencia de HY5, y las dos proteínas parecen encontrarse en un equilibrio entre homo- y heterodímeros. La fuerza relativa de los fenotipos de los mutantes (mayor para *hy5* que para *hyh*) sugiere que los homodímeros HY5 pueden hacer la función de los heterodímeros HY5/HYH en el mutante *hyh*, pero los homodímeros HYH pueden solo compensar parcialmente la pérdida de los homodímeros HY5 y heterodímeros HYH/HY5 en el mutante *hy5* (Holm et al 2002).

Las proteínas homólogas ABI5 y EEL actúan de manera antagónica en la regulación de la expresión génica en la embriogénesis tardía, obteniéndose así un control transcripcional más preciso (Bensmihen et al 2002). En el mutante *abi5* la expresión de *AtEm1* (gen LEA homólogo del gen *Em* de trigo, de expresión dependiente de ABA) está disminuída mientras que en el mutante *eel* está aumentada. Pero este aumento está relacionado con la proteína ABI5 funcional, porque no se obtiene en el doble mutante. La expresión de uno de los factores no está alterada en el mutante del otro factor indicando que actúan en el mismo nivel en la regulación de la expresión de *AtEm1*, aunque EEL no es capaz de transactivar a *AtEm1*. En ensayos *in vitro* las dos proteínas se unen a las mismas cajas del promotor, como homodímeros y heterodímeros. Estos datos sugieren que en la semilla EEL y ABI5 compiten por los mismos elementos *cis* en el promotor de *AtEm1*. En el mutante *eel*, la proteína EEL está ausente y ABI5 puede activar la expresión de *AtEm1* al máximo nivel. En las semillas salvajes el heterodímero EEL-ABI5 y el homodímero EEL compiten por la unión al promotor de *AtEm1* con el homodímero ABI5, evitando la óptima activación del gen por este dímero. Esta competición entre ABI5 y EEL puede ser un mecanismo adoptado por las plantas para tener un control más preciso de la expresión de los genes LEA en el desarrollo de la semilla.

El hecho de que EmBP-2 y ZmBZ pertenezcan a la misma subfamilia y tengan elementos bZIP muy similares, que se unan a los mismo elementos ABRE y se encuentren en el embrión simultáneamente abre la posibilidad de que estas dos proteínas actúen como heterodímeros en el control de la expresión génica. Las diferencias en su expresión durante la germinación, en la acumulación de las proteínas en el embrión joven y en tejido vegetativo, así como la diferente modulación de la interacción con el DNA por fosforilación indica que diferentes señales de transducción puede activar a estas proteínas. La heterodimerización constituiría un punto de conexión a nivel de regulación de la expresión génica entre diferentes vías de transducción en respuesta a diferentes señales.

Las proteínas EmBP-2 y ZmBZ interactúan en ensayos *in vitro* de *pull-down*, probablemente a través de sus elementos bZIP (figura 54).

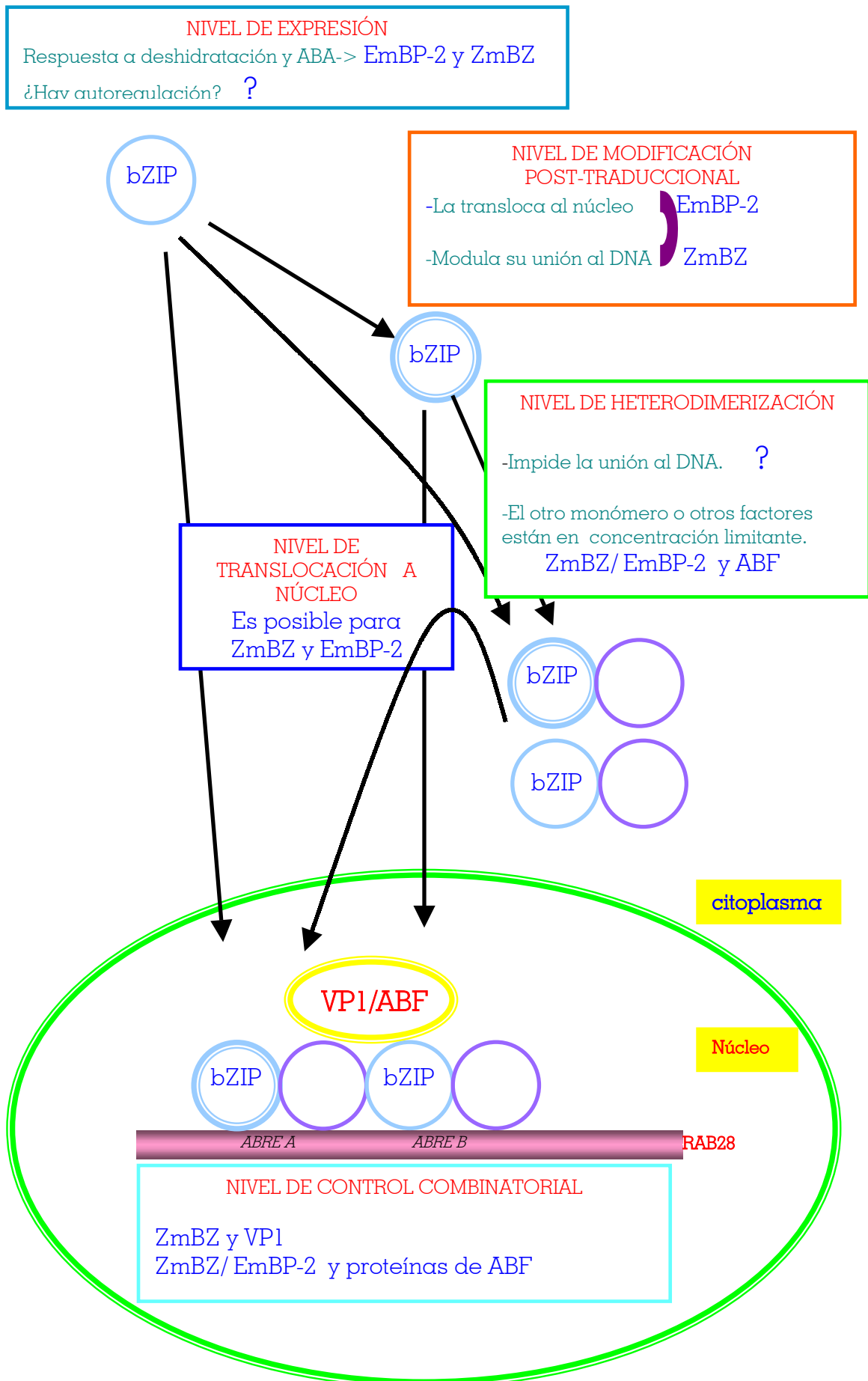
Era necesario determinar si esta interacción representaba la formación de un heterodímero, y si éste era capaz de interactuar con el DNA de una manera específica. Se han realizado ensayos

de tipo EMSA con las dos proteínas recombinantes juntas. La movilidad electroforética de las dos proteínas como homodímeros es prácticamente idéntica, de manera que no es posible diferenciar los homodímeros de los heterodímeros por esta característica. Se han diseñado experimentos de competición para detectar la interacción del heterodímero con el ABRE A, buscando una interacción diferente de la interacción obtenida con los homodímeros (figura 55). Una de nuestras hipótesis relacionaba la secuencia de los elementos bZIP de ZmBZ y EmBP-2 con una diferente especificidad de interacción con las secuencias de DNA. El heterodímero presenta una competición con la sonda ABRE A sin marcar radiactivamente más lenta que los homodímeros. Esto indica que ZmBZ y EmBP-2 forman un heterodímero capaz de unirse al ABRE A, y que esta interacción es diferente de la interacción de los homodímeros. Esta diferencia probablemente es debida a las pequeñas diferencias en la secuencia de los elementos bZIP de estas proteínas. Ensayos de *supershift* con los dos anticuerpos y con los homodímeros y el heterodímero parecen indicar que la conformación de estos dímeros puede ser diferente (resultado no mostrado). Ensayos preliminares nos indican que la especificidad de interacción del heterodímero respecto a los homodímeros es diferente, ya que éste se une con más afinidad al ABRE B (resultado no mostrado).

La heterodimerización entre ZmBZ y EmBP-2 no parece ser un mecanismo de control de la capacidad transactivadora de estos factores en la regulación de *rab28 in vivo* (figura 34). Es posible que EmBP-2 y ZmBZ pertenezcan a diferentes *enhanceosoma* que median la activación de *rab28* en el embrión. El patrón de expresión de EmBP-2 es diferente de ZmBZ, porque se induce en tejido vegetativo por deshidratación y durante la germinación disminuyen sus niveles más lentamente y se induce por ABA a los 2 dag (figura 18). Las dos proteínas podrían participar en la regulación de *rab28* en diferentes situaciones. Si los *enhanceosomas* fuesen independientes, al menos deberíamos ver un efecto aditivo al sobreexpresarlas juntas, a no ser que compartan elementos entre ellos, como una proteína del *enhanceosoma* que se forme en respuesta al desarrollo embrionario. EmBP-2 podría interactuar con mayor afinidad con esta proteína y este *enhanceosoma* podría tener más afinidad por el ABRE A, por eso no vemos casi diferencia entre la sobreexpresión de EmBP-2 sola o con ZmBZ. La sobreexpresión de las dos proteínas juntas en callos BMS tampoco produce un efecto aditivo ni sinérgico en la activación de *rab28* (resultado no mostrado), aunque estas dos proteínas tienen la capacidad de formar un heterodímero en ensayos EMSA *in vitro* (figura 55), y de interactuar con el ABRE A. Aún así, el patrón de expresión en la embriogénesis de estas proteínas y su interacción *in vitro* con el ABRE A es compatible con la idea de que participen juntas en la regulación de otros genes durante la embriogénesis.

En el siguiente esquema se intenta reunir todos los datos obtenidos sobre los mecanismos que modulan la actividad de los factores EmBP-2 y ZmBZ en el control de la actividad del gen *rab28*.

NIVELES DE REGULACIÓN DE LAS PROTEÍNAS bZIP



4.8. PERSPECTIVAS FUTURAS

Hemos estudiado el patrón de expresión de los factores EmBP-2 y ZmBZ a nivel de órganos enteros, y sería muy interesante continuar este estudio mediante el uso de técnicas de hibridación *in situ* y de inmunocitoquímica en diferentes tejidos, embrionarios y vegetativos, y en diferentes situaciones de estrés hídrico, para conocer si hay una expresión de estos factores específica de tejido o de determinados tipos celulares. Para conocer mejor los mecanismos que regulan la transcripción de estos factores se podrían aislar sus promotores. Esto nos permitiría conocer qué elementos cis regulan su expresión y aislar los factores de transcripción que participen en su regulación mediante estudios de Un-Híbrido en levadura.

Los estudios de regulación de la transcripción de *rab28* en ensayos de transformación transitoria por las bZIPs aisladas indican que las vías de transducción inducidas por el ABA son muy importantes para su capacidad transactivadora. Sería interesante estudiar qué mecanismos están involucrados. Para conocer el efecto transactivador de la proteína EmBP-2 es necesario el aislamiento del clon entero y volver a realizar estos ensayos con él. Podemos obtener más información de la función *in vivo* de estos factores mediante la obtención de plantas transgénicas de *Arabidopsis* o de tabaco que sobreexpresen estos factores, y estudiar los fenotipos obtenidos. Los estudios de localización subcelular de las proteínas de fusión a GFP podrían optimizar utilizando estas plantas transgénicas, para aumentar el número de células transformadas.

La importancia del control combinatorial en la modulación de la actividad de EmBP-2 y ZmBZ se encuentra en las primeras etapas de estudio. Se puede analizar la interacción entre los dos factores mediante ensayos de inmunoprecipitación *in vivo* o de ensayos tipo dos-híbridos en levadura. Estos ensayos en levadura también pueden ser útiles para el aislamiento de nuevas proteínas que interaccionen con los factores bZIP aislados, y diseccionar de esta manera la vía de transducción de señal en la cual participan así como conocer otras proteínas con las que puedan heterodimerizar, de la familia bZIP o de otras familias.

Con todos estos resultados será posible evaluar la posibilidad de generar plantas transgénicas de maíz que sobreexpresen estos factores, para estudiar a nivel de planta entera su efecto en la inducción de tolerancia a la deshidratación.

5.1 Material vegetal y tratamientos

Se han utilizado embriones de diferentes edades y plántulas de la línea homocigótica W64A de maíz. Para obtener las plántulas las semillas se han esterilizado en etanol durante 5min, seguidos por 10 min en hipoclorito de sodio al 5% y lavadas con agua destilada. Las plantas de maíz han sido crecidas sobre papel Whatman y sobre una capa de vermiculita saturada con agua, durante 5 días con un fotoperiodo de 16 horas de luz a 28°C y 8 horas de oscuridad a 26°C. Todos los tratamientos se aplicaron durante 4 horas sino se indica otro tiempo en casos concretos. Para la deshidratación se expusieron las plantas sobre un papel seco tipo Whatman a 26°C. Para los tratamientos de estrés salino se introdujeron las plantas en un medio líquido conteniendo 250mM de NaCl o 15 mM LiCl. El estrés osmótico se realizó de igual manera con un medio líquido con 400 mM manitol. El tratamiento con ABA se realizó introduciendo las plantas en un medio líquido conteniendo 100 μ M de ABA. Los tratamientos de 37°C y 4°C se realizaron sometiendo a las plantas introducidas en agua a estas temperaturas.

5.2. Cepas bacterianas

Tabla II. Cepas bacterianas usadas en este trabajo

Cepa	Utilización	Referencia o fuente
<i>E. coli</i> K-12 DH5 α	Amplificación de DNA plasmídico	Hannah, 1983
<i>E. coli</i> XL1-Blue MRF	Amplificación de fagos/excisión	Stratagene
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	Sobreexpresión de proteínas	Stratagene

5.3. Vectores, oligonucleótidos y contrucciones

Tabla III. Plásmidos usados en este trabajo

Plásmido	Utilización	Referencia o fuente
pGEM-T-easy	Clonage de productos de PCR	Promega
pET-28 α ,c	Sobreexpresión de proteínas	Novagen
pPK100	Transformación transitoria	Derivado de pEGFP1, Clontech

Tabla IV. Oligonucleótidos usados en este trabajo

Utilidad	Oligonucleótido
EMSA	
ABRE A (Busk and Pagès 1997)	5'-tgg aag ctt cgc gcc acg tgg gca tga gat ct-3' 5'-tgg aga tct cat gcc cac gtg gcg cga agc tt-3'
ABRE A- (Busk and Pagès 1997)	5'-tgg aag ctt cgc gcc tgc agg gca tga gat ct-3' 5'-tgg aga tct cat gcc ctg cag gcg cga agc tt-3'
ABRE B (Busk and Pagès 1997)	5'-tgg aag ctt gtc tcc acg tct ctc gca gat ct-3' 5'-tgg aga tct gcg aga gac gtg gag aca agc tt-3'
ABRE B- (Busk and Pagès 1997)	5'-tgg aag ctt gtc tga att cct ctc gca gat ct-3' 5'-tgg aga tct gcg aga gga att cag aca agc tt-3'
ABRE 1 Cl16	5'-tgg aac cga gac gtg gcg ggc cgg-3'
Cl17	5'-tgg ccg gcc cgc cac gtc tcg gtt-3'
ABRE 2 Cl18	5'-tgg act gca cac gtc ccg ccg gcg-3'
Cl19	5'-tgg cgc cgg cgg gac tgt tgc agt-3'
ABRE3ab Cl20	5'-tgg gcg tac gtg tac gtg ctg ttc-3'
Cl21	5'-tgg gaa cag cac gta cac gta cgc-3'
ABRE 4 Cl22	5'-tgg cat gcc cac gta cac ccc tgc-3'
Cl23	5'-tgg gca ggg gtg tac gtg ggc atg-3'
G-box	5'-ggg agt tcc aac tta att atc acg tgg act tat aag aca ccg a-3' 5'-ggt cgg ttt ctt ata agt cca cgt gat aat taa gtt gga act c-3'
PCR	
RT-PCR	VL1: 5'-g igi gag agr agg aar car tcm aac-3'
RT-PCR	VL2: 5'-iac ytt ict igc yag ytc ytc-3'
Gene-race ZmBZ	Cl1: 5'-gct ggc aat ctt cct gat tcc c-3'
Gene-race ZmBZ Nested	Cl2: 5'-ggt ttc atc att gtg tct gga atg c-3'
Clonaje construcción pPK100-ZmBZparcial	Cl 3: 5'-ccc atg gaa ttc ggc acg agc- 3'
Clonaje construcción pPK100-EmBP-2, <i>Forward</i>	Cl 4: 5'-gcc atg gtt cgg cac gag gat tc -3'
Clonaje construcción pPK100-EmBP-2, <i>Reverse</i>	Cl 5: 5'-tgg atc cac tca tct cat c- 3'
Clonaje construcción pPK100-ZmBZ, <i>Forward</i>	Cl 6: 5'-acc atg ggt cat gat -3'
Clonaje construcción pPK100-ZmBZ-GFP, <i>Reverse</i>	Cl 7: 5'-gc cat ggt agc ggc cac ggc -3'
Clonaje construcción pPK100-ZmBZ, <i>Reverse</i>	Cl 8: 5'-c gcg gcc gct agc ggc cac g-3'
RT-PCR ZmBZ	Cl 9: 5'-cag gct aac gga aag ctc cc-3'
RT-PCR ZmBZ	Cl 10: 5'-cac ggc act gat cag cta gc-3'
PCR ZmBZ sobre DNA genómico	Cl 11: 5'-ata tta tgg ccc agg ggt ct-3'
PCR ZmBZ sobre DNA genómico	Cl 12: tct gat cta ccg tcc gct agt-3'
Gene-race EmBP-2	Cl 24: cca tca tcg aca aag tgc tgc ca-3'

Gene-race EmBP-2	Cl 25: 5'-gga atg cgt cgc agc att tag t-3'
RT-PCR EmBP-2	Cl 26: 5'-cac gag gat tet cca gtt aaa gc-3'
Gene-race EmBP-2	Cl 27: 5'-att tag ttc acc ctg tcc aga cgt ctc t-3'
Gene-race EmBP-2, RT-PCR EmBP-2	Cl 28: 5'-ctt cgt tgt gtc aat ctg gat gc-3'
Gene-race EmBP-2	Cl 30: 5'-ggc tca cct tgt aca ttg gcg ccg ctg gac-3'
Gene-race EmBP-2	Cl 32: 5'-gcc ctc gct ccc acc ggc act tcc gg-3'

Las bases degeneradas de VL1 y VL2 indican: i: G o C; y: T o C; r: A o G; m: C o A.

Tabla V. Construcciones usadas en este trabajo

	Descripción de la construcción	Información
1	pET28c-EmBP-2	Cortado del vector aislamiento de la genoteca embrión seco, dianas BamHI-XhoI
2	pET28α-ZmBZ	Cortado del vector aislamiento de la genoteca embrión seco, dianas Not I-XhoI
3	pPK100-ZmBZ	Inserto por PCR con oligos Cl 6 y Cl 8, dianas NcoI-NotI
4	pPK100-ZmBZ-GFP	Inserto por PCR con oligos Cl6 y Cl 7, dianas NcoI-NcoI
5	pPK100-ZmBZparcial	Inserto por PCR con oligos Cl3 y Cl 8, dianas NcoI-NotI
6	pPK100-ZmBZparcial-GFP	Inserto por PCR con oligos Cl3 y Cl 7, dianas NcoI-NcoI
7	pPK100-EmBP-2	Inserto por PCR con oligos Cl4 y Cl 5, dianas NcoI-BamHI

5.4. Digestión de DNA con enzimas de restricción, reacción de desfosforilación y reacción de ligación

5.4.1. Digestión

La relación DNA/enzima utilizada en las reacciones de digestión ha sido para cada µg de DNA una unidad de enzima, en el apropiado tampón de digestión, incubando la reacción posteriormente a 37°C durante 2 horas. Para las digestiones de DNA genómico se han usado 0,5 unidades de enzima para cada µg de DNA, incubando la reacción con el tampón adecuado a 37°C durante 1 hora. Transcurrido este tiempo se volvía a añadir la misma cantidad de enzima. La reacción de digestión se comprobaba mediante electroforesis de DNA hasta que el DNA se digería totalmente (ver apartado 5.7.1). En todos los casos la concentración de glicerol no sobrepasó el 10% del volumen de reacción.

5.4.2. Desfosforilación

Cuando el objetivo de la reacción de digestión del DNA era utilizar ese DNA para una reacción de ligación, se desfosforilaba el vector después de la digestión. Para la reacción de desfosforilación se diluía la reacción de digestión hasta 100 μl añadiendo 10 μl del tampón de desfosforilación 10x, 1 μl de fosfatasa alcalina y la cantidad de agua necesaria. La reacción se incubaba a 37°C durante una hora. Posteriormente se desactivaba la fosfatasa poniendo la reacción a 75°C durante 15min.

5.4.3. Ligación

Las reacciones de ligación se han realizado calculando la cantidad de inserto y de vector en ng según la siguiente ecuación (Sambrook et al., 1989):

$$X = \text{Inserto (ng)} = \text{Plasmido (ng)} \times \text{PM del inserto (en kb)} / \text{PM del plásmido (en kb)}$$

Esto nos da una relación de inserto y vector 1 / 1 en masa. Para todas las ligaciones se ha usado una relación 3 a 1 de inserto respecto al vector. Para cada 100 ng de vector se han usado 0,1 unidades de enzima T4 ligasa en un volumen final de reacción de 10 μl con el tampón apropiado. La incubación se ha realizado a 16 °C toda la noche. Cuando la reacción no funcionaba con estas condiciones se ha variado la relación inserto/vector, o se ha incubado la reacción en un baño de agua toda la noche en un gradiente de temperatura que iba desde los 15 °C hasta los 25 °C.

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

El método utilizado para la preparación de células de *E. coli* competentes ha sido el del CaCl_2 . Para esto se han seguido estrictamente los pasos descritos en el libro de protocolos Sambrook et al 1989. Las células una vez competentes se mantenían a -80 °C hasta su utilización.

El método utilizado para la transformación de las células competentes ha sido el choque térmico. La alícuota de células se descongelaba en hielo, durante unos 15min. El DNA a transformar se añadía a las células (en ningún caso el volumen de DNA ha excedido el 10% del volumen de células competentes) y se mezclaba utilizando una pipeta. La mezcla DNA-células competentes se incubaba en hielo durante 15 min como mínimo. El choque térmico se ha realizado a 42 °C durante 90 segundos o a 37°C durante 5 min. Después se incubaban las células 2 min en hielo, se añadían 900 μl de LB y se incubaban una hora a 37°C en agitación. Después se centrifugaban las células 2 min a 4000 rpm. Entonces se retiran 900 μl de sobrenadante, se resuspenden las células en el resto del volumen con una pipeta y se plaquean sobre placas de LB/agar con el antibiótico apropiado

para la selección de las colonias transformadas. Cuando ya se ha secado se incuban con las placas invertidas a 37 °C toda la noche.

- ➔ Medio LB: 10 g/l bacto triptonα, 5 g/l de extracto de levadura, 10 g/l NaCl. Ajustar el PH α 7 con NaOH.
- ➔ Placas LB: Medio LB más 15 g/l de agar.

5.6. Extracción y purificación de ácidos nucleicos

5.6.1. Extracción y purificación de DNA plasmídico de *E. coli*

El DNA plasmídico se prepara a partir de un cultivo bacteriano siguiendo el siguiente protocolo:

1. Una colonia bacteriana se inocula en 3 ml de medio LB con el antibiótico apropiado y se deja crecer incubando a 37 °C toda la noche en agitación.
 2. Centrifugar todo el cultivo a 13000 rpm durante 1min a TA.
 3. Resuspender el *pellet* de bacterias en 150 μl de solución I.
 4. Añadir 300 μl de solución II, mezclar con vórtex y dejar 5min a TA.
 5. Añadir 225 μl de solución III y mezclar con vórtex.
 6. Dejar en hielo 15 min como mínimo.
 7. Centrifugar a 13000 rpm durante 10 min a TA.
 8. Separar el sobrenadante y añadir 675 μl de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25/24/1).
 9. Mezclar con vórtex y centrifugar a 13000 rpm 5 min a TA.
 10. A la fase acuosa añadir 675 μl de cloroformo, mezclar con vórtex y centrifugar a 13000 rpm 5 min a TA.
 11. Añadir al sobrenadante 675 μl de isopropanol, mezclar con vórtex y dejar 3 min a TA.
 12. Centrifugar a 13000 rpm 15 min a TA.
 13. Lavar el *pellet* con 1 ml de etanol 70%
 14. Centrifugar a 13000 rpm 5 min a 4 °C
 15. Dejar secar el pellet y resuspender en agua mq con Rnasa 100μg/ml.
- ➔ Solución I: 50mM glucosa, 25mM Tris-HCl pH8, 10 mM EDTA
 - ➔ Solución II: 0,2 N NaOH, 1% SDS
 - ➔ Solución III: 3M acetato de potasio pH 4,8

5.6.2. Extracción de DNA genómico de maíz

El DNA genómico se extrae de los tejidos vegetales utilizando el método descrito por Dellaporta et al. 1983. El método se puede adaptar para preparaciones a pequeña escala (en tubos eppendorf) tal y como sigue:

1. Se trituran 5 g de tejido vegetal en un mortero utilizando N₂ líquido.
2. Se añaden 20 ml de tampón de extracción y se homogeniza.
3. Transferir la muestra a un tubo de centrifuga, añadir un volumen de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25/24/1) y mezclar. No utilizar el vórtex.
4. Centrifugar a 13000 rpm durante 15 min a TA.
5. Transferir el sobrenadante y añadir acetato de amonio hasta una concentración final de 2,7 M.
6. Añadir 0,6 volúmenes de isopropanol, mezclar y dejar la muestra 30 min a TA.
7. Centrifugar a 13000 rpm durante 15 min a TA.
8. Lavar el pellet con 2 ml de etanol 70%
9. Centrifugar a 13000 rpm durante 5 min a TA.
10. Resuspender en 1ml de agua con Rnasa (100 µg/ml).
11. Dejar la muestra 30 min a TA.
12. Añadir 1ml de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25/24/1) y mezclar.
13. Centrifugar a 13000 rpm durante 15 min a TA.
14. Añadir al sobrenadante 1 ml de cloroformo y mezclar.
15. Centrifugar a 13000 rpm durante 15 min.
16. Al sobrenadante añadir 2 ml de etanol 100%, 100 µl de acetato de sodio 3M pH 5,2 y mezclar.
17. Centrifugar a 13000 rpm durante 15 min a TA.
18. Lavar el pellet con 1 ml de etanol 70%
19. Centrifugar a 13000 rpm durante 10 min a TA.
20. Resuspender en 400µl de agua mq.

➔ Tampón de extracción: 7M urea, 0,3 M NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 8, 20mM EDTA, 1% sarcosil.

5.6.3. Extracción y purificación de RNA total de maíz

El RNA total se ha obtenido siguiendo el siguiente protocolo:

1. Preparar mortero y mano de mortero libres de RNasas mediante un tratamiento de 4 horas a 200 °C.
2. Triturar en el mortero 10g de material vegetal con N₂ líquido hasta obtener un polvo fino.

3. Añadir 12 ml de tampón Z6 con 3 μ l de β -mercaptoetanol al polvo y dejar descongelar a TA.
 4. Alicuotar la muestra en 2 tubos corex libres de RNasas y añadir un volumen igual de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25/24/1) a cada uno.
 5. Mezclar con vórtex, y centrifugar a 8000 rpm durante 20 min a 4°C
 6. Separar la fase superior y ponerla en otros 2 tubos corex libres de RNasas. Añadir un volumen igual de cloroformo a cada corex y mezclar con vórtex.
 7. Centrifugar a 8000 rpm durante 20 min a 4 °C.
 8. Separar la fase superior y ponerla en otros 2 tubos corex libres de RNasas. Añadir ácido acético 1M, el 10% del volumen, y 2,5 volúmenes de etanol 100%. Mezclar con vórtex.
 9. Dejar los tubos a -20°C al menos una hora.
 10. Centrifugar a 8000 rpm durante 30 min a 4 °C.
 11. Lavar cada *pellet* con 6 ml de acetato de sodio 3M pH 5,2.
 12. Centrifugar a 8000 rpm durante 20 min a 4°C.
 13. Lavar cada *pellet* con 5ml de etanol 70%
 14. Centrifugar a 8000 rpm durante 10 min a 4°C.
 15. Dejar secar los *pellets* durante 20 min a TA, resuspenderlos en 200 μ l de agua DEPC y guardar a -70°C.
 16. Realizar un tratamiento DNasa: La reacción compuesta por 88 μ l de la muestra de RNA, 10 μ l de tampón DNasa 10x y 2 μ l de DNasa/RNasa *free* se incubaba 30 min a 37 °C.
 17. Repetir los pasos 4 a 15, omitiendo el 11, adecuando los volúmenes de todas las soluciones. Resuspender en 200 μ l de agua DEPC y guardar a -70°C.
-
- ➔ Tampón Z6: 191 g de guanidina-HCl, 10ml de EDTA 0,5M y agua hasta 250 ml.
 - ➔ Acetato de sodio 3M pH 5,2: 24,6 g de acetato de sodio, 100 ml de agua DEPC. Autoclave.
 - ➔ Ácido acético 1M: 5,7 ml de ácido acético glacial, 94,3 ml agua DEPC.
 - ➔ Agua DEPC: 500 μ l de DEPC en 5 ml de etanol 100%, 494,5 ml de agua. Autoclavar 2 veces.
 - ➔ Tampón DNasa 10x: 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 10mM MgCl₂, 1 mM DTT, 40 unidades Rnasina.

5.6.4. Purificación de bandas de DNA de geles de agarosa

La purificación de bandas de DNA de geles de agarosa se ha realizado usando el kit de purificación de la casa Amersham GFX™ Gel band purification Kit, siguiendo estrictamente el protocolo que incluye este kit.

5.7. Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa

5.7.1. Electroforesis de DNA

El porcentaje de agarosa utilizado en el gel depende de la longitud de las bandas de DNA que se pretenden visualizar. Los geles de un 1% de agarosa se utilizan normalmente para visualizar bandas de DNA que tienen un tamaño comprendido entre 3000pb y 800pb. Cuando se pretende visualizar bandas de mayor tamaño se utilizan geles de menor porcentaje, del 0,8% de agarosa. Si las bandas a visualizar son menores de 800pb, hay que recurrir a porcentajes más altos, del 1,5% o mayores, según cada caso. Para preparar un gel del 1% de agarosa se disuelven en el microondas 1 g de agarosa en 100 ml de tampón TAE 1x. La solución se deja enfriar hasta 55°C y se añade entonces EtBr hasta una concentración final de 0,5 µl/ml. Las muestras de DNA se mezclan con el volumen de tampón de carga 10x necesario para obtener una concentración final de tampón de 1x. Se corren las muestras en tampón TAE1x con un voltaje entre 40 y 90 V el tiempo necesario. El DNA migra hacia el electrodo positivo.

- ➔ 10x tampón de carga: 0,25% azul de bromofenol, 0,25% de cianol de xileno, 50% de glicerol en 1x TE.
- ➔ 50x tampón TAE: 2M Tris-acetato pH8,1, 0,1M EDTA.

5.7.2. Electroforesis de RNA

Se ha realizado en geles desnaturizantes de agarosa 1%. El gel se prepara mezclando 10 ml del tampón MEN 10x con 18 ml de formaldehído 37%, equilibrado previamente a 60 °C, con una segunda solución preparada disolviendo en el microondas 1 g de agarosa en 72 ml de H₂O y dejándola enfriar hasta 60 °C. Cada muestra de RNA se ha preparado mezclando extracto de RNA con H₂O csp 20µl, con 40 µl de tampón de carga. La mezcla se calienta a 65 °C 10min. La electroforesis se realiza en el tampón 1x MEN a 50-90 V durante el tiempo necesario.

- ➔ Tampón de carga 1x: Para cada muestra: 6µl MEN10x, 9 µl formaldehído, 25 µl formamida, 1 µl bromuro de etidio.
- ➔ Tampón MEN 10x: 200 mM MOPS pH7, 50 mM acetato de sodio, 10 mM EDTA.

5.8. Transferencia de ácidos nucleicos: Southern blot

Después de la electroforesis en geles de agarosa, la transferencia de los ácidos nucleicos a una membrana de nylon (Hybond-N, Amersham) se realiza siguiendo el siguiente protocolo:

1. Sumergir el gel de agarosa en una solución de HCl 0,25N durante 20 min con agitación suave.
2. Lavar con agua y sumergir el gel en una solución desnaturalizante durante 30 min con agitación suave.
3. Sumergir el gel en una solución neutralizante durante 15 min con agitación suave.
4. Poner el gel sobre un papel tipo Whatman, siguiendo las instrucciones gráficas del protocolo que acompaña a las membranas Hybond-N.
5. Alrededor del gel se colocan 4 piezas de parafilm para que la transferencia se realice únicamente a través del gel.
6. Colocar una membrana del tamaño del gel sobre éste. Eliminar el aire que haya quedado atrapado entre la membrana y el gel.
7. Sobre la membrana colocar 3 papeles tipo Whatman, del tamaño del gel, previamente equilibrados en solución 20x SSC.
8. Sobre los papeles Whatman colocar más papel absorbente de manera que forme una columna.
9. Colocar sobre la columna de papel un cristal y un peso no mayor de 1 Kg, para hacer presión y tener un buen contacto.
10. Dejar transferir toda la noche.
11. Después de la transferencia tratar la membrana 2 h a 80 °C.

➔ Solución desnaturalizante: 0,5N NaOH, 1,5M NaCl.

➔ Solución neutralizante: 0,5M Tris-HCl pH 7,4, 1,5M NaCl.

➔ 20x tampón SSC: 300 mM citrato de sodio pH 7, 300 mM NaCl.

5.9. Hibridación de ácidos nucleicos

5.9.1. Marcage radiactivo de sondas de DNA para Southern blot

El marcaje se ha realizado utilizando el Kit *Random Primed DNA Labelling* de Roche. El protocolo seguido es el siguiente:

1. Diluir 25 ng de DNA en 12 µl de agua.
2. Desnaturalizar el DNA durante 10 min a 100°C.
3. Poner en hielo y añadir 1 µl dATP, 1µl dTTP y 1 µl dGTP, todos 0,5 mM.

4. Añadir 2 μl de solución *reaction mixture*, 2 μl de $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP y 1 μl de enzima Klenow 2 unidades/ μl .
5. Incubar durante 30min a 37°C.
6. Añadir 80 μl de TE y purificar según el siguiente protocolo.

5.9.2. Purificación de la sonda

La purificación se ha realizado utilizando el Kit ProbeQuant TM G-50 micro columns de Amersham.

El protocolo seguido es el siguiente:

1. Centrifugar una columna de purificación 1 min a 3000 rpm a TA.
2. Colocar la centrífuga sobre un eppendorf nuevo y añadir la sonda a la columna. Centrifugar durante 2 min a 3000rpm a TA.
3. La sonda purificada es directamente el eluyente de la columna.
4. Usar en el momento o congelar a -20°C.

5.9.3. Hibridación de Southern blot

La hibridación se ha realizado siguiendo el protocolo que acompaña a las membranas de nylon (Hybond-N, Amersham).

1. Prehibridar la membrana en solución de hibridación a 65 °C en agitación durante mínimo 2 h.
2. Poner solución de hibridación nueva y añadir la sonda, previamente desnaturalizada 10min a 100°C.
3. Dejar la hibridación toda la noche a 65°C en agitación.
4. Retirar la solución de hibridación y añadir solución de lavado 1. Lavar a 65°C con agitación durante 10 min. Repetir los lavados comprobando con el Geiger las cuentas de la membrana, hasta que en las zonas sin DNA transferido haya baja radiactividad. Si se pretende conseguir unas condiciones de alta astringencia, lavar con solución de lavado 2, siguiendo los pasos descritos para la solución 1. La hibridación y los lavados se han realizado también a 55°C cuando se necesitaban condiciones de menor astringencia.
5. Sellar la membrana dentro de una bolsa de plástico y exponer a una película de autoradiografía dentro de un *cassette* a -70°C.
6. Dejar exponer el tiempo necesario según las cuentas de la membrana antes de revelar la película.

- ➔ Solución de prehibridación: 5xSSC, 5x solución Denhardt, 0,5 % (p/v) SDS, 10 mg/ml DNA esperma de salmón.
- ➔ Solución de hibridación: Igual que la de prehibridación pero con la sonda radiactiva.
- ➔ Solución de lavado 1: 1x SSC, 0,5 % (p/v) SDS.
- ➔ Solución de lavado 2: 0,1x SSC, 0,5 % (p/v) SDS.
- ➔ Solución Denhardt's 100x: Para 100 ml: Ficoll 2g, polivinilpirrolidona 2g, BSA 2g. Enrasar con H₂O.
- ➔ SSC 20x: NaCl 3M, citrato sódico 0,3 M.

5.10. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

El protocolo seguido en la reacción de PCR se encuentra en Sambrook et al 1989. Esta reacción se ha utilizado para el aislamiento de los factores utilizando como DNA molde el cDNA utilizado para la elaboración de dos genotecas de maíz: Una de embrión seco y otra de hojas de plántulas de 5dag deshidratadas durante 3 h. Los oligonucleótidos utilizados fueron VL1 y VL2. También la hemos utilizado para los ensayos de RT-PCR (apartado 5.13), RACE (apartado 5.12) y para la elaboración de algunas construcciones (Tabla V). Las condiciones de la reacción de PCR fueron las siguientes: Tampón PCR 1x, MgCl₂ 2 mM, oligonucleótido 1: 0,5μM, oligonucleótido 2: 0,5 μM, mezcla dNTP 0,2 mM, Taq polimerasa 2,5 un. Cuando se utilizaban DNA polimerasas comerciales, se utilizaba el tampón de la misma casa comercial.

- ➔ Tampón de PCR: Tris.HCl 200 mM pH8,4 , KCl 500 mM

5.11. Cribado de las genotecas de embrión seco y de hoja estresada de maíz

5.11.1. Genoteca de embrión seco

La genoteca se construyó en el vector λZAP II y se utilizó la bacteria XL1-Blue con MRF', un episoma que posibilita que sean infectadas, siguiendo los pasos indicados por la casa Clontech. Los plásmidos positivos se recuperan del vector por escisión con un fago denominado helper, de la casa Clontech. La escisión nos da los insertos clonados en el vector BS-SK.

La hibridación se realizó como se describe en el apartado 5.9. Las soluciones de lavado son también las indicadas, la solución 1 y la solución 2. Las sondas fueron las secuencias aisladas del PCR descrito en los resultados (figura 1).

5.11.2. Genoteca de hoja estresada

La genoteca se construyó utilizando el kit de Stratagene HybriZAP, con el vector HybriZAP. Se siguieron las instrucciones que proporcionan los fabricantes con algunas pequeñas modificaciones (Tesis doctoral de Dimosthenis Kizis 2001). Los plásmidos positivos se recuperan en el vector pADGAL₄₂₄.

La hibridación se realizó igual que en el otro cribado. Las sondas fueron las secuencias parciales aisladas de la genoteca de embrión seco.

5.12. RACE

Para la realización de estas reacciones se siguió estrictamente las instrucciones que indican los fabricantes. Se ha realizado una reacción utilizando los oligos Cl1 y Cl2, con la que se consiguió el extremo 5' de ZmBZ de embrión. También 4 reacciones más utilizando los oligos Cl 27, Cl25, Cl30 y Cl 31 para conseguir el extremo 5' de EmBP-2. El material de partida de la reacción es RNA de embrión seco en todas, excepto en la última de EmBP-2 (con el oligo Cl31) que se realizó con RNA de embriones de 40 dap. Se ha utilizado 2 µg de RNA total. En la reacción de EmBP-2 con el oligo Cl30 el material de partida fueron 200 ng de mRNA de embrión seco (aislado utilizando el kit Magnesphere™ magnetic separation products de Promega). En todas las reacciones se hizo la reacción *nested* PCR, con dos oligos internos, dentro de la primera secuencia amplificada con dos oligos externos (ver instrucciones de fabricantes).

5.13. RT-PCR

Mediante esta reacción se ha determinado el patrón de transcripción de los factores, utilizando 30 ciclos de PCR. El protocolo seguido es el siguiente:

1. Extracción de RNA de los tejidos a estudiar, siguiendo los pasos descritos en 5.6.3.
2. Cuantificación por espectrofotómetro y en gel de agarosa de las muestras.
3. Reacción Dnasa mezclando: 25 µg de RNA, 5 µl de tampón Dnasa, 1,5 µl Dnasa, H₂O csp 50 µl. Dejar 10 min a 37 °C.
4. Purificar y precipitar los RNAs, siguiendo los pasos 4-10, descritos en el apartado 5.6.3.
5. Disolver el precipitado de RNA en 25 µl de H₂O DEPC
6. Preparar la retrotranscripción: mezclar: 5 µl de RNA sin DNA, 5,5 µl H₂O, 0,5 Rnasina^R, 100 pmol oligo dT. Calentar 5 min a 65°C. Después dejar enfriar 2 min en hielo.
7. Añadir a cada muestra: Tampón *first strand* 5x: 4 µl; 0,1 M DTT: 2 µl; dNTP mix 10 mM: 1 µl; Rnasina 0,5 µl; 200 unidades de M-MLV-RT de Promega.

8. Reacción a 42 °C durante 1h.
 9. Desactivar la reacción 15 min a 75 °C.
 10. Añadir 80 µl de H₂O y congelar a -80 °C. Utilizar en cada reacción de PCR 1-2 µl (la cantidad de molde es necesario optimizarlo cada reacción de PCR). La reacción de PCR se realiza como se indica en el apartado 5.10.
 11. Después de la PCR se hace una electroforesis siguiendo las instrucciones del apartado 5.7.1. con toda el volumen de la reacción de PCR.
-
- ➔ Tampón Dnasa: 200 mM HEPES pH 7,5, 5 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂. Autoclavar.
 - ➔ Tampón *first strand* 5x: 250 mM Tris.HCl pH 8,3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 50 mM DTT.
 - ➔ Rnasina^R: Promega
 - ➔ Oligo poliT: oligo (dT)₅₀

5.14. Extracción, purificación y análisis de las proteínas

5.14.1. Extracción de proteínas

Extracción total de tejido

Los extractos proteicos se obtuvieron mediante el siguiente protocolo:

1. Homogenización del tejido en un mortero con nitrógeno líquido.
 2. El polvo obtenido se resuspende con tampón de extracción y se centrifuga 5 min a 13000 rpm y a 4°C para eliminar los restos celulares.
 3. Las proteínas del sobrenadante se precipitan con TCA 10% durante 30 min-1h en hielo.
 4. Centrifugar 20 min a 13000 rpm y a 4°C.
 5. El precipitado de proteínas se lava dos veces con metanol/0,1 M acetato de amonio, y se dejan secar
 6. Resuspender en tampón de carga. A veces es necesario tratar con ultrasonidos 10 min en este punto.
-
- ➔ Tampón de extracción: 100 mM Tris.HCl, 50 mM NaCl, 1mM PMSF
 - ➔ Tampón de carga 2x: 120 mM Tris.HCl pH 6,8, 20% glicerol, 4% SDS, 0,008% azul de bromofenol y 10% β-mercaptoetanol.

Inhibidores de proteasas

La proteína ZmBZ parcial recombinante se degrada muy fácilmente, y se utilizaron los siguientes inhibidores de proteasas en su purificación (apartado 5.14.2.):

Inhibidor	Concentración stock	Concentración de trabajo
Aprotinina	10 mg/ml	10 µg/ml
Leupeptina	21 mM	10-100 µM
Pepstatina	1,46 mM	1 µM
E-64	1 mM	1-10 µM

Extracción de proteínas nucleares

La extracción de proteínas nucleares se ha realizado utilizando un protocolo modificado de Abmayr and Workman (1992), adaptado para tejidos embrionarios de maíz por Busk and Pagès (1997). El procedimiento de extracción se describe para un embrión pero se puede escalar a cantidades mayores de tejido. El protocolo es el siguiente:

Todos los pasos se han realizado a 4°C con los equipos y materiales enfriados previamente.

1. Triturar un embrión (aproximadamente 100 mg) en un mortero utilizando N₂ líquido.
2. Transferir a un tubo eppendorf y añadir 1 ml de tampón A.
3. Colocar un tubo eppendorf con el extremo inferior cortado dentro de otro tubo eppendorf con una membrana miracloth entre ellos.
4. Transferir la muestra en el tubo superior y centrifugar a 3000 g durante 15 min
5. Resuspender el precipitado nuclear en 400 µl de tampón A.
6. Centrifugar a 2000 g durante 10 min
7. Resuspender el precipitado en 6 µl de tampón de baja concentración de sal.
8. Añadir 1,5 volúmenes de tampón de alta concentración de sal
9. Mezclar con vórtex durante 30 min
10. Centrifugar a 14000 g durante 15 min
11. Transferir el sobrenadante en una tapa de eppendorf cortada previamente
12. Colocar encima una membrana de diálisis y cerrar la tapa del eppendorf
13. Dializar durante 45 min contra 100 ml de tampón de diálisis
14. Transferir el extracto a un tubo eppendorf y centrifugar a 14000g durante 20 min
15. Transferir el sobrenadante a un tubo eppendorf nuevo y congelar en N₂ líquido
16. Guardar a -80 °C

➔ Tampón A: 10 mM Hepes pH 7,8, 10 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 5mM EDTA, 1 mM DTT, 0,2 mM PMSF, 250 mM sacarosa, 0,5% (v/v) tritón X-100.

➔ Tampón de baja concentración de sal: 20 mM Hepes pH 7,8, 20 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM EDTA, 0,5 mM DTT, 0,2 mM PMSF, 25 % glicerol.

➔ Tampón de alta concentración de sal: Igual que el de baja pero con 1,6 M KCl.

- ➔ Tampón de diálisis: 20 mM Hepes pH 7,8, 100 mM KCl, 0,2 mM EDTA, 0,5 mM DTT, 0,2 mM PMSF, 10 % glicerol.
- ➔ DTT y PMSF se añaden justo antes de su uso de unos *stocks* de 1M DTT y 200 mM PMSF en etanol.

5.14.2. Sobreexpresión y purificación de las proteínas recombinantes

La sobreexpresión de las proteínas recombinantes se ha realizado utilizando el sistema pET (Novagen). Las construcciones 1 y 2 (Tabla V) se han utilizado para la sobreexpresión de las proteínas EmBP-2 y ZmBZ respectivamente. La sobreexpresión y purificación de las proteínas se ha realizado según el siguiente protocolo:

Sobreexpresión de las proteínas recombinantes (pequeña escala)

1. Transformar células competentes BL21 de E.coli con las construcciones apropiadas y el vector solo como control y seleccionar en placas de LB/kanamicina.
2. Inocular una colonia en 5 ml de LB/kanamicina e incubar ON a 37 °C en agitación. Este es el precultivo.
3. Transferir 50 µl del cultivo en 5 ml de LB e incubar durante 3 h a 37 °C en agitación. Guardar el cultivo inicial a 4 °C.
4. Sacar una muestra de 200 µl y guardar a 4 °C.
5. Añadir 1 mM de IPTG y dejar a 37 °C en agitación otras 3h.
6. Sacar muestras de 200 µl cada hora durante la incubación a 37 °C y guardar a 4 °C.
7. Centrifugar las muestras de 200 µl a 13000rpm durante 5 min a TA.
8. Para cada precipitado de cada muestra añadir 50 µl de tampón de muestras 1x
9. Hervir a 100 °C durante 6 min.
10. Centrifugar a 13000 rpm durante 5 min a TA.
11. Utilizar 10-20 µl del sobrenadante para cargar en un gel de poliacrilamida
12. Correr las muestras como se describe en el apartado 5.14.4.
13. Realizar una tinción de azul de coomassie como se describe en el apartado 5.14.5.

Sobreexpresión de las proteínas recombinantes (gran escala)

1. Hacer una dilución 1/100 del cultivo inicial en medio LB/kanamicina.
2. Incubar durante 3 h a 37 °C, en agitación.
3. Añadir 1 mM de IPTG e incubar otras 3 horas.
4. Centrifugar a 9000 rpm durante 10 min a 4°C.
5. Lavar el precipitado con 40 ml de TE pH 7,5.
6. Centrifugar a 9000 rpm durante 5 min a 4 °C. Guardar el precipitado a -20°C.

Purificación de las proteínas recombinantes

La purificación se realiza capturando a las proteínas en una resina saturada con NiSO₄. La proteína de interés se expresa como una proteína de fusión con el marcador *His Tag* en su extremo N terminal. Este marcador interacciona con el NiSO₄ y la proteína queda inmovilizada en la resina. La proteína se eluye de la resina con una solución que contiene imidazol, el cual disruptora la interacción anterior. La purificación se realizó en los siguientes pasos:

1. Resuspender el precipitado en 10 ml de tampón de unión (sin imidazol), 0,1 % nonidet P-40.
2. Sonicar las células durante 1- 2 min manteniéndolas en hielo. Realizar tandas de 10 pulsos de 10 segundos para evitar el excesivo calentamiento de la muestra.
3. Centrifugar a 9000 rpm durante 20 min a 4 °C.
4. Pasar el sobrenadante a través de la columna de purificación, previamente equilibrada como se describe después.
5. Recolectar el primer eluyente y guardar a 4 °C.
6. Pasar 5 ml de tampón de unión 1x con 5 mM de imidazol por la columna.
7. Recolectar el eluyente y guardar a 4 °C.
8. Pasar 4 ml de volumen de diferentes soluciones de tampón de unión 1x con diferente concentración de imidazol (60 mM, 120 mM, 200 mM, 250 mM, 300 mM, 500 mM y 1M) a través de la columna, recolectando los eluyentes y guardándolos a 4 °C.
9. Usar 20 µl de cada eluyente para preparar las muestras de proteínas y analizarlas en geles de poliacrilamida como se describe en 5.14.4.
10. Realizar una transferencia Western-blot.
11. Utilizar la membrana para la inmunodetección utilizando el reactivo His-Probe-HRP (PIERCE) como se describe después.

Para la purificación de la proteína EmBP-2 se necesitó el uso de urea como agente desnaturante. Se añadió al tampón de unión 8x urea hasta una concentración final de 6M, ajustando el pH a 7,9.

Preparación de la columna de purificación

Todos los pasos se realizan a 4°C.

1. Añadir 1,5 ml de la resina His-Bind (Novagen) en la columna y dejar que el líquido salga de la columna.
2. Pasar por la columna 3x el volumen de la resina con H₂O
3. Pasar por la columna 5x el volumen de la resina con tampón de carga
4. Pasar por la columna 3x el volumen de la resina con tampón de unión.
5. Dejar la columna drenar y mantener con un poco de volumen de tampón de unión hasta su uso, evitando que se seque.

- ➔ Tampón de carga: 50 mM NiSO₄
- ➔ Tampón de unión 8x: 4 M NaCl, 160 mM Tris.HCl pH 7,9.

Inmunodetección de las proteínas marcadas con la cola de histidinas

1. Bloquear la membrana con tampón de bloqueo durante 1h a TA.
2. Lavar la membrana con tampón de lavado 3x 15 min cada vez.
3. Añadir el reactivo His Probe-HRP e incubar durante 1 h a TA.
4. Lavar la membrana con el tampón de lavado, 3x 15 min cada vez
5. Revelar con el sustrato para ECL.

- ➔ Tampón Tris: 0,1 M Tris, 0,15 M NaCl, pH 7,2.
- ➔ Tampón de bloqueo: 3% BSA en tampón Tris
- ➔ Tampón de lavado: 0,3 % BSA en tampón Tris.
- ➔ Reactivo HisProbe-HRP: 1 µg/ml en tampón de lavado.

5.14.3. Cuantificación de proteínas

La cuantificación de proteínas se ha realizado mediante el método de Bradford (1076):

1. Se construye una curva standard de la siguiente manera:
 - Preparar 6 muestras standard de concentraciones conocidas, hasta 20 µg/µl.
 - Añadir a esos volúmenes H₂O hasta 800 µl.
 - Añadir 200 µl de reactivo Bradford (Bio-Rad) y dejar durante 20 min a TA
 - Medir la densidad óptica (OD₆₀₀).
 - Dibujar la gráfica patrón con los valores de OD₆₀₀ contra las concentraciones conocidas de cada muestra standard.
2. Medir la densidad óptica (OD₆₀₀) de las muestras problema y calcular con la curva patrón su concentración.

5.14.4. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida

Electroforesis monodimensional

La electroforesis en gel desnaturizante de SDS/poliacrilamida (SDS-PAGE) y la electrotransferencia en filtros de nitrocelulosa (Western blot) se realizó como se describe en Goday

et al 1994. Se ha utilizado el *MiniproteanTM* (Bio-Rad) con espaciadores de 1,5 mm. La concentración de acrilamida del gel separador osciló entre el 12,5%-15%. El voltaje utilizado en la electroforesis ha sido: 100-120 V.

Reactivos	Gel separador		Gel concentrador
	12,5 %	15%	3%
40 % (ACRILAMIDA BIS-ACRILAMIDA 30/0,8%)	3,1 ml	3,75 ml	0,15 ml
LOWER BUFFER	2,5ml	2,5ml	----
UPPER BUFFER	----	----	0,5 ml
AGUA	4,4 ml	3,75 ml	1,3 ml
TEMED	5 µl	5 µl	2 µl
APS 15% (p/v)	40,4 µl	40,4 µl	20 µl

- ➔ Lower buffer: 1,5 M Tris.HCl, pH 8,8; 0,4 % SDS
- ➔ Upper buffer: 0,5 M Tris.HCl, pH 6,8; 0,4 % SDS
- ➔ Tampón de electroforesis 10x: 1,92 M glicina; 0,25 M Tris.HCl, pH 8,3; 1% SDS
- ➔ Tampón de muestras 2x: 125 mM Tris.HCl pH 6,8, 4% SDS, 20 % glicerol, 0,04 % azul de bromofenol.

Marcadores de peso molecular

Se han utilizado dos tipos: de alto peso molecular y de bajo peso molecular

Proteínas de alto P.M.	KDa	Proteínas de bajo P.M.	KDa
Miosina	205,0	BSA	66,0
β-galactosidasa	117,0	Ovoalbúmina	45,0
Fosforilasa B	97,4	G-3, P-DH	36,0
BSA	66,0	Anhidrasa carbónica	29,0
Ovoalbúmina	45,0	Tripsinógeno	24,0
Anhidrasa carbónica	29,0	α-lactoalbúmina	21,1
		Inhibidor de tripsina	14,2

Electroforesis bidimensional

El sistema electroforético bidimensional que se ha utilizado en este trabajo combina el isoelectroenfoque (IEF) en la primera dimensión con la electroforesis desnaturante en geles de SDS-PAGE en la segunda dimensión.

El protocolo seguido para el IEF es el siguiente:

1. Las proteínas precipitadas se resuspenden con 20 µl de solución de lisis.

2. Las muestras se cargan en el capilar que contiene el gel de poliacrilamida polimerizado, un máximo de 10 μl .
 3. Las muestras se cubren con 10 μl de la solución tampón, seguido del electrolito superior, la solución H_3PO_4 20mM hasta llenar el capilar. El electrolito inferior es NaOH 20 mM.
 4. La electroforesis se realiza cambiando el voltaje cada cierto tiempo:
 - 100 V, 30 min
 - 200 V, 45 min
 - 300 V, 75 min
 - 500 V, 60 min
 5. Una vez finalizado el electroenfoque, los geles se sacan de los capilares mediante unas jeringuillas y se equilibran con tampón de muestras 2x (ver apartado 5.14.4).
 7. Se pueden guardar congelados a -80°C
 8. La electroforesis SDS-PAGE se realiza según el método descrito anteriormente.
- ➔ Tampón de lisis: urea 9,5 M, nonidet P-40 2 % (p/v), anfólinas (pH 3,5-10) 0,8 % (p/v), DTT 100 mM. Las anfólinas se añaden en el momento de empleo.
- ➔ Disolución tampón: urea 8 M, anfólinas 0,4 % (p/v), nonidet P-40 5 % (p/v), β -mercaptoetanol 5% (v/v). Las anfólinas se añaden en el momento de empleo.

5.14.5. Desfosforilación de extractos proteicos

Ensayos de doble dimensión

Los precipitados de proteínas se resuspenden en tampón fosfatasa alcalina (AP) 1x, cóctel de inhibidores de proteasas dilución 1/100 la concentración de trabajo (apartado 5.14.1), y H_2O . Se separa la muestra en dos partes iguales. A una de ellas se le añade 10 unidades de AP, y la otra mitad nos sirve de control. Las dos muestras se dejan 4 h a 37°C . Después se precipitan añadiendo 4 volúmenes de acetona fría. Dejar secar totalmente.

Extractos de proteínas nucleares

Se añade al extracto tampón fosfatasa 10x hasta tener una concentración de 1x y se ajusta el volumen del resto de componentes de la reacción al volumen de extracto. Se hace la reacción igual que se describe arriba. La muestra se congela en N_2 líquido hasta su uso.

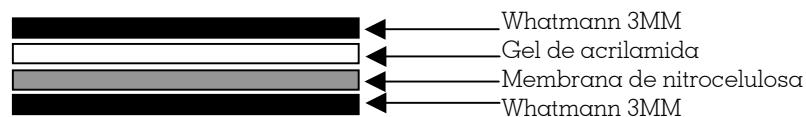
- ➔ Fosfatasa alcalina (AP): Roche
- ➔ Tampón de AP: Roche

5.14.6. Visualización de las proteínas por tinción de azul de coomassie

Si no va a realizarse una inmunotransferencia, una vez finalizada la electroforesis se tiñe el gel con una solución de azul de coomassie durante 20 min, a TA, con agitación suave. A continuación se destiñe con metanol/acético/agua (30/10/60, v/v/v), hasta que se puedan ver las bandas de proteínas.

5.14.7. Electrotransferencia

Las proteínas separadas por SDS-PAGE se electrotransfirieron a membranas de nitrocelulosa utilizando el aparato Transfer Blot Semidry (Bio-Rad). El montaje de la transferencia se realizó como se indica en el siguiente esquema, utilizando papel Whatmann 3 MM empapado en el tampón de transferencia. La membrana y el gel se equilibran 2-3 min con este tampón también.



Condiciones de la electrotransferencia: 20-30 min, amperaje constante de 0,2 mA /cada gel que se transfiere en el aparato.

→ Tampón de transferencia: Tris 48 mM, glicina 39 mM, metanol 20%, SDS 10 %.

5.14.8. Inmunodetección

El procedimiento utilizado para la detección inmunológica de proteínas fijadas a filtros de nitrocelulosa fue el mismo en todos los casos, variando únicamente el anticuerpo primario y su dilución. Los anticuerpos primarios utilizados son:

-Anticuerpo generado contra EmBP-2: suero policlonal de conejo contra la proteína EmBP-2 de maíz, generado mediante inmunización de conejos (apartado 5.15) con la proteína recombinante expresada *in vitro* en *E. coli* (apartado 3.2.3). Dilución de trabajo: 1/1500.

-Anticuerpo generado contra ZmBZ: suero policlonal de conejo (apartado 5.15) contra la proteína ZmBZ de maíz, generado mediante inmunización de conejos con la proteína recombinante expresada *in vitro* en *E. coli* (apartado 3.2.3). Dilución de trabajo: 1/750.

Los anticuerpos secundarios utilizados han sido 2: anti IgG conjugado a la enzima fosfatasa alcalina (AP, dilución de trabajo 1/2000) y anti IgG conjugado a una peroxidasa (HPR, dilución de trabajo 1/5000).

Procedimiento:

1. Una vez finalizada la electrotransferencia, teñir la membrana con rojo Ponceau durante 2 min (0,1 % p/v en ácido acético al 1%). Eliminar el exceso de colorante con agua.
2. Marcar con un lápiz la posición de los marcadores de peso molecular.
3. Lavar con PBS 1x, 4 lavados de 5 min cada uno con agitación suave.
4. Incubar la membrana con solución bloqueante 1h a TA (o toda la noche a 4 °C), con agitación suave
5. Lavar 3 x 5 min con PBS 1x, con agitación suave.
6. Incubar el filtro 1 h a TA , o toda la noche a 4 °C, con el anticuerpo primario en la dilución adecuada en la solución bloqueante (agitación suave).
7. Lavar con PBS 1x, 3x 15 min, con agitación suave
8. Incubar el filtro 1 h a TA con el anticuerpo secundario diluido adecuadamente en PBS 1x, con agitación suave.
9. Lavar con PBS 1x, 3x15 min, con agitación suave.
11. Revelado según el anticuerpo secundario utilizado.

Detección utilizando el conjugado anti IgG-AP

El revelado de la actividad fosfatasa alcalina se realizó por el método colorimétrico, empleando NBT y BCIP como sustratos. Se han analizado por este sistema los sueros inmunes y preinmunes generados contra las dos proteínas, en los controles realizados de reconocimiento de las proteínas recombinantes por los anticuerpos. El protocolo seguido está desrito en el Molecular cloning, a laboratory manual (Sambrook et al. 1989).

1. Equilibrar la membrana con el tampón de la fosfatasa alcalina durante 10 min, con agitación suave.
2. Incubar en la solución de revelado. Dejar desarrollar el color en la oscuridad hasta que aparezcan las bandas esperadas.
3. Para parar la reacción se sumerge la membrana en la solución PBS1x, 20 mM EDTA (pH 8) o bien agua.

Detección utilizando el conjugado anti IgG-HPR

El revelado de la actividad peroxidasa se realizó por quimioluminiscencia, en ensayos ECL.

1. Mezclar 1 ml de la solución de luminol con 10 µl de la solución *enhancer* justo antes de la detección.
2. Añadir la solución anterior a la membrana, cubrir con papel *shannah wrap* y colocar encima una película de autoradiografía.

3. Exponer durante el tiempo necesario y revelar la autoradiografía.
 - ➔ Solución de luminol: 0,1 M Tris.HCl pH 8,6, 1,25 mM de luminol sódico, 2,7 mM H₂O₂.
 - ➔ Solución *enhancer*: 11 mg ácido p-hidroxicumárico en 10 ml DMSO.
 - ➔ PBS 1x, pH 7,5: 16 mM NaH₂PO₄, 84 mM Na₂HPO₄, 1,5 M NaCl.
 - ➔ Solución bloqueante (100 ml): 3 g Molico (leche desnatada en polvo), 0,1 ml Tween-20, hasta 100 ml con PBS 1x.
 - ➔ Tampón fosfatasa alcalina: 100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂, 100 mM Tris.HCl, pH 9,5.
 - ➔ Solución *stock* NBT (4-nitro-blue-tetrazolium chloride): 50 mg/ml en 70% dimetilformamida.
 - ➔ Solución *stock* BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate): 50 mg/ml en 100% dimetilformamida.
 - ➔ Solución de revelado (10 ml): 10 ml tampón fosfatasa alcalina, 66 µl de solución *stock* NBT, 33 µl de solución *stock* BCIP.

5.15. Obtención de anticuerpos policlonales en conejos

Para la obtención de los anticuerpos se ha inmunizado a conejos de laboratorio (*Oryctolagus cuniculus*), de la variedad New Zealand White, con el antígeno elegido. Se han utilizado estos animales por su fácil manipulación, porque toleran muy bien las inyecciones y extracciones sanguíneas y porque la cantidad de suero obtenido es muy superior a la obtenida con ratones o ratas. Cuando el antígeno es inyectado a un animal por primera vez, los anticuerpos se producen en 10 o 12 días. La cantidad necesaria de antígeno para producir una buena inmunización oscila entre 200 ng- 1µg/ inyección, que deberá repetirse un mínimo de 3 veces para asegurarnos un buen título de IgG.

Inmunización

Se ha utilizado el adyuvante de Freund para potenciar la inmunización. Se encuentra en 2 formas, el completo (CFA) y el incompleto (IFA). Las diferencias entre los dos es que CFA contiene *M. tuberculosis* muertas por calor capaces de provocar una respuesta inmune fuerte y prolongada, pero que puede provocar granulomas en el conejo. Para evitar este problema sólo se utiliza en la primera inmunización, la que da una respuesta menor inmunitaria, y en el resto de inmunizaciones se utiliza IFA. La administración del antígeno es subcutánea.

1. Colocar en un tubo la cantidad de proteína purificada que se va a utilizar y diluir en un volumen final de 500 µl con PBS.

2. Añadir 500 μl de adyuvante y vortear fuertemente hasta la formación de una emulsión. El CFA se utiliza solo en la primera inmunización. En el resto el IFA.
3. Inyectar por vía subcutánea de 100 μl en 100 μl en diferentes partes del cuerpo del conejo. Los conejos han estado previamente 15 días en cuarentena.

Obtención del suero

1. Extraer la sangre del conejo y colocar en un tubo con un gel separador.
2. Incubar la sangre a 37 °C durante 1h para que coagule.
3. Centrifugar a 4000 rpm durante 5 min a 4°C.
4. Alicuotar el suero en tubos eppendorf y calentar a 55 °C 1h para desactivar el sistema del complemento. Guardar a -70 °C

5.16. Transformación transitoria mediante la técnica de biolística

La transformación transitoria se realizó siguiendo una modificación del protocolo de Klein et al 1987:

Preparación de las partículas de oro

1. Pesar 60 mg de partículas de oro de 1 μm de diámetro
2. Lavar con 1 ml de etanol 100% grado HPLC
3. Vortex 10 min
4. Dejar reposar las partículas durante 15 min a T
5. Dar un corto *spin* y quitar el etanol
6. Lavar con 1 ml H_2O
7. Vortex durante 1 min y dejar las partículas reposar 15 min a TA. Dar un *spin* corto al final y quitar el H_2O . Repetir los pasos 6 y 7, 3 veces más
8. Quitar el H_2O
9. Resuspender el pellet en 1 ml de glicerol estéril 50%
10. Vortex durante 10 min
11. Hacer alícuotas de 20 μl y guardar a -20 °C

Precipitación de las muestras de DNA

1. Sonicar durante 3 min las partículas
2. Vortear las partículas durante 10 min
3. Añadir 10 μl de la muestra de DNA vortear, y sin dejar el vortex añadir secuencialmente 25 μl de CaCl_2 2,5 M y 10 μl de espermidina
4. Contar 20 golpecitos de vortex
5. Dejar en hielo durante 15 min
6. Quitar el sobrenadante y añadir 500 μl de etanol 100% grado HPLC
7. Vórtex durante 10 segundos y dejar las partículas en hielo 15 min
8. Dar un pequeño spin y quitar el etanol
9. Añadir 200 μl de etanol 100% grado HPLC y vortex durante 10 segundos
10. Dejar en hielo 15 min
11. Dar un corto spin y quitar el etanol
12. Resuspender las partículas en 10 μl de etanol 100% HPLC y dejar en hielo hasta su uso (no dejar pasar más de 2 horas).

Disparo de los microproyectiles

1. Esterilizar con etanol 100% grado HPLC las membranas portadoras y los soportes de las membranas. Dejar secar
2. Montar las membranas dentro de los soportes
3. Sonicar durante 3 segundos y vortear brevemente la muestra de partículas, y dividir cada muestra en dos membranas. Dejar secar.
4. Conectar el aparato. Abrir la bombona de helio y poner una presión de salida 200 Psi superior a la de la resistencia de las membranas de ruptura. Conectar el vacío de la máquina.
5. Montar las piezas del aparato en el siguiente orden: Disco de metal, soporte de la membrana con la membrana portadora del DNA y la tapa de seguridad.
6. Esterilizar las membranas de ruptura (siempre se han usado de 900 Psi) en isopropanol y dejar secar durante 1-2 min (nunca más de 15 min).
7. Colocar la membrana de ruptura en su pieza portadora, situarla dentro del aparato en la entrada del gas helio y fijarla bien.
8. Colocar la pieza que contiene la membrana portadora del DNA en el aparato.
9. Colocar la placa de Petri con el material biológico dos posiciones más debajo de la pieza con el DNA (esta distancia es un parámetro que debe ser optimizado según cada situación)
10. Cerrar la puerta del aparato y conectar el vacío. Cuando llega al valor de 0,1 atm, bloquear el aparato.

11. Presionar el botón de disparo, la salida de helio, y mantener así hasta que la membrana de ruptura se rompa.
12. Desactivar el vacío. Cuando llegue a 1 atm abrir la puerta y retirar la muestra. Cada placa de Petri se ha disparado 2 veces de manera que recibe todas las partículas de un eppendorf .

Preparación de la muestra biológica

Callos

Los callos se hicieron inicialmente a partir de la línea de maíz Black Mexican Sweet (BMS) y se han mantenido en medio MS a 26 °C. Aproximadamente 1 g de callo se coloca sobre un papel de filtro y sobre una placa de MS-2, y se extiende con mucho cuidado para aumentar la superficie del material expuesta. Se incuba toda la noche a 26 °C en oscuridad. 4 horas antes del experimento se colocan en placas MS-2 con 200 mM de manitol.

Embriones W64A y vp1

Los embriones se extraen de la panocha de la edad de interés con la ayuda de una espátula y se colocan directamente sobre placas de Petri con medio MS. En cada placa se colocan de 4-8 embriones, según el número de embriones que se disponga. El tiempo que transcurre desde que se empiezan a colocar los embriones en las placas y se bombardean no puede pasar de 2 horas para evitar interferencias con el programa de germinación.

Coleoptilos de 2 dag

Los granos de maíz secos se ponen a germinar como se ha indicado en el apartado 5.1 sin previa esterilización. Para el experimento de transformación se cogen los embriones germinados y se colocan 4 en una placa de Petri con medio MS, dejando expuesta a las partículas los coleoptilos.

Epidermis de cebolla

Las células de la monocapa de epidermis de cebolla se colocan en placas con medio MS, 2 horas antes de la transformación.

Suspensiones celulares de BMS

La suspensión de células BMS, derivadas de los callos BMS, se mantiene en erlenmeyer en medio MS-2 a 26 °C en oscuridad, con agitación de 100 rpm. Cuando se van a utilizar las células, se dejan reposar unos minutos y se filtra la suspensión en condiciones estériles al vacío (sobre un papel de filtro estéril humedecido con medio líquido MS), el volumen de células deseado, intentando que queden repartidas por el papel de filtro de manera que formen una

capa delgada. El papel se coloca en una placa de Petri con medio MS durante 24h a 26 °C y a oscuras. Dos horas antes de la transformación se coloca en placas de Petri MS-200 mM manitol.

- ➔ Placas MS: 4,7 g/l MS, 20 g/l sacarosa, 0,5 g/l MES pH 5,8, 2 g/l gelrite. Autoclave. A este medio después del autoclave y antes de que solidifique se le puede añadir 2 mg/l de la hormona 2,4-D (denominado entonces medio MS-2).
- ➔ Medio MS: Igual que arriba pero sin gelrite.

Bombardeo y tratamiento de las muestras

En todos los experimentos de bombardeo se ha procedido igual. Se han utilizado 2 µg de la construcción *reporter*, 2 µg de la construcción control interno y hasta 2 µg de efectores y de DNA relleno (el vector pPK100 sin inserto). Después de la transformación cada muestra se divide en 2 partes y se transfiere a medio MS o MS-2 (embriones y coleoptilos, o callos BMS respectivamente) sin y con 0,1 mM de ABA. Las muestras se incubaron durante 22 h a 26 °C en la oscuridad. Las muestras de los experimentos de análisis de la actividad del promotor *rab28* se congelan en N₂ líquido y se guardan a -70°C. Las muestras de los experimentos de localización subcelular se preparan para analizar al microscopio, disgregando suavemente en el porta la muestra, sobre una gota de agua, con una espátula.

Ensayo luciferasa

La actividad luciferasa se ha medido utilizando el Luciferase Assay System (Promega) siguiendo el protocolo propuesto en el *quit*.

Preparación de las muestras y medida de luminiscencia

La actividad LUC es estable durante 30 min una vez el tejido se tritura. Mantener a 4 °C siempre.

1. Añadir 300 µl de tampón de extracción 1x y triturar el tejido hasta su homogenización
2. Centrifugar durante 5 min a 4 °C a 13000 rpm.
3. Transferir el sobrenadante a un nuevo tubo eppendorf.
4. Añadir 20 µl del sobrenadante a 200 µl del reactivo LUC en una cubeta de luminómetro y medir la luminiscencia.
5. Congelar el resto de la muestra en N₂ líquido y guardar a -70 °C.

Calibrado del luminómetro

Encender el luminómetro y esperar 30 min. Ajustar el *background* a 0 mV y el control interno a 10 mV. Introducir los siguientes parámetros: *Data points*: 600, *Low limit*: 0 mV, *High limit*: 1000 mV, *Intpoint 1*: 0min 4segundos, *Intpoint 2*: 0min 14segundos, *Time constant*: 0,5 segundos, *Scaling*: auto.

- ➔ Tampón de extracción 5x: 124 mM Tris.HCl pH 7,8, 10 mM CDTA, 10 mM DTT, 5% tritón X-100, 50 % glicerol.
- ➔ Reactivo luciferasa (Promega).

Ensayo actividad β -glucuronidasa (GUS)

La actividad GUS se ha medido de acuerdo con el protocolo proporcionado por el kit GUS-light (PE biosystems):

Procedimiento:

1. Preparar el tampón de reacción diluyendo el sustrato Glucuron (PE Biosystems) 1 a 100 con el diluyente del tampón de reacción.
2. Equilibrar el tampón de reacción y el acelerador a TA.
3. Transferir a un tubo de luminómetro 20 μ l de extracto (el mismo usado para el ensayo LUC) y añadir 180 μ l de tampón de reacción.
4. Dejar 1 h a TA
5. Añadir 300 μ l de acelerador y mezclar rápidamente
6. Leer la luminiscencia de la reacción con los mismos parámetro que el ensayo LUC.

- ➔ Sustrato Glucuron: PE Biosystems.
- ➔ Diluyente del tampón de racción: 0,1 M fosfato sódico pH7.
- ➔ Acelerador: PE Biosystems.

Análisis en el microscopio confocal

Las imágenes se han analizado en un microscopio confocal de la casa Leica TSC SP, Heidelberg, Germany.

5.17. Interacción DNA-proteína

Los ensayos EMSA se han realizado siguiente protocolo:

1. En un tubo eppendorf se añade 0,5 µl de oligonucleótido de doble cadena (100 µg/µl), 0,4 µl dNTP mix (3x300µM dATP, dGTP y dTTP), 0,5 µl agua, 0,3 µl 10x tampón de marcaje (tampón multicore de Boehringer), 0,3 µl Klenow (2 unidades/µl) y 1µl ³²-P-dCTP (3000Ci/mmol).
2. Hacer un spin y dejar 20 min a TA.
3. Añadir 97 µl TE pH8
4. Añadir 100 µl fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25/24/1) y mezclar
5. Centrifugar a 13000 rpm durante 10 min a TA
6. Pasar el sobrenadante a través de una columna NAP (Pharmacia), equilibrada con 9 ml de 0,3x TE pH8
7. Añadir 400 µl de TE pH8
8. Recolectar 500 µl en un eppendorf
9. Eluir la sonda con 1 ml de 0,3x TE pH8
10. Guardar a -20°C

Reacción de unión

1. En un tubo eppendorf se añaden: 300 µg de poli dIdC, 2 µl de 10x tampón de binding, 1,5 µl de prueba marcada y 1 µg BSA. Añadir con agua hasta 15 µl. Las cuentas utilizadas en todos los casos 40000 cpm (Beckman LS6000SC).
2. Añadir la cantidad necesaria de proteína purificada (de 10-1000 ng) o extracto de proteínas nucleares (hasta 50 µg, equilibrar las diferencias entre las muestras con BSA).
3. Incubar durante 20 min en hielo
4. Añadir 2 µl de glicerol 87 %.

Si se realizan ensayos de competición o de *supershift*, antes de añadir la sonda se añade la cantidad necesaria de oligonucleótido sin marcar o de anticuerpo y se incuba durante 10 min en hielo. Luego se añade la sonda y se continúa en el paso 3.

Electroforesis y tratamiento del gel

1. Preparar un gel de poliacrilamida al 5% mezclando: 5 ml de acrilamida/bisacrilamida (30:0,8) 40%, 2 ml TBE , 33 ml agua, 55 µl TEMED y 500 µl de APS 15%

2. Correr las muestras en 0,5 x TBE a 120 V durante 3,5 h a 4°C
 3. Sumergir el gel en 10% de ácido acético durante 10 min
 4. Secar durante 1,5 h al vacío
 5. Exponer con una película de autoradiografía dentro de un *cassette* a -70 °C.
- ➔ Tampón de unión 1x: 25 mM HEPES pH 7,8, 75 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 0,5 mM EDTA pH8, 0,2 mM DTT.
- ➔ TBE 10x: 0,89 M Tris, 20 mM EDTA, 0,89 M ácido bórico

Hibridación de los oligonucleótidos de cadena sencilla

1. Mezclar 3,5 nmol de cada oligo de cadena sencilla a hibridar en una solución 50 mM NaCl.
2. Calentar 10 min a 100 °C y dejar enfriar a TA.
3. Guardar a -80°C.

5.18. Ensayo de inmunodeplección

Inmunoprecipitación del extracto con el anticuerpo contra EmBP-2

Para la inmunodeplección de las proteínas del extracto nuclear de embrión que interaccionaban con los sueros inmune y preinmune de EmBP-2 se siguieron los siguientes pasos:

1. Se fusionaron los anticuerpos a las bolas magnéticas (Dynabeads) a 4°C O/N, siguiendo las instrucciones que se indican en el kit. Se hizo por duplicado con cada suero.
2. Se incubaron los extractos de proteínas nucleares de embrión seco con las bolas con el anticuerpo a 4°C O/N.
3. Se recuperaron los extractos y se congelaron a -80 °C. Las Dynabeads con las proteínas inmovilizadas se lavaron con el tampón PBS/BSA 1% (p/v), y se guardaron a -80°C.

Ensayo de interacción con el DNA de las proteínas inmunoprecipitadas

Las condiciones para la reacción de unión al DNA entre el ABRE A y el ABRE A mutado se adaptaron a un volumen de reacción de 30 µl a partir de las condiciones vistas en el apartado 5.17. Para el tratamiento posterior de las muestras se siguieron los pasos descritos por Horard et al (2000).

1. A cada eppendorf se le añadió la siguiente mezcla: 3 μl de tampón de unión (apartado 5.17), 0,4 μl de polidIdC (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), 0,5 μl BSA (100 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), 22 μl H₂O, 4 μl oligonucleótido (ABRE A o ABRE A mutado) marcados con $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP (3000 Ci/mmol). La radiactividad de cada oligonucleótidos se igualó previamente para introducir en cada reacción 80000 cpm.
2. La reacción de unión se realizó durante 30 min a 4°C en hielo. Cada 10 min se resuspendían las Dynabeads agitando suavemente los eppendorfs..
3. Se eliminó el sobrenadante y se realizaron lavados con 1 ml de TBE 0,5x (apartado 5.17) hasta que no había señal en las muestras control negativo (10 lavados de 1 ml).
3. Se elimina todo el sobrenadante, se suspendieron las Dynabeads de cada eppendorf en 300 μl de una solución con: 0,5 % SDS y 0,2 μg de proteinasa K/ml.
4. Incubar 1h a 65 °C.
5. Añadir 300 μl de fenol/cloroformo. Vortéx y retirar la fase superior.
6. Añadir 300 μl de cloroformo. Vórtex y retirar la fase superior.
7. Precipitar con 10 % acetato de sodio 3M pH 5,2 y 2,5 volúmenes de etanol. Dejar 30 min en nieve carbónica.
8. Centrifugar 15 min, a TA.
9. Quitar el etanol y poner tampón de carga de DNA 1x (apartado 5.7.1.).
10. Cargar todas las muestras en un gel de acrilamida SDS-PAGE al 15 %, también una alícuota de los *inputs*, para comprobar las cuentas de los oligonucleótidos. Correr a 100 V, hasta que las muestras entren en el gel.
11. Tratar el gel igual que en la parte "electroforesis y tratamiento del gel", pasos 3-5, del apartado 5.17.

5.19. Ensayos *in vitro* de fosforilación

Para los ensayos de fosforilación CK2 *in vitro*, se adicionó 2 pmol de subunidad CK2 α , o 2 pmol de subunidad CK2 α y 2 pmol de subunidad CK2 β , a las proteínas recombinantes (5 μg) o al control positivo RAB17 (2 μg), 10 μl de tampón 3x CK2 y H₂O csp 30 μl . Las muestras se incubaron 20 min a 30 °C. La reacción de fosforilación se paró añadiendo tampón de muestras de electroforesis y las proteínas fosforiladas se separaron en un gel del 12% SDS-PAGE. El gel se tiñó con azul de coomassie (apartado 5.14.6) y se secó al vacío. La visualización de las proteínas fosforiladas se hace por autoradiografía.

- ➔ Tampón CK2 3x: 27 mM MgCL₂, 1,5 mM EGTA, 90 mM β -glicerolfosfato, 1,5 mM EDTA, 3 mM DTT, 0,24 mM ATP y 9 μCi [γ -³²P]ATP.

5.20. Ensayos *in vitro* de *pull-down*

Es un método para detectar interacciones proteína-proteína *in vitro*. Una de las proteínas se inmoviliza en una columna de afinidad y se pasa la otra proteína por la columna. Si hay interacción entre las dos, la segunda quedará retenida. En las columnas se fijaron las proteínas recombinantes EmBP-2 y ZmBZ, inmovilizadas en una resina con NiSO₄ (ver apartado 5.14.2, "preparación de la columna"). Se utilizaron 100 µg de cada proteína recombinante. Para retener estas proteínas en la resina se añadieron éstas a un eppendorf, con la resina equilibrada, y se mantuvieron en un agitador orbital a 4 °C O/N.

La proteína que se pasa por las columnas es la EmBP-2, que ha sido marcada con ³⁵S-Metionina en una reacción *in vitro* de transcripción-traducción TNT de Promega, siguiendo las instrucciones del fabricante) a partir de la construcción 1 de la tabla V.

El protocolo para el *pull down* seguido fue:

1. En un tubo eppendorf de 0,5 ml poner 1-5 µg de proteína de fusión inmovilizada a la resina (Biolabs) y añadir resina libre equilibrada hasta un volumen final de 90 µl .
2. Dejar sedimentar y quitar el sobrenadante.
3. Añadir 180 µl de tampón de unión, 1 mM DTT, 3 µl de suero preinmune y 3 µl de PMSF 100 mM.
4. Dejar 1h a 4 °C en agitación suave
5. Dejar sedimentar y quitar el sobrenadante.
6. Añadir la TNT (dejar 1 µl a parte como *input* para conocer el marcaje de la muestra).
7. Dejar a 4 °C en rotación suave O/N
8. Traspasar a un tubo de 1,5 ml i dejar sedimentar en hielo.
9. Retirar el sobrenadante y lavar con 1 ml de tampón RIPA
10. Mezclar bien y dejar sedimentar en hielo.
11. Retirar el sobrenadante. Repetir los pasos 9-10, 8 veces.
12. Añadir 20 µl de tampón de muestras 1x con β-mercaptoetanol (apartado 5.14.4) y calentar a 95 °C durante 5 min.
13. Cargar en un gel de proteínas SDS-PAGE. Correr a un voltaje 100 V.
14. Teñir el gel de proteínas con azul de Coomassie, siguiendo instrucciones del apartado 5.14.6.
15. Secar el gel de proteínas con vacío y calor durante 1 h.
16. Exponer el gel a una película de autoradiografía en un cassette. Guardar a TA el tiempo necesario para ver la señal.

➔ Tampón de unión: 20 mM HEPES-KOH pH 7,9, 50 mM KCl, 2,5 mM MgCl₂, 10 % glicerol, 1 mM DTT , 0,2 % Nonidet P40, 100 µM PMSF.

➔ Tampón RIPA: 100 mM Tris-HCl pH 7,5 , 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,2 % Nonidet P40.

5.21. Programas informáticos

La manipulación de las secuencias se ha realizado con los siguientes programas:

GCG: Genetics Computer Group Inc., Madison, Wisconsin, USA, 1991.

BLAST (EBI): <http://www2.ebi.ac.uk/blast2/>

Algunas direcciones de interés son:

Direcciones

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/	NCBI
http://www.ebi.ac.uk/	EBI
http://www.expasy.ch/	ExPASy
http://www.arabidopsis.org/	AGI-Arabidopsis database
http://www.tigr.org/tdb/e2k1/osa1/index.shtml/	Rice database
http://www.agron.missouri.edu/	Maize database

1. Utilizando la técnica del RT-PCR y posterior cribado de genotecas de maíz se han aislado 2 clones de cDNA que codifican para dos proteínas de la familia de factores de transcripción bZIP, que se han denominado EmBP-2 y ZmBZ.
2. El estudio del patrón de transcripción de los factores aislados indica que son muy abundantes en los tejidos embrionarios. En tejido vegetativo se observa un nivel basal, que no se induce por ABA ni por deshidratación. Durante la germinación el nivel de mRNA de EmBP-2 disminuye.
3. El patrón de acumulación de las proteínas en los tejidos no se correlaciona con el patrón de transcripción. La proteína EmBP-2 se acumula en tejido vegetativo en respuesta a la deshidratación y en la germinación en respuesta al ABA. La proteína ZmBZ no se detecta en tejido vegetativo y su acumulación incrementa en respuesta al ABA en embriones jóvenes.
4. Las proteínas ZmBZ y EmBP-2 recombinantes interaccionan *in vitro* con los elementos ABRE del promotor *rab28*. *In vivo* los factores presentan un efecto transactivador en embriones y en coleótilos cuando aplicamos un tratamiento con ABA.
5. El factor ZmBZ tiene un efecto sinérgico con el factor VP1 en la activación de *rab28*. En el mutante *viviparous-1* ZmBZ no tiene efecto transactivador.
6. La proteína EmBP-2 recombinante compite con las proteínas endógenas en su unión al ABRE A, y su anticuerpo reacciona con una de éstas proteínas. Ni la adición de la proteína ZmBZ ni de su anticuerpo altera el patrón de bandas retardadas.
7. La proteína EmBP-2 se encuentra en estado fosforilado durante la embriogénesis. EmBP-2 y ZmBZ son fosforiladas *in vitro* por la proteína quinasa CK2. La interacción de estas proteínas con el ABRE A está modulada por su estado de fosforilación, de manera que la afinidad de EmBP-2 aumenta cuando está fosforilada y la de ZmBZ disminuye.
8. Estudios de inmunolocalización indican que EmBP-2 y ZmBZ se localizan en el citoplasma y en el núcleo. Dentro del núcleo los factores se localizan en la periferia de las masas de cromatina condensada y en la región intercromatínica. La proteína de fusión ZmBZ-GFP presenta idéntica localización.
9. Las proteínas recombinantes EmBP-2 y ZmBZ interaccionan *in vitro* formando un heterodímero capaz de interaccionar con el ABRE A.

- Abe H, Yamaguchi-Shinozaki K, Urao T, Iwasaki T, Hosokawa D and Shinozaki K (1997). Role of Arabidopsis MYC and MYB homologs in drought- and abscisic acid-regulated gene expression. *Plant Cell* 9: 1859-1868.
- Ache P, Becker D, Ivashikina N, Dietrich P, Roelfsema MRG and Hedrich R (2000). GORK, a delayed outward rectifier expressed in guard cells of *Arabidopsis thaliana*, is a K⁺-selective, K⁺-sensing ion channel. *FEBS Lett* 486: 93-98.
- Anderson B, Ward J and Schroeder J (1994). Evidence for an extracellular reception site for abscisic acid in *Commelina* guard cells. *Plant Physiol* 104: 1177-1183.
- Audran C, Borel C, Frey A, Sotta B, Meyer C, Simonneau T and Marion-Poll A (1998). Expression studies of the zeaxanthin epoxidase gene in *Nicotiana plumbaginifolia*. *Plant Physiol* 118: 1021-1028.
- Bailey PC, McKibbin RS, Lenton JR, Holdsworth MJ, Flintham JE and Gale MD (1999). Genetic map locations for orthologous *Vp1* genes in wheat and rice. *Theor Appl Genet* 98: 281-284.
- Beaudoin N, Serizet C, Gosti F and Giraudat J (2000). Interactions between abscisic acid and ethylene signaling cascades. *Plant Cell* 12: 1103-1115.
- Bensmihen S, Rippha S, Lambert G, Jublot D, Pautot V, Granier F, Giraudat J and Parcy F (2002). The homologous ABI5 and EEL transcription factors function antagonistically to fine-tune gene expression during late embryogenesis. *Plant Cell* 14: 1391-1403.
- Bobb AJ, Eiben HG and Bustos MM (1995). PvAlf, an embryo-specific acidic transcriptional activator enhances gene expression from phaseolin and phytohemagglutinin promoters. *Plant J* 8:331-343.
- Boyer JS (1982). Plant productivity and environment. *Science* 218: 443-448.
- Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle protein-dye binding. *Anal Biochem*. 72: 248-254.
- Bray EA, Moses MS, Morabito D, Hong B, Shih T-Y and Imaizumi M (1996). Exogenous ABA does not mimic endogenous ABA in the induction of gene expression. In *Workshop on Abscisic Acid Signal Transduction in Plants*. Instituto Juan March de Estudios e Investigaciones. Madrid. Spain.
- Bray EA (1997). Plant responses to water deficit. *Trends Plant Sci* 2: 48-54.

Bibliografia

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

Busk PK, Jensen AB and Pagès M (1997). Regulatory elements *in vivo* in the promoter of the abscisic acid responsive gene *rab17* from maize. *Plant J* 11: 1285-1295.

Carlberg C (1999). Lipid soluble vitamins in gene regulation. *Biofactors* 10: 91-97.

Carlini LE, Ketudat M, Parsons RL, Prabhakar S, Schmidt RJ and Guiltinan MJ (1999). The maize EmBP-1 orthologue differentially regulates Opaque2-dependent gene expression in yeast and cultured maize endosperm cells. *Plant Mol Biol* 41: 339-349.

Chandler JW and Bartels D (1997). Structure and function of the *vp1* gene homologue from the resurrection plant *Craterostigma plantagineum* Hochst *Mol Gen Genet* 256: 539-546.

Chern MS, Bobb AJ and Bustos MM (1996). The regulator of Mat2 (ROM2) protein binds to early maturation promoters and represses PvALF-activated transcription. *Plant Cell* 8: 305-321.

Choi H, Hong J, Ha J, Kang J and Kim S (2000). ABFs, a family of ABA-responsive element binding factors. *J Biol Chem* 275: 1723-1730.

Cohen A, Plant AP, Moses MS and Bray EA (1991). Organ-specific and environmentally regulated expression of two abscisic acid-induced genes of tomato. *Plant Physiol* 97: 1367-1374.

Cutler S, Ghassemian M, Bonetta D, Cooney S and McCourt P (1996). A protein farnesyl transferase involved in abscisic acid signal transduction in *Arabidopsis*. *Science* 273: 1239-1241.

Després C, DeLong C, Glaze S, Liu E and Fobert PR (2000). The *Arabidopsis* NPR1/NIM1 protein enhances the DNA binding activity of a subgroup of the TGA family of bZIP transcription factors. *Plant Cell* 12: 279-290.

Duckham SC, Taylor IB, Linforth RST, Al-Naieb RJ, Marples BA and Bowman WR (1989). The metabolism of *cis* ABA-aldehyde by the *wilty* mutants of potato, pea and *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot* 40: 901-905.

Ellenberg TE, Brandl CJ, Struhl K, Harrison SC (1992). The GCN4 basic region leucine zipper binds DNA as a dimer of uninterrupted helices: crystal structure of the protein-DNA complex. *Cell* 71: 1223-1237.

- Feldbrügge M, Sprenger M, Dinkelbach M, Yazaki K, Harter K and Weisshaar B (1994). Functional analysis of a light-responsive plant bZIP transcriptional regulator. *Plant Cell*. 6: 1607-1621.
- Felsenfeld G (1992). Chromatin as an essential part of the transcriptional mechanism. *Nature* 355: 219-224.
- Finkelstein R and Lynch T (2000). The Arabidopsis abscisic acid response gene *ABI5* encodes a basic leucine zipper transcription factor. *Plant Cell* 12: 599-609.
- Finkelstein RR, Wang ML, Lynch TJ, Rao S and Goodman HM (1998). The Arabidopsis abscisic acid response locus *ABI4* encodes an APETALA2 domain protein. *Plant Cell* 10:1043-1054.
- Finkelstein RR (1994). Mutations at two new Arabidopsis ABA response loci are similar to the *abi3* mutations. *Plant J* 5: 765-771.
- Furini A, Koncz C, Salamini F and Bartels D (1997). High level transcription of a member of a repeated gene family confers dehydration tolerance to callus tissue of *Craterostigma plantagineum*. *EMBO J* 16: 3599-3608.
- Gampala S, Hagenbeek D and Rock C (2001). Functional interactions of lanthanum and phospholipase D with the abscisic acid signaling effectors VP1 and ABI1-1 in rice protoplasts. *J Biol Chem* 276: 9855-9860.
- García-Garrido JM, Fanlo J, Delseny M and Martínez-Izquierdo JA (1996). The ABRE-like or coupling-like ACGCGTGG element of the rice *Ltp2* promoter is necessary for ABA response. Workshop on Abscisic Acid Signal Transduction in Plants. Instituto Juan March de Estudios e Investigaciones. Madrid. Spain.
- Ghassemian M, Nambara E, Cutler S, Kawaide H, Kamiya Y and McCourt P (2000). Regulation of abscisic acid signaling by the ethylene response pathway in Arabidopsis. *Plant Cell* 12: 1117-1126.
- Ghelis T, Dellis O, Jeannette E, Bardat F, Miginiac E and Sotta B (2000). Abscisic acid plasmalemma perception triggers a calcium influx essential for RAB18 gene expression in *Arabidopsis thaliana* suspension cells. *FEBS Lett* 483: 67-70.
- Gilroy S and Jones R (1992). Gibberellic acid and abscisic acid coordinately regulate cytoplasmic calcium and secretory activity in barley aleurone protoplasts. *Proc Acad Sci USA* 89: 3591-3595.

Bibliografia

Gilroy S and Jones R (1994). Perception of gibberellin and abscisic acid at the external face of the plasma membrane of barley (*Hordeum vulgare* L.) aleurone protoplasts. *Plant Physiol* 104: 1185-1192.

Gilroy S, Read ND and Trewavas AJ (1990). Elevation of cytoplasmic calcium by caged calcium or caged inositol trisphosphate initiates stomatal closure. *Nature* 343: 769-771.

Giraudat J, Hauge B, Valon C, Smalle J, Parcy F and Goodman H (1992). Isolation of the Arabidopsis ABI3 gene by positional cloning. *Plant Cell* 4: 1251-1261.

Giraudat J, Parcy F, Bertauche N, Gosti F, Leung J, Morris PC, Bouvier-Durand M and Vartanian N (1994). Current advances in abscisic acid action and signalling. *Plant Mol Biol* 26: 1557-1577.

Gomez-Cardenas A, Verhey SD, Holappa LD, Shen Q, Ho TH and Walker-Simmons MK (1999). An abscisic acid-induced protein kinase, PKABA1, mediates abscisic acid-suppressed gene expression in barley aleurone layers. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 1767-1772.

Görlich D (1997). Nuclear protein import. *Curr Opin Cell Biol* 9: 412-419.

Gosti F, Beaudoin N, Serizet C, Webb A, Vartanian N and Giraudat J (1999). ABI1 protein phosphatase 2C is a negative regulator of abscisic acid signaling. *Plant Cell* 11: 1897-1909.

Grabov A and Blatt MR (1998). Co-ordination of signalling elements in guard cell ion channel control. *J Exp Bot* 49: 351-360.

Guiliano G, Pichersky E, Malik VS, Timko MP, Scolnik P and Cashmore AR (1988). An evolutionarily conserved protein binding sequence upstream of a plant light regulated gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 7089-7093.

Guiltinan MJ and Miller L (1994). Molecular characterization of the DNA binding and dimerization domains of the bZIP transcription factor EmBP-1. *Plant Mol Biol* 26: 1041-1053.

Hardtke CS, Gohda K, Osterlund MT, Oyama T, Okada K and Deng XW (2000). HY5 stability and activity in Arabidopsis is regulated by phosphorylation in its COP1 binding domain. *EMBO J* 19: 4997-5006.

Harley MS, Raikhel S and Raikhel NV (1999). Protein targeting to the nuclear pore. What can we learn from plant? *Plant Physiol* 119: 1157-1163.

- Harter K, Kircher S, Frohnmeyer H, Krenz M, Nagy F and Schäfer E (1994). Light-regulated modification and nuclear translocation of cytosolic G-box binding factors in parsley. *Plant Cell* 6: 545-559.
- Hashimoto Y, Zhang C, Kawauchi J, Imoto I, Adachi MT, Inazawa J, Amagasa T, Hai T and Kitajima S (2002). An alternatively spliced isoform of transcriptional repressor ATF3 and its induction by stress stimuli. *Nuc Ac Res* 30: 2398-2406.
- Hattori T, Vasil V, Rosenkras L, Hannah LC, McCarty DR and Vasil JK (1992). The *viviparous-1* gene and abscisic acid activate the regulatory gene for anthocyanin biosynthesis during seed maturation in maize. *Genes Dev* 6: 609-618.
- Hattori T, Terada T and Hamasuna ST (1994). Sequence and functional analyses of the rice gene homologous to the maize VP1. *Plant Mol Biol* 24: 805-810.
- Heimovaara-Dijkstra S, Mundy J and Wang M (1995). The effect of intracellular pH on the regulation of the Rab 16A and the α -amylase 1/6-4 promoter by abscisic acid and gibberellin. *Plant Mol Biol* 27: 815-820.
- Hill A, Nantel A, Rock C and Quatrano R (1996). A conserved domain of the Viviparous-1 gene product enhances the DNA binding activity of the bZIP protein EmBP-1 and other transcription factors. *J Biol Chem* 271: 3366-3374.
- Himmelbach A, Iten M and Grill E (1998). Signalling of abscisic acid to regulate plant growth. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 353: 1439-1444.
- Hirayama T, Ohto C, Mizoguchi T and Shinozaki D (1995). A gene encoding a phosphatidylinositol-specific phospholipase C is induced by dehydration and salt stress in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 3903-3907.
- Hobo T, Howyama Y and Hattori T (1999). A bZIP factor, TRAB1, interacts with VP1 and mediates abscisic acid-induced transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 15348-15353.
- Holdsworth M, Lenton J, Flintham J, Gale M, Kurup S, McKibbin R, Bailey P, Larner V and Russel L (2001). Genetic control mechanisms regulating the initiation of germination. *J Plant Physiol* 158: 439-445.
- Horard B, Tatout C, Poux S and Pirrotta V (2000). Structure of a Polycomb response element and in vitro binding of polycomb group complexes containing GAGA factor. *Mol Cell Biol*. May: 3187-3197.

Bibliografía

- Hugouvieux V, Kwak J and Schroeder J (2001). A mRNA cap binding protein, ABH1, modulates early abscisic acid signal transduction in *Arabidopsis*. *Cell* 106: 477-487.
- Hwang I and Goodman HM (1995). An *Arabidopsis thaliana* rod-specific kinase homologue is induced by dehydration, ABA and NaCl. *Plant Journal* 8: 37-43.
- Hughes DW and Galau GA (1991). Developmental and environmental induction of *Lea* and *LeaA* mRNAs and the postabscission program during embryo culture. *Plant Cell* 3, 606-618.
- Imay R, Moses MS and Bray EA (1995). Expression of an ABA-induced gene of tomato in transgenic tobacco during periods of water deficit. *J Exp Bot* 46: 1077-1084.
- Ingram J and Bartels D (1996). The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annu rev Plant Physiol. Plant Mol Biol* 47: 377-403.
- Iwasaki T, Yamaguchi-Sinozaki K and Shinozaki K (1995). Identification of a cis-regulatory region of a gene in *Arabidopsis thaliana* whose induction by dehydration is mediated by abscisic acid and requires protein synthesis. *Mol Gen Genet* 247: 391-398.
- Izawa T, Foster R and Chua N-H (1993). Plant bZIP protein DNA binding specificity. *J Mol Biol.* 230: 1131-1144.
- Jacob T, Ritchie S, Assmann S and Gilroy S (1999). Abscisic acid signal transduction in guard cells is mediated by phospholipase D activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 12192-12197.
- Jakoby M, Weisshaar B, Dröge-Laser W, Vicente-Carbajosa J, Tiedemann J, Kroj T and Parcy F (2002). bZIP transcription factors in *Arabidopsis*. *Trends Plant Sci* 7: 106-111.
- Jans DA (1995). The regulation of protein transport to the nucleus by phosphorylation. *Biochem J* 311: 705-716.
- Jeannette E, Rona J-P, Bardat F, Cornel D, Sotta B and Miginiac E (1999). Induction of RAB18 gene expression and activation of K⁺ outward rectifying channels depend on extracellular perception of ABA in *Arabidopsis thaliana* suspension cells. *Plant J* 18: 13-22.
- Jiang-QW, Oono K and Imai R (2002). Two novel mitogen-activated protein signaling components, OsMEK1 and OsMAP1, are involved in a moderate low-temperature signaling pathway in rice. *Plant physiol* 129: 1880-1891.

Jones HD, Peters NCB and Holdsworth MJ (1997). Genotype and environment interact to control dormancy and differential expression of the VIVIPAROUS 1 homologue in embryos of *Avena fatua*. Plant J 12: 911-920.

Karssen C, Brinkhorst-van der Swan D, Breeklund A and Koornneef M (1983). Induction of dormancy during seed development by endogenous abscisic acid: Studies of abscisic acid deficient genotypes of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Planta 157: 158-165.

Kao C-Y, Cocciolone SM, Vasil IK and McCarty DR (1996). Localization and interaction of the cis-acting elements for abscisic acid, VIVIPAROUS1, and light activation of the C1 gene of maize. Plant Cell 8: 1171-1179.

Kim BT, Min YK, Asami T, Park NK, Kwon OY, Cho KY and Yoshida S (1999). 2-Fluoroabscisic acid analogs: Their synthesis and biological activities. J Agric Food Chem 47: 313-317.

Kim SY, Chung HJ and Thomas TL (1997). Isolation of a novel class of bZIP transcription factors that interact with ABA-responsive and embryo-specification elements in the *Dc3* promoter using a modified yeast one-hybrid system. Plant J 11:1237-1251.

Kim SY and Thomas TL (1998). A family of novel basic leucine zipper proteins binds to seed-specification elements in the carrot *Dc3* gene promoter. J Plant Physiol 152: 607-613.

Kircher S, Wellmer F, Nick P, Rügner A, Schäfer E and Harter K (1999). Nuclear import of the parsley bZIP transcription factor CPRF2 is regulated by phytochrome photoreceptors. J Cell Biol 144: 201-211.

Kizis D and Pages M (2002). Maize DRE-binding proteins DBF1 and DBF2 are involved in *rab17* regulation through the drought-responsive element in an ABA- dependent pathway. Plant J 30: 679-689.

Kizis D. Tesis doctoral (2001). Isolation and characterization of transcription factors that interact with the DRE2 cis-element from the promoter of the *rab17* gene from maize.

Klein TM, Wolf ED, Wu R and Sanford JC (1987). High velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. Nature 327, 70-73.

Klimczak LJ, Schindler U and Cashmore AR (1992). DNA binding activity of Arabidopsis G-box binding factor GBF1 is stimulated by phosphorylation by casein kinase II from broccoli. Plant Cell 4: 87-98.

Bibliografia

Köhler JJ, Metallo SJ, Schneider TL and Schepartz A (1999). DNA specificity enhanced by sequential binding of protein monomers. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 11735-11739.

Koornneef M, Jorna ML, Brinkhorst-van der Swan DLC and Karssen CM (1982). The isolation of abscisic acid (ABA) deficient mutants by selection of induced revertants in non-germinating gibberellin sensitive lines of *Arabidopsis thaliana* (L.). *Heynh Theor Appl Genet* 61: 385-393.

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

Kovtun Y, Chiu W-L, Tena G and Sheen J (2000). Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 2940-2945.

Kozmik Z, Kurzbauer R, Dörfler P and Busslinger M (1993). Alternative splicing of *Pax-8* gene transcripts is developmentally regulated and generates isoforms with different transactivation properties. *Mol Cel Biol Oct*: 6024-6035.

Kurup S, Jones H and Holdsworth M (2000). Interactions of the developmental regulator ABI3 with proteins identified from developing *Arabidopsis* seeds. *Plant J* 21: 143-155.

Lam E and Chua N-H (1991). Tetramer of a 21-base pair synthetic element confers seed expression and transcriptional enhancement in response to water stress and abscisic acid. *J Biol Chem* 266: 17131-17135.

Leckie CP, McAinsh MR, Allen GJ, Sanders D and Hetherington AM (1998). Abscisic acid-induced stomatal closure mediated by cyclic ADP-ribose. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 15837-15842.

Lee Y-H and Chun J-Y (1998). A new homeodomain-leucine zipper gene from *Arabidopsis thaliana* induced by water stress and abscisic acid treatment. *Plant Mol Biol* 37: 377-384.

Lemichez E, Wu Y, Sanchez JP, Mettouchi A, Mathur J and Chua N-H (2001). Inactivation of AtRac1 by abscisic acid is essential for stomatal closure. *Genes Dev* 15: 1808-1816.

Leube MP, Grill E and Amrhein N (1998). ABI1 of *Arabidopsis* is a protein serine/threonine phosphatase highly regulated by the proton and magnesium ion concentration. *FEBS Lett* 424: 100-104.

Leyman B, Geelen D and Blatt MR (2000). Localization and control of expression of Bt-Syr1, a tobacco snare protein. *Plant J* 24: 369-381.

Leyman B, Geelen D, Quintero FJ and Blatt MR (1999). A tobacco syntaxin with a role in hormonal control of guard cell ion channels. *Science* 283: 537-540.

Li H, Shen JJ, Zheng ZL, Lin YK and Yang ZB (2001). The rop GTPase switch controls multiple developmental processes in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 126: 670-684.

Li J, Wang X-Q, Watson MB and Assmann SM (2000). Regulation of abscisic acid-induced stomatal closure and anion channels by guard cell AAPK kinase. *Science* 287: 300-303.

Li Y and Walton DC (1990). Violaxanthin is an abscisic acid precursor in water-stressed dark-grown bean leaves. *Plant Physiol* 92: 551-559.

Liu J-H, Luo M, Cheng K-J, Mohapatra SS and Hill RD (1999). Identification and characterization of a novel barley gene that is ABA-inducible and expressed specifically in embryo and aleurone. *J Exp Bot* 50: 727-728.

Liu J and Zhu JK (1998). A calcium sensor homolog required for plant salt tolerance. *Science* 280: 1943-1945.

Liu XJ and Lam E (1998). Two binding sites for the plant transcription factor ASF-1 can respond to auxin treatment in transgenic tobacco. *J. Biol. Chem.* 269: 668-675.

Liu ZB, Hagen G and Guilfoyle TJ (1997). A G-box binding protein from soybean binds to the E1 auxin-response element in the soybean GH3 promoter and contains a proline-rich repression domain. *Plant Physiol* 115: 397-407.

Lohmer S, Maddaloni M, Motto M, Salamini F and Thompson RD (1993). *Plant Cell* 5: 65-73.

Lopez-Molina L and Chua N-H (2000). A null mutation in a bZIP factor confers ABA-insensitivity in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 41: 541-547.

Lopez-Molina L, Mongrand S and Chua N-H (2001). A postgermination developmental arrest checkpoint is mediated by abscisic acid and requires ABI5 transcription factor in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 4782-4787.

Lotan T, Ohto M-A, Yee KM, West MAL LoR, Kwong RW, Yamagishi K, Fischer RL, Goldberg RB and Harada JJ (1998). *Arabidopsis* LEAFY COTYLEDON1 is sufficient to induce embryo development in vegetative cells. *Cell* 93: 1195-1205.

Bibliografía

Lu C and Fedoroff N (2000). A mutation in the Arabidopsis HYL1 gene encoding a dsRNA binding protein affects responses to abscisic acid, auxin, and cytokinin. *Plant Cell* 12: 2351-2365.

Lu G, Paul A-L, McCarty DR and Ferl RJ (1996). Transcription factor veracity: Is GBF3 responsible for ABA-regulated expression of Arabidopsis *Adh*? *Plant Cell* 8: 847-857.

Luerssen H, Kirik V, Herrmann P and Misera S (1998). FUSCA3 encodes a protein with a conserved VP1/ABI3-like B3 domain which is of functional importance for the regulation of seed maturation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 15: 755-764.

Marcotte WDJr, Russel SH and Quatrano RS (1989). Abscisic acid-responsive sequences from the *Em* gene of wheat. *Plant Cell* 1: 969-976.

Marin E, Nussaume L, Quesada A, Gonneau M, Sotta B, Huguency P, Frey A and Marion-Poll A (1996). Molecular identification of zeaxanthin epoxidase of *Nicotiana plumbaginifolia*, a gene involved in abscisic acid biosynthesis and corresponding to the ABA locus of *Arabidopsis thaliana*. *EMBO J* 15: 2331-2342.

Martin ML and Busconi L (2001). A rice membrane-bound calcium-dependent protein kinase is activated in response to low temperature. *Plant Physiol* 125: 1442-1449.

McCarty DR (1995). Genetic control and integration of maturation and germination pathways in seed development. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 46: 71-93.

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

McCourt P (1999). Genetic analysis of hormone signaling. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 50: 219-243.

McKendree WL, Jr, And Ferl RJ (1992). Functional elements of the Arabidopsis *Adh* promoter include the G-box. *Plant Mol Biol* 19: 859-862.

Meimoun A, Holtzman T, Weissman Z, McBride HJ, Stillman DJ, Fink GR and Kornitzer D (2000). Degradation of the transcription factor Gcn4 requires the kinase Pho85 and the SCF^{CDC4} ubiquitin-ligase complex. *Mol Biol Cell* 11: 915-927.

Merlot S, Gosti F, Guerrier D, Vavasseur A and Giraudat J (2001). The ABI1 and ABI2 protein phosphatases 2C act in a negative feedback regulatory loop of the abscisic acid signalling pathway. *Plant J* 25: 295-303.

Meshi T, Moda I, Minami M, Okanami M and Iwabuchi M (1998). Conserved Ser residues in the basic region of the bZIP-type transcription factor HBP-1 α (17): importance in DNA binding and possible targets for phosphorylation. *Plant Mol Biol* 36: 125-136.

Metallo SJ and Schepartz A (1997). Certain bZIP peptides bind DNA sequentially as monomers and dimerize on the DNA. *Nat Struct Biol* 4: 115-117.

Morris AE, Kloss B, McChesney RE, Bancroft C and Chasin LA (1992). An alternatively spliced Pit-1 isoform altered in its ability to trans-activate. *Nuc Ac Res* 20: 1355-1361.

Mundy J, Yamaguchi-Shinozaki K and Chua N-H (1990). Nuclear proteins bind conserved elements in the abscisic acid-responsive promoter of a rice RAB gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 1406-1410.

Mustilli AC, Merlot S, Vavasseur A, Fenzi F and Giraudat J (2002). Arabidopsis OST1 protein kinase mediates the regulation of stomatal aperture by abscisic acid and acts upstream of reactive oxygen species production. *Plant Cell* 14: 3089-3099.

Nagatani A (1998). Regulated nuclear targeting. *Curr Opin Plant Biol* 1: 470-474.

Nakagawa D, Ohmiya K and Hattori T (1996). A rice bZIP protein, designated OSBZ8, is rapidly induced by abscisic acid. *Plant J* 9: 217-227.

Nakayama T, Okanami M, Meshi T and Iwabuchi M (1997). Dissection of the wheat transcription factor HBP-1 α (17) reveals a modular structure for the activation domain. *Mol Gen Genet* 253: 553-561.

Nantel A & Quatrano RS (1996). Characterization of three rice basic/leucine zipper factors, including two inhibitors of EmBP-1 DNA binding activity. *J Biol Chem* 271: 31296-31305.

Neill SJ, Horgan R and Rees AF (1978). Seed development and vivipary in *Zea mays* L. *Planta* 171: 358-364.

Ng CK-Y, Carr K, McAinsh MR, Powell B and Hetherington AM (2001). Drought-induced guard cell signal transduction involves sphingosine-1-phosphatase. *Nature* 410: 596-599.

Bibliografia

- Niu X and Guiltinan MJ (1994). DNA binding specificity of the wheat bZIP protein EmBP-1. *Nucleic Acids Res* 22: 4969-4978.
- Niu X, Renshaw-Gegg L, Miller L and Guiltinan MJ (1999). Bipartite determinants of DNA binding specificity of plant basic leucine zipper proteins. *Plant Mol Biol* 41: 1-13.
- Niu X, Helentjaris T and Bate NJ (2002). Maize ABI4 binds coupling element 1 in abscisic acid and sugar response genes. *Plant Cell* 14: 2565-2575.
- Oeda K, Salinas J and Chua N-H (1991). A tobacco bZIP transcription activator (TAF-1) binds to a G-box-like motif conserved in plant genes. *EMBO J.* 10: 1793-1802.
- Okanami M, Mexhi T, Tamai H and Iwabuchi M (1996). HALF-1, a bZIP-type protein, interacting with the wheat transcription factor HBP-1 α contains a novel transcriptional activation domain. *Genes Cell* 1: 87-99.
- Ono A, Izawa T, Chua N-H and Shimamoto K (1996). The rab16B promoter of rice contains two distinct abscisic acid-responsive elements. *Plant Physiol* 112: 483-491.
- O'Shea EK, Klemm JD, Kim P and Alber T (1991). X-ray structure of the GCN4 leucine zipper, a two-stranded, parallel coiled coil. *Science* 254: 539-544.
- Parcy F, Valon C, Raynal M, Gaubier-Comella P, Delseny M and Giraudat J (1994). Regulation of gene expression programs during *Arabidopsis* seed development: Roles of the *ABI3* locus and of endogenous abscisic acid. *Plant Cell* 6: 1567-1582.
- Parry AD, Blonstein AD, Babiano MJ, King PJ and Horgan R (1991). Abscisic acid metabolism in a wilty mutant of *Nicotiana plumbaginifolia*. *Planta* 191: 123-138.
- Pei Z, Murata Y, Benning G, Thomine S, Klusener B, Allen G, Grill E and Schroeder J (2000). Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signalling in guard cells. *Nature* 406: 731-734.
- Pla M, Goday A, Vilardell J, Gómez J and 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.
- Pla M, Gómez J, Goday A and Pagès M (1991). Regulation of the abscisic acid-responsive gene *rab28* in maize *viviparous* mutants. *Mol Gen Genet* 230: 394-400.

Pla M, Vilardell J, Gultinan MJ, Marcotte WR, Niogret MF, Quatrano RS and Pages M (1993). The cis-regulatory element CCACGTGG is involved in ABA and water-stress responses of the maize gene *rab28*. *Plant Mol Biol* 21: 259-266.

Plant AL, Cohen A, Moses MS and Bray EA (1991). Nucleotide sequence and spatial expression pattern of a drought- and ABA-induced gene of tomato. *Plant Physiol* 97: 900-906.

Pysh LD, Aukerman MJ and Schmidt RJ (1993). OHP1: a maize basic domain/leucine zipper protein that interacts with *Opaque2*. *Plant Cell* 5: 227-236.

Quatrano RS (1996). Regulation of *Em* gene expression: The role of ABA and regulatory factors. In *Workshop on Abscisic Acid Signal Transduction in Plants*. Instituto Juan March de Estudios e Investigaciones. Madrid. Spain.

Radin JW (1992). Reconciling water-use efficiencies of cotton in field and laboratory. *Crop Sci* 32: 13-18.

Raz V, Bergervoet J and Koornneef M (2001). Sequential steps for developmental arrest in *Arabidopsis* seeds. *Development* 128: 243-252.

Riechmann J et al (2000). *Arabidopsis* transcription factors: Genome-wide comparative analysis among eukaryotes. *Science* 290: 2105-2110.

Riera M, Peracchia G and Pagès M (2001). Distinctive features of plant protein kinase CK2. *Mol Cell Biochem.* 227(1-2):119-27.

Ritchie S and Gilroy S (1998). Abscisic acid signal transduction in the barley aleurone is mediated by phospholipase D activity- *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 2697-2702.

Ritchie S and Gilroy S (2000). Abscisic acid stimulation of phospholipase D in the barley aleurone is G-protein-mediated and localized to the plasma membrane. *Plant Physiol* 124: 693-702.

Robichaud CS, Wong J and Sussex IM (1980). Control of *in vitro* growth of *viviparous* embryo mutants of maize by abscisic acid. *Dev Genet* 1: 325-330.

Rock C (2000). Pathways to abscisic acid-regulated gene expression. *New Phytol* 148: 357-396.

Bibliografía

Rohde A, Ardiles-Diaz W, Van Montagu M and Boerjan W (1998). Isolation and expression analysis of an ABSCISIC ACID-INSENSITIVE 3 (ABI3) homologue from *Populus trichocarpa*. *J Exp Bot* 49: 1059-1060.

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

Rook F, Corke F, Card R, Munz G, Smith C and Bevan MW (2001). Impaired sucrose-induction mutants reveal the modulation of sugar-induced starch biosynthetic gene expression by abscisic acid signalling. *Plant J* 26: 421-433.

Rosahl S, Schmidt R, Schell J and Willmitzer L (1986). Isolation and characterization of a gene from *Solanum tuberosum* encoding patatin, the major storage protein of tomato tubers. *Mol Gen Genet* 203: 214-220.

Sanchez J-P and Chua N-H (2001). *Arabidopsis* PLC1 is required for secondary responses to abscisic acid signals. *Plant Cell* 13: 1143-1154.

Sanchez-Martinez D, Puigdomenech P and Pages M (1986). Regulation of gene expression in developing *Zea mays* embryos. Protein synthesis during embryogenesis and early germination of maize. *Plant Physiol* 82: 543-549.

Sambrook J, Fritsch E and Maniatis TI (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual*, Ed. 2 ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Schaeffer HJ and Weber MJ (1999). Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. *Mol Cell Biol* 19: 2435-2444.

Schindler U, Terzaghi W, Beckmann H, Kadesch T and Cashmore AR (1992a). DNA binding site preferences and transcriptional activation properties of the *Arabidopsis* transcription factor GBF1. *EMBO J* 11: 1275-1289.

Schindler U, Menkens AE, Beckmann H, Ecker JR, Cashmore, AR (1992b). Heterodimerization between light-regulated and ubiquitously expressed *Arabidopsis* GBF bZIP proteins. *EMBO J* 11: 1261-1273.

Schroeder J, Allen G, Hugouvieux V, Kwak J and Waner D (2001). Guard cell signal transduction. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 52: 627-658.

Schultz TF, Medina J, Hill A and Quatrano RS (1998). 14-3-3 proteins are part of an abscisic acid-VIVIPAROUS1 (VP1) response complex in the Em promoter and interact with VP1 and EmBP1. *Plant Cell* 10: 837-847.

Schultz TF and Quatrano RS (1997). Evidence for surface perception of abscisic acid by rice suspension cells as assayed by Em gene expression. *Plant Sci* 130: 63-71.

Schwartz A, Wu W-H, Tucker EB and Assmann SM (1994). Inhibition of inward K⁺ channels and stomatal response by abscisic acids: An intracellular locus of phytohormone action. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 4019-4023.

Schwartz SH, Tan BC, Cage DA, Zeevaart JAD and McCarty DR (1997). Specific oxidative cleavage of carotenoids by VP14 of maize. *Science* 276: 1872-1874.

Schwartz SH, Zeevaart JD, Léon-Kloosterziel KM and Koornneef M (1996). Biochemical characterization of the *aba2* and *aba3* mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol Suppl* 111: 111.

Seo M, Peeters A, Koiwai H, Oritani T, Marion-Poll A, Zeevaart J, Koornneef M, Kamiya Y and Koshiba T (2000). The *Arabidopsis* aldehyde oxidase 3 (AAO3) gene product catalyzes the final step in abscisic acid biosynthesis in leaves. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:12908-12913.

Sheen J (1996). Ca²⁺-dependent protein kinases and stress signal transduction in plants, *Science* 274: 1900-1903.

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

Shen Q, Zhang P and Ho T-HD (1996). Modular nature of abscisic acid (ABA) response complexes: Composite promoter units that are necessary and sufficient for ABA induction of gene expression in barley. *Plant cell* 8:1107-1119.

Shinozaki K and Yamaguchi-Shinozaki (2000). Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways. *Curr Op Plant Biol* 3: 217-223.

Bibliografía

Shiota H, Satoh R, Watabe K-I, Harada H and Kamada H (1998). C-ABI3, the carrot homologue of the Arabidopsis ABI3 is expressed during both zygotic and somatic embryogenesis and functions in the regulation of embryogenesis-specific ABA-inducible genes. *Plant Cell Physiol* 39: 1184-1193.

Shoji K, Iwasaki T, Matsuki R, Miiyao M and Yamamoto N (1998). Cloning of α cDNA encoding an importin-alpha and up-regulation of the gene by light in rice leaves. *Gene* 212: 279-286.

Skriver K and Mundy J (1990). Gene expression in response to abscisic acid and osmotic stress. *Plant Cell* 2: 503-512.

Smith HMS and Raikhel NV (1998). Nuclear localization signal receptor importin α associates with the cytoskeleton. *Plant Cell* 10: 1791-1799.

Smith HMS and Raikhel NV (1999). Protein targeting to the nuclear pore. What can we learn from plants? *Plant Physiol* 119: 1157-1163.

Söderman E, Mattsson J and Engstrom P (1996). The Arabidopsis homeobox gene *ATHB-7* is induced by water deficit and by abscisic acid. *Plant J* 10: 375-381.

Söderman E, Hjellstrom M, Fahleson J and Engstrom P (1999). The HD-Zip gene *ATHB6* in Arabidopsis is expressed in developing leaves, roots and carpels and up-regulated by water deficit conditions. *Plant Mol Biol* 40: 1073-1083.

Söderman e, Brocard I, Lynch T and Finkelstein R (2000). Regulation and function of the Arabidopsis *ABA-insensitive4 (ABI4)* gene in seed and ABA response signaling networks. *Plant Physiol* 124: 1752-1765.

Steber C and McCourt P (2001). A role for brassinosteroids in germination in Arabidopsis. *Plant Physiol* 125: 763-769.

Stockinger EJ, Gilmour SJ and Thomashow MF (1997). *Arabidopsis thaliana* CBF1 encodes an AP2 domain-containing transcriptional activator that binds to the C-repeat/DRE, a cis acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 1035-1040.

Stone SL, Kwong LW, Yee KM, Pelletier J, Lepiniec L, Fischer RL, Goldberg RB and Harada JJA (2001). LEAFY COTYLEDON2 encodes a B3 domain transcription factor that induces embryo development. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 11806-11811.

Suckow M, von Wilcken-Bergmann B and Müller-Hill B (1993). Identification of three residues in the basic regions of the bZIP proteins GCN4, C/EBP and TAF-1 that are involved in specific DNA binding. *EMBO J* 12: 1193-1200.

Sutton F, Paul SS, Wang X-Q and Assmann SM (2000). Distinct abscisic acid signaling pathways for modulation of guard cell versus mesophyll cell potassium channels revealed by expression studies in *Xenopus laevis* oocytes. *Plant Physiol* 124: 223-230.

Suzuki M, Kao CY and McCarty Dr (1997). The conserved B3 domain of VIVIPAROUS1 has a cooperative DNA binding activity. *Plant Cell* 9: 799-807.

Takaishi H, Konishi H, Hidenori M, Ono Y, Shirai Y, Saito N, Kitamura T, Ogawa W, Kasuga M, Kikkawa U and Nishizuka Y (1999). Regulation of nuclear translocation of forkhead transcription factor AFX by protein kinase B. *PNAS* 96: 11836-11841.

Tamai H, Iwabuchi M and Meshi T (2002). Arabidopsis GARP transcriptional activators interact with the Pro-rich activation domain shared by G-box-binding bZIP factors. *Plant Cell Physiol* 43: 99-107.

Taylor IB, Linfoth RST, Al-Naieb RJ, Bowman WR and Marples BA (1988). The wilted tomato mutants *flacca* and *sitiens* are impaired in the oxidation of ABA-aldehyde to ABA. *Plant Cell Environ* 11: 739-745.

Terzaghi WB, Bertekap RL and Cashmore AR (1997). Intracellular localization of GBF proteins and blue light-induced import of GBF2 fusion proteins into the nucleus of cultured Arabidopsis and soybean cells. *Plant J* 11: 967-982.

Thomas GH and Elgin SCR (1988). Protein/DNA architecture of the Dnase I hypersensitive region of the *Drosophila* hsp26 promoter. *EMBO J* 7: 2191-2201.

Ullah H, Chen J-G, Young J, Im K-H, Sussman M and Yones A (2001). Modulation of cell proliferation by heterotrimeric g protein in Arabidopsis. *Science* 292: 2066-2069.

Uno Y, Furihata T, Abe H, Yoshida R, Shinozaki K and Yamaguchi-Shinozaki K (2000). Arabidopsis basic leucine zipper transcription factors involved in an abscisic acid-dependent signal transduction pathway under drought and high-salinity conditions. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 11632-11637.

Urao T, Yamaguchi-Shinozaki K, Urao S and Shinozaki K (1993). An Arabidopsis myb homolog is induced by dehydration stress and its gene product binds to the conserved MYB recognition sequence. *Plant Cell* 5: 1529-1539.

Bibliografia

Van der Krol AR and Chua N-H (1991). The basic domain of plant bZIP proteins facilitates import of a reporter protein into plant nuclei. *Plant Cell* 3:667-675.

Varagona MJ, Schmidt RJ and Raikhel NV (1992). Nuclear localization signal(s) required for nuclear targeting of the maize regulatory protein Opaque-2. *Plant Cell* 4: 1213-1227.

Varagona MJ and Raikhel NV (1994). The basic domain in the bZIP regulatory protein Opaque2 serves two independent functions: DNA binding and nuclear localization. *Plant J* 5: 207-214.

Varagona MJ, Schmidt RJ and Raikhel NV (1992). Nuclear localization signal(s) required for nuclear targeting of the maize regulatory protein Opaque-2. *Plant Cell* 4: 1213-1227.

Vasil V, Marcotte WRJr, Rosenkrans L, Cocciolone SM, Vasil JK, Quatrano RS and McCarty R (1995). Overlap of Viviparous 1 (VP1) and abscisic acid response elements in the *Em* promoter: G-box elements are sufficient but not necessary for VP1 transactivation. *Plant Cell* 7: 1511-1518.

Vega-Palas MA and Ferl RJ (1995). The Arabidopsis Adh gene exhibits diverse nucleosome arrangements within a small Dnase I-sensitive domain. *Plant Cell* 7: 1923-1932.

Vetten NC & Ferl RJ (1995). Characterization of a maize G-box binding factor that is induced by hypoxia. *Plant J* 7 : 589-601.

Vettore AL, Yunes JA, Neto GC, Silva MJ, Arruda P and Leite A (1998). The molecular and functional characterization of an Opaque2 homologue gene from Coix and a new classification of plant bZIP proteins. *Plant Mol Biol* 36: 249-263.

Virbasius C-M, Wagner S and Green MR (1999). A human nuclear-localized chaperone that regulates dimerization, DNA binding and transcriptional activity of bZIP protein. *Mol Cell* 4: 219-228.

Walker-Simmons M, Kudrna DA, Warner RL (1989). Reduced accumulation of ABA during water stress in a molybdenum cofactor mutant of barley. *Plant Physiol* 90: 728-733.

Wang H, Qi Q, Schorr P, Cutler AJ, Crosby W and Fowke LC (1998). ICK1, a cyclin-dependent protein kinase inhibitor from *Arabidopsis thaliana* interacts with both Cdc2 α and CycD3, and its expression is induced by abscisic acid. *Plant J* 15: 501-510.

Wang X-Q, Ullah H, Jones A and Assmann S (2001). G protein regulation of ion channels and abscisic acid signaling in *Arabidopsis* guard cells. *Science* 292: 2070-2072.

- Webb AAR, Larman MG, Montgomery LT, Taylor JE and Hetherington AM (2001). The role of calcium in ABA-induced gene expression and stomatal movements. *Plant J* 26: 351-362.
- Weisshaar B, Armstrong GA, Block A, Da Costa e Silva O, and Hahlbrock K (1991). Light-inducible and constitutively expressed DNA-binding proteins recognizing a plant promoter element with functional relevance in light responsiveness. *EMBO J* 10: 1777-1786.
- Wellmer F, Schäfer E and Harter K (2001). The DNA binding properties of the parsley bZIP transcription factor CPRF-4a are regulated by light. *J Biol Chem* 276: 6274-6279.
- White CN, Proebsting WM, Hedden P and Rivin CJ (2000). Gibberellins and seed development in maize. Evidence that gibberellin/abscisic acid balance governs germination versus maturation pathways. *Plant Physiol.* 122: 1082-1088.
- Williams T and Tjian R (1991). Analysis of the DNA binding and properties of the human transcription factor AP-2. *Genes Dev* 5: 670-682.
- Wu Y, Kuzma J, Marechal E, Craeff R, Lee HC, Foster R and Chua N-H (1997). Abscisic acid signaling through cyclic ADP-ribose in plants. *Science* 278: 2126-2130.
- Xiong L, Ishitani M and Zhu J-K (1999). Interaction of osmotic stress, temperature and abscisic acid in the regulation of gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 119: 205-211.
- Xiong LL, Ishitani M, Lee H, Zhang C and Zhu J-K (2001a). The *Arabidopsis LOS5/ABA3* locus encodes a molybdenum cofactor sulfurase and modulates cold and osmotic stress responsive gene expression. *Plant Cell* 13: 2063-2083.
- Xiong LL, Lee BH, Ishitani M, Lee H, Zhang C and Zhu JK (2001b). FIERY1 encoding an inositol polyphosphatase 1-phosphatase is a negative regulator of abscisic acid and stress signaling in *Arabidopsis*. *Genes Dev* 15: 1971-1984.
- Xiong L, Lee H, Ishitani M and Zhu JK (2002a). Regulation of osmotic stress-responsive gene expression by the *LOS6/ABA1* locus in *Arabidopsis*. *J Biol Chem* 277: 8588-8569.
- Xiong L, Schumaker KS and Zhu JK (2002b). Cell signaling during cold, drought and salt stress. *Plant Cell supplement*, S165-S183.
- Yamaguchi Y, Wada T, Suzuki F, Takagi T, Hasegawa J and Handa H (1998). Casein kinase II interacts with bZIP domains of several transcription factors. *Nucleic Acids Res* 26: 3854-3861.

Bibliografia

Yamaguchi-Shinozaki K and Shinozaki K (1993). A novel *cis*-acting element in an *Arabidopsis* gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress. *Plant Cell* 6: 251-264 (1994).

Yang Z (2002). Small GTPases: Versatile signaling switches in plants. *Plant Cell* 14 (suppl.) S375-S388.

Zeevaart JAD and Creelman RA (1988). Metabolism and physiology of abscisic acid. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 39: 439-473.

Zhang S, Jin C-D and Roux SL (1993). Casein kinase II-type protein kinase from Pea cytoplasm and its inactivation by alkaline phosphatase in vitro. *Plant Physiol* 103: 955-962.

Zheng Z, Jin Z, Xia K, Zhou X and Ma C (1998). An ABA-binding protein with nucleic acid-binding properties. *Sci China Ser C Life Sci* 41: 209-216.