



DIPARTIMENTO DI AGROBIOLOGIA E AGROCHIMICA

DOTTORATO DI RICERCA IN BIOTECNOLOGIE VEGETALI

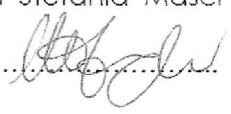
XXIII Ciclo.

ANALISI FUNZIONALE DI UN PROMOTORE *HEAT SHOCK* DI GIRASOLE E SUE
APPLICAZIONI BIOTECNOLOGICHE

BIO/13

Coordinatore:

Prof.ssa Stefania Masci

Firma 

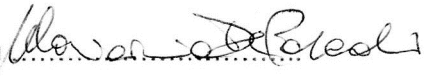
Tutor:

Prof.ssa Carla Perrotta

Firma 

Dottoranda:

Mariarosaria De Pascali

Firma 

ABSTRACT

Plants respond to environmental stimuli, such as heat shock, by re-programming cellular activity, mainly regulated at transcription level, that activate genes encoding specific proteins (HSP). The object of this work is the analysis of genomic DNA region spanning the two sunflower small HSP genes (*HaHSP17.6a* and *HaHSP17.6b*); these genes are physically associated, arranged in tandem in head-to-head orientation and linked by a 3809 bp region. The regions encoding for these two genes show only slight structural differences, in fact they differ for only 30 nucleotides, which give a eight aminoacid substitution in the deduced aminoacidic sequence. However, they have a very different expression profile, probablis due to the fact that they are differently regulated, because of differences into their promoters. By comparison of the intergenic region sequence with PLACE and PlantCARE databases, it has been possible to definine the structure of this region containing characteristic elements of plant HS promoters (TATA box, HSE, CCAAT box) and other stress related *cis*-acting elements. These elements are present in different number and positions in the upstream regions of the two genes and this could explain the differences in their of HS response to different stresses. Functional analysis by progressive deletions of the upstream region of the more responsive gene, *HaHSP17.6b*, was performed in order to verify the functional role of the *cis* acting elements identified. Using *GFP* as reporter gene different recombinant plasmids ware produced containing the fragments obtained by progressive deletions of the region of interest. The recombinant plasmid collection was used to carry out transient expression assays in *N. tabacum* protoplasts, subjected to the various stresses.

The data obtained indicate that *GFP* gene expression is induced not only in response to heat shock, but also under heavy metal, NaCl, cold and abscissic acid stresses. The higher expression of *GFP* is obtained when it is under the control of the whole upstream region (1682) of *HaHSP17.6b*. However the transcription level does not decrease significantly when constructs with partial parts of the upstream region are used. Interestingly the expression level obtained with HS promoter is comparable with that of the CaMV35S strong promoter. Thus, the HS promoter acts as a strong promoter but it has the ability to further increase transcription activity in response to different environmental stimuli. This indicates that the *HaHSP17.6b* promoter could be in the future utilised as a powerful biotechnological tool for instance to produce a biosensor for environmental monitoring.

RIASSUNTO

Le piante rispondono agli stimoli ambientali, come lo stress da alte temperature (HS), mediante una riprogrammazione delle attività cellulari, regolata principalmente a livello trascrizionale, che prevede l'attivazione di geni che codificano per proteine specifiche (HSP). Oggetto di questo lavoro è l'analisi della regione di DNA genomico compresa tra due geni di girasole (*HaHSP17.6a* e *HaHSP17.6b*), che codificano per due HSP a basso peso molecolare, associati fisicamente, con orientamento invertito e separati da una regione intergenica di 3809 bp. Le regioni codificanti dei due geni presentano solo lievi differenze, essi differiscono solo per 30 nucleotidi che nella sequenza aa dedotta danno una sostituzione di solo 8 aa. Tuttavia, essi hanno un profilo di espressione molto differente ciò dipende con molta probabilità dal fatto che sono regolati in maniera diversa a causa di differenze nei loro promotori.

Il confronto della sequenza della regione intergenica con quelle presenti nelle banche dati PLACE e *PlantCARE*, ha reso possibile definire la struttura di questa regione che contiene le sequenze che regolano l'espressione dei due geni.

Mediante l'analisi *in silico* sono stati individuati gli elementi caratteristici dei promotori HS vegetali (TATA box, HSE, CCAAT box) e altri elementi *cis*-agenti coinvolti nella risposta ad altri tipi di stress. Tali elementi sono presenti in numero e in posizioni diverse nelle regioni a monte dei due geni e ciò potrebbe spiegare la notevole diversità nell'inducibilità dei due geni in risposta ai diversi stress. Per verificare il ruolo funzionale delle sequenze identificate è stata quindi effettuata un'analisi funzionale mediante delezioni progressive della regione a monte del gene più responsivo, *HaHSP17.6b*. Sono stati prodotti costrutti contenenti il gene *reporter GFP*, posto sotto il controllo dei frammenti di diversa lunghezza ottenuti dalla regione a monte di *HaHSP17.6b*. Questi plasmidi ricombinanti sono stati utilizzati per effettuare saggi di espressione transiente in protoplasti di *Nicotiana tabacum* sottoposti a stress diversi. I dati ottenuti indicano che l'espressione del gene *GFP* è indotta non solo in risposta alle alte temperature, ma anche in risposta allo stress da metalli pesanti, stress salino, da basse temperature e da acido abscissico. L'incremento dell'espressione di *GFP* è massimo quando esso è posto sotto il controllo di tutta la (1682 bp) a monte del gene *HaHSP17.6b*. Tuttavia il livello di trascrizione non decresce significativamente quando vengono utilizzati i costrutti contenenti porzioni parziali di questa regione.

E' interessante notare che il livello di espressione che si ottiene con il promotore HS è paragonabile a quello ottenuto utilizzando il promotore forte CaMV35S. Il promotore HS quindi si comporta come un promotore forte ma presenta il vantaggio di incrementare ulteriormente l'attività di trascrizione in risposta a stimoli ambientali.

I dati ottenuti indicano le grandi potenzialità del promotore *HaHSP17.6b* nell'ambito biotecnologico, in futuro esso potrebbe infatti essere utilizzato per costruire biosensori per il monitoraggio ambientale.

1	Introduzione	pag. 1
	<i>La risposta agli stress ambientali: meccanismi molecolari</i>	pag. 2
	<i>La risposta Heat Shock</i>	pag. 3
	<i>Heat Shock Protein</i>	pag. 3
	<i>HSP nelle piante</i>	pag. 5
	<i>Heat Shock Protein a basso peso molecolare</i>	pag. 6
	<i>Regolazione dei geni Heat Shock</i>	pag. 7
	<i>Applicazioni Biotecnologiche di Promotori Heat Shock</i>	pag. 13
	<i>Descrizione del clone genomico</i>	pag. 16
	<i>Analisi delle sequenze</i>	pag. 17
	<i>Espressione in vivo dei geni HaHSP17.6a e HaHSP17.6b</i>	pag. 18
2	Scopo della Tesi	pag. 20
3	Materiali e Metodi	pag. 22
	<i>Materiale vegetale</i>	pag. 23
	<i>Preparazione degli acidi nucleici</i>	pag. 23
	<i>Estrazione di RNA totale</i>	pag. 23
	<i>Estrazione di DNA genomico</i>	pag. 24
	<i>Estrazione DNA plasmidico</i>	pag. 25
	<i>Elettroforesi del DNA su gel di agarosio</i>	pag. 27
	<i>Determinazione della concentrazione di DNA e RNA mediante lettura allo spettrofotometro</i>	pag. 28
	<i>Digestione con enzimi di restrizione</i>	pag. 28
	<i>RT-PCR</i>	pag. 29
	<i>Produzione di oligonucleotidi specifici</i>	pag. 31
	<i>Amplificazione del DNA genomico mediante PCR</i>	pag. 32
	<i>Eluizione di frammenti di DNA dal gel di agarosio e purificazione dei prodotti di amplificazione</i>	pag. 32
	<i>Clonaggio di frammenti di DNA nel vettore pGEM®-T EASY</i>	pag. 33
	<i>Preparazione delle cellule competenti</i>	pag. 34
	<i>Trasformazione cellule competenti</i>	pag. 35
	<i>Digestione del DNA plasmidico</i>	pag. 35

	<i>Analisi di sequenza</i>	pag. 36
	<i>Risorse WEB</i>	pag. 36
	<i>Produzione di costrutti ricombinanti</i>	pag. 37
	<i>Procedure sperimentali per la caratterizzazione dei costrutti ottenuti</i>	pag. 39
	<i>Materiale vegetale</i>	pag. 39
	<i>Preparazione dei protoplasti da foglie di N.tabacum</i>	pag. 39
	<i>Trasformazione dei protoplasti</i>	pag. 40
	<i>Trattamenti di stress</i>	pag. 43
4	Risultati	pag. 44
	<i>Analisi strutturale della regione intergenica</i>	pag. 45
	<i>Analisi funzionale della regione intergenica</i>	pag. 50
	<i>Saggi di espressione transiente in protoplasti di N.tabacum</i>	pag. 55
5	Discussione	pag. 67
6	Conclusioni	pag. 75
7	Bibliografia	pag. 77
	Abbreviazioni	pag. 92

1-INTRODUZIONE

LA RISPOSTA AGLI STRESS AMBIENTALI: MECCANISMI MOLECOLARI

Nel corso dell'evoluzione tutti gli organismi hanno sviluppato complessi meccanismi fisiologici e molecolari atti a fronteggiare i cambiamenti ambientali ed a mantenere funzionalità ed efficienza anche in condizioni sfavorevoli. Per adattarsi ad un ambiente variabile gli organismi sono quindi in grado di modificare l'attività dei propri geni, allo scopo di sintetizzare le proteine più adatte a fronteggiare le nuove condizioni, il risultato di questa modificazione rende l'organismo più adeguato a crescere e riprodursi nel nuovo ambiente. Tutto ciò coinvolge la successione di eventi ai quali gli organismi viventi convertono l'informazione contenuta in un gene in una proteina, attraverso una serie di passaggi indicati nel loro insieme come “flusso dell'informazione genica”. Negli eucarioti, questo processo è finemente regolato a livello di ciascuno dei passaggi che lo costituiscono, ciò significa che l'intero processo può essere modificato secondo le necessità ed il momento metabolico dell'organismo stesso; infatti, è noto che la regolazione dell'espressione genica può essere fortemente influenzata dall'interazione con l'ambiente. Nella Figura 1.1 è rappresentata la serie di passaggi che portano dal gene alla proteina, sono indicati i punti di controllo a livello dei quali interviene anche l'interazione con l'ambiente.

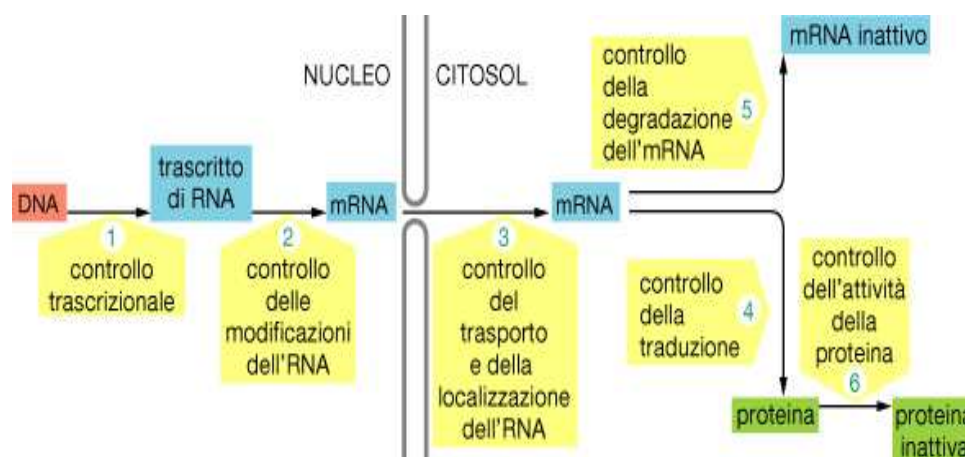


Figura 1.1. Livelli di controllo dell'espressione genica negli eucarioti (da Alberts *et al.*, 2004).

Il punto principale di controllo dell'espressione genica è a livello trascrizionale, riguarda cioè il momento in cui un gene viene trascritto, quando le interazioni tra i fattori di trascrizione e gli elementi *cis* regolatori, presenti nella regione del promotore, rivestono un ruolo di fondamentale importanza (Brivanlou e Darnell, 2002). Sebbene sia stato definito in maniera abbastanza precisa il generale meccanismo di controllo trascrizionale, è chiaro che esistono meccanismi di controllo peculiari di sistemi specifici, per i quali ancora molto deve essere studiato e compreso.

LA RISPOSTA *HEAT SHOCK*

Un esempio di sistema di controllo dell'espressione genica ampiamente studiato è costituito dalla risposta cellulare agli stress abiotici, in particolare alle alte temperature. Gli organismi viventi hanno messo a punto un efficace meccanismo di risposta all'incremento della temperatura che nel suo insieme è indicato come risposta *Heat Shock*. Essa consiste in una rapida riprogrammazione delle attività cellulari; ed è universalmente conservata, cioè presente in tutti gli organismi dai batteri, alle piante, all'uomo; ciò conferma quindi che essa abbia un ruolo essenziale per la sopravvivenza degli organismi esposti alle alte temperature. La riprogrammazione del metabolismo cellulare si attua mediante l'attivazione di geni specifici: i geni *Heat Shock* (HS), che codificano per una particolare classe di proteine: le *Heat Shock Protein* (HSP), chiamate così perché individuate, per la prima volta, come proteine indotte dallo stress termico (Ritossa, 1962), ma successivamente osservate anche in seguito allo stimolo prodotto da altri stress ambientali.

Heat Shock Protein

Le HSP sono proteine altamente conservate a livello cellulare presenti in tutti gli organismi dai batteri all'uomo (Feder e Hofmann, 1999; Morimoto *et al.*, 1990). Esse vengono sintetizzate in risposta a diversi tipi di stress, biotici ed abiotici in grado di provocare alterazioni strutturali e funzionali delle proteine cellulari. Le HSP sono codificate da una famiglia multigenica e sono state classificate in base alla loro omologia di sequenza e al loro peso molecolare (Feder e Hofmann, 1999). Nella Tabella 1.1 è riportata una classificazione delle HSP in base alle dimensioni, alla localizzazione intracellulare ed alla funzione.

Classi	Membri rappresentativi	Localizzazione intracellulare	Principali funzioni
HSP 70 <u>Sottofamiglia:</u> DnaK HSP110/SSE	HSP/HSC70 HSP70 Bip HSP91	Citosol Cloroplasti, mitocondri RE Citosol	Prevengono l'aggregazione delle proteine, favoriscono il corretto ripiegamento delle proteine e l'import, la trasduzione del segnale e l'attivazione trascrizionale.
Chaperonina/ HSP60 <u>Sottofamiglia:</u> Gruppo I Gruppo II	Cpn60 CCT	Cloroplasti, mitocondri Citosol	Favoriscono il ripiegamento proteico.
HSP90	HSP90 AtHSP90-1 AtHSP90-5 AtHSP90-6 AtHSP90-7	Citosol Cloroplasti Mitocondri RE	Facilitano la maturazione di molecole segnale.
HSP100/Clp <u>Sottofamiglia:</u> Classe I Classe II	HSP100 ClpB, ClpA/C ClpD ClpM, ClpN ClpX, ClpY	Citosol, mitocondri Cloroplasti Cloroplasti	Prevengono l'errato ripiegamento delle proteine.
smHSP <u>Sottofamiglia:</u> I II III IV V VI	HSP17.6 HSP17.9 HSP21, HSP26,2 HSP22 HSP23 HSP22.3	Citosol Citosol Cloroplasti RE Mitocondri Membrana	Prevengono l'aggregazione delle proteine denaturate favorendone la stabilizzazione.

Tabella 1.1. Le diverse classi di HSP: sono indicate anche la localizzazione intracellulare e la funzione principale (da Wang *et al.*, 2004).

Come è evidente anche dalla tabella, molte HSP hanno la funzione di *chaperone* molecolari. Gli *chaperone* molecolari sono proteine che si legano ad altre proteine parzialmente ripiegate o denaturate e, in questo modo, ne prevengono l'aggregazione o ne promuovono il corretto ripiegamento; quindi sono capaci di indurre, o di ripristinare, il ripiegamento corretto delle proteine a cui si legano (Wang *et al.*, 2004). Esse, inoltre, sono fondamentali nel mantenimento dell'omeostasi cellulare; sono anche responsabili di eventi di assemblaggio, traslocazione e degradazione delle proteine. La scoperta delle HSP è da attribuirsi a Ritossa che, nel 1962, le individuò nelle cellule salivari del moscerino della frutta, *Drosophila busckii*, in conseguenza di uno *shock* termico (Ritossa, 1962).

In seguito a questa scoperta numerosi studiosi si interessarono alle HSP, evidenziando l'espressione di queste proteine in diversi organismi e in diversi sistemi e apparati: nel tessuto nervoso, nei tubuli del Malpighi e nelle ali della mosca (Tissieres *et al.*, 1974), nei fibroblasti dell'embrione di pollo (Kelly e Schlesinger, 1978), in *Escherichia coli* (Lemeux *et al.*, 1978), nei lieviti (McAlister e Finkelstein, 1980) e in diversi tessuti delle piante (Barnett *et al.*, 1980).

HSP nelle piante

La identificazione e caratterizzazione delle HSP vegetali ha messo in evidenza che queste proteine rivestono un ruolo particolarmente importante per organismi sessili, come le piante, che non possono sottrarsi alle alte temperature spostandosi nell'ambiente.

Le piante rispondono a temperature di 8 – 10°C superiori a quelle ottimali per la loro crescita, inducendo la sintesi delle HSP, che generalmente non sono prodotte in condizioni di crescita normali, e reprimendo la sintesi di molte delle normali proteine (Sachs e Ho, 1986). La condizione migliore per la sintesi delle HSP nelle piante è un incremento rapido della temperatura di crescita, a partire da un livello ottimale (variabile da specie a specie) fino a raggiungere temperature elevate pari a 39-40°C. Comunque, le HSP possono essere indotte anche se durante la crescita, l'incremento di temperatura è graduale e pari a 2,5°C per ora, una condizione che si verifica durante il normale sviluppo in campo (Altscheler e Mascarenhas, 1982). Anche nelle piante le HSP possono essere arbitrariamente raggruppate in base al loro peso molecolare in: HSP ad alto peso molecolare (HMW-HSP) con PM che va da 68 a 110 kDa ed HSPs a basso peso molecolare (LMW-HSP) con PM tra 15 e 27 kDa (Krishnan *et al.*, 1989).

Anche l'ubiquitina, una piccola proteina di 76 aminoacidi coinvolta nella proteolisi intracellulare ATP-dipendente, viene considerata una HSP (Lindquist e Craig, 1988).

Heat Shock Protein a basso peso molecolare (smHSP)

Un gruppo particolarmente importante di HSP, nell'ambito del mondo vegetale, è costituito dalle HSP a basso peso molecolare (smHSP). Infatti, nelle piante la risposta *heat shock* è caratterizzata proprio dalla sintesi di un gruppo molto numeroso di smHSP. Esse hanno un peso molecolare (PM) compreso tra i 15 e 30 kDa (Key *et al.*, 1981; Waters *et al.*, 1996) e sono indotte, oltre che dalle alte temperature, anche da altri stimoli abiotici quali: il freddo, i metalli pesanti, i raggi UV (Hong e Vierling, 2001; Sun *et al.*, 2002). Costituiscono la classe di HSP più abbondante, infatti, nelle piante ne sono state identificate almeno 20 diverse, mentre in altri organismi esse sono molto meno numerose: tre nei mammiferi (HSP25, HSP26, HSP27), due in *Saccharomyces cerevisiae* (HSP26 e HSP43), quattro in *Drosophila melanogaster* (Arrigo *et al.*, 1994; Waters, 1995). Le smHSP vegetali sono codificate tutte da geni nucleari e sono divise in sei classi in base all'omologia di sequenza e alla loro localizzazione. Alle classi CI, CII e CIII appartengono le smHSP a localizzazione citosolica o nucleare; alle altre tre classi appartengono proteine localizzate nei plastidi (P), nel reticolo endoplasmico (RE) e nei mitocondri (MT) (Scharf *et al.*, 2001; Sun *et al.*, 2002). La caratteristica strutturale di queste proteine è la presenza di un dominio chiamato "dominio α -cristallino" (ACD) o dominio *heat shock*, lungo circa 100 aminoacidi, nella regione C-terminale (Waters *et al.*, 1996). Il dominio ACD distingue le smHSP da tutte le altre proteine che sono prodotte in seguito all'esposizione a temperature elevate. Questo dominio è diviso in due regioni consenso, dominio consenso I e dominio consenso II, e da una regione idrofilica di lunghezza variabile (Vierling, 1991). La regione consenso I è costituita dalla sequenza aminoacidica: Pro-X(14)-Gly-Val-Leu. Una sequenza simile è presente anche nella regione consenso II: Pro-X(14)-Val/Leu/Ile-Val/Leu/Ile. Questo dominio *heat shock* è particolarmente conservato nelle smHSP vegetali, contiene quattro residui completamente conservati e 15 residui altamente conservati (Waters, 1995). È stato anche osservato che esistono nelle piante alcune smHSP la cui sintesi, oltre che da stress ambientali, può essere indotta durante specifiche fasi dello sviluppo, come l'embriogenesi, la germinazione, lo sviluppo del polline e la maturazione dei frutti. Si è visto per esempio che negli embrioni di *Arabidopsis* le HSP citosoliche AtHSP17.4-CI, AtHSP17.6-CI e AtHSP17.7CII iniziano ad accumularsi quando i semi si trovano a metà

della loro maturazione e diventano molto abbondanti nella fase di tarda maturazione e nei semi secchi (Sun *et al.*, 2001).

I dati che indicano una notevole espressione di *smHSP* nelle strutture riproduttive, anche in assenza di stress, dimostrano l'importanza delle *smHSP* per il successo dell'attività riproduttiva (Hernandez e Vierling, 1993).

REGOLAZIONE DEI GENI *HEAT SHOCK*

Le basi molecolari dei meccanismi coinvolti nella regolazione dell'espressione dei geni *heat shock* sono state studiate in diversi organismi, i risultati di questi studi hanno ampiamente dimostrato che l'attivazione di questi geni, come del resto quella della maggior parte dei geni, è regolata principalmente a livello trascrizionale.

L'espressione dei geni HS viene indotta oltre che in risposta ad un improvviso aumento della temperatura, (o comunque in seguito a stimoli che la cellula percepisce come stress), anche in risposta ad altri stimoli. Nella Figura 1.2 sono riportati i diversi fattori che inducono l'espressione dei geni HS.

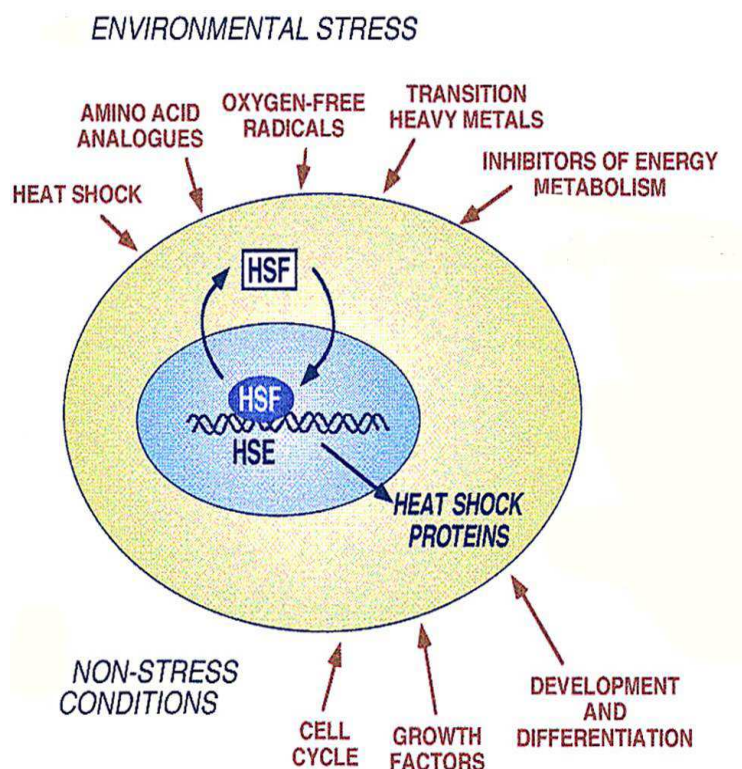


Figura 1.2. Rappresentazione schematica delle diverse condizioni che attivano la risposta *heat shock*. L'espressione dei geni *heat shock* è mediata dall'interazione tra gli *Heat Shock Factor* (HSF) e gli *Heat Shock Element* (HSE) presenti nel promotore (modificato da Morimoto, 1998).

L'attivazione dei geni HS è mediata principalmente dall'interazione tra elementi *cis* specifici presenti nel promotore dei geni HS, localizzati a monte della regione TATA-box (Parker e Topol, 1984; Pelham, 1982; Wu, 1984) denominati *Heat Shock Element* (HSE) e i fattori di trascrizione denominati *Heat Shock Factor* (HSF). Gli HSF sono in grado di riconoscere e legare con alta affinità gli elementi HSE e quindi di attivare il processo di trascrizione. Gli HSE sono costituiti da almeno tre unità pentameriche della sequenza 5'-nGAAn-3': maggiore è il numero di queste unità, maggiore è l'affinità della sequenza consenso per gli HSF (Barros *et al.*, 1992). Infatti, affinché il legame sia efficiente è richiesta la presenza di almeno tre unità, che così formano la sequenza: 5'-nGAAnnTTCnnGAAn-3' (Schöffl *et al.*, 1998). L'importanza degli elementi HSE nelle piante è stata studiata anche utilizzando piante transgeniche di tabacco, nelle quali il gene *reporter* era regolato dal promotore 35S del virus del mosaico del cavolfiore (CaMV) modificato integrando al suo interno sequenze HSE (Schöffl *et al.*, 1989). Quando queste piante erano sottoposte ad un trattamento di stress con temperature elevate si aveva un incremento dell'espressione del gene *reporter*.

Numerosi studi effettuati sugli HSF indicano che questi fattori di trascrizione specifici sono molto conservati negli eucarioti superiori anche se diversamente distribuiti: infatti in *Saccharomyces cerevisiae* (Sorger e Pelham, 1988; Wiederrecht *et al.*, 1988) e in *Drosophila melanogaster* (Arrigo, 1998) è presente un solo gene *HSF*. Al contrario un maggior numero di HSF sono stati identificati nei vertebrati dove sono 4 (HSF1-4) e nelle piante, ad esempio nel pomodoro ne sono stati identificati 18 e 34 nella soia (Nover *et al.*, 1996, 2001; Kotak *et al.*, 2004). L'esistenza di più HSF nei vertebrati e nelle piante indica che la risposta agli stress è modulata da fattori di trascrizione differenti in relazione al tipo specifico di risposta (Leppä e Sistonen, 1997). Infatti, è noto che il fattore HSF1 è quello direttamente implicato nella risposta agli stress in senso stretto e quindi nella sintesi delle HSP; mentre HSF2 è coinvolto nell'attivazione dei geni HS, in particolar modo durante lo sviluppo embrionale e il differenziamento cellulare; invece HSF4 viene ritenuto un fattore di regolazione negativo. Tutti gli HSF hanno nella regione ammino-terminale un dominio che lega il DNA (DBD), costituito da tre eliche (H1, H2, H3) e da quattro foglietti β -antiparalleli; nel dominio DBD è presente un *core* idrofobico che permette il riconoscimento dell'elemento HSE.

All'interno della porzione centrale degli HSF è presente un dominio detto di oligomerizzazione che è diviso in due porzioni A e B, denominate HR A/B. Nella porzione A è presente una *heptad repeat*, costituita dalla ripetizione imperfetta di un modulo di sette aminoacidi, mentre la regione B è composta da due *heptad repeat*. Infine, nella regione carbossi-terminale degli HSF è presente il dominio di attivazione della trascrizione. La struttura degli HSF è completata da due sequenze amminoacidiche basiche, localizzate tra il dominio di oligomerizzazione e il dominio di attivazione, che si ritiene funzionino come segnale di localizzazione nucleare (NLS). La struttura di un HSF è riportata nella Figura 1.3 (Morimoto, 1998).

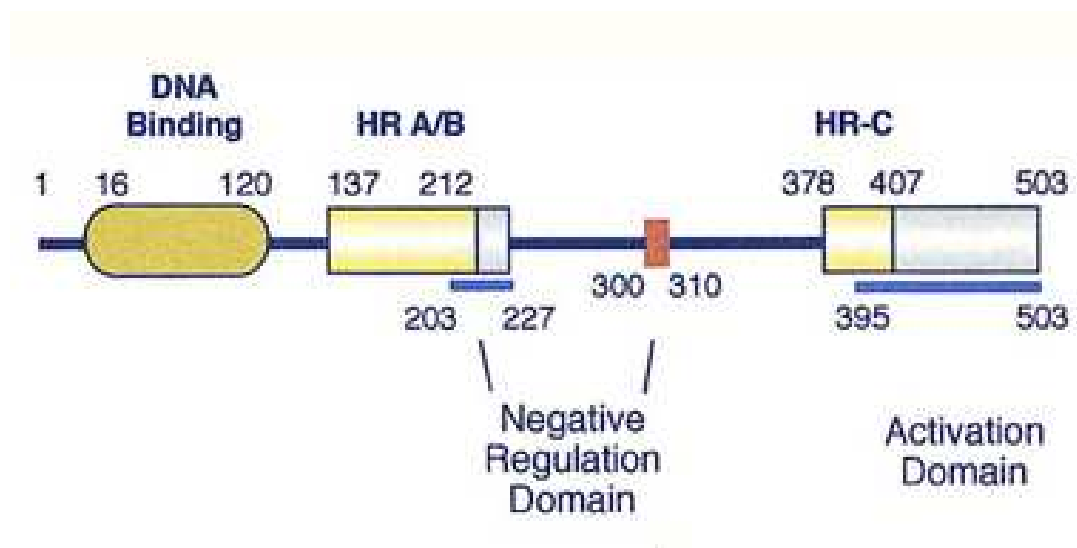


Figura 1.3. Rappresentazione schematica della struttura di un HSF. DNA *binding*: dominio di legame per il DNA; HR-A /B: dominio di oligomerizzazione; HR-C: dominio di attivazione (da Morimoto, 1998).

Nelle piante gli HSF hanno un peso molecolare compreso tra 31,2 e 57,5 kDa. Sulla base delle omologie di sequenza e della loro struttura, gli HSF vegetali sono stati suddivisi in tre

classi: A, B, C (Nover *et al.*, 2001). La struttura degli HSF appartenenti alle diverse classi è riportata nella Figura 1.4.

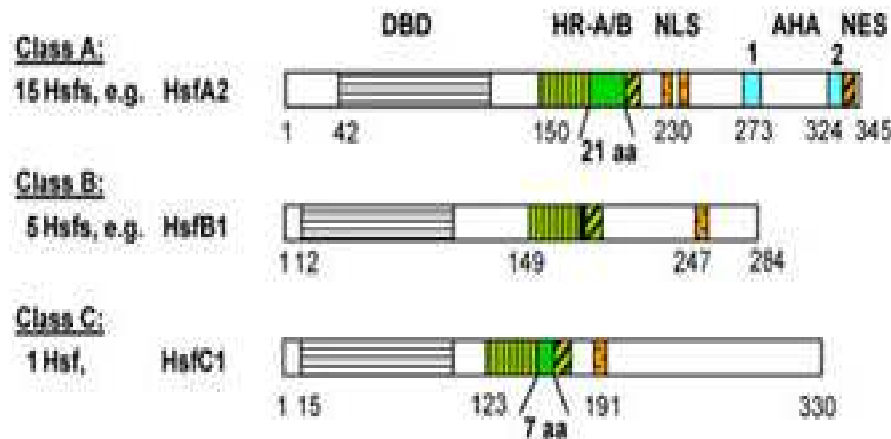


Figura 1.4. Struttura dei fattori HSF di classe A, B, C di *Arabidopsis*. DBD: dominio di legame per il DNA; HR-A /B: dominio di oligomerizzazione; NLS: regione di localizzazione nucleare; AHA: dominio di attivazione; NES: dominio di esportazione nucleare (modificato da Baniwal *et al.*, 2004).

In situazioni normali gli HSF sono presenti nel citoplasma in forma inattiva come monomeri complessati con varie molecole *chaperone*, in particolare con la HSP90. Il legame con queste proteine ne inibisce il legame al DNA e quindi l'attività. In seguito alla esposizione ad agenti di stress, come le alte temperature, si ha un incremento delle proteine denaturate presenti nella cellula e un conseguente aumento del fabbisogno di proteine *chaperone*, che pertanto si dissociano dai monomeri di HSF. La dissociazione da HSP90 determina negli HSF l'esposizione dei residui segnale per la localizzazione nucleare, essi che quindi traslocano nel nucleo, all'interno del quale subiscono una omotrimerizzazione.

L'omotrimerico HSF è in grado di legarsi con gli elementi HSE e di promuovere la trascrizione dei geni HS e quindi la sintesi delle HSP (Figura 1.5).

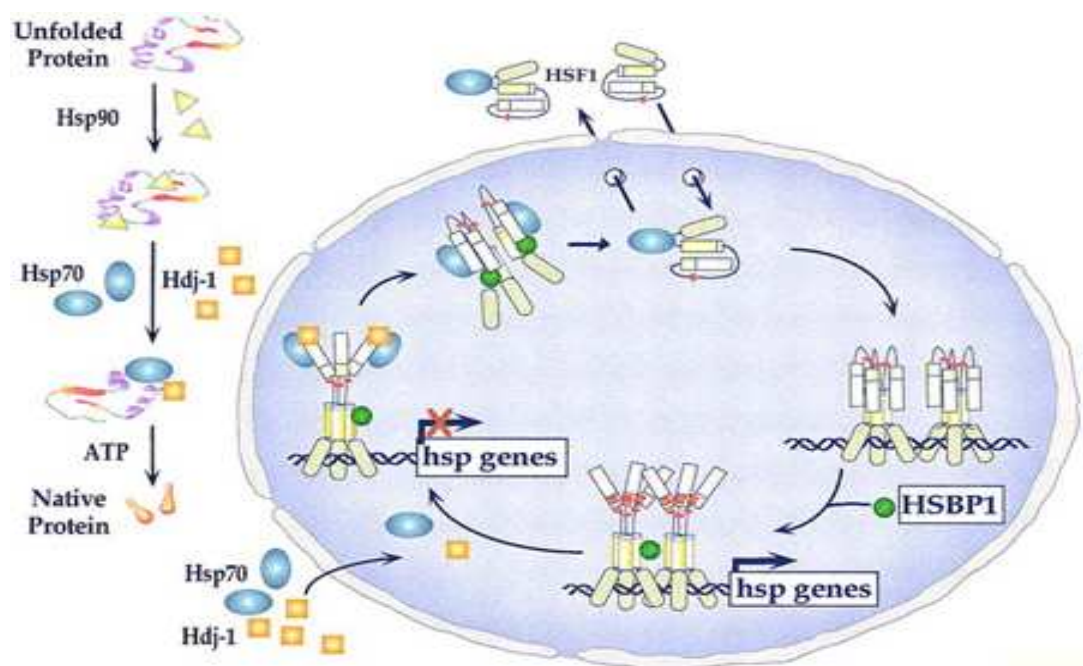


Figura 1.5. Fattori coinvolti nell'attivazione dell'espressione dei geni *heat shock* (da Morimoto, 1998).

Altri elementi caratteristici dei promotori dei geni HS, e quindi coinvolti nella loro regolazione, sono le CCAAT box e le regioni ricche in AT (Czarnecka *et al.*, 1989; Rieping e Schöffl, 1992).

Le CCAAT box sono localizzate nella regione del promotore immediatamente a monte degli elementi HSE. Il contributo delle CCAAT box nell'espressione basale dei geni HS è stato ben dimostrato nell'uomo e in *Xenopus* (Bienz, 1986; Wu *et al.*, 1986), ma esse sono coinvolte anche nell'incremento della risposta allo stress da alte temperature.

Infatti, studi effettuati su piante di soia indicano che la presenza di tali sequenze ha la funzione di rendere più accessibile il sito di legame dei fattori di trascrizione e ciò determina un incremento del livello di trascrizione di dei geni *heat shock*, potenziando quindi la risposta della pianta allo stress. Questi dati sperimentali suggeriscono quindi per queste sequenze un ruolo da *enhancer*. Le CCAAT box sono presenti non solo nei promotori dei geni *heat shock*, ma sono uno degli elementi *cis-acting* più diffusi, esse infatti sono presenti nel 30% dei promotori eucariotici (Bucher, 1990).

Un altro elemento caratteristico dei promotori HS è costituito dalle regioni AT-rich che sono localizzate a monte della TATA box e sono costituite da sequenze ripetute (A)_n, (T)_n e (TA)_n. I primi ad indicare le regioni AT-rich come elemento coinvolto nella regolazione dei geni HS, furono Baumann e collaboratori (1987) in seguito ad analisi funzionale, mediante delezioni progressive, del promotore del gene *Gmhsp17.3B*. Altri studi confermarono la presenza delle sequenze AT-rich nei promotori di diversi geni inducibili vegetali (Bustos *et al.*, 1989; Datta e Cashmore, 1989; Jordano *et al.*, 1989). Studi successivi hanno rilevato una regione bipartita di 33 bp omologa alle sequenze ricche in AT, localizzata a monte del gene *GmHsp17.5E* di *Glicine max*, può aumentare l'attività del promotore del gene *Adh1* di mais in condizioni di stress anaerobio (Czarnecka *et al.*, 1992), ciò conferma quindi il coinvolgimento dell'elemento AT-rich nell'attivazione dei geni HS e il suo ruolo di *enhancer*. L'attività dell'elemento AT è indipendente dal suo orientamento, ma varia a seconda della sua posizione in modo inversamente proporzionale rispetto alla distanza dal sito d'inizio della trascrizione. Diverse classi di geni delle piante contengono sequenze ricche in AT a monte del sito d'inizio della trascrizione, queste sono infatti state individuate nei geni espressi durante lo sviluppo e nei geni regolati dalla luce e geni che si esprimono in seguito a stress termico (Czarnecka *et al.*, 1992). Quindi, sia le CCAAT box che le regioni AT rich hanno la funzione di amplificare la risposta allo stress. Tuttavia sembra che le sequenze ricche in AT abbiano un effetto moderato sull'espressione dei geni HS rispetto a quello esercitato dalle sequenze CCAAT. Infatti, una delezione dell'elemento CCAAT determina una sensibile riduzione, circa 5 volte, dell'espressione dei geni HS. E' noto tuttavia che l'attività complessiva del promotore deriva da un'azione sinergica delle CCAAT box e degli elementi HSE (Rieping e Schöffl, 1992), a tutt'oggi comunque non è ancora completamente chiarito il ruolo esatto che questi elementi, cioè HSE e CCAAT box, hanno nella regolazione della trascrizione.

APPLICAZIONI BIOTECNOLOGICHE DI PROMOTORI *HEAT SHOCK*

In base alla definizione comunemente accettata il promotore è una regione di DNA all'interno della quale sono presenti specifiche sequenze, dette consenso, alla quale si lega la RNA polimerasi per iniziare la trascrizione di un gene. Negli eucarioti il promotore si divide in due regioni: il *core*, costituito da una serie di sequenze che agiscono in *cis* e sono necessarie per il corretto inizio della trascrizione; ed una regione più distale, costituita da uno o più elementi che come indica il nome sono situati ancora più a monte del sito di inizio, che controlla l'attività del promotore stesso attraverso l'interazione con fattori di trascrizione specifici (Yamamoto *et al.*, 2007).

Negli ultimi anni, lo studio dei promotori ha riguardato con particolare interesse non solo gli aspetti strutturali di queste sequenze ma anche le loro notevoli potenzialità legate alla loro possibile utilizzazione in ambito biotecnologico. In particolare si ritiene che essi possano costituire dei veri e propri strumenti applicabili alla regolazione dell'espressione di geni di interesse eterologhi. In questo ambito benché siano numerosi i promotori conosciuti e disponibili; negli ultimi anni è cresciuta specificamente l'attenzione da parte dei ricercatori per i promotori *heat shock*.

Questo è dovuto all'interesse per i meccanismi biomolecolari coinvolti nella regolazione dell'espressione genica che, ad oggi, non sono stati completamente chiariti (e si sa, che le istruzioni che controllano l'espressione di un gene sono contenute proprio nei promotori), ma un ulteriore motivo di interesse è legato alla capacità dei promotori HS di modulare l'espressione di un gene posto a valle non solo in risposta alle alte temperature, ma anche in risposta a numerosi altri stress ambientali, come lo stress ossidativo, lo stress osmotico, lo stress da metalli pesanti.

Queste considerazioni portano a ritenere che i promotori HS rappresentino un potente strumento biotecnologico da utilizzare in ambiti diversi e con potenzialità notevoli.

Esistono già da tempo numerosi studi relativi all'utilizzazione di promotori eterologhi per il controllo di geni vegetali.

In *Nicotiana tabacum*, ad esempio, il promotore *hsp17.6L* di soia è stato usato per regolare l'espressione del gene che conferisce resistenza all'igromicina (Severin e Schoffl, 1990); lo stesso promotore è stato utilizzato anche per regolare l'espressione della ricombinasi FLP in mais (Lyznik *et al.*, 1995) e in *Arabidopsis thaliana* (Kilby *et al.*, 2000); infine, Yoshida

e collaboratori (1995), hanno utilizzato il promotore *hsp18.2* di *Arabidopsis* per controllare l'espressione di un gene esogeno in cellule BY2 di tabacco poste in terreni di coltura liquidi.

Il mondo vegetale non è l'unico ambito nel quale è stata sperimentata l'utilizzazione di questi promotori. Infatti, i promotori *heat shock* hanno trovato un vasto impiego anche nella terapia genica in quanto permettono di controllare l'espressione del gene d'interesse in maniera sito-specifica e in precisi periodi temporali (Huang *et al.*, 2000; Rome *et al.*, 2005). Uno dei promotori HS utilizzati per la terapia genica è il promotore del gene che codifica per l'HSP70B, esso possiede infatti caratteristiche biologiche che lo rendono particolarmente interessante per una applicazione di questo tipo perché oltre ad essere attivato e modulato dal calore è presente in tutti gli organismi, dai batteri all'uomo (Feder e Hoffmann, 1999), ed è molto efficiente, infatti è in grado di pilotare l'espressione del gene *reporter* a livelli comparabili a quelli raggiunti utilizzando il promotore del *citomegalovirus* (CMV). Sotto il controllo di questo promotore l'espressione del gene *reporter*, praticamente assente in condizioni basali, viene indotta dallo stress termico; il gene può essere soggetto così ad espressione controllata per esempio attraverso l'utilizzo di ultrasuoni focalizzati (*focused ultrasound*). Mediante questa tecnica infatti è possibile aumentare la temperatura in un'area ben definita inducendo in questo modo l'espressione del gene solo nell'area riscaldata (Rome *et al.*, 2005); questo rende il promotore HSP70B uno strumento particolarmente utilizzabile per la terapia genica. Altro esempio è costituito da geni suicidi codificanti per la timidina chinasi (TC) e per la citosina deaminasi (CD), che posti sotto il controllo di promotori HS, sono stati introdotti in cellule tumorali, e in seguito all'attivazione da HS hanno provocato la completa distruzione o la riduzione del tumore (Blackburn *et al.*, 1998). Braidon e collaboratori (2000) hanno invece sviluppato una terapia contro il cancro al seno che si basa sull'utilizzo di un gene suicida posto sotto il controllo del promotore *hsp70*.

L'efficacia della terapia genica basata sull'utilizzo di promotori *heat shock* è stata dimostrata anche da Huang e collaboratori (2000), che hanno iniettato all'interno della linea cellulare tumorale C57BL/6 un adenovirus contenente il gene IL-12 di topo posto sotto il controllo del promotore *hsp70B*. L'azione del virus combinata ad una moderata ipertermia (le cellule tumorali venivano sottoposte ogni 7 giorni a 42,5°C per 40 minuti di trattamento) produce in questo caso una significativa inibizione del tumore.

Numerosi lavori presenti in letteratura indicano una possibile utilizzazione dei promotori HS anche nell'ambito del monitoraggio ambientale. Si ritiene infatti che essi siano strumenti molto innovativi e potenti che offrono notevoli vantaggi anche in questo ambito. In particolare, grazie alla loro capacità di attivare l'espressione di un gene *reporter* posto sotto il loro controllo in seguito a stress di diversa natura, si ritiene che essi costituiscano un'importante risorsa per la produzione di *biomarker* e per la progettazione di biosensori (Ryan e Hightower, 1996; Bierkens, 1998).

Un esempio è dato dall'uso dei promotori *hsp16/lacZ* (Güven e de Pomerai, 1995) e *hsp70/lacZ* (Stringham *et al.*, 1992; Stringham e Candido, 1994) per la trasformazione di *Caenorhabditis elegans*; ciò ha reso possibile l'utilizzazione di questo organismo come biosensore per rilevare la presenza nell'acqua di metalli pesanti quali il cadmio, il mercurio e il rame.

Saidi e collaboratori (2007) hanno utilizzato il promotore dell'*hsp17.3* di soia fuso con il gene GUS per trasformare piante di *Physcomitrella patens* allo scopo di rilevare la presenza di sostanze inquinanti nel terreno.

Il vantaggio che presenta un sistema basato sull'uso dei promotori HS risulta particolarmente importante vista la necessità di mettere a punto sistemi di monitoraggio ambientale più sensibili, efficienti e specifici. Attualmente infatti, la presenza di inquinanti nel suolo o nelle acque può essere rilevata solo mediante analisi chimiche dispendiose in termini di tempo e di costi, che spesso forniscono poche informazioni circa la reale natura della sostanza inquinante. Queste difficoltà possono essere superate utilizzando come biosensori organismi viventi che esprimono geni *reporter* sotto il controllo di promotori sensibili alle variazioni ambientali, cioè proprio i promotori *Heat Shock* (HS).

A tale scopo è quindi estremamente importante avere a disposizione un promotore che abbia le caratteristiche strutturali e funzionali adatte alla sua utilizzazione in ambito biotecnologico.

Un promotore di questo tipo era già disponibile nel laboratorio di Tecnologie Ricombinanti del Di.S.Te.B.A. dell'Università del Salento, presso il quale ho svolto questo lavoro di tesi di dottorato.

DESCRIZIONE DEL CLONE GENOMICO

Il clone genomico che era stato isolato da una libreria di girasole, varietà Gloriasol, contiene un frammento di DNA lungo 9.5 kb ed è stato identificato in seguito ad ibridazione con la sonda per una *smHSP* di orzo (GeneBank Accession N° AJ306557). Il frammento di 9,5 kb è stato suddiviso in frammenti più piccoli che sono stati sotto-clonati e sottoposti ad analisi di sequenza per studiarne le caratteristiche strutturali. La sequenza nucleotidica indica che all'interno di questo clone sono presenti due *open reading frame* (ORF), poste in tandem, relative a due geni per *smHSP* denominati: *HaHsp17.6a* e *HaHsp17.6b*. Le due ORF sono separate da una regione di 3809 bp e hanno orientamento invertito. Lo schema che illustra l'organizzazione del frammento genomico da 9,5 kb contenente le due ORF è riportato nella Figura 1.6.

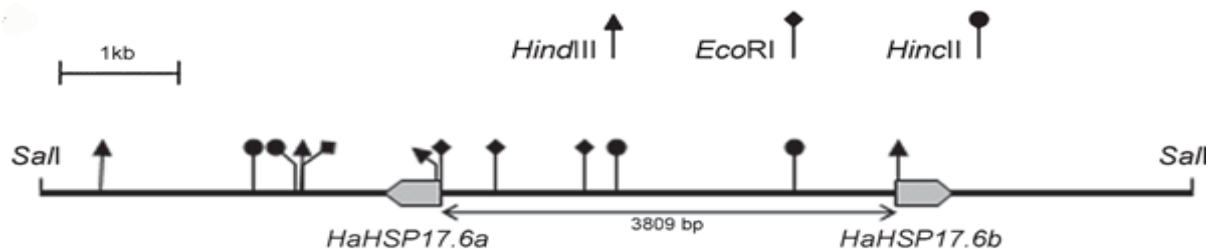


Figura 1.6. Schema dell'organizzazione del clone di 9,5 kb; è riportata la posizione e l'orientamento delle due ORF codificanti per *smHSP*. La direzione delle frecce indica che il gene *HaHSP17.6a* si trova in posizione invertita rispetto al gene *HaHSP17.6b*. I due geni sono separati da una regione lunga 3809 bp (Rampino *et al.*, 2010).

Analisi delle sequenze

L'analisi *in silico* delle sequenze amminoacidiche dedotte (aa) indica che una ORF codifica per una proteina di 17,67 kDa (ID CAC84405.2); l'altra ORF invece codifica per una proteina di 17,60 kDa (ID CAC84406.1). In base all'analisi di sequenza si può affermare che le due ORF sono molto simili tra loro, esse infatti hanno la stessa lunghezza, differiscono solo per 30 nucleotidi che a livello della sequenza aa dedotta producono una sostituzione di soli 8 amminoacidi. Nelle sequenze nucleotidiche dei due geni, che hanno una elevata omologia (Figura 1.7A) sono presenti le regioni consenso tipiche delle *smHSP* di classe CI (Figura 1.7B).

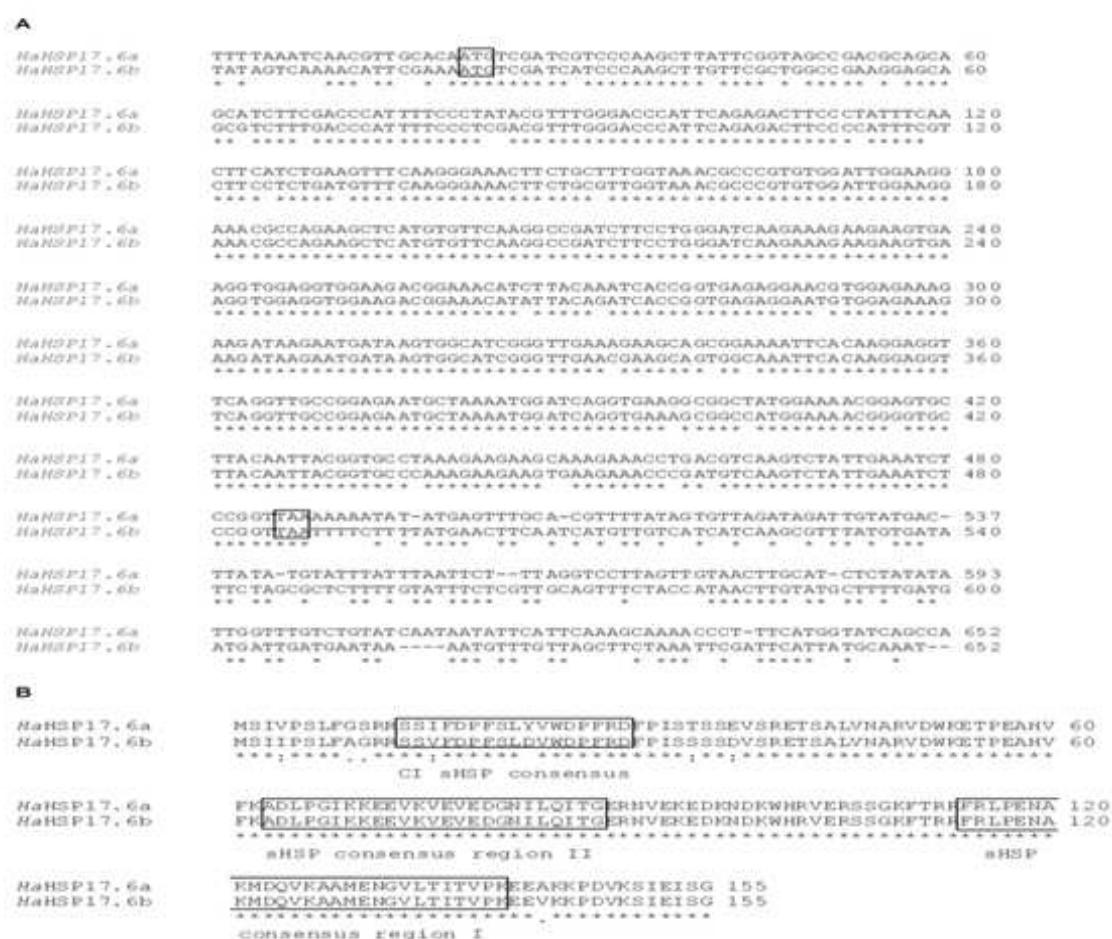


Figura 1.7. A. Allineamento della sequenza nucleotidica del gene *HaHSP17.6a* con la sequenza del gene *HaHSP17.6b*. Con il simbolo * si evidenziano le basi conservate. B. Nei rettangoli sono racchiuse le tipiche regioni consenso delle *small HSP* di classe CI (Rampino *et al.*, 2010).

Espressione in vivo di *HaHSP17.6a* e *HaHSP17.6b*

L'analisi dell'espressione dei due geni svolte su piantine di girasole sottoposte a diversi tipi di stress: alte e basse temperature, NaCl, metalli pesanti, etanolo (Figura 1.8), indica che la trascrizione di entrambi i geni è indotta dalle temperature elevate ma con differenze molto significative sia nel livello che nella cinetica di espressione, infatti, il gene *HaHsp17.6b* ha un'espressione basale, cioè è attivo già a 25°C e viene fortemente sovra-espresso in seguito a tutti i tipi di stress, anche se in maniera diversa a seconda del trattamento; al contrario la trascrizione del gene *HaHSP17.6a* è indotta a livelli elevati, benché sempre inferiori rispetto a *HaHSP17.6b*, solo dalle alte temperature e in seguito al trattamento con alcuni metalli pesanti o con NaCl.

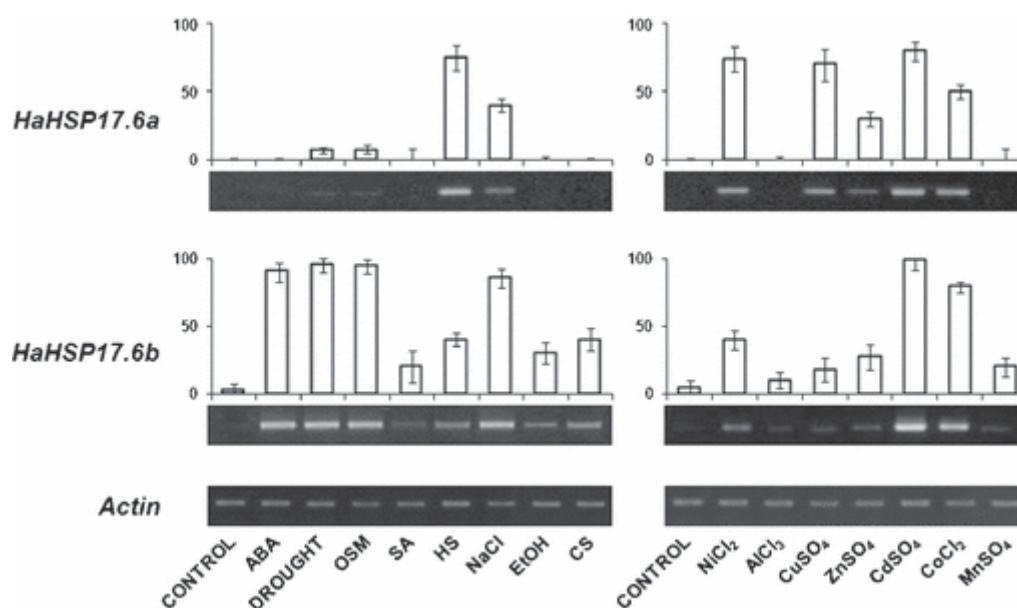


Figura 1.8. Analisi di espressione mediante RT-PCR dei geni *HaHSP17.6a* e *HaHSP17.6b* in differenti condizioni di stress. *Control*, campioni non sottoposti a stress; ABA, 48 h in 100 μ M; DROUGHT, 5 h su carta da filtro a temperatura ambiente; OSM, 5 h in una soluzione 0,5 M di mannitolo; SA, 4 h in una soluzione di acido salicilico 0,1 mM; HS, 2,5 h a 42°C; NaCl, 5 h in una soluzione di NaCl 0,4 M; EtOH, 4 h in etanolo 2,5% (v/v); CS, 5 h a 4°C. Per lo stress da metalli pesanti, le piantine di girasole sono state incubate per 5 h in soluzioni di metalli pesanti 20 mM. La quantità di ogni trascritto è stata normalizzata rispetto a quella del gene per l'actina, ed è espressa come livello relativo di trascritto. I valori riportati sono la media dei dati ottenuti in 3 esperimenti indipendenti (Rampino *et al.*, 2010).

Inoltre, i due geni sono chiaramente regolati in maniera diversa sia a livello tissutale che in seguito a stress prolungati nel tempo (dati non riportati). Tutto ciò ha portato ad ipotizzare che

le differenze nell'espressione dei due geni possano essere correlate ad una diversa struttura dei loro promotori. In seguito a queste considerazioni ho quindi intrapreso un'analisi strutturale della sequenza lunga 3,8 kb interposta tra i due geni.

2-SCOPO DELLA TESI

La risposta *Heat Shock* delle piante è caratterizzata dalla sintesi di HSP a basso peso molecolare (*smHSP*) la cui espressione è finemente regolata dalla specifica struttura dei loro promotori. Lo scopo di questo lavoro è stato la caratterizzazione a livello funzionale di uno di tali promotori. Nella prima parte del lavoro mi sono focalizzata sulla caratterizzazione strutturale della regione promotore presente in un clone genomico di girasole che contiene due geni per *smHSP* posti in tandem.

Le ORF di tali geni hanno un orientamento invertito e sono separate da una regione intergenica di 3809 bp. Le sequenze nucleotidiche dei due geni presentano le tipiche regioni consenso delle *smHSP* di classe CI e sono caratterizzate da omologia molto elevata; tuttavia i due geni presentano un profilo ed una cinetica di espressione molto differenti, questa discrepanza potrebbe essere dovuta alla differente struttura dei loro promotori. Poiché i due geni rispondono in maniera diversa ho proceduto con l'analisi funzionale della regione a monte del gene più responsivo al fine di chiarire il ruolo funzionale dei motivi regolatori in esso contenuti.

3-MATERIALI E METODI

MATERIALE VEGETALE

Semi di girasole (*Helianthus annuus L.*), varietà *Gloriasol*, sono stati fatti imbibire in acqua per qualche ora, poi sono stati fatti germogliare in agriperlite, un inerte siliceo espanso; dopo 10 giorni dalla germinazione quando hanno raggiunto lo stadio di due foglie. Le piantine sono state prelevate, lavate e congelate in azoto liquido. Le piantine di girasole sono state poi utilizzate per l'estrazione del DNA genomico.

PREPARAZIONE DEGLI ACIDI NUCLEICI

ESTRAZIONE DI RNA TOTALE

Il materiale utilizzato per l'estrazione dell'RNA è stato sottoposto ad opportuni trattamenti finalizzati all'inattivazione dell'enzima ribonucleasi (RNasi). Il materiale di plastica è stato posto in autoclave a 121°C ed alla pressione di 1 atm per 40 minuti. La vetreria, i mortai, i pestelli e le spatole sono stati sterilizzati al calore secco in stufa a 200°C *over night*.

L'acqua è stata trattata con 0,1% dietilpirocarbonato (DEPC), un agente alchilante che annulla l'attività enzimatica dell'RNasi principalmente attraverso l'etossiformilazione dei gruppi istidinici. Successivamente, l'acqua è stata autoclavata a 121°C alla pressione di 1 atm per 40 minuti per eliminare ogni traccia di DEPC. L'acqua così preparata è stata utilizzata per sciacquare la vetreria, i mortai, i pestelli e le spatole.

L'RNA totale è stato purificato da protoplasti di *N. tabacum* utilizzando il *kit SV Total RNA Isolation System* (Promega, <http://www.promega.com/>) e poi è stato trattato con DNasi I per eliminare eventuali residui di DNA genomico.

Seguendo le indicazioni fornite nel protocollo della ditta produttrice, 175 µl di *SV RNA Lysis Buffer* (GTC 4 M; Tris 0,01 M pH 7,5; β-Mercaptoetanolo 0,97%) sono stati aggiunti direttamente ai protoplasti, successivamente sono stati aggiunti 350 µl di *SV RNA Dilution Buffer* e, dopo aver rimescolato capovolgendo la provetta 3-4 volte, il campione è stato sottoposto a centrifugazione per 10 minuti alla velocità di 14000 x g; il sovranatante è stato trasferito in una nuova provetta; sono stati aggiunti 200 µl di etanolo 95% .

La soluzione è stata trasferita nello *Spin Column Assembly*, costituita da un tubo di raccolta da 2 ml e da una colonna (*Spin Basket*) contenente una membrana di fibre di vetro che legano l'RNA. Dopo centrifugazione, per 1 minuto alla massima velocità, l'eluato è stato eliminato. Successivamente, sono stati aggiunti 600 µl di *SV RNA Wash Solution* (Potassio acetato 60 mM; Tris-HCl 10 mM pH 7,5; Etanolo 60%) e, dopo aver centrifugato per 1 minuto, l'eluato è stato eliminato; sulla membrana presente nello *Spin Basket* sono stati aggiunti 50 µl di *DNase incubation mix* (una miscela contenente DNasi, che ha la funzione di eliminare ogni traccia di DNA dal campione); la miscela di reazione è stata incubata per 15 minuti a 20-25°C; la reazione è stata bloccata con l'aggiunta di 200 µl di *SV DNase Stop Solution* (Guanidina tiocianato 2 M; Tris-HCl 4 mM pH 7,5; Etanolo 57%) dopo centrifugazione per 1 minuto a 14000 x g, l'eluato è stato eliminato; è stato effettuato un primo lavaggio con 600 µl di *SV RNA Wash Solution*; dopo centrifugazione per 1 minuto alla massima velocità, l'eluato è stato eliminato; sono stati aggiunti 250 µl di *SV RNA Wash Solution* e si è centrifugato per 2 minuti a 14000 x g; lo *Spin Basket* è stato trasferito in una nuova provetta. L'RNA è stato eluito con 100 µl di *Nuclease-Free Water* centrifugando per 1 minuto a 14000 x g; l'RNA così purificato è stato conservato a -40°C.

ESTRAZIONE DI DNA GENOMICO

Il materiale vegetale, circa 10 g di piantine di girasole, è stato ridotto in polvere con pestello e mortaio aggiungendo di tanto in tanto azoto liquido, il DNA genomico è stato estratto mediante il Metodo Della Porta (Dellaporta *et al.*, 1983), basato sulla seguente procedura: all'omogenato sono stati aggiunti 20 ml di *Buffer* di Estrazione (NaCl 0,35 M, SDS 2%, Tris 50 mM pH 8, EDTA 10 mM, Urea 7 M). Successivamente è stato aggiunto un uguale volume di FIAC (Fenolo: Cloroformio: Alcool Isoamilico 25:24:1) e dopo 10 minuti di agitazione, il campione è stato centrifugato a 2000 x g per 10 minuti; è stata poi recuperata la fase superiore e ripetuta l'estrazione con FIAC.

E' stata quindi recuperata la fase superiore alla quale è stato aggiunto 1/10 di volume di NH₄-Acetato 5M e 1 volume di isopropanolo. Il campione è stato lasciato a temperatura ambiente finché non si è formata la medusa; poi è stato centrifugato per 1 o 2 minuti a 2000 x g; è stato eliminato il sovrantante; infine il *pellet* è stato risospeso in acqua o in TE.

ESTRAZIONE DI DNA PLASMIDICO

Minipreparazione: metodo della lisi alcalina

Per la minipreparazione di DNA plasmidico è stato utilizzato il metodo della lisi alcalina, basato sulla seguente procedura: 1,5 ml di coltura batterica sono stati trasferiti in una provetta da 1,5 ml e le cellule sono state raccolte centrifugando per 2-3 minuti a 14000 x g; il sovranatante è stato eliminato e sono stati aggiunti al precipitato 500 µl di STE *buffer* (NaCl 0,1M; Tris-HCl 10 mM pH 8,0; EDTA 1 mM pH 8,0) rimescolando successivamente al *vortex*, le cellule sono state poi centrifugate per 2-3 minuti a 14000 x g; è stato rimosso il sovranatante e il precipitato è stato risospeso agitando al *vortex* in 100 µl di Soluzione I (Tris-HCl 25 mM pH 8,0; EDTA 10 mM pH 8,0; Glucosio 50 mM). Sono stati poi aggiunti 200 µl di Soluzione II (NaOH 0,2 N; SDS 1%). Il contenuto della provetta è stato rimescolato per inversione e la provetta è stata posta in ghiaccio. Successivamente sono stati aggiunti 150 µl di Soluzione III (Potassio acetato 3 M; Acido acetico glaciale 11,5%), il contenuto della provetta è stato rimescolato per inversione; la provetta è stata centrifugata per 5 minuti a 14000 x g. Il sovranatante è stato poi accuratamente trasferito in una nuova provetta da 1,5 ml; al sovranatante sono stati aggiunti 450 µl di FIAC (Fenolo: Cloroformio: Alcool Isoamilico 25:24:1), si è agitato per inversione e centrifugato per 2-3 minuti a 14000 x g; la fase acquosa è stata prelevata accuratamente; sono stati aggiunti 2 volumi di etanolo assoluto, si è rimescolato per inversione e si è lasciato per 5-10 minuti a temperatura ambiente; si è centrifugato per 15 minuti. Il sovranatante è stato eliminato e il precipitato è stato asciugato a temperatura ambiente per 15 minuti; infine, il precipitato è stato risospeso in 16 µl di acqua sterile.

Minipreparazione con il Kit Wizard®Plus

La purificazione di plasmidi ricombinanti da sottoporre ad analisi di sequenza è stata effettuata mediante il kit *Wizard®Plus Minipreps DNA Purification System* (Promega) che costituisce un metodo semplice e affidabile per isolare rapidamente il DNA plasmidico. Tale sistema prevede i passaggi di seguito descritti: 10 ml di coltura batterica sono stati centrifugati a 3000 x g per 10 minuti; è stato eliminato il sovranatante e il *pellet* è stato risospeso in 400 µl di *Cell Resuspension Solution* (Tris-HCl 50 mM pH 7,5; EDTA 10 mM; RNase A 100 µg/ml); le cellule risospese sono

state trasferite in una provetta da 1,5 ml; sono stati aggiunti 400 µl di *Cell Lysis Solution* (NaOH 0,2 M; SDS 1%) ed è stato rimescolato per inversione; sono stati aggiunti 400 µl di *Neutralization Solution* (Potassio acetato 1,32 M pH 4,8) ed è stato rimescolato per inversione; il lisato è stato centrifugato a 14000 x g per 10 minuti. E' stata preparata una *Wizard®Minicolumn*, nella quale è stato posto 1 ml di *DNA Purification Resin*; il lisato di cellule batteriche precedentemente preparato è stato accuratamente trasferito nella colonna contenente la resina; mediante lo stantuffo di una siringa il lisato è stato spinto attraverso la minicolonna; successivamente sono stati fatti passare 2 ml di *Column Wash Solution* (Potassio acetato 80 mM; Tris-HCl 8,3 mM; EDTA 40 µM; Etanolo 55%). La minicolonna è stata trasferita in una provetta da 1,5 ml ed è stata sottoposta a centrifugazione a 14000 x g per 2 minuti per eliminare dalla resina i residui di liquido; la minicolonna è stata trasferita in una nuova provetta da 1,5 ml e il DNA è stato eluito con 50 µl di *Nuclease-Free Water*, dopo 1 minuto di incubazione a temperatura ambiente, mediante centrifugazione a 14000 x g per 20 secondi; il DNA plasmidico purificato è stato conservato a -20°C. I plasmidi purificati sono stati utilizzati direttamente per il sequenziamento automatico del DNA.

Midipreparazione con il Kit *PureLink™*

La midi-preparazione di DNA plasmidico è stata effettuata con il sistema *PureLink™: Hi Pure Plasmid Midiprep Kit* (Invitrogen, <http://www.invitrogen.com/>). Una singola colonia è stata inoculata in 1 ml di *LB medium* contenente ampicillina (100 µg/ml), e incubata per 4-5 ore a 37°C in agitazione. Questa sospensione batterica è stata usata come pre-inoculo per 25 ml di *LB medium* contenente ampicillina (100 µg/ml), la sospensione risultante è stata incubata a 37°C in agitazione per una notte. Il giorno dopo la coltura è stata centrifugata a 4000 x g per 10 minuti, successivamente il *pellet* è stato risospeso in 4 ml di *Resuspension Buffer* (Tris/HCl 50 mM pH 8,0; EDTA 10 mM; RNase A 20 mg/ml). Alla sospensione batterica così ottenuta sono stati poi aggiunti 4 ml di *Lysis Buffer* (NaOH 0,2 M; SDS 1%) e, dopo aver mescolato per inversione, la soluzione è stata incubata a temperatura ambiente per 5 minuti. Sono stati aggiunti 4 ml di *Precipitation Buffer* (Acetato di potassio 3 M pH 5,5), e dopo aver mescolato per inversione, la mix è stata centrifugata per 10 minuti a 12000 x g a temperatura ambiente.

Il sovranatante è stato poi recuperato e posto in una colonna, a cui sono stati precedentemente aggiunti 10 ml di *Equilibration Buffer* (NaCl 0,6 M; Sodio acetato 0,1 M pH 5,0; Triton X-100 0,15%).

Seguono 2 lavaggi con 10 ml di *Wash Buffer* (Sodio acetato 0,1 M pH 5,0; NaCl 825 mM). Il DNA plasmidico è stato infine eluito con 5 ml *Elution Buffer* (Tris/HCl 100 mM pH 8,5; NaCl 1,25 M) e fatto precipitare aggiungendo 3,5 ml di isopropanolo e centrifugando a 15000 x g per 30 minuti a 4°C. Successivamente è stato eliminato il sovrinatante, il *pellet* è stato risospeso con 3 ml di etanolo al 70% e centrifugato a 15000 x g per 5 minuti a 4°C. E' stato eliminato il sovrinatante e il *pellet* è stato risospeso in 200 µl di TE.

ELETTROFORESI DEL DNA SU GEL DI AGAROSIO

Per l'identificazione e la separazione dei frammenti di DNA è stata utilizzata l'elettroforesi su gel di agarosio 1% nel tampone TAE 1X, diluito al momento dell'utilizzazione a partire da una soluzione 50X, la cui composizione è riportata nella tabella successiva.

<i>TAE 50X (per un volume di 500 ml)</i>	
<i>Componente</i>	<i>Quantità</i>
Tris	121 g
Acido acetico glaciale	28,55 ml
EDTA (0,5 M pH 8,0)	50 ml
Acqua	Fino a 500 ml

Alla soluzione di agarosio è stato aggiunto Bromuro di etidio (0,5 µg/ml). L'elettroforesi è stata condotta nel tampone TAE 1X. Le bande relative ai frammenti di DNA sono state osservate ponendo il gel su una fonte di luce ultravioletta.

L'immagine del gel è stata ottenuta per acquisizione con lo scanner nell'apparato *Kodak EDAS 290* (Kodak, Rochester, NY, USA) e l'intensità delle bande è stata misurata utilizzando il programma *Kodak 1D Image Analysis Software*.

Per l'analisi dei frammenti ottenuti dopo RT-PCR, l'intensità delle bande del gene *target GFP* (*Accession number*: **AAC78774**) è stata normalizzata rispetto a quella del gene per l'actina (*Accession number*: **EU938079**).

Il valore dell'intensità più alta del gene *target* è stato impostato a 100. Il valore riportato corrisponde alla media di tre misurazioni $\pm$ SEM (Errore Standard della Media).

Le dimensioni dei frammenti di DNA sono state determinate per confronto con uno standard di peso molecolare: il DNA *Ladder* 1 kb (Invitrogen, <http://www.invitrogen.com/>), costituito da una miscela di frammenti di DNA a dimensioni note. Dopo l'elettroforesi, il DNA *Ladder* si separa in bande di dimensioni scalari che vanno da 74 bp a 12.216 bp.

DETERMINAZIONE DELLA CONCENTRAZIONE DI DNA E RNA MEDIANTE LETTURA ALLO SPETTROFOTOMETRO

La determinazione della quantità di DNA e di RNA presente nei campioni è stata realizzata mediante lettura allo spettrofotometro. Le letture sono state eseguite alle lunghezze d'onda di 260 nm (che corrisponde alla lunghezza d'onda nella quale si ha l'assorbimento massimo delle basi puriniche e pirimidiniche) e 280 nm (assorbimento massimo per gli amminoacidi aromatici come triptofano e fenilalanina). Il rapporto tra le due letture permette una stima della purezza del campione: il valore del rapporto tra la densità ottica a 260 e quella a 280 nm deve essere compreso tra 1,7 e 1,9. Contaminazioni con proteine, polisaccaridi o fenolo, abbassano significativamente il valore di questo rapporto. Dalla lettura a 260 nm si può risalire alla concentrazione di DNA o di RNA del campione con una quantificazione empirica, sapendo che un valore di densità ottica pari ad 1, a 260 nm, corrisponde ad una soluzione contenente 50 µg/ml di DNA a doppio filamento o ad una contenente 40 µg/ml di RNA a singolo filamento.

DIGESTIONE CON ENZIMI DI RESTRIZIONE

Le digestioni del DNA plasmidico sono state effettuate utilizzando quantità di DNA comprese tra 500 ng e 4 µg in relazione alle dimensioni della molecola e alla sua successiva utilizzazione. La miscela di digestione è stata incubata per almeno 1 ora a

37°C con 2-5 unità dei diversi enzimi di restrizione, nelle condizioni di reazione specifiche per ogni enzima.

RT-PCR (*Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction*)

Per la reazione della retrotrascrizione è stato utilizzato l'enzima *M-MLV Reverse Transcriptase* (Finnzymes, <http://www.finnzymes.it/>) e un *primer* oligo(dT) come innesco. Ogni reazione è stata allestita in una provetta da 200 µl nella quale sono stati posti 12 µl di *Mix 1* contenente: oligo(dT)₁₅, RNA e dNTP ed è stata incubata per 5 minuti a 65°C in un *thermocycler* pre-riscaldato, per denaturare e svolgere eventuali strutture secondarie dell'RNA che potrebbero impedire la sintesi di cDNA *full-length*.

<i>Mix 1</i>	
<i>Componente</i>	<i>Volume</i>
RNA (2 µg)	10 µl
Oligo(dT) ₁₅ (0,5 µg/ µl)	1 µl
dNTP <i>mix</i> (10Mm)	1 µl

Successivamente la provetta è stata posta in ghiaccio e poi centrifugata per alcuni secondi. Quindi sono stati aggiunti 7 µl di *Mix 2* contenente: *First-Strand Buffer* 5X, DTT e *RNasin*.

<i>Mix 2</i>	
<i>Componente</i>	<i>Volume</i>
<i>First-Strand Buffer</i> 5X	4 µl
DTT (0,1M)	2 µl
<i>RNasin</i> (40 U/ µl)	1 µl

Il campione è stato incubato per 2 minuti a 37°C in un *thermocycler* pre-riscaldato, è poi stato aggiunto 1 µl di enzima *M-MLV* (200 U/ µl) e il campione è stato incubato a 37°C per 50 minuti. Infine, per inattivare l'enzima, la miscela di reazione è stata incubata per 15 minuti a 70°C. Il cDNA ottenuto è stato conservato a -20°C.

Le successive reazioni di PCR sono state effettuate utilizzando la polimerasi *DyNAzyme™ II* (Finnzymes) in miscele di reazione allestite come indicato di seguito.

In una provetta da 200 µl sono stati aggiunti i componenti riportati nella successiva tabella.

<i>Componente</i>	<i>Volume</i>
cDNA	1 µl
<i>Mg Free Buffer</i> 10X	5µl
MgCl ₂ 50 mM	1,5 µl
dNTP <i>mix</i> 10 mM	1 µl
<i>Forward Primer</i> 100 mM	0,2 µl
<i>Reverse Primer</i> 100 mM	0,2 µl
<i>Taq</i> polimerasi	0,25 µl
Acqua	40,85 µl

L'amplificazione è stata condotta in un *thermocycler* che è stato così programmato:

94°C per 2 minuti, un ciclo

94°C	30 secondi	} 25-35 cicli
52°C-69°C	30 secondi	
72°C	1 minuto	

72°C per 5 minuti, un ciclo

Le sequenze dei *primer* utilizzati nelle reazioni di amplificazione sono riportate nella tabella 3.1. La temperatura di *annealing* è stata scelta di volta in volta in base alla sequenza del *primer* utilizzato.

PRODUZIONE DI OLIGONUCLEOTIDI SPECIFICI

Per l'analisi di PCR sono stati disegnati *primer* specifici utilizzando l'apposito programma *Primer3Plus* (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>). I *primer* sono stati forniti dalla PRIMM (<http://www.primmbiotech.com/>).

NOME	SEQUENZA 5' → 3'	TEMPERATURA DI MELTING
He1UTRfor	AAAGGGTTTTGCTTTGAATGAA	52.8°C
He2UTRrev	CTGCAACGAGAAATACAAAAGAGC	59.3°C
MX17.6bfor	TGCCTCGAGTATACACTTAACATCAT	70°C
MXM17.6bfor	TGCCTCGAGAAAGATGTTGG	60°C
LTR17.6bfor	TGCCTCGAGCTGATGCCGACCAAACAAC	70°C
MXD17.6bfor	TGCCTCGAGTTAATTTCTCTTCTT	66°C
MXCBOX17.6bfor	TGCCTCGAGCAAGACGTT	56°C
MXH17.6for	TGCCTCGAGTTGAAAAGAACT	60°C
MB17.6brev	TTGGATCCTTTTCGAATGTTTTG	62°C
secGFPHfor	TGCCTCGAGAAGCTCCTAT	58°C
secGFPHrev	GATCATGAACGACTCTAGAGGAT	66°C
GFP1F	GAGGGTGAAGGTGATGCAA	58°C
GFP1R	TGTATAGTTCATCCATGCCATGTGTA	72°C
ACTABRTF	CGCGAAAAGATGACTCAAATCA	62°C
ACTABRTR	AGCAGAGGCGAATCCAGAATT	62°C

Tabella 3.1. Elenco di tutti i *primer* utilizzati in questo lavoro; è riportata anche la temperatura di *melting*.

AMPLIFICAZIONE DEL DNA GENOMICO MEDIANTE PCR

Per isolare la regione intergenica, è stata condotta una reazione di PCR sul DNA genomico di girasole, varietà *Gloriasol*, utilizzando gli opportuni *primer* e il kit *TripleMaster® PCR System* (Eppendorf, <http://www.eppendorf.it/>). La reazione di PCR è stata eseguita in un volume finale di 50 µl seguendo il protocollo previsto dal produttore. L'amplificazione è stata condotta in un *thermocycler* che è stato così programmato: il DNA genomico è stato inizialmente denaturato a 93°C per 3 minuti, sono quindi seguiti 10 cicli: a 93°C per 15 secondi, 52°C per 30 secondi, e 68°C per 5 minuti. Dall'undicesimo ciclo in poi il tempo di estensione scelto è stato allungato di ulteriori 5 secondi per ogni ciclo successivo. La reazione di PCR è terminata con uno *step* di estensione finale a 68°C per 5 minuti.

ELUIZIONE DI FRAMMENTI DI DNA DA GEL DI AGAROSIO E PURIFICAZIONE DEI PRODOTTI DI AMPLIFICAZIONE

L'eluizione dei frammenti di DNA dal gel di agarosio e la purificazione dei prodotti di amplificazione sono state effettuate utilizzando il kit *Wizard® SV GEL and PCR Clean-Up System* (Promega). Tale *kit* sfrutta la capacità intrinseca della molecola di DNA di legarsi ad una membrana di silice in presenza di sali caotropici. Il DNA è stato purificato seguendo il protocollo previsto dal produttore: la porzione di gel contenente il frammento di DNA di interesse è stata tagliata ed è stata posta in un tubo da centrifuga; sono stati aggiunti 10 µl di *Membrane Binding Solution* (Guanidina tiocianato 4,5 M; Potassio acetato 0,5 M pH 5,0) per 10 mg di gel di agarosio; la miscela è stata rimescolata al *vortex* e quindi incubata a 65°C fino ad ottenere la completa dissoluzione del gel; il gel dissolto, c (o il prodotto di PCR trattato) è stato trasferito in una minicolonna assemblata, nella quale è montata la membrana di silice, ed è stato incubato per 1 minuto a temperatura ambiente. Il campione è stato centrifugato a 16000 x g per 1 minuto ed il liquido che si deposita nell'apposito tubo di raccolta, nel quale la minicolonna è montata, è stato eliminato. Il DNA legato alla membrana è stato purificato mediante un lavaggio con 700 µl di *Membrane Wash Solution* (Potassio acetato 10 mM pH 5; EDTA 16,7 µM pH 8; Etanolo 80%) seguito da centrifugazione a 16000 x g per 1 minuto.

Dopo aver svuotato il tubo da raccolta si è effettuato un secondo lavaggio con 500 µl di *Membrane Wash Solution* e si è centrifugato a 16000 x g per 5 minuti; la minicolonna è stata trasferita delicatamente in un tubo sterile da centrifuga; sono stati aggiunti 30 µl di *Nuclease-Free Water* è, dopo aver incubato per 1 minuto a temperatura ambiente, il DNA è stato eluito mediante centrifugazione a 16000 x g per 1 minuto; il DNA è stato conservato a 4°C.

CLONAGGIO DI FRAMMENTI DI DNA NEL VETTORE *pGEM®-T EASY*

I prodotti di PCR sono stati clonati nel plasmide *pGEM®-T Easy* (Promega) (Figura 3.1). Esso è particolarmente adatto per il clonaggio di prodotti di PCR in quanto viene fornito dalla ditta produttrice linearizzato e presenta ad entrambe le estremità un residuo di timidina che serve per l'appaiamento con il residuo di adenosina presente all'estremità del frammento di DNA amplificato.

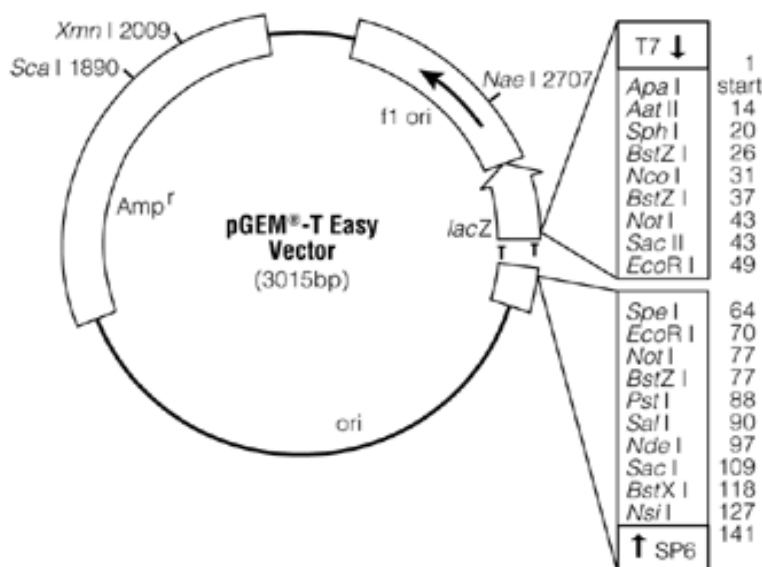


Figura 3.1. Mappa circolare del plasmide *pGEM®T Easy*.

La formazione della molecola ricombinante viene stabilizzata dalla ligazione, sono stati quindi preparati 10 µl di miscela di ligazione contenente i seguenti componenti:

<i>Miscela di ligazione</i>	
<i>Componente</i>	<i>Volume</i>
<i>2X Rapid Ligation Buffer</i>	5 µl
<i>pGEM®-T Easy (50 ng/µl)</i>	1 µl
Prodotto di PCR	3 µl
T4 DNA Ligasi (3 U/µl)	1 µl

La miscela di ligazione è stata incubata per 1 ora a temperatura ambiente o, se è richiesto il massimo numero di ricombinanti, a 4°C per tutta la notte.

PREPARAZIONE DELLE CELLULE COMPETENTI

E' stato utilizzato un ceppo di *Escherichia coli*: *DH5α*.

Per rendere competenti le cellule è stata utilizzata la seguente procedura: è stata allestita una pre-coltura inoculando una colonia in 5 ml di LB *medium* (Tryptone 10 g/l; Estratto di lievito 5 g/l; NaCl 10g/l; pH 7,5) (Sigma, <http://www.sigmaaldrich.com/italy.html>), e le cellule sono state fatte crescere a 37°C in agitazione, per tutta la notte; il giorno dopo, l'inoculo è stato diluito in 25 ml di LB all'interno di una beuta sterile che è stata posta a 37°C in agitazione; le cellule sono state fatte crescere sino a una D.O.600 = 0,3–0,4; la coltura è stata centrifugata per 10 minuti a 3000 x g; è stato eliminato il sovrnatante e le cellule sono state immediatamente incubate in ghiaccio; le cellule sono state poi risospese in un volume di TSB (*Transfer and Storage Buffer*) + DMSO (Dimetilsolfossido) pari a 1/10 del volume iniziale della coltura; la sospensione cellulare è stata incubata in ghiaccio per 20 minuti; essa è stata poi suddivisa in aliquote da 100 µl in tubi freddi di polipropilene; le cellule così preparate sono state utilizzate subito per la trasformazione.

TRASFORMAZIONE CELLULE COMPETENTI

Per trasformare le cellule competenti è stata seguita la seguente procedura: a 100 µl di cellule competenti sono stati aggiunti 5 µl di miscela di ligazione; le cellule sono state incubate in ghiaccio per 30 minuti; successivamente sono state poste a 42°C per 30 secondi in un bagno termostato; sono stati poi aggiunti 250 µl di SOC *medium* (Tryptone 2%; Estratto di lievito 0,5%; NaCl 10 mM; KCl 2,5 mM; MgCl₂ 10 mM; MgSO₄ 10 mM; Glucosio 20 mM; pH 7) e le cellule sono state incubate 37°C per un'ora in agitazione; aliquote di 100 e 200 µl di cellule sono state piastrate uniformemente su capsule Petri contenenti LB più Agar 15 g/l con ampicillina 100 mg/ml; 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galattoside (X-Gal) 64 µg/ml; isopropiltiogalattoside (IPTG) 160 µM; le piastre sono state incubate a 37°C per tutta la notte.

DIGESTIONE DEL DNA PLASMIDICO

Il DNA plasmidico è stato digerito con l'enzima di restrizione *EcoRI* per excidere i frammenti di DNA dal vettore *pGEM-T- Easy*. Le reazioni sono state allestite come di seguito indicato e sono state poste a 37°C per un ora.

<i>Componente</i>	<i>Volume</i>
DNA	5 µl
<i>Buffer</i> 10X	1 µl
<i>EcoRI</i> (10 U/ µl)	0,5 µl
Acqua	3,5 µl

I prodotti della digestione sono stati analizzati mediante elettroforesi su gel di agarosio 1%, con etidio bromuro (0,5 µg/ml), in tampone TAE 1X.

ANALISI DI SEQUENZA

Per ogni plasmide ricombinante purificato sono state preparate aliquote contenenti circa 400 ng di DNA da utilizzare per una singola reazione di analisi di sequenza utilizzando i *primer* universali: M13 *forward* ed M13 *reverse*. Le soluzioni sono state quindi inviate presso l'ISPA-CNR-Sezione di Lecce, dove sono state sottoposte ad analisi di sequenza mediante il sequenziatore automatico ABI PRISM 310 (*Applied Biosystem*).

RISORSE WEB

Per la ricerca di sequenze di DNA, è stata utilizzata la banca dati: **NCBI** (*The National Center for Biotechnology Information*, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Per il confronto delle sequenze nucleotidiche è stato utilizzato il programma **BLAST** (<http://www.ncbi.nih.gov/BLAST>). La determinazione del grado di omologia tra sequenze nucleotidiche o di identità tra sequenze amminoacidiche è stata effettuata mediante il programma **ClustalW** (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>). La traduzione delle sequenze nucleotidiche è stata effettuata con il programma **Translate Tool** (<http://www.expasy.org/tools/dna.html>).

Per lo studio e l'analisi di sequenza dei promotori sono stati utilizzati il programma: **TSSP/ Prediction of PLANT Promoters** (*Using RegSite Plant DB, Softberry Inc*) e le banche dati: **PLACE** (<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/>) e **PlantCARE** (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>).

PRODUZIONE DEI COSTRUTTI RICOMBINANTI

Per l'analisi funzionale della regione a monte del gene *HaHSP17.6b* è stato usato un vettore denominato *secGFP* gentilmente fornito dal laboratorio di Biologia Cellulare dei Vegetali dell'Università del Salento guidato dalla Prof.ssa Gabriella Piro. L'organizzazione schematica di questo plasmide è riportato di seguito (Figura 3.2).

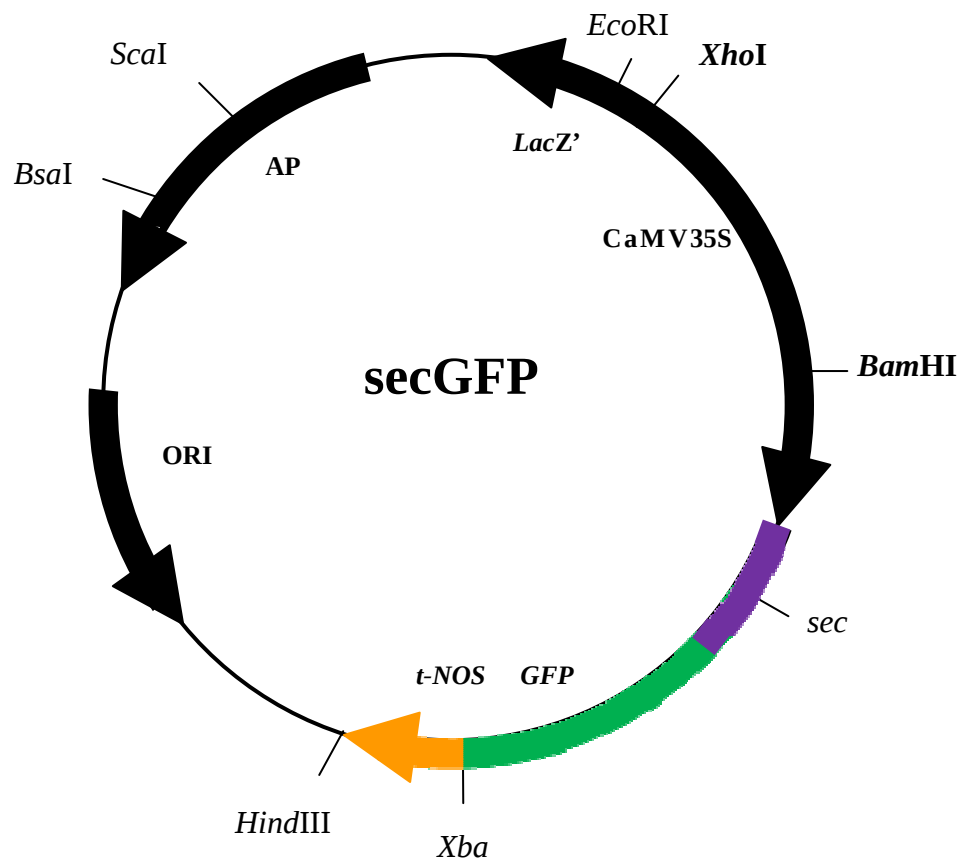


Figura 3.2. Mappa di restrizione del plasmide *secGFP* derivato da pUC19. AP: gene che conferisce la resistenza all'ampicillina. ORI: origine di replicazione. *t-NOS*: sequenza di terminazione della trascrizione derivata dal gene per la nopalina sintetasi. *Sec*: sequenza del peptide segnale che favorisce la secrezione della proteina GFP all'esterno della cellula. *GFP*: sequenza del gene codificante per la *Green Fluorescent Protein*. In grassetto sono indicati i siti unici di restrizione utilizzati per la preparazione dei costrutti ricombinanti.

Il vettore *secGFP*, deriva dal plasmide pUC19 e contiene il promotore forte del gene 35S di CaMV (*Cauliflower Mosaic Virus*) a monte del gene per la GFP (*Green Fluorescent Protein*), il terminatore del gene *Nos* (*Nopaline synthase*) e un peptide segnale denominato *sec*. Questo è un segnale di localizzazione endocellulare che promuove la secrezione della proteina GFP all'esterno della cellula. Il vettore *secGFP* è stato digerito con gli enzimi di restrizione *XhoI/BamHI* al fine di eliminare il promotore forte CaMV35S. Differenti porzioni della regione a monte del gene *HaHSP17.6b* sono state amplificate utilizzando la Taq polimerasi *DyNAzyme™ II* (Finnzymes) utilizzando i *primer* localizzati in punti differenti della sequenza. I *primer* utilizzati, riportati nella Tabella 3.1, contengono i siti di riconoscimento per gli enzimi di restrizione *XhoI* e *BamHI*; questi permettono di inserire il prodotto di amplificazione nel vettore di espressione *secGFP*, in sostituzione del promotore forte CaMV35S precedentemente eliminato. Il prodotto di amplificazione è stato purificato mediante *PureLink™ Quick Gel Extraction Kit* (Invitrogen). Successivamente l'amplificato è stato digerito con gli enzimi di restrizione *XhoI* e *BamHI* a 37°C per 2 h. Le reazioni di ligazione sono state effettuate utilizzando diversi rapporti di ligazione tra vettore e inserto, calcolando la quantità di inserto da impiegare con la seguente formula:

$$\text{ng di inserto} = \frac{(\text{ng di vettore} \times \text{dimensione in kbp dell'inserto})}{\text{dimensioni in kbp del vettore}}$$

Ogni miscela di reazione è stata incubata in presenza dell'enzima T4 DNA ligasi (Promega) e del tampone di ligazione 1X. La miscela di ligazione è stata posta a 4°C *over night*.

PROCEDURE SPERIMENTALI PER LA CARATTERIZZAZIONE DEI COSTRUTTI OTTENUTI

MATERIALE VEGETALE

In questo lavoro sono state utilizzate piantine di 8-10 settimane di *Nicotiana tabacum* L., cv. SR1, cresciute in condizioni di sterilità in scatole Magenta contenenti terreno *Murashige and Skoog* (composto da micro, macro elementi e vitamine) con 15% di saccarosio e 8% di agar. Le piantine sono state fatte crescere in una camera di crescita a 25°C. In seguito, le piantine sono state trasferite e messe a crescere in vasi contenenti terriccio nelle stesse camere termostatate.

PREPARAZIONE DEI PROTOPLASTI DA FOGLIE DI *N. tabacum*

I protoplasti sono stati ottenuti dal mesofillo fogliare di *N. tabacum*, qui di seguito è dettagliatamente descritta la procedura con cui sono stati isolati i protoplasti dalle foglie di *N. tabacum*. La composizione di tutte le soluzioni utilizzate è riportata nelle pagine successive, alla fine della sezione Materiali e Metodi.

Le foglie più espanse di una piantina sono state trasferite, in condizioni sterili, in una piastra Petri e ad esse sono stati aggiunti 2 ml di Soluzione di Digestione. Per garantire le condizioni sterili delle foglie, queste sono state precedentemente lavate con candeggina al 10%, in condizioni di sterilità. Dalle foglie è stata rimossa la nervatura centrale, sono stati praticati numerosi tagli e sono stati aggiunti altri 8 ml di Soluzione di Digestione per un totale di 10 ml finali per ogni piastra. Le piastre, quindi, sono state chiuse con *parafilm* e messe a incubare *over night* al buio a 26°C. Per permettere ai protoplasti di distaccarsi completamente dall'epidermide della foglia, le piastre sono state poste ad agitare delicatamente per 15-20 min. La sospensione di protoplasti è stata poi prelevata con una pipetta con la punta tagliata (per evitare di danneggiare le cellule), filtrata attraverso una maglia d'acciaio con un passo di 150 *mesh* (Sigma) e divisa in aliquote da 5 ml in tubi da 12 ml.

Sulla superficie di ogni aliquota è stato stratificato 1 ml di soluzione W5 senza mescolare le due fasi che si formano, creando così un gradiente. Si è centrifugato, con una centrifuga con rotore a braccio oscillante (*Allegra™ 2IR Centrifuge, Beckman Coulter™*) per 10 min a 80 x g senza freni e con un'accelerazione minima.

I protoplasti interi si raccolgono all'interfaccia tra le due fasi, mentre quelli rotti si depositano sul fondo. I protoplasti integri sono stati raccolti con una pipetta con la punta tagliata, cercando di non prelevare la fase inferiore (Soluzione di Digestione), ma prelevando tutta la fase superiore (Soluzione W5). A questa sospensione di cellule sono stati aggiunti 10 ml di soluzione W5 e, dopo una delicata agitazione, i protoplasti sono stati centrifugati per 5 min a 80 x g (al fine di eliminare del tutto la Soluzione di Digestione); con un movimento deciso è stato eliminato il sovranatante lasciando il *pellet* sul fondo. Sono stati poi effettuati due successivi lavaggi uguali al primo, i protoplasti sono stati risospesi in un volume di 6 ml di Soluzione W5 infine, i tubi sono stati incubati in posizione orizzontale a 4°C per 2h.

TRASFORMAZIONE DEI PROTOPLASTI PER L'ANALISI DELL'ESPRESSIONE TRANSIENTE

Dopo 2 h a 4°C si è proceduto raccogliendo i protoplasti per centrifugazione (80 x g per 5 min); il sovranatante è stato eliminato e il *pellet* è stato risospeso in Soluzione MMM ad una concentrazione di $2,5 \times 10^6$ protoplasti/ml è stata quindi, effettuata la trasformazione dei protoplasti seguendo i passaggi sotto riportati. Sono stati preparati nuovi tubi e in essi sono stati messi 300 µl di sospensione di protoplasti usando una pipetta dalla punta tagliata; è stato poi aggiunto il DNA plasmidico (10 µg per costrutto utilizzato) il tubo è stato agitato delicatamente; sono stati aggiunti 300 µl di Soluzione PEG (*Polietilenglicole*) e, agitando delicatamente per mescolare le due fasi che si creano, si è atteso per 1 min; sono stati aggiunti 2 ml di Soluzione K3 (Saccarosio 0,3 M); infine, la soluzione ottenuta è stata messa ad incubare a 26°C, al buio.

Dopo 2 h sono stati aggiunti 5 ml di Soluzione W5 per lavare via la Soluzione PEG centrifugando a 80 x g per 5 min; i protoplasti sono stati quindi risospesi in 2 ml di Soluzione K3 e messi a incubare a 26°C al buio fino al giorno dopo.

K3 Macro (1 litro)	
Componente	Quantità
KNO ₃	25,3 g
NH ₄ NO ₃	2,5 g
NaH ₂ PO ₄ * 2H ₂ O	1,5 g
CaCl ₂ * 2H ₂ O	9,0 g
MgSO ₄ * 7H ₂ O	2,5 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,34 g

K3 100X-vit (100 ml)	
Componente	Quantità
Inositolo	1 g
Piridossina HCl	0,010 g
Tiamina HCl	0,100 g
Acido Nicotinico	0,010 g

B5-micro (100 ml)	
Componente	Quantità
H ₃ BO ₃	0,3 g
KI	0,075 g
MnSO ₄ * H ₂ O	1 g
ZnSO ₄ * 7H ₂ O	0,2 mg
CuSO ₄ * 5H ₂ O	2,5 mg
Na ₂ MoO ₄ * 2H ₂ O	25 mg
CoCl ₂ * 6H ₂ O	2,5 mg
Na ₂ EDTA (200X) 40 mM	14.92 g/l
FeCl ₃ * 6H ₂ O (200X) 40 mM	5,4 g/l

K3 (1 litro)	
<i>Componente</i>	<i>Volume/ Quantità</i>
K3 Macro	100 ml
Na ₂ EDTA (200X)	5 ml
FeCl ₃ * 6H ₂ O (200X)	5 ml
B5-micro	1 ml
K3-vit	10 ml
Saccarosio	102,7 g
Xilosio	0,25 g
Il pH è stato aggiustato a 5,8; la soluzione è stata sterilizzata in autoclave, successivamente sono stati aggiunti gli ormoni: 0,5 ml di 2,4-D; 5 ml di NAA; 1 ml di BAP.	

W5 (1 litro)	
<i>Componente</i>	<i>Concentrazione</i>
NaCl	154 mM
CaCl ₂ * 2H ₂ O	125 mM
KCl	5 mM
Glucosio	5 mM

MMM (100 ml)	
<i>Componente</i>	<i>Concentrazione</i>
Mannitolo	0.5 mM
MgCl ₂ * 6H ₂ O	15 mM
MES	0,1%

ORMONI	
2,4-D	20 mg in 1 ml di etanolo assoluto; si porta a 100 ml con H ₂ O
NAA	20 mg in 1 ml di etanolo assoluto; si porta a 100 ml con H ₂ O
BAP	20 mg in 1 ml di KOH 1M; si porta a 100 ml con H ₂ O

PEG (<u>P</u> oli <u>E</u> tilen <u>G</u> licole) 100 ml	
Componente	Concentrazione
Mannitolo	0,4 M
Ca(NO ₃) ₂	0,1 M
Aggiungere circa 40 ml di acqua distillata e portare a pH 8 con KOH. Aggiungere PEG 4000 al 40 % e portare a 100 ml con acqua distillata. Sterilizzare in autoclave.	

TRATTAMENTI DI STRESS

I protoplasti trasformati e i protoplasti di controllo (cioè non trasformati) sono stati sottoposti a diversi tipi di stress, per l'*Heat Shock* (HS), i protoplasti sono stati incubati per un ora in un termostato regolato a diverse temperature comprese tra 26°C e 42°C; per lo stress salino (NaCl), i protoplasti sono stati incubati in una soluzione di NaCl 0,4 M; per lo stress da metalli pesanti (CdSO₄), i protoplasti sono stati incubati in una soluzione di CdSO₄ 20mM; per lo stress da acido abscissico, i protoplasti sono stati incubati in una soluzione di ABA 100 µM; per lo stress da basse temperature i protoplasti sono stati incubati a 4°C.

L'incubazione dei protoplasti con i diversi agenti di stress è stata realizzata per tempi diversi compresi tra 30 minuti e 5 ore. In seguito a tutti i trattamenti di stress realizzati è stata effettuata una conta cellulare dei protoplasti mediante camera contaglobuli. Sono stati anche contati i protoplasti di controllo mantenuti a 26°C per tutta la notte.

4-RISULTATI

ANALISI STRUTTURALE DELLA REGIONE INTERGENICA

L'analisi dell'espressione dei due geni *HaHSP17.6a* e *HaHSP17.6b* effettuata in un lavoro precedente su piantine di girasole sottoposte a trattamento con alte temperature ed altri tipi fattori di stress (freddo, NaCl, metalli pesanti, etanolo) indica che i due geni vengono indotti solo da stimoli diversi, e con una intensità differente. (Rampino *et al.*, 2010). Poiché le loro porzioni codificanti sono pressoché identiche è stato ipotizzato che le differenze riscontrate siano da attribuire a differenze nelle regioni di regolazione dell'espressione. Allo scopo quindi di individuare la presenza di potenziali elementi *cis*, che potrebbero presumibilmente giustificare il diverso profilo di espressione dei due geni, la regione di 3809 bp, compresa tra le due ORF, è stata analizzata *in silico*.

Quest'analisi è stata effettuata confrontando la sequenza nucleotidica da analizzare con quelle presenti in due banche dati denominate **PLACE** (*Plant cis-acting regulatory DNA elements*) (Higo *et al.*, 1999) e **PlantCARE** (Lescot *et al.*, 2002). Le due banche dati utilizzate sono state scelte perché contengono sequenze caratteristiche di elementi *cis*-regolatori, *enhancer* e repressori tipici delle piante.

Questa analisi ha permesso di individuare le specifiche sequenze consenso caratteristiche dei promotori eucariotici, in particolare sono state individuate due probabili TATA *box* la cui sequenza 5'-TATAAAAT-3' rispettivamente a -118 bp e -116 bp dal probabile sito d'inizio della trascrizione di *HaHSP17.6a* e *HaHSP17.6b*. All'interno della regione di 3809 bp sono presenti anche le sequenze consenso specifiche che caratterizzano i promotori dei geni *heat shock*; infatti sono stati individuati probabili elementi HSE perfetti ed imperfetti (Wu, 1995); e numerose CCAAT-*box*. In particolare, nella regione a monte del gene *HaHSP17.6a* è presente la sequenza consenso di quello che si definisce un tipico elemento HSE perfetto (5'-CcaGAAagTTCtcGaa-3') localizzato a -18 bp dalla probabile TATA *box*. E' presente anche la sequenza relativa a quello che viene definito un HSE imperfetto (5'-ATAAAAATTT-3') localizzato a -61 bp, cioè in posizione più distale. Nella regione a monte del gene *HaHSP17.6b* è stato individuato un elemento HSE perfetto (5'-CatGAAagTTCccGAA-3') a -22 bp ed un HSE imperfetto (5'-TAAATTTTTT-3') a -54 bp dalla probabile TATA *box*, quindi questi elementi hanno una localizzazione molto simile nelle porzioni a monte dei due geni.

A monte degli elementi HSE sono state individuate numerose CCAAT box, la cui posizione è riportata nella Figura 4.1.

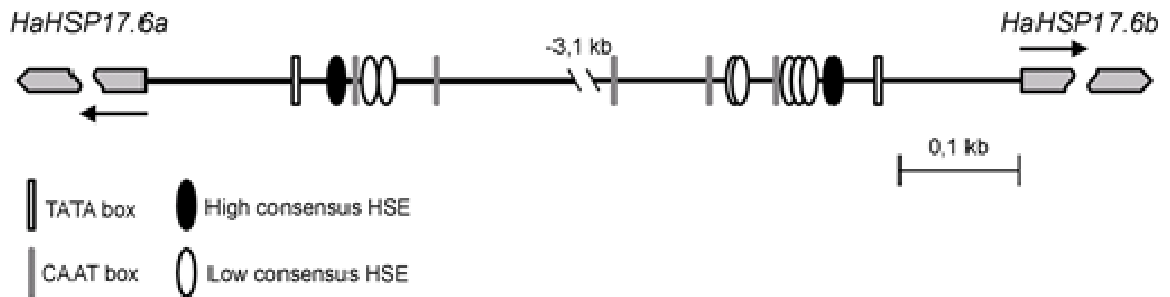


Figura 4.1. Rappresentazione schematica di alcuni degli elementi regolatori presenti nella regione intergenica tra *HaHSP17.6a* e *HaHSP17.6b*.

La regione a monte del gene *HaHSP17.6a* contiene un altro elemento caratteristico dei promotori HS, mentre la regione a monte del gene *HaHSP17.6b* ne è priva. Precisamente, subito a valle dell'elemento HSE imperfetto, a -870 bp dalla probabile TATA box, è stata individuata una regione ricca in A-T che, come riportato in letteratura, è coinvolta nella regolazione dei geni HS.

Il confronto tra i dati ottenuti in questo lavoro e quelli riportati da altri autori, riguardo alla struttura del promotore di geni per smHSP di girasole (Coca *et al.*, 1996; Almoguera *et al.*, 1998; Carranco *et al.*, 1999), indica che i diversi elementi HSE individuati nella regione a monte dei due geni sono distribuiti lungo entrambe le regioni secondo un'organizzazione che corrisponde a quella rilevata nei promotori di altri geni per HSP a basso peso molecolare di girasole (Figura 4.2). In particolare tutti i probabili elementi HSE sono localizzati a circa 90 nucleotidi a monte della probabile TATA box. Questa è un'ulteriore conferma che a monte di questi geni sono presenti elementi *cis* localizzati nella maniera adeguata perché essi vengano sovra-espressi in seguito a *heat shock*.

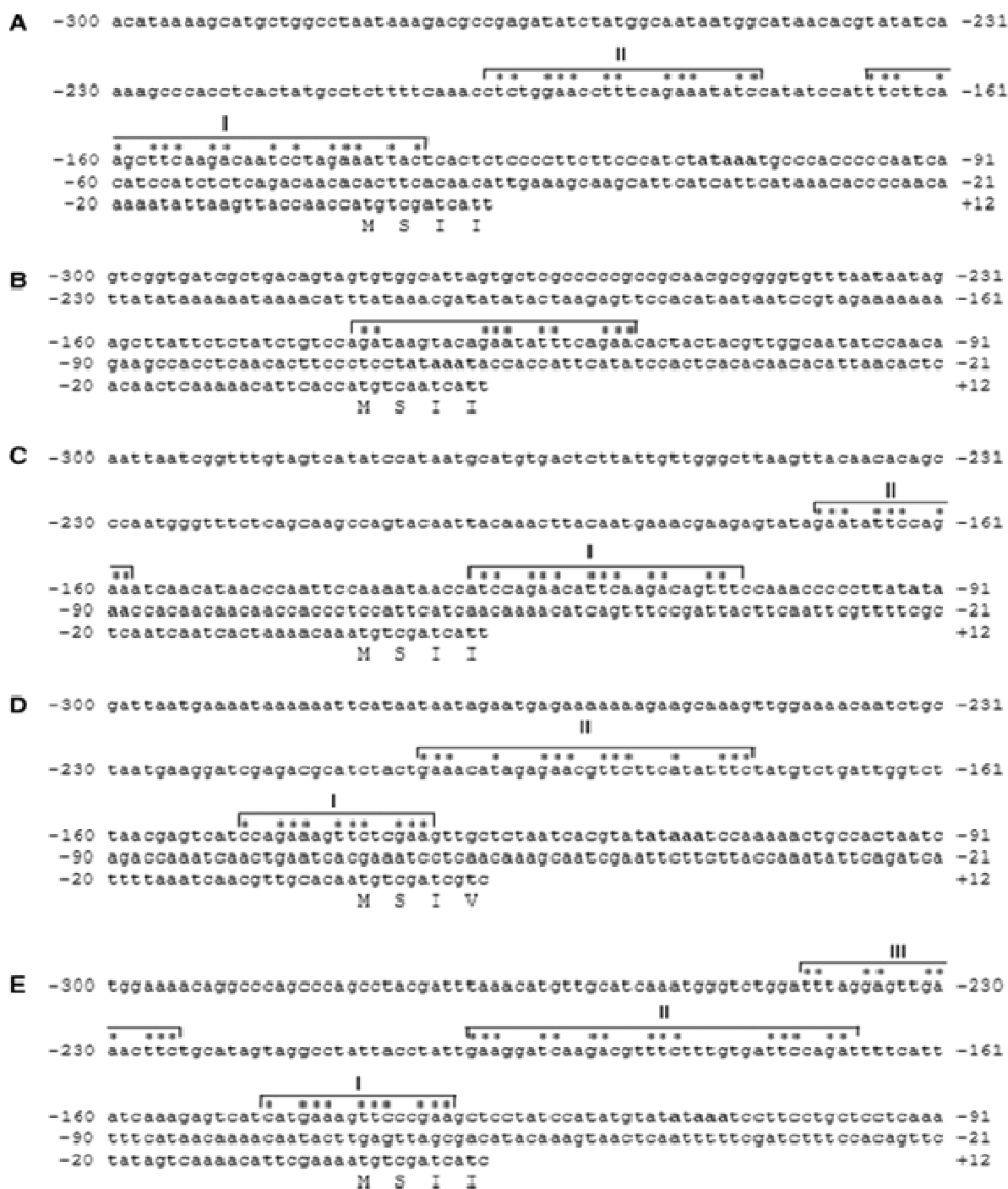


Figura 4.2. Confronto tra le sequenze nucleotidiche della regione in 5' a monte dei geni *HaHSP17.6a* e *HaHSP17.6b* con quelle di altri geni codificanti per *smHSP* di girasole, identificate da altri autori. Le lettere A, B, C, D ed E, si riferiscono rispettivamente alle sequenze dei geni *HaHSP17.7G4*, *HaHSP17.6G1*, *HaHSP18.G8*, *HaHSP17.6a* e *HaHSP17.6b*. I probabili elementi HSE sono racchiusi nelle parentesi; le unità alternate di 5'-nGAAn-3' sono contraddistinte da un asterisco. Gli HSE prossimali e distali sono indicati dai numeri romani I, II e III.

Lungo tutta la regione esaminata sono state individuate inoltre numerose altre sequenze consenso di elementi *cis* coinvolti nella risposta ad altri tipi di stress. Sono infatti presenti numerosi elementi ABRE (*Abscissic Acid Responsive Element*) coinvolti nella risposta allo stress da acido abscissico; diversi elementi ARE (*Anaerobic Responsive Elements*) e numerosi elementi coinvolti nella risposta alla luce. Più specificamente nella regione a monte del gene *HaHSP17.6b* sono presenti sequenze caratteristiche dei elementi coinvolti nella risposta alla luce (*Box 1*, *Box 4*, *G-Box*), elementi *cis* agenti coinvolti nella risposta allo stress anaerobio (ARE) ed elementi coinvolti nella risposta al trattamento con acido abscissico (ABRE).

Nel promotore del gene *HaHSP17.6b* sono state invece individuate sequenze per altri tipi di elementi *cis*-agenti coinvolti nella risposta alla luce (*G-box*, *GAG motif*, *GATA motif*). Sono state anche individuate sequenze caratteristiche di elementi ACE responsabili della risposta alla luce. Inoltre, nella regione a monte del gene *HaHSP17.6b* sono stati individuati, a circa -1524 bp dalla probabile TATA box, due elementi MRE (*Metal Responsive Elements*) coinvolti nella risposta allo stress da metalli pesanti; a -925 bp è stato individuato un elemento LTR (*Low Temperature Responsive Element*), coinvolto nella regolazione dei geni in risposta allo stress da basse temperature. A poche paia di basi dall'elemento LTR è stato individuato l'elemento DRE (*Dehydration Responsive Element*). Esso è coinvolto nella risposta a diversi tipi di stress: *drought*, stress salino, stress da basse temperature. Tutti gli elementi *cis* individuati mediante l'analisi *in silico* sono elencati nella Tabella 4.1.

Induttore	Nome	Sequenza Consenso	N° di Copie		Referenza
			Filamento +	Filamento -	
Alte Temperature	HSE	CNNGAANN TTCNNG	2	0	Schöffl <i>et al.</i> 1998
Acido Abscissico	ABRE	YACGTG	6	0	Hattori <i>et al.</i> 1995
Luce	G-box	CACGTG	7	1	Sommer and Saedler, 1986
	GATA-motif BoxI	GATA	0	2	Vorst <i>et al.</i> 1990
		TTTCAAA	3	1	Kuhlemeier <i>et al.</i> 1988
	Box4 ACE	ATTAAT	3	0	Lois <i>et al.</i> 1989
		AAAACGTTTA	0	1	Feldbrügge <i>et al.</i> 1994
	GT1-motif	GGTTAA	1	3	Vauterin <i>et al.</i> 1999
	Gap-Box	CAAATGAARA	2	1	Conley <i>et al.</i> 1994
	I-Box	GATATGG	0	3	Rosche and Westhoff, 1995
	C-Box GAG-motif	CTGACGTCAG	1	0	Vauterin <i>et al.</i> 1999
		AGAGAGT	2	1	Arguello-Astora <i>et al.</i> 1996
	chs-CMA1 TCCC-motif	TTACTTAA	1	0	Ozeki <i>et al.</i> 1993
		TCTCCCT	2	0	Bichler and Herrmann, 1990
	Sp1	CCRCCC	2	2	Litts <i>et al.</i> 1992
	At1-motif	ATTAATTTTACA	1	0	Chatterjee <i>et al.</i> 2007
	TCT-motif	TCTTAC	0	2	Kwon <i>et al.</i> 1994
	3-AF3 binding site	CACTATCTAAC	0	1	Kuhlemeier <i>et al.</i> 1988
Metil jasmonato	CGTCA-motif	CGTCA	1	3	Rouster <i>et al.</i> 1997
	TGACG-motif	TGACG	3	1	Rouster <i>et al.</i> 1997
Stress Anerobio	ARE	TGGTTT	2	5	Grover <i>et al.</i> 2001
Meristema	CAT-box	GCCACT	0	1	Meshi <i>et al.</i> 2000
Endosperma	GCN4-motif	TGAGTCA	0	1	Kim and Wu, 1990
	Skn-1-motif	GTCAT	5	2	Takaiwa <i>et al.</i> 1991
Auxina	TGA-box	TGACGTAA	1	0	Hagen <i>et al.</i> 1991
	TGA-element	AACGAC	0	1	Pastuglia <i>et al.</i> 1997
Acido Salicilico	TCA-element W-box	CCATCTTTTT	1	0	Hennig <i>et al.</i> 1993
		TTGCCY	1	0	Chen <i>et al.</i> 2002
<i>Drought</i>	DRE	TACCGACAT	0	1	Knight <i>et al.</i> 1999
Biosintesi di flavonoidi	MBSI	SGTTA	1	0	Koes <i>et al.</i> 1989
Basse Temperature	DRE	TACCGACAT	0	1	Knight <i>et al.</i> 1999
Controllo del Ciclo Circadiano	LTR	CCGAAA	2	1	White <i>et al.</i> 1994
	circadian	CAANNNNATC	1	0	Picherisky <i>et al.</i> 1985
Meccanismi di difesa	TC-rich	ATTYTCTWMM	2	1	Diaz-De-Leon <i>et al.</i> 1993
	Box-W1	TTGACC	1	0	Rushton <i>et al.</i> 1996

Tabella 4.1. Elementi regolatori presenti nella regione intergenica analizzata.

ANALISI FUNZIONALE DELLA REGIONE INTERGENICA

Poiché i dati precedenti indicavano che tra i due geni il più sensibile a diversi fattori di stress è il gene *HaHSP17.6b*, è stato deciso di fare una dissezione della regione a monte di questo gene. Al fine di verificare che le sequenze individuate come ipotetici segnali di regolazione (elementi *cis*) abbiano effettivamente un ruolo funzionale e siano coinvolte nel controllo trascrizionale di *HaHSP17.6b*. Si è deciso perciò di effettuare un'analisi funzionale di una regione di 1700 bp a monte di questo gene. Sulla base della struttura di questa regione e della posizione dei diversi motivi individuati *in silico*, sono stati disegnati *primer* specifici al fine di amplificare porzioni di dimensioni diverse di questa regione a monte del gene *HaHSP17.6b*. Sono stati disegnati sette *primer* senso ed un unico *primer* antisenso le cui sequenze sono riportate nella Tabella 4.2. E' da notare che i *primer* senso sono stati disegnati in modo da inserire all'estremità 5' della porzione da amplificare un sito di restrizione per *XhoI* (5'-CTCGAG-3'), il *primer* antisenso è stato invece disegnato in modo da inserire all'estremità 3' un sito di restrizione per *BamHI* (5'-GGATCC-3'). Il *primer* secGFPHrev è stato disegnato in modo da inserire all'estremità 5' della porzione da amplificare un sito di restrizione per *XbaI* (-AGATCT-).

NOME	SEQUENZA 5'→ 3'	TEMPERATURA DI MELTING
MX17.6bfor	TGCCTCGAGTATACACTTAACATCAT	70°C
MXM17.6bfor	TGCCTCGAGAAAGATGTTGG	60°C
LTR17.6bfor	TGCCTCGAGCTGATGCCGACCAAACAAC	70°C
MXD17.6bfor	TGCCTCGAGTTAATTTCTCTTCTT	66°C
MXCBOX17.6bfor	TGCCTCGAGCAAGACGTT	56°C
MXH17.6for	TGCCTCGAGTTGAAAAGAACT	60°C
MB17.6brev	TTGGATCCTTTTCGAATGTTTTG	62°C
secGFPHfor	TGCCTCGAGAAGCTCCTAT	58°C
secGFPHrev	GATCATGAACGACTCTAGAGGAT	66°C

Tabella 4.2. Elenco dei *primer* utilizzati per amplificare porzioni differenti della regione lunga circa 1700 bp, posta a monte del gene *HaHSP17.6b*. E' riportata anche la temperatura di *melting*. In grassetto sono evidenziate le sequenze specifiche dei siti per gli enzimi di restrizione *XhoI* (-CTCGAG-), *BamHI* (-GGATCC-) e *XbaI* (-AGATCT-).

Nella figura 4.3 sono riportate le posizioni delle sequenze complementari ai diversi *primer* sul frammento da amplificare ed è riportata solo la porzione di circa 1700 bp che si ottiene dopo l'amplificazione mediante PCR.

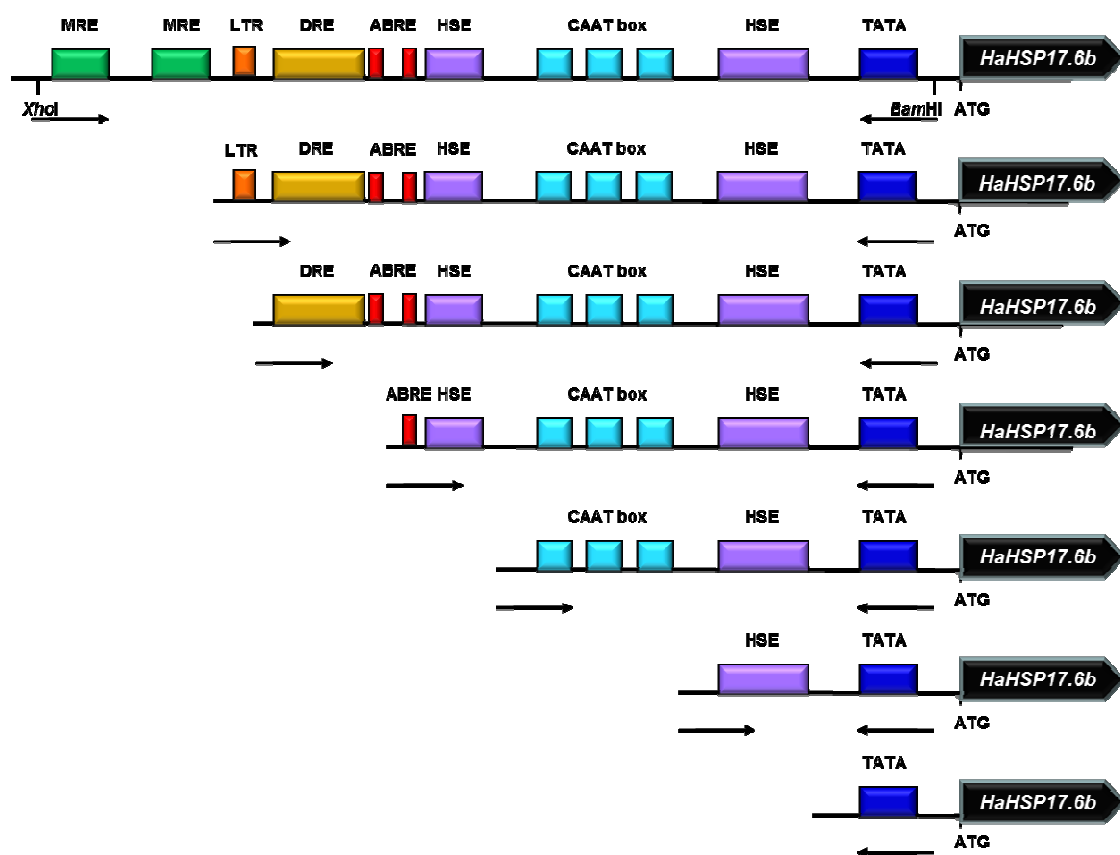


Figura 4.3. Rappresentazione schematica della regione di circa 1700 bp posta a monte del gene *HaHSP17.6b* e degli elementi di regolazione in essa presenti; sono indicate anche le posizioni dei *primer* utilizzati per amplificare i frammenti di dimensioni differenti corrispondenti a porzioni parziali della regione d'interesse.

L'aggiunta dei due siti di restrizione alle estremità dei *primer* è necessaria per le successive fasi di clonaggio. I frammenti di delezione della regione a monte del gene *HaHSP17.6b*, dopo essere stati amplificati e tagliati con gli enzimi di restrizione *XhoI* e *BamHI*, sono stati purificati dal gel di agarosio e inseriti nel vettore *secGFP* a monte del gene *reporter GFP*. Secondo lo schema riportato nella Figura 4.4. Lo schema riportato è valido anche per tutti gli altri frammenti di delezione ottenuti dall'amplificazione con reazioni di PCR realizzate utilizzando i diversi *primer*.

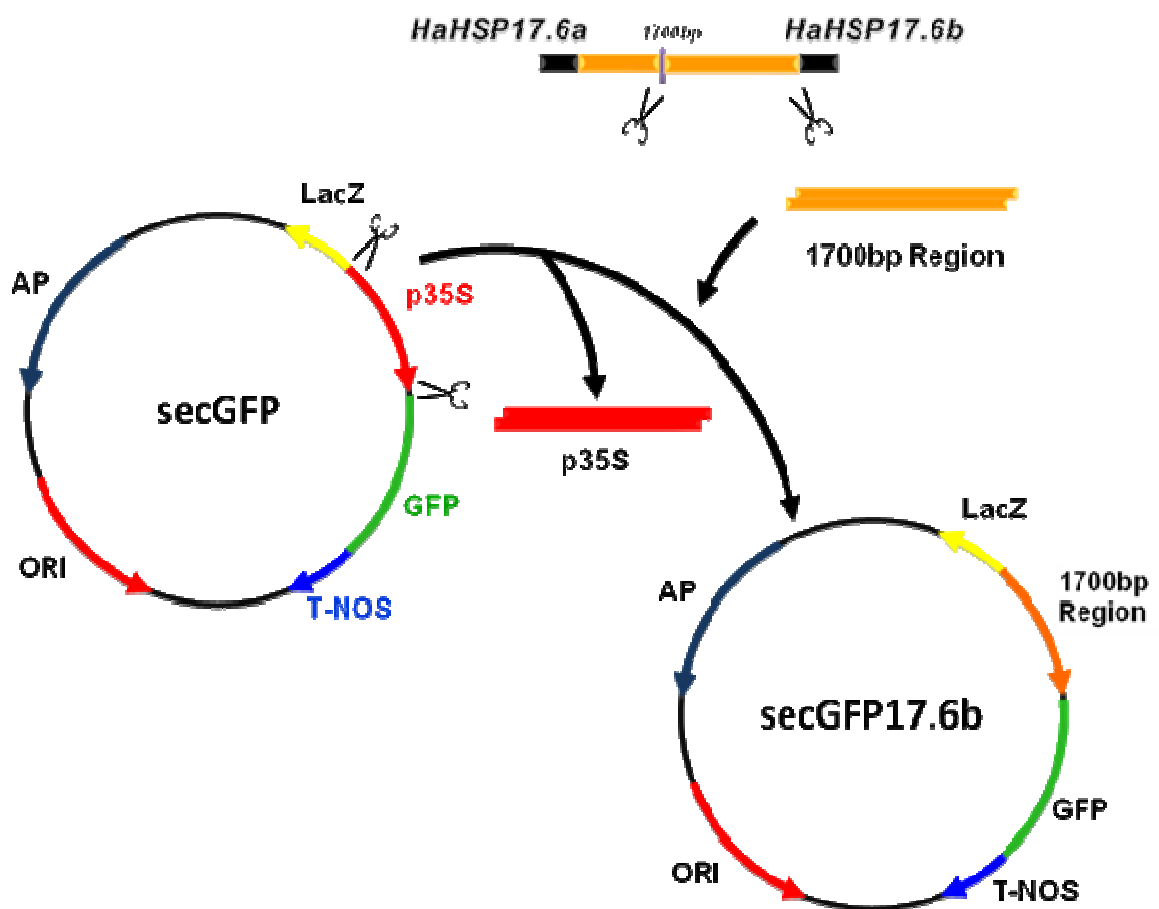


Figura 4.4. Schema del clonaggio del frammento di circa 1700 bp, della regione a monte del gene *HaHSP17.6b*, nel vettore *secGFP* opportunamente modificato.

Prima di procedere alle operazioni di clonaggio il vettore *secGFP* era stato opportunatamente modificato, rimuovendo il promotore forte CaMV35S per inserire al suo posto i diversi frammenti di delezione della regione oggetto di studio. Sono stati così ottenuti diversi plasmidi ricombinanti la cui autenticità è stata confermata mediante analisi di sequenza; essi possiedono tutti una cassetta di espressione caratterizzata dalla stessa struttura di base dalla sequenza codificante del gene *GFP* e da quella del terminatore *nos* (*T-Nos*). I plasmidi, denominati *secGFP1682bp*, *secGFP1574bp*, *secGFP1037bp*, *secGFP859bp*, *secGFP311bp*, *secGFP133bp*, differiscono solo per la diversa lunghezza della sequenza derivata dalla regione a monte del gene *HaHSP17.6b* (Figura 4.5), posta a monte del gene *GFP*.

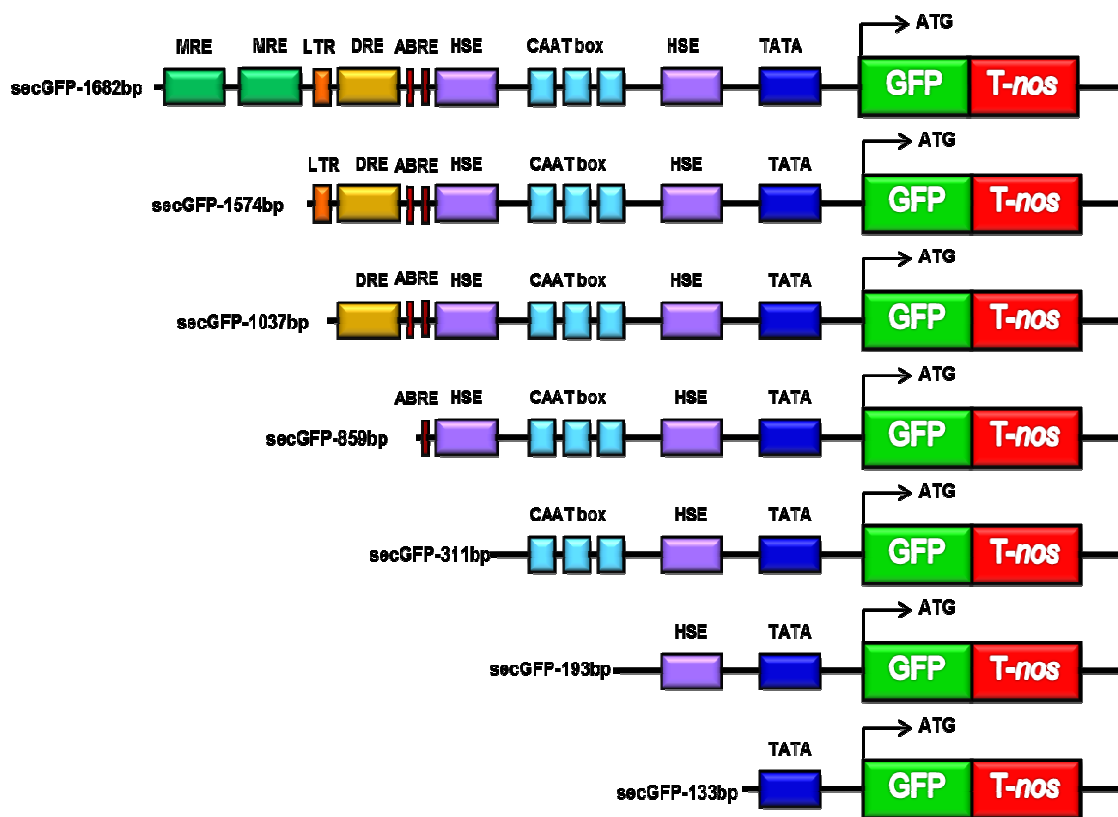


Figura 4.5. Rappresentazione schematica dei costrutti ricombinanti ottenuti inserendo frammenti di delezione della regione a monte del gene *HaHSP17.6b* nel vettore *secGFP* nella regione promotore di GFP. Ogni costrutto è denominato *secGFP-* seguito da un numero che si riferisce alla lunghezza in bp del frammento inserito.

Il frammento amplificato con la coppia di *primer* *MX17.6bfor/ MB17.6brev* è quello di dimensioni maggiori, pari a 1682 bp, e contiene tutti gli elementi regolatori individuati e presi in considerazione nella regione oggetto di studio: due elementi MRE, un elemento LTR, un elemento DRE, due elementi ABRE, un elemento HSE perfetto prossimale alla probabile TATA *box* e un elemento imperfetto più distale, tre CCAAT *box*, ed una TATA *box*. Il plasmide ricombinante che si ottiene inserendolo nel vettore è stato denominato secGFP17.6b.

Utilizzando la coppia di *primer* *MXM17.6bfor/ MB17.6brev* si ottiene un frammento di delezione lungo 1574 bp, che ha perso, rispetto al primo, i due elementi MRE; il plasmide corrispondente è stato denominato secGFP1574bp.

Il frammento di delezione lungo 1037 bp è stato amplificato utilizzando la coppia di *primer* *LTR17.6bfor/ MB17.6brev*, e ha perso anche l'elemento LTR; il plasmide corrispondente è denominato secGFP1037bp.

Dal frammento di delezione, ottenuto con la coppia di *primer* *MXD17.6bfor/ MB17.6brev*, lungo 859 bp, è stato eliminato anche un elemento ABRE; il plasmide corrispondente è denominato secGFP859bp.

Dal frammento lungo 311 bp, ottenuto con la coppia di *primer* *MXH17.6bfor/ MB17.6brev*, è stato eliminato il successivo elemento ABRE e l'HSE imperfetto; il plasmide è denominato secGFP311bp.

Utilizzando la coppia di *primer* *MXCBOX17.6bfor/ MB17.6brev* si ottiene il frammento lungo 193 bp che contiene l'HSE perfetto e la TATA *box*, mentre sono state eliminate le CAAT *box*; il plasmide corrispondente è denominato secGFP193bp.

Il frammento più breve, lungo solo 133 bp, ottenuto con la coppia di *primer* *secGFPHfor/ secGFPHrev*, è stato privato anche dell'HSE perfetto e quindi contiene solo la TATA *box*; il plasmide corrispondente è denominato secGFP133bp.

SAGGI DI ESPRESSIONE TRANSIENTE IN PROTOPLASTI DI *Nicotiana tabacum*

Tutti i plasmidi ricombinanti ottenuti sono stati utilizzati per effettuare i saggi di espressione transiente nei protoplasti isolati da foglie di *Nicotiana tabacum*.

Tuttavia, al fine di operare in condizioni sperimentali ottimali, prima di procedere con i saggi di espressione transiente, sono stati messi a punto i parametri più adatti per il trattamento dei protoplasti con i diversi tipi di stress, sono stati cioè stabiliti i tempi, le temperature e le concentrazioni adatte da utilizzare affinché i protoplasti non subiscano, durante le manipolazioni, un danno talmente grave da mascherare la reale risposta cellulare alla percezione dei diversi tipi di stress.

Perciò protoplasti, da noi denominati *wild type*, cioè non trasformati, e protoplasti trasformati con due plasmidi differenti sono stati sottoposti a diversi trattamenti: stress da alte temperature, stress salino, stress da metalli pesanti, stress da acido abscissico e stress da basse temperature come riportato precedentemente (Materiali e Metodi). Successivamente, utilizzando una camera conta globuli, è stata effettuata la conta delle cellule vitali al microscopio ottico. I protoplasti vivi si riconoscono per la loro caratteristica forma tondeggianti dovuta alla presenza del vacuolo, mentre i protoplasti morti hanno perso la forma tondeggiante a causa della rottura del vacuolo. L'immagine al microscopio è riportata nella Figura 4.6. Il pannello A si riferisce ai protoplasti trasformati con il plasmide secGFP300 non sottoposti ad alcun tipo di stress.

Nel campo visivo a fuoco sono evidenti numerosi protoplasti dall'aspetto vitale, mentre sul fondo sono visibili solo rari protoplasti morti. Il pannello B si riferisce ai protoplasti trasformati con il plasmide secGFP300 e sottoposti a *heat shock* (1h a 38°C). Nel campo visivo a fuoco sono presenti numerosi protoplasti vitali, sul fondo sono visibili i protoplasti morti in numero decisamente maggiore rispetto alla condizione riportata nel pannello A.

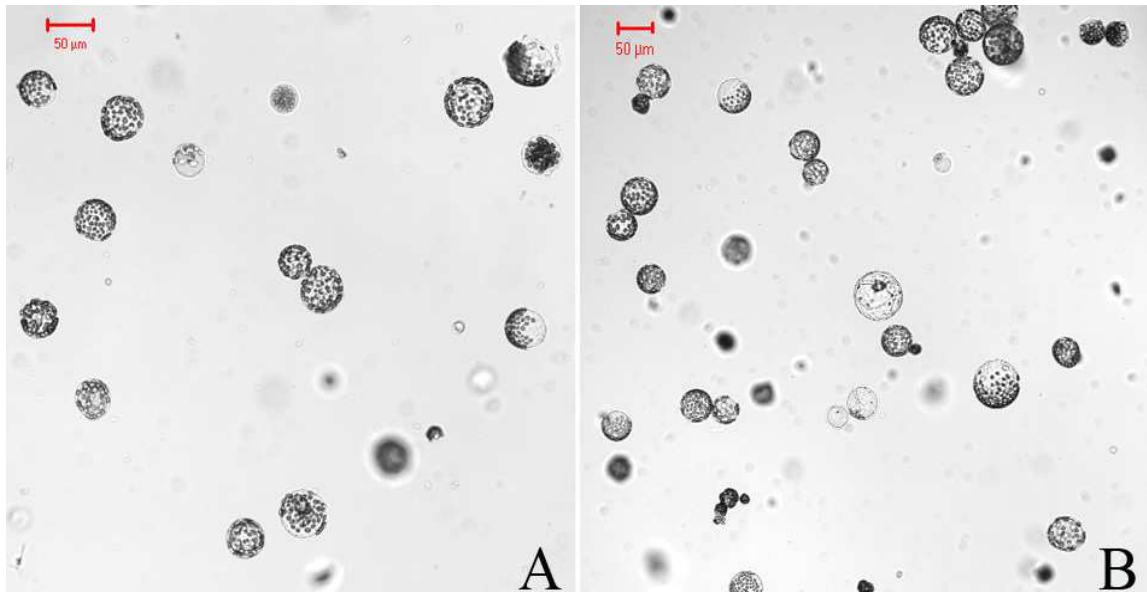


Figura 4.6. Immagine al microscopio ottico di protoplasti di *N.tabacum* trasformati con il plasmide *secGFP300*. **A:** protoplasti non sottoposti a stress. **B:** protoplasti sottoposti a *heat shock*.

In base ai dati ottenuti dal conteggio delle cellule vitali sono state scelte le condizioni di trattamento migliori. Nella figura 4.7 sono riportati in grafico il numero di protoplasti vitali e di quelli morti determinato in seguito ai diversi trattamenti sia per i protoplasti *wild type* che per quelli trasformati.

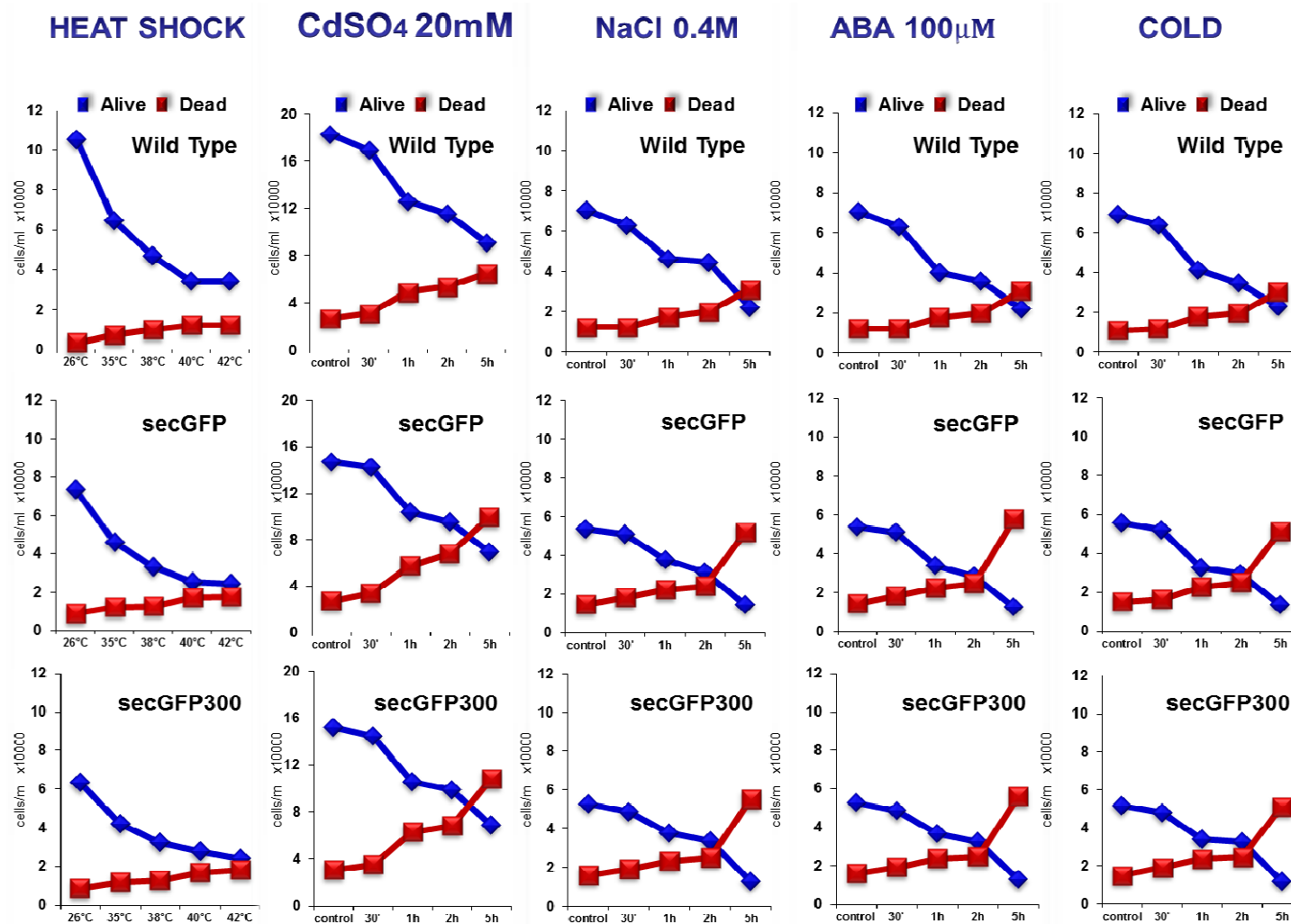


Figura 4.7. Il grafico rappresenta l'effetto degli stress sulla vitalità cellulare dei protoplasti di *N.tabacum*. I protoplasti wt e trasformati con due plasmidi differenti sono stati posti a temperature diverse per quanto riguarda lo stress termico; mentre per quanto riguarda gli altri stress sono stati valutati tempi di esposizione diversi. La conta cellulare è espressa in cellule/ml. In blu sono indicati i protoplasti vivi, in rosso i protoplasti morti. Gli esperimenti sono stati ripetuti più volte e il valore riportato costituisce la media dei valori rilevati.

I risultati ottenuti indicano chiaramente che già l'evento di trasformazione provoca una riduzione del numero di protoplasti vivi, indipendentemente dal trattamento a cui successivamente essi sono sottoposti; inoltre con il passare del tempo e ovviamente ancora di più in condizioni di stress, si ha un incremento della mortalità cellulare.

In base ai risultati ottenuti si è quindi deciso di trattare i protoplasti con NaCl 0,4 M per 30 minuti per quanto riguarda lo stress salino; per lo stress da metalli pesanti, è stato scelto il trattamento per 30 minuti con CdSO₄ 20mM; per lo stress da acido abscissico, il trattamento è stato effettuato per 30 minuti con una soluzione di ABA 100 µM.

I parametri scelti per imporre lo stress da alte e basse temperature sono rispettivamente 38°C per un ora e 4°C per 30 minuti.

I protoplasti sono stati quindi trasformati con i diversi costrutti ricombinanti contenenti i frammenti di delezione della regione a monte del gene *HaHSP17.6b*. Dopo la trasformazione, essi sono stati sottoposti ai diversi trattamenti, e successivamente è stato estratto l'RNA totale, al fine di valutare l'accumulo dei trascritti di GFP, e quindi l'attività della regione promotore. Questa analisi è stata effettuata mediante RT-PCR utilizzando *primer* specifici disegnati sulla sequenza nucleotidica del gene codificante per la GFP (vedi Tabella 3.1 in Materiali e Metodi). Come controllo interno della PCR è stato utilizzato il gene codificante per l'actina di *N. tabacum*. La quantità di ogni trascritto è stata normalizzata rispetto a quella del gene per l'actina ed è espressa come livello relativo di trascritto.

I risultati ottenuti analizzando i protoplasti non sottoposti ad alcun tipo di stress e trasformati con i diversi costrutti sono riportati nella Figura 4.8. La presenza del trascritto non è ovviamente rilevabile nei protoplasti wt, mentre si rileva una forte attivazione della trascrizione del gene per la GFP quando i protoplasti sono trasformati con il plasmide contenente il gene *GFP* posto sotto il controllo del promotore forte CaMV35S.

Nei protoplasti trasformati con il costrutto secGFP17.6b (contenente l'intero frammento da 1682 bp a monte del gene *HaHSP17.6b*) si rileva un'attivazione del gene *GFP* pari a quella rilevata quando GFP è sotto il controllo del promotore forte CaMV35S.

Il livello di induzione del gene *GFP* decresce progressivamente con un andamento corrispondente alla lunghezza del frammento di delezione e rimane abbastanza evidente. Soltanto nei protoplasti trasformati con il costrutto secGFP133bp (contenente solo la TATA box) non si rileva alcuna attività di trascrizione del gene *GFP*.

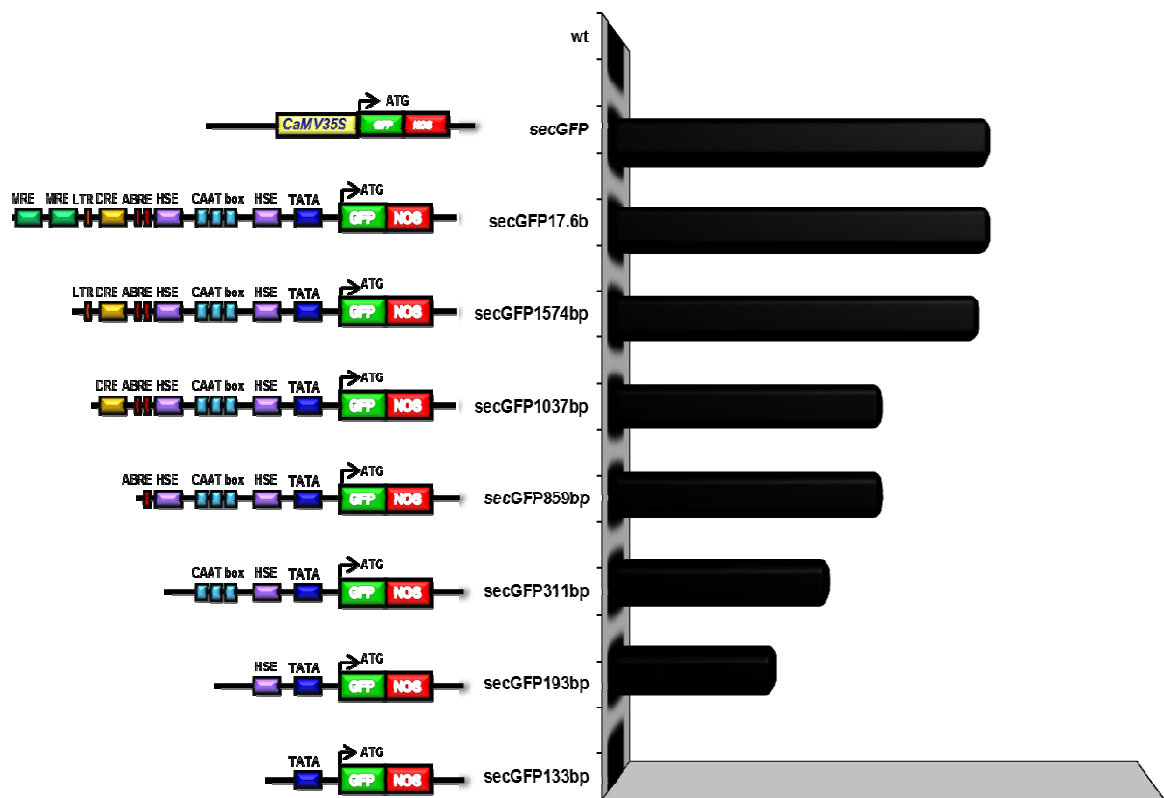


Figura 4.8. Analisi mediante RT-PCR dell'espressione del gene *GFP* regolato da differenti porzioni della regione a monte del gene *HaHSP17.6b*; il diagramma rappresenta i differenti livelli d'espressione del gene *GFP* in assenza di stress.

I risultati ottenuti dopo aver sottoposto i protoplasti trasformati con tutti i costrutti a stress da alte temperature, indicano che il livello di espressione di *GFP* è sempre più elevato rispetto a quello che si verifica in assenza di stress. Quando *GFP* è posto sotto il controllo delle regioni parziali il suo livello di espressione diminuisce progressivamente all'accorciarsi della regione promotore, finchè si annulla quando il promotore si riduce al frammento di 133 bp contenente solo la probabile TATA box (Figura 4.9).

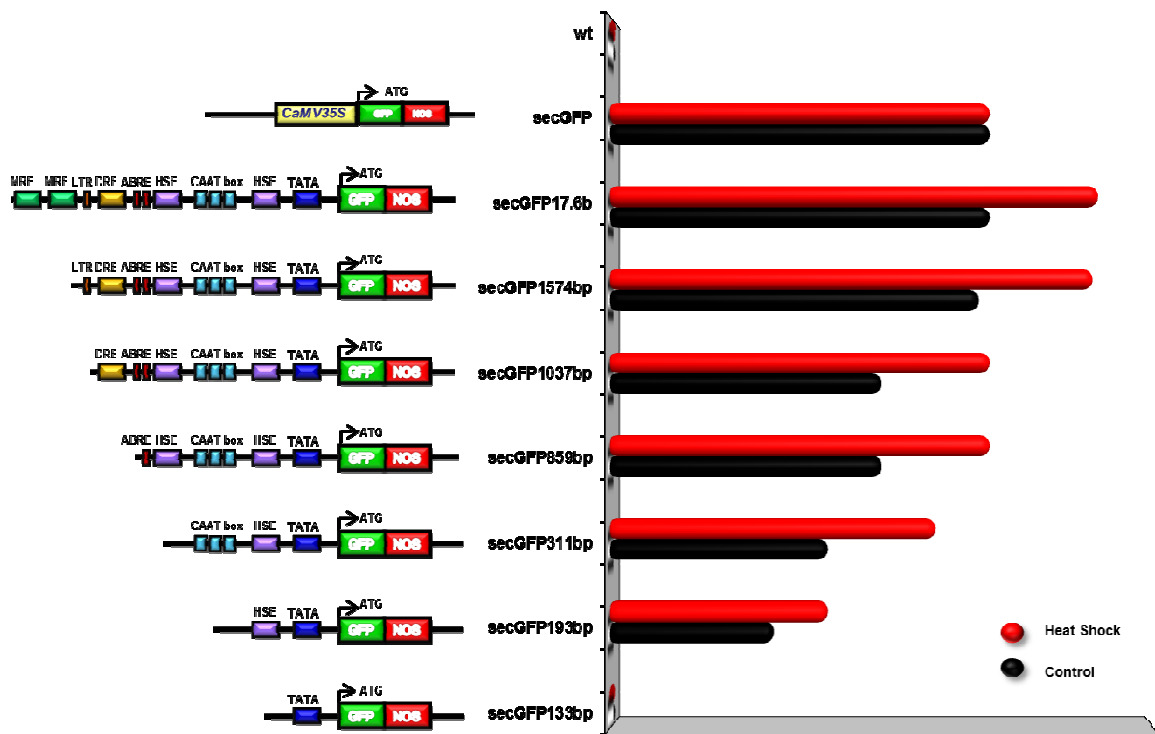


Figura 4.9. Analisi mediante RT-PCR dell'espressione del gene *GFP* regolato da differenti porzioni della regione a monte del gene *HaHSP17.6b*. Nel diagramma sono rappresentati i differenti livelli d'espressione del gene *GFP* in seguito allo stress da alte temperature (1h a 38°C) in confronto a quelli ottenuti quando i protoplasti trasformati non sono sottoposti a stress.

La valutazione dei livelli di espressione di *GFP* nei protoplasti trasformati con tutti i costrutti dopo un trattamento con CdSO_4 20 mM per 20 minuti, riportata nella Figura 4.9. indica che lo stress da metalli pesanti, induce notevolmente l'espressione di *GFP* quando questo è posto sotto il controllo di tutta la regione (secGFP17.6b) oggetto di studio, sia quando è posto sotto il controllo di un frammento più corto (secGFP1574bp). Il livello di espressione si riduce, ma non significativamente, anche quando vengono eliminati i due probabili elementi MRE (-TGCGCAAC-), cioè gli elementi regolatori direttamente coinvolti nella risposta allo stress da metalli pesanti (Figura 4.10), cioè nei protoplasti trasformati con secGFP1574bp. L'espressione di *GFP* rimane più o meno agli stessi livelli anche con secGFP1037bp e si azzerava solo quando la trasformazione è effettuata con il plasmide secGFP133bp.

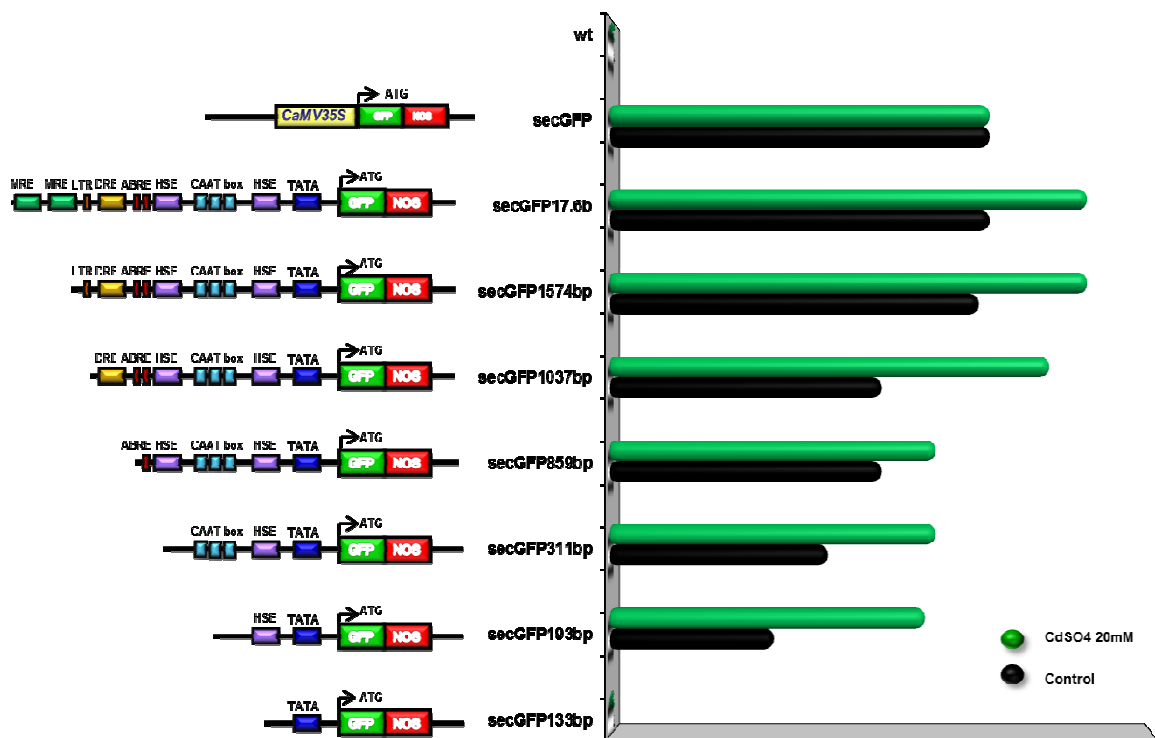


Figura 4.10. Analisi mediante RT-PCR dell'espressione del gene *GFP* regolato da differenti porzioni della regione a monte del gene *HaHSP17.6b*. Nel diagramma sono rappresentati i differenti livelli d'espressione del gene *GFP* in seguito allo stress da metalli pesanti (CdSO_4 20mM per 30 minuti) in confronto a quelli ottenuti quando i protoplasti trasformati non sono sottoposti a stress.

I livelli di espressione di *GFP* in seguito al trattamento con NaCl 0,4 M per 30 minuti dei protoplasti trasformati con tutti i costrutti sono riportati nella Figura 4.11. I risultati ottenuti indicano che in seguito a stress salino, l'espressione del gene *GFP* viene indotta significativamente e a livelli confrontabili a quelli di quando esso è posto sotto il controllo di tutta la regione di interesse e delle porzioni parziali più lunghe (secGFP1574bp, secGFP1037bp), che tra i vari elementi contengono anche il probabile elemento DRE (-TACCGACAT-). Il livello di espressione del gene *GFP* invece diminuisce, anche se non drasticamente, quando esso è posto sotto il controllo dei frammenti privi di questo elemento (secGFP859bp, secGFP311bp, secGFP193bp) riducendosi progressivamente ed in maniera più evidente rispetto agli altri stress finora riportati. Solo nei protoplasti trasformati con secGFP133bp, l'espressione del gene *GFP* risulta azzerata.

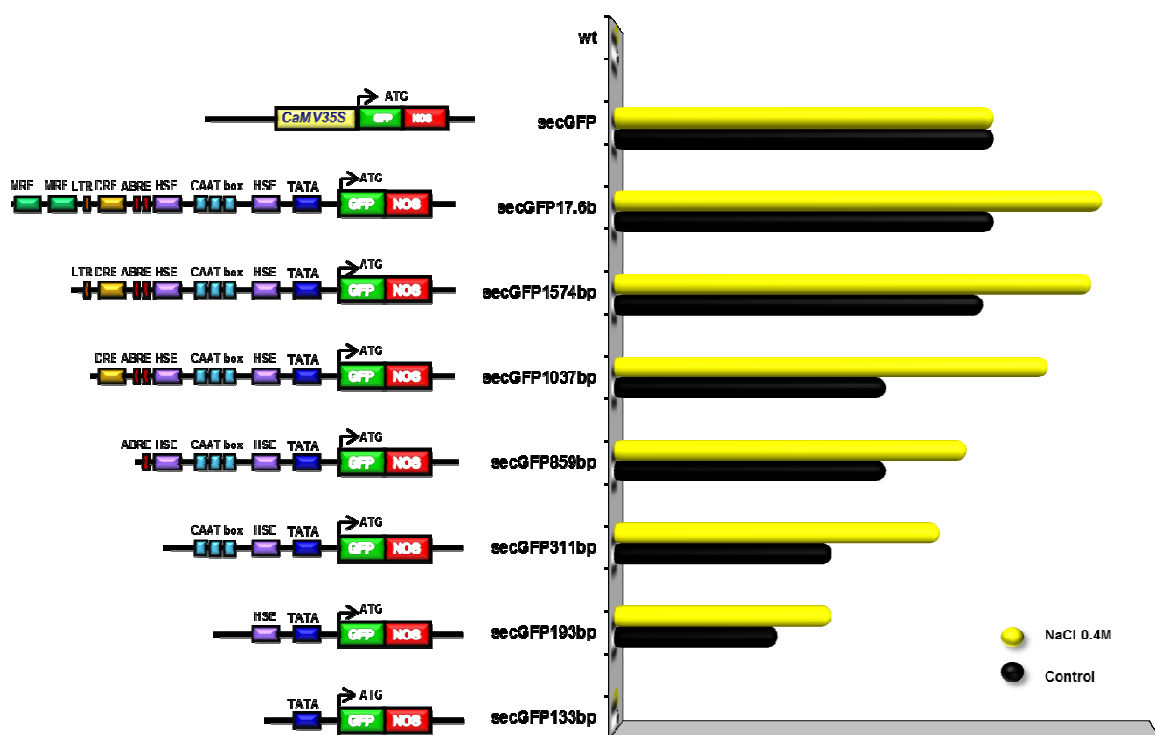


Figura 4.11. Analisi mediante RT-PCR dell'espressione del gene *GFP* regolato da differenti porzioni della regione a monte del gene *HaHSP17.6b*. Nel diagramma sono rappresentati i differenti livelli d'espressione del gene *GFP* in seguito a stress salino (NaCl 0,4 M per 30 minuti), in confronto a quelli ottenuti quando i protoplasti trasformati non sono sottoposti a stress.

La variazione nei livelli di espressione del gene *GFP* determinata dal trattamento con ABA 100 μ M nei protoplasti trasformati con tutti i costrutti sono riportate nella Figura 4.12. Dalle variazioni nei livelli di trascrizione rilevate si può affermare che lo stress da acido abscissico induce l'espressione del gene *GFP* a livelli molto alti che rimangono tali anche quando *GFP* è posto sotto il controllo della regione parziale priva dei probabili elementi ABRE, cioè nei protoplasti trasformati con secGFP311bp. Il livello di espressione del gene *GFP* resta molto elevato e pressoché costante, esso però si azzerava quando dal promotore viene eliminata la porzione contenente le CCAAT box (secGFP193bp).

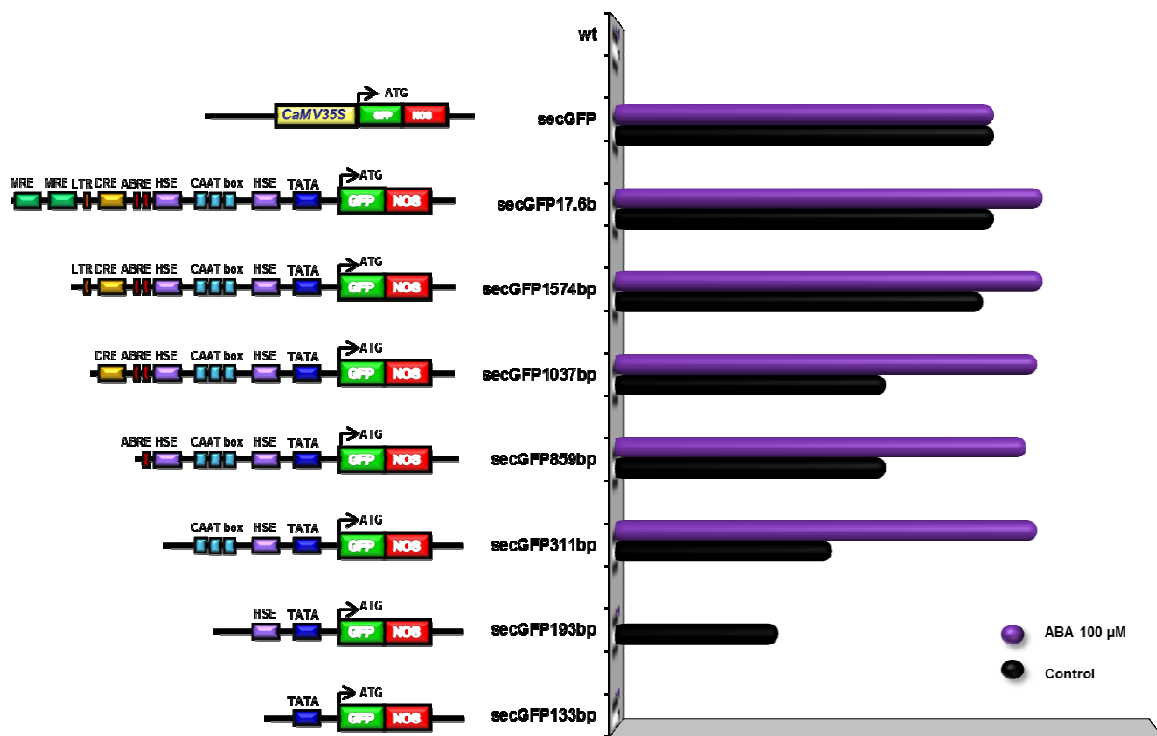


Figura 4.12. Analisi mediante RT-PCR dell'espressione del gene *GFP* regolato da differenti porzioni della regione a monte del gene *HaHSP17.6b*. Nel diagramma sono rappresentati i differenti livelli d'espressione del gene *GFP* in seguito a stress da acido abscissico (ABA 100 μ M per 30 minuti), in confronto a quelli ottenuti quando i protoplasti trasformati non sono sottoposti a stress.

Il livello di espressione del gene *GFP* rilevato nei protoplasti trasformati con tutti i costrutti e posti ad una temperatura di 4°C per 30 minuti, è riportato nella Figura 4.13. I dati ottenuti indicano che in seguito a stress da basse temperature, l'espressione del gene *GFP* viene indotta quando esso è posto sotto il controllo di tutta la regione oggetto di studio, che contiene anche il probabile elemento LTR e l'elemento DRE, contenuti nei vettori ricombinanti *secGFP17.6b*, *secGFP1574bp*, *secGFP1037bp*. L'induzione resta elevata anche quando il gene è posto sotto il controllo del frammento di delezione privo dell'elemento LTR (*secGFP1037bp*). Tuttavia, quando viene eliminato l'elemento DRE (*secGFP859bp*), l'espressione del gene *GFP* si azzeramente.

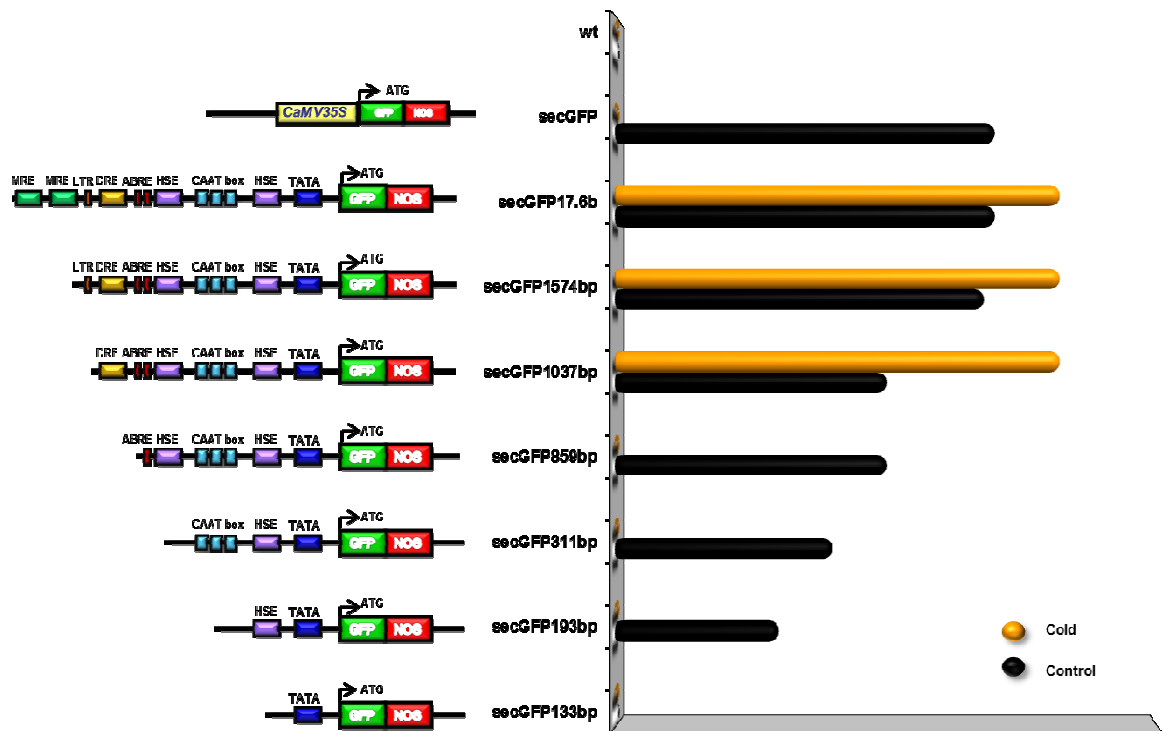


Figura 4.13. Analisi mediante RT-PCR dell'espressione del gene *GFP* regolato da differenti porzioni della regione a monte del gene *HaHSP17.6b*. Nel diagramma sono rappresentati i differenti livelli d'espressione del gene *GFP* in seguito a stress da basse temperature (4°C per 30 minuti), in confronto a quelli ottenuti quando i protoplasti trasformati non sono sottoposti a stress.

In conclusione il gene *GFP*, quando è posto sotto il controllo di tutta la regione promotore, viene indotto a livelli massimi in risposta ai vari stress testati; inoltre nel caso del trattamento con ABA e in seguito allo stress da basse temperature l'attivazione della trascrizione non si riduce sostanzialmente quando *GFP* è posto sotto il controllo delle porzioni parziali del promotore, anche se esse sono prive degli elementi *cis* direttamente coinvolti nella risposta ad un determinato stress.

In generale i risultati ottenuti indicano che il gene *reporter* è espresso a livelli massimali quando è posto sotto il controllo di tutta la regione di circa 1700 bp a monte di *HaHSP17.6b* e che in seguito a tutti i trattamenti di stress i livelli di espressione sono decisamente superiori a quelli che si ottengono con il promotore forte CaMV35S.

I livelli massimi di espressione permangono anche quando si utilizza il plasmide secGFP1574 bp. I plasmidi contenenti porzioni più piccole della regione promotore inducono livelli di espressione inferiori e differenze in relazione ai diversi stress.

Infine, è interessante osservare che la porzione del promotore lunga 133 bp è incapace di attivare l'espressione di *GFP* non solo in tutte le condizioni di stress considerate, ma anche in condizioni di controllo. I dati finora riportati sono riassunti nella Figura 4.14.

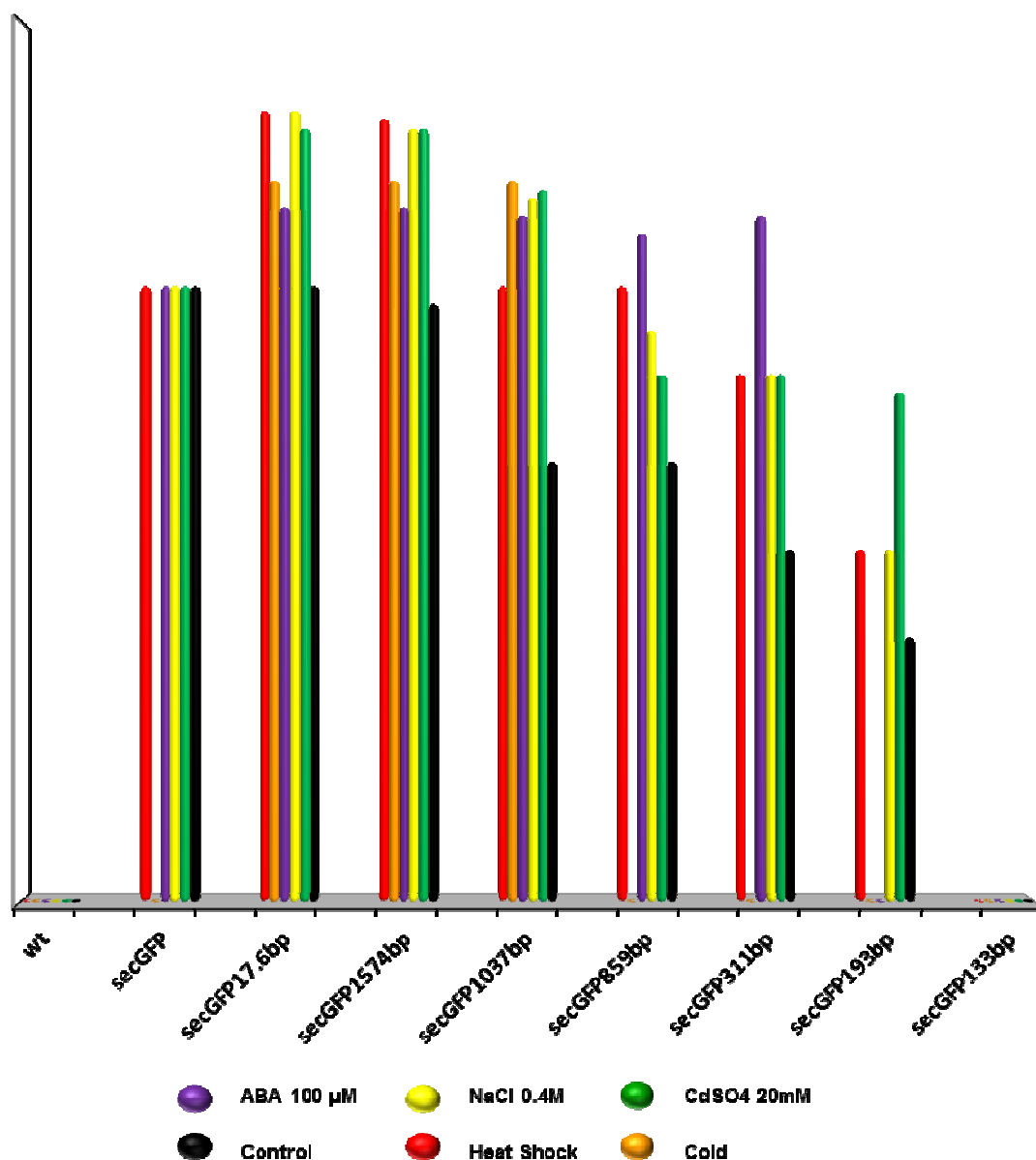


Figura 4.14. Analisi mediante RT-PCR dell'espressione del gene *GFP* regolato da differenti porzioni della regione a monte del gene *HaHSP17.6b*. Nel diagramma sono rappresentati i differenti livelli d'espressione del gene *GFP* in seguito a stress da alte temperature, indicato con il colore rosso; stress da basse temperature indicato con il colore arancione, stress da metalli pesanti indicato con il colore verde; stress salino indicato con il colore giallo; stress da acido abscissico indicato con il colore viola. Il controllo, costituiti dai protoplasti trasformati con i diversi costrutti e non sottoposti ad alcun trattamento, è indicato con il colore nero.

5-DISCUSSIONE

In questo lavoro è stata caratterizzata a livello funzionale la regione a monte della porzione codificante del gene *HaHSP17.6b*, associato fisicamente ad un altro gene per *smHSP* denominato *HaHSP17.6a*.

Mediante analisi bioinformatica è stata analizzata la regione, compresa tra i due geni, che contiene le sequenze che ne regolano l'espressione. Le porzioni codificanti di questi geni hanno un'elevata omologia di sequenza, questo dato, associato alla loro contiguità fisica, indica che i due geni possano aver avuto origine da un evento di duplicazione e inversione genica; è infatti noto che nelle piante molti geni codificanti per *smHSP* derivano proprio da eventi di duplicazione e inversione (Waters e Vierling, 1999). L'organizzazione di questi due geni è differente rispetto a quella riscontrata in altri organismi; in *Arabidopsis* sei geni codificanti per *smHSP* citoplasmatiche di classe I sono dispersi tra tutti e cinque i cromosomi (Scharf *et al.*, 2001; Siddique *et al.*, 2008). In riso invece, i nove membri della famiglia genica CI sono associati in due gruppi localizzati su due cromosomi diversi, e probabilmente provengono da due eventi di duplicazione distinti (Guan *et al.*, 2004).

Il fatto che i due geni originino da un evento di duplicazione potrebbe far ipotizzare per essi la stessa funzione; ma geni che si originano da un evento di duplicazione pur presentando un'elevata omologia di sequenza possono avere funzione biologica diversa (Barros *et al.*, 1992). Pertanto la funzione di un nuovo gene non si può evincere soltanto dalla similarità di sequenza della regione codificante. E' necessario quindi studiare anche le regioni fiancheggianti, nelle quali sono presenti elementi *cis*-regolatori che influenzano fortemente l'espressione del gene.

Negli eucarioti uno dei punti principali di controllo della regolazione dei geni è a livello trascrizionale, questo si realizza mediante le interazioni tra i fattori di trascrizione e gli elementi *cis* regolatori, presenti nella regione del promotore. Questa regione contiene tutte le sequenze importanti per l'inizio e la regolazione della trascrizione di un gene (Heintzman e Ren, 2007; Juven-Gershon *et al.*, 2008b), eventi nei quali gli elementi *cis*-regolatori giocano un ruolo di fondamentale importanza.

I dati ottenuti dall'analisi *in silico* indicano che, per entrambi i geni per *smHSP* di girasole oggetto di questo lavoro, la regione a monte della ORF presenta gli elementi *cis* caratteristici dei promotori HS eucariotici.

In particolare, in entrambi i promotori la sequenza TATA è posta a monte del probabile sito d'inizio della trascrizione, nella posizione canonica indispensabile perché essa interagisca con il complesso proteico necessario a garantire il corretto inizio della trascrizione. Inoltre, per entrambi i promotori, sono presenti vicino alla TATA *box*, due elementi HSE perfetti che hanno cioè la struttura adatta a garantire il legame con gli specifici fattori di trascrizione HSF (Schöffl *et al.*, 1998). Infatti, è noto che l'attivazione dei geni HS dipende proprio dall'interazione tra HSF e gli elementi HSE presenti nel promotore (Williams e Morimoto, 1990; Rieping e Schöffl, 1992). Inoltre in entrambi i promotori sono presenti, ad una distanza maggiore dal probabile sito d'inizio della trascrizione, altri elementi HSE, la cui sequenza è simile a quella di un HSE imperfetto. Gli HSE imperfetti sono considerati rilevanti ai fini dell'attivazione dei geni HS allo stesso livello degli HSE perfetti (Barros *et al.*, 1992). La presenza di più elementi HSE distribuiti nella regione a monte dei due geni è in accordo con quanto riportato da altri autori, riguardo alla struttura del promotore di geni per *smHSP* di girasole (Coca *et al.*, 1996; Almoguera *et al.*, 1998; Carranco *et al.*, 1999).

Entrambi i promotori presentano, a monte dei probabili elementi HSE, numerose CCAAT *box*. Questo motivo solitamente è localizzato a monte del sito d'inizio della trascrizione e quindi della TATA *box*. Il ruolo preciso delle regioni CCAAT nella regolazione dell'espressione dei geni HS non è stato ad oggi completamente chiarito. In generale si ritiene che la loro presenza incrementi il livello di espressione basale dei geni *heat shock* (Czarnecka-Verner *et al.*, 1994). I dati riportati rispetto alla struttura dei promotori dei geni HS indicano che le CCAAT *box* sono piuttosto frequenti e sono principalmente concentrate a monte degli elementi HSE.

Ciò suggerisce un rapporto sinergico tra le CCAAT *box* e gli HSE nell'attivazione dell'espressione dei geni HS. Infatti, esperimenti condotti su piante di soia, suggeriscono che tali sequenze agiscano rendendo più accessibile il sito di legame dei fattori di trascrizione e, di conseguenza, aumentando il livello di trascrizione dei geni HS e quindi la risposta della pianta allo stress (Rieping e Schöffl, 1992).

Nel promotore del gene *HaHSP17.6a*, è presente anche una regione ricca in AT; benché tutta la regione compresa tra i due geni sia ricca di A e di T, solo questa

sequenza, lunga 44 bp e adiacente ad una CCAAT *box*, sembra avere le caratteristiche per essere considerata un elemento coinvolto nella risposta *heat shock*.

I primi ad ipotizzare il potenziale coinvolgimento della regione AT-rich nella regolazione dell'espressione dei geni HS furono Baumann e i suoi collaboratori nel 1987. Essi osservarono una maggiore attività del promotore del gene *hs6871* di soia in risposta allo stress da alte temperature, quando a monte degli elementi HSE era presente l'elemento AT-rich, intuendone così il ruolo di *enhancer* e suggerendo che la regolazione dei geni HS non dipende esclusivamente dalla presenza degli elementi HSE (Baumann *et al.*, 1987).

Sia le CCAAT *box* che le regioni ricche in AT, cooperano con gli elementi HSE per ottenere un effetto quantitativo nell'attivazione dei geni HS e quindi modulano l'espressione genica comportandosi da *enhancer* (Rieping e Schöffl, 1992).

Sulla base dell'analisi *in silico* si può quindi dire che i promotori dei geni *HaHSP17.6a* e *HaHSP17.6b* sono tra loro speculari, non solo riguardo alla struttura ma anche riguardo alla localizzazione, per gli HSE perfetti e per la TATA *box* che li caratterizzano come promotori HS. Tuttavia essi presentano una diversificazione interessante, che è la presenza di sequenze caratteristiche di *cis*-elementi associati con l'attivazione dell'espressione genica in risposta a induttori diversi (acido abscissico, luce, metil jasmonato, acido salicilico, diversi stress abiotici, stress biotico) distribuiti diversamente all'interno delle due porzioni a monte dei geni.

Le differenze individuate nella struttura dei due promotori potrebbero quindi giustificare le differenze riscontrate nell'espressione dei due geni, in risposta a diversi stimoli ambientali, nelle piantine di girasole, come già riportato in un articolo pubblicato di recente dal gruppo di ricerca del quale faccio parte. I dati riportati nel lavoro indicano che i due geni sono caratterizzati da notevoli differenze nei livelli di espressione in seguito al trattamento delle piantine di girasole con diversi agenti che provocano stress. Questi dati indicano anche che il gene *HaHSP17.6b* risponde a tutti gli stress e che la sua trascrizione è indotta a livelli molto più elevati e si possono spiegare ipotizzando che il promotore del gene *HaHSP17.6b* sia più efficiente (Rampino *et al.*, 2010).

E' stato quindi deciso di utilizzare la regione che contiene il promotore di questo gene per un'analisi funzionale attraverso sue delezioni progressive.

Lo scopo finale di questa parte del lavoro è: i) ottenere una maggiore comprensione e caratterizzazione dei meccanismi coinvolti nella regolazione di *HaHSP17.6b*; ii) verificare il ruolo nella risposta HS degli elementi *cis* individuati; iii) fornire informazioni relative alle dimensioni minime richieste per l'attività del promotore e all'effettivo ruolo svolto dagli altri elementi *cis* presenti, coinvolti nel controllo trascrizionale dei geni in risposta ad altri tipi di stress. La regione analizzata si estende fino a circa 1700 bp a monte del gene *HaHSP17.6b*, perché queste sono le dimensioni che in media si ritiene contengano tutti gli elementi di regolazione. I costrutti ricombinanti, contenenti porzioni parziali di questa regione, sono fusi al gene *GFP*.

I costrutti sono stati utilizzati per effettuare saggi di espressione transiente in protoplasti isolati da foglie di *N.tabacum* sottoposti a diversi trattamenti di stress. Negli organismi vegetali i sistemi di espressione transiente sono tra i più utilizzati per lo studio della regolazione dell'espressione genica. Il principale vantaggio che questi presentano è dato dalla loro semplicità e dalla rapidità con la quale si ottengono i risultati (Kapila *et al.*, 1997); inoltre nelle piante costituiscono il sistema più utilizzato per monitorare l'attività di un promotore (Abel e Theologis, 1994).

I risultati ottenuti indicano che il gene *GFP* posto sotto il controllo di tutta la regione a monte del gene *HaHSP17.6b* ha un livello di espressione paragonabile a quello ottenuto con il promotore forte 35S di CaMV. Questo dato è molto interessante poiché permette di prevedere realmente future applicazioni biotecnologiche del promotore *HaHSP17.6b*. Generalmente nelle piante per garantire l'espressione di un transgene si utilizza il promotore CaMV35S, che è costitutivo e garantisce livelli elevati di trascrizione del transgene. Il promotore *HaHSP17.6b*, oltre a garantire un'elevata espressione del transgene in condizioni basali, in risposta a determinati stimoli ambientali o alla somministrazione di sostanze chimiche specifiche, può ulteriormente incrementare l'espressione del gene che controlla. Un promotore simile, individuato recentemente, è il promotore del gene codificante per la perossidasi in *Ipomea batatas* che, fuso con il gene reporter GUS, è stato utilizzato per trasformare piante di tabacco.

Si è visto che questo promotore incrementa il livello di espressione di GUS 30 volte di più del promotore CaMV35S in risposta al perossido d'idrogeno e ai raggi UV (Kim *et al.*, 2003).

Un altro esempio è dato dal promotore *arc5-I* di *Phaseolus vulgaris*, che è stato utilizzato per produrre anticorpi in *A. thaliana*, questo garantiva la produzione del prodotto posto sotto il suo controllo in quantità tali da raggiungere il 36% di proteine solubili totali (TSP), lo stesso prodotto posto sotto il controllo del promotore 35S non supera l'1% delle TSP (De Jaeger *et al.*, 2002).

Questi esempi mettono in evidenza l'importanza di un promotore come quello del gene *HaHSP17.6b* che, grazie alle sue caratteristiche, può avere diverse applicazioni biotecnologiche: dalla produzione di proteine ricombinanti in un sistema inducibile, alla produzione di biosensori vegetali e batterici per il monitoraggio ambientale.

E' perciò particolarmente interessante vedere se e quanto i diversi elementi *cis* presenti nella regione analizzata influenzano l'attività del promotore in risposta ai differenti stimoli. Per questo le diverse porzioni della regione a monte di *HaHSP17.6b* sono state analizzate per la capacità di attivare la trascrizione non solo in seguito allo stress da alte temperature, ma anche in risposta a stress da metalli pesanti, alle basse temperature, a stress salino e a trattamento con acido abscissico. I dati ottenuti da questa analisi indicano in generale che l'attivazione dell'espressione di *GFP* è massima quando è presente tutta la regione.

Tranne che nel caso del trattamento con ABA e in seguito allo stress da basse temperature l'attivazione della trascrizione non si riduce sostanzialmente quando *GFP* è posto sotto il controllo delle porzioni parziali del promotore, anche se esse sono prive degli elementi *cis* direttamente coinvolti nella risposta ad un determinato stress. Ciò può essere spiegato ipotizzando che non siano i singoli elementi *cis*-agenti ad essere importanti per l'attività del promotore, quanto piuttosto il sinergismo creato dalla loro contemporanea presenza.

Del resto, è ormai chiaro che la risposta delle piante agli stress è un meccanismo molto complesso, che coinvolge l'attivazione di diverse *pathway* di risposta tra loro interconnesse e l'espressione di singoli geni a valle è regolata da una o più vie (Zhu, 2002; Shinozaki *et al.*, 2003).

Ad esempio, studi recenti indicano chiaramente che la risposta delle piante allo stress salino è in larga misura sovrapposta alla risposta cellulare a stress idrico e da basse temperature (Nakashima e Yamaguchi-Shinozaki, 2006; Yamaguchi-Shinozaki e Shinozaki, 2006), ciò suggerisce che la risposta agli stress è mediata dall'interazione di più elementi regolatori.

L'attivazione di *GFP* in risposta al trattamento con acido abscissico, presenta un andamento differente da quelli riportati per HS, metalli pesanti e NaCl. Anche in questo caso l'espressione è massima quando a monte di *GFP* è presente tutta la regione di 1700 bp e questo è in accordo con la presenza di due elementi ABRE localizzati a -943 bp e a -522 bp dalla probabile TATA box. Infatti è noto che la presenza di copie multiple (minimo due) di ABRE nel promotore è una condizione indispensabile perché il trattamento con ABA attivi la trascrizione del gene posto a valle (Skriver *et al.*, 1991). E' interessante osservare che la trascrizione di *GFP* continua a livelli elevati senza subire alcuna variazione anche quando gli elementi ABRE vengono eliminati.

Questo si può spiegare considerando la specifica struttura dell'elemento ABRE (-CACGTG-) e il fatto che nel frammento di delezione siano presenti alcuni elementi ACGT che rispondono alla luce. In letteratura è riportato che gli elementi ACGT presenti nei promotori di alcuni geni coinvolti nella risposta alla luce (Guiliano *et al.*, 1988), agli U.V. (Weisshaar *et al.*, 1991) e all'acido cumarico (Loake *et al.*, 1992), possono essere coinvolti anche nella risposta allo stress da ABA, infatti la loro sequenza di riconoscimento corrisponde al *core* dell'elemento ABRE (Busk e Montserrat, 1998).

Ciò suggerisce che qualche elemento riconosciuto durante l'analisi *in silico* come elemento responsivo alla luce, sia in realtà responsabile della risposta al trattamento da ABA, e ciò giustificherebbe il fatto che l'espressione del gene *GFP* si mantiene elevata fino a quando non viene eliminata anche la porzione del promotore che contiene questi elementi. L'attivazione della trascrizione di *GFP* in seguito allo stress da bassa temperatura è determinata dalla presenza, nella regione analizzata, di un probabile elemento LTR (-CCGAAA-) a -1037 bp e di un elemento DRE (-TACCGACAT-) a -859 bp, che sono tipici elementi *cis* coinvolti nella risposta allo stress da freddo,

caratterizzati da un *core* -CCGA-. Il livello di espressione di *GFP* rimane piuttosto alto anche quando si elimina l'elemento LTR (-1037 bp).

Quando invece *GFP* è posto sotto il controllo della porzione di -859 bp, la sua trascrizione non viene più indotta sotto stress da bassa temperatura.

Ciò suggerisce che artefice della risposta allo stress da freddo sia l'elemento DRE al quale si legano i fattori trascrizionali DREB2 (*Dehydration-Responsive Elements Binding Factor*) indotti dalla disidratazione e i fattori DREB1 noti anche come CBF (*C-repeat Binding Factor*) indotti dal freddo. Essi si legano in maniera specifica ai corrispondenti elementi *cis*, caratterizzati dal motivo CCGAC. I geni della famiglia CBF/DREB sono essi stessi indotti dall'evento di stress e determinano a loro volta la trascrizione di parecchi geni coinvolti nella risposta allo stress da freddo e da siccità. Il fatto che sia i fattori DREB2 (indotti da siccità) sia i fattori DREB1 (indotti da freddo) riconoscano lo stesso elemento *cis* implica che un gene contenente un DRE-CRT (*C-repeat*) nel proprio promotore possa essere attivato sia in seguito allo stress da siccità sia in seguito allo stress da freddo; ciò che varia, in relazione ai differenti tipi di stress, sono i fattori di trascrizione che si legano all'elemento *cis*, e cioè DREB1-CBF per il freddo e DREB2 per la disidratazione (Stokinger *et al.*, 1997).

6-CONCLUSIONI

I risultati ottenuti dall'analisi funzionale mediante delezioni progressive della regione a monte del gene *HaHSP17.6b* permettono solo di fare delle ipotesi circa il reale ruolo funzionale dei motivi *cis* individuati nel promotore del gene *HaHSP17.6b*. Un modo per ottenere dati più significativi potrebbe essere in futuro un'analisi che preveda mutazioni sito-specifiche delle sequenze consenso mirate a compromettere la funzionalità dei singoli motivi individuati. Questa analisi ha tuttavia messo in evidenza le potenzialità dell'uso di questo promotore in ambito biotecnologico. Dai risultati ottenuti si è visto infatti che la trascrizione di *GFP*, quando è posto sotto il controllo di tutta la regione promotore, viene indotta a livelli massimi in risposta ai vari stress testati; inoltre, anche in assenza di stress il livello di espressione di *GFP* è elevato ed è paragonabile a quello del gene posto sotto il controllo del promotore forte CaMV35S. Questo dato indica che, nel caso di una sua ipotetica utilizzazione in ambito biotecnologico, il promotore *HaHSP17.6b* oltre a garantire un'elevata espressione del transgene in condizioni basali, può ulteriormente incrementare l'espressione del gene posto sotto il suo controllo non solo in risposta alle alte temperature, ma anche in risposta ad altri stimoli ambientali. Queste sue proprietà potrebbero essere utilizzate per lo sviluppo di biosensori.

Negli ultimi anni è stata riportata la preparazione di piattaforme batteriche in grado di rivelare rapidamente la presenza di composti tossici nell'ambiente, mediante l'attivazione dell'espressione di geni *reporter* posti sotto il controllo di promotori HS sensibili alle variazioni ambientali (Ryan e Hightower, 1996; Bierkens, 1998). Un promotore HS come quello oggetto di questa tesi quindi potrà essere utilizzato per la progettazione di biosensori per il monitoraggio ambientale.

7-BIBLIOGRAFIA

Abel S., Theologis A. (1994) **Transient transformation of *Arabidopsis* leaf protoplasts: a versatile experimental system to study gene expression.** *Plant J* 5: 421-427.

Alberts B., Bray D., Hopkink K., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. (2004) **Biologia molecolare della cellula** (Zanichelli, eds).

Almoguera C., Prieto-Dapena P., Jordano J. (1998) **Dual regulation of a heat shock promoter during embryogenesis: stage-dependent role of heat shock elements.** *Plant J* 13: 437–446.

Altscheler M., Mascarenhas J. P. (1982) **Heat shock proteins and effects of heat shock in plants.** *Plant Mol Biol* 1: 103-115.

Arrigo A. (1998) **Small stress proteins: chaperones that act as regulators of intracellular redox state and programmed cell death.** *Biol Chem* 379: 19–26.

Arrigo A., Arrigo P., Landry J. (1994) **Expression and function of the low-molecular weight heat shock proteins.** Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Lab. Press: 335-373.

Baniwal S. K., Bharti K., Chan K. Y., Fauth M., Ganguli A., Kotak S., Mishra S. K., Nover L., Port M., Scharf K. D., Tripp J., Weber C., Zielinski D., von Koskull-Döring P. (2004) **Heat stress response in plants: a complex game with chaperones and more than twenty heat stress transcription factors.** *J Biosci* 29: 471–487.

Barnett T., Altschuler M., McDaniel C. N., Mascarenhas J. P. (1980) **Heat shock induced proteins in plant cells.** *Dev Genet* 1: 331-340.

Barros M. D., Czarnecka E., Gurley W. B. (1992) **Mutational analysis of a plant heat shock element.** *Plant Mol Biol* 19: 665-675.

Baumann G., Raschke E., Bevan M., Schöffl F. (1987) **Functional analysis of sequences required for transcriptional activation of a soybean heat shock gene in transgenic tobacco plants.** *EMBO J* 6: 1161-1166.

Bichler J., Herrmann R. G. (1990) **Analysis of the promoters of the single-copy genes for plastocyanin and subunit delta of the chloroplast ATP synthase from spinach.** *Eur J Biochem* 190: 415-426.

Bienz M. (1986) **A CCAAT box confers cell-type-specific regulation on the *Xenopus hsp70* gene in oocytes.** *Cell* 46: 1037-1042.

Bierkens J. (1998) **Heat-shock proteins in ecotoxicological risk assessment.** Advances in Molecular Toxicology. VSP International Science Press, Zeist, Netherlands, pp. 531–544.

Blackburn R. V., Galoforo S. S., Corry P. M., Lee Y. J. (1998) **Adenoviral transduction of a cytosine deaminase/thymidine kinase fusion gene into prostate carcinoma cells enhances prodrug and radiation sensitivity.** *Cancer Res* 58: 1358-1362.

Braiden V., Ohtsuru A., Kawashita Y., Miki F., Sawada T., Ito M., Cao Y., Kaneda Y., Koji T., Yamashita S. (2000) **Eradication of breast cancer xenografts by hyperthermic suicide gene therapy under the control of the heat shock protein promoter.** *Hum Gene Ther* 11: 2453-2463.

Brivanlou A., Darnell J. (2002) **Signal transduction and the control of gene expression.** *Science* 295: 813-818.

Bucher P. (1990) **Weight matrix descriptions of four eukaryotic RNA polymerase II promoter elements derived from 502 unrelated promoter sequences.** *J Mol Biol* 212: 563–578.

Busk P. K., Pagès M. (1998) **Regulation of abscisic acid-induced transcription.** *Plant Mol Biol* 37: 425-435.

Bustos M. M., Gultinan M. J., Jordano J., Begum D., Kalkan F. A., Hall T. C. (1989) **Regulation of beta-glucuronidase expression in transgenic tobacco plants by an A/T-rich, cis-acting sequence found upstream of a French bean beta-phaseolin gene.** *Plant Cell* 1: 839-853.

Carranco R., Almoguera C., Jordano J. (1999) **An imperfect heat shock element and different upstream sequences are required for the seed-specific expression of a small heat shock protein gene.** *Plant Physiol* 121:723–730.

Chatterjee-Kishore M., Kishore R., Hicklin D. J., Marincola F. M. (1998) **Different requirements for signal transducer and activator of transcription 1a and interferon regulatory factor 1 in the regulation of low molecular mass polypeptide 2 and transporter associated with antigen processing 1 gene expression.** *J Biol Chem* 273:16177–16183.

Coca M. A., Almoguera C., Thomas T. L., Jordano J. (1996) **Differential regulation of small heat-shock genes in plants: analyses of a water-stress-inducible and developmentally activated sunflower promoter.** *Plant Mol Biol* 31: 863–876.

Czarnecka E., Ingersoll J. C., Gurley W. B. (1992) **AT-rich promoter elements of soybean heat shock gene *Gmhsp17.5E* bind two distinct sets of nuclear proteins in vitro.** *Plant Mol Biol* 19: 985-1000.

Czarnecka E., Key J. L., Gurley W. B. (1989) **Regulatory domains of the *Gmhsp17.5-E* heat shock gene promoter of soybean. A mutational analysis.** *Mol Cell Biol* 9: 3457-3463.

Czarnecka-Verner E., Dulce-Barros M., Gurley W. B. (1994) **Regulation of heat shock gene expression. In “Stress-induced gene expression in plant”. A. S. Basra Harwood Acad Pub 131-161.**

Datta N., Cashmore A. R. (1989) **Binding of a pea nuclear protein to promoters of certain photoregulated genes is modulated by phosphorylation. *Plant Cell* 1: 1069–1077.**

De Jaeger G., Scheffer S., Jacobs A., Zambre M., Zobell O., Goossens A., Depicker A., Angenon G. (2002) **Boosting heterologous protein production in transgenic dicotyledonous seeds using *Phaseolus vulgaris* regulatory sequences. *Nat Biotechnol* 20:1265-1268.**

Dellaporta S.L., Wood J., Hicks J.B. (1983) **A plant DNA miniprep: version II. *Plant Mol Biol Rep* 1: 19-21.**

Diaz-De-Leon F., Klotz K. L., Lagrimini M. (1993) **Nucleotide sequence of the tobacco (*Nicotiana tabacum*) anionic peroxidase gene. *Plant Physiol* 101: 1117-1118.**

Feder M. E., Hofmann G. E. (1999) **Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annu Rev Physiol* 61: 243-282.**

Giuliano G., Pichersky E., Malik V. S., Timko M. P., Scolnik P., Cashmore A. R. (1988) **An evolutionarily conserved protein binding sequence upstream of a plant light-regulated gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 7089-7093.**

Guan J. C., Jinn T. L., Yeh C. H., Feng S. P., Chen Y. M., Lin C. Y. (2004) **Characterization of the genomic structures and selective expression profiles of nine class I small heat shock protein genes clustered on two chromosomes in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Mol Biol* 56: 795–809.**

Güven K., de Pomerai D. I. (1995) **Differential expression of Hsp70 proteins in response to heat and cadmium in *Caenorhabditis elegans*. *J Thermal Biol* 20: 355-363.**

Hattori T., Terada T., Hamasuna S. (1995) **Regulation of the *Osem* gene by abscisic acid and the transcriptional activator VP1: analysis of cis-acting promoter elements required for regulation by abscisic acid and VP1.** *Plant J* 7: 913-925.

Heintzman N. D., Ren B. (2007) **The gateway to transcription: identifying, characterizing and understanding promoters in the eukaryotic genome.** *Cell Mol Life Sci* 69: 386-400.

Hernandez L.D., Vierling E. (1993) **Expression of low molecular weight heat-shock proteins under field conditions.** *Plant J* 101: 1209-1216.

Higo K., Ugawa Y., Iwamoto M., Korenaga T., (1999) **Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database.** *Nucl Ac Res* 27: 297-300.

Hong S. W., Vierling E. (2001) **Hsp101 is necessary for heat tolerance but indispensable for development and germination in the absence of stress.** *Plant J* 27:25–35.

Huang Q., Hu J. K., Lohr F., Zhang L., Braun R., Lanzen J., Little J. B., Dewhirst M. W., Li C. Y. (2000) **Heat-induced gene expression as a novel targeted cancer gene therapy strategy.** *Cancer Res* 60: 3435–3439.

Jordano J., Almoguera C., Thomas T. L. (1989) **A sunflower helianthinin gene upstream sequence ensemble contains an enhancer and sites of nuclear protein interaction.** *Plant Cell* 1:855–866.

Juven-Gershon T., Hsu J. Y., Theisen J. W., Kadanoga J. T. (2008b) **The RNA polymerase II core promoter-the gateway to transcription.** *Curr Opin Cell Biol* 20: 253-259.

Kapila J., De Rycke R., Van Montagu M., Angenon G. (1997) **An *Agrobacterium*-mediated transient gene expression system for intact leaves.** *Plant Sci* 122: 101-108.

Kelly P. M., Schlesinger M. J. (1978) **The effect of aminoacid analogues and heat shock on gene expression in chicken embryo fibroblasts.** *Cell* 15: 1277-1286.

Key J. L., Lin C. Y., Chen Y. M. (1981) **Heat shock proteins of higher plants.** *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 78: 3526- 3530.

Kilby N. J., Fyvie M. J., Sessions R. A., Davies G. J., Murray J. A. (2000) **Controlled induction of GUS marked clonal sectors in *Arabidopsis*.** *J Exp Bot* 51: 853–863.

Kim K. Y., Kwon S. Y., Lee H. S., Hur Y., Bang J. W., Kwak S. S. (2003) **A novel oxidative stress-inducible peroxidase promoter from sweet potato: molecular cloning and characterization in transgenic tobacco plants and cultured cells.** *Plant Mol Biol* 51:831-838.

Kim S.Y., Wu R. (1990) **Multiple protein factors bind to the promoter region of a rice glutelin promoter region.** *Nucl Ac Res* 18: 6845-6852.

Knight H., Veale E., Warren G., Knight M. (1999) **The *sfr6* mutation in *Arabidopsis* suppresses low-temperature induction of genes dependent on the CRT/DRE sequence motif.** *Plant Cell* 11: 875-886.

Koes R. E., Spelt C. E., van Den Elzen P. J. M., Mol J. N. M. (1989) **Cloning and molecular characterization of the chalcone synthase multigene family of *Petunia hybrida*.** *Gene* 81: 245-257.

Kotak S., Port M., Ganguli A., Bicker F., von Koskull-Doring P. (2004) **Characterization of C-terminal domains of *Arabidopsis* heat stress transcription factors (Hsfs) and identification of a new signature combination of plant class A Hsfs with AHA and NES motifs essential for activator function and intracellular localization.** *Plant J* 39: 98–112.

Krishnan M., Nguyen H.T., Burke J.J. (1989) **Heat shock protein synthesis and thermal tolerance in wheat.** *Plant Physiol* 90: 140-145.

Kuhlemeier C., Cuozzo M., Green P. J., Goyvaerts E., Ward K., Chua N. H. (1998) **Localization and conditional redundancy of regulatory elements in rbcS-3A, a pea gene encoding the small subunit of ribulose-bisphosphate carboxylase.** *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 4662-4666.

Lemeux P. G., Herendeen S. L., Bloch P. L., Neidhardt F. C. (1978) **Transient rates of synthesis of individual polypeptides in *E.coli* following temperature shifts.** *Cell* 13: 427-434.

Leppä S., Sistonen L. (1997) **Heat shock response-pathophysiological implications.** *Ann Med* 29: 73-78.

Lescot M., Dehais P., Thijs G., Marchal K., Moreau Y., Van de Peer Y., Rouze P., Rombauts S. (2002) ***PlantCARE*, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for *in silico* analysis of promoter sequences.** *Nucleic Ac Res* 30: 325-327.

Lindquist S., Craig E.A. (1988) **The heat shock proteins.** *Annu Rev Genet* 22: 631-677.

Litts J. C., Erdman M. B., Huang N., Karrer E. E., Noueiry A., Quatrano R. S., Rodriguez R. L. (1992) **Nucleotide sequence of the rice (*Oryza sativa*) Em protein gene (*Emp1*).** *Plant Mol Biol* 19: 335-337.

Loake G. J., Faktor O., Lamb C. J., Dixon R. A. (1992) **Combination of H-box [CCTACC(N)₇CT] and G-box (CACGTG) cis elements is necessary for feed-forward stimulation of a chalcone synthase promoter by the phenylpropanoid-pathway intermediate p-coumaric acid.** *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 9230-9234.

Lois R., Dietrich A., Hahlbrock K., Schulz W. (1989) **A phenylalanine ammonia-lyase gene from parsley: structure, regulation and identification of elicitor and light responsive cis-acting elements.** *EMBO J* 8: 1641-1648.

Lyznik L. A., Hirayama L., Rao K. V., Abad A., Hodges T. K. (1995) **Heat-inducible expression of FLP gene in maize cells.** *Plant J* 8: 177–186.

McAlister L., Finkelstein D. B. (1980) **Heat shock protein and thermal resistance in yeast.** *Biochem Biophys Res Commun* 93: 819-824.

Meshi T., Taoka K. I., Iwabuchi M. (2000) **Regulation of histone gene expression during the cell cycle.** *Plant Mol Biol* 43: 643-657.

Morimoto R.I., Tissieres A., Georgopoulos C. (1990) **The stress response, functions of the proteins, and perspectives.** In Stress proteins in biology and medicine (ed. Morimoto R.I., Tissieres A., Georgopoulos C.), pp. 1-36.

Morimoto, R. I. (1998) **Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators.** *Genes Dev* 12: 3788–3796.

Nakashima K., Yamaguchi-Shinozaki K. (2006) **Regulons involved in osmotic stress-responsive and cold stress responsive gene expression in plants.** *Physiol Plantarum* 126: 62-71.

Nover L., Scharf K. D., Gagliardi D., Vergne P., Czarnecka-Verner E., Gurley W. B. (1996) **The Hsf world: classification and properties of plant heat stress transcription factors.** *Cell Stress Chap* 1: 215–223.

Nover L., Bharti K., Doring P., Mishra S. K., Ganguli A., Scharf K. D. (2001) **Arabidopsis and the heat stress transcription factor world: how many heat stress transcription factors do we need?** *Cell Stress Chaperon* 6: 177–189.

Ozeki Y., Davies E., Takeda J. (1993) **Structure and expression of *chalcone synthase* gene in carrot suspension cultured cells regulated by 2,4-D.** *Plant Cell Physiol* 34: 1029-1037.

Parker C. S., Topol J. (1984) **A *Drosophila* RNA polymerase II transcription factor binds to the regulatory site of an *hsp70* gene.** *Cell* 37: 273-283.

Pelham H. R. B. (1982) **A regulatory upstream promoter element in the *Drosophila hsp70* heat-shock gene.** *Cell* 30: 517–528.

Pichersky E., Bernatzky R., Tanksley S. D., Breidenbach R. B., Kausch A. P., Cashmore A. R. (1985) **Molecular characterization and genetic mapping of two clusters of genes encoding chlorophyll a/b-binding proteins in *Lycopersicon esculentum* (tomato)** *Gene* 40: 247-258.

Rampino P., Mita G., Assab E., De Pascali M., Giangrande E., Treglia A. S., Perrotta C. (2010) **Two sunflower *17.6HSP* genes, arranged in tandem and highly homologous, are induced differently by various elicitors.** *Plant Biol* 12: 13-22.

Rieping M., Schöffl F. (1992) **Synergistic effect of upstream sequences, CCAAT box elements, and HSE sequences for enhanced expression of chimaeric *heat shock* genes in transgenic tobacco.** *Mol Gen Gen* 23: 226–232.

Ritossa F. M. (1962) **A new puffing pattern induced by a temperature shock and DNP in *Drosophila*.** *Experientia* 18: 571-573.

Rome C., Couillaud F., Moonen C.T. (2005) **Spatial and temporal control of expression of therapeutic genes using heat shock protein promoters.** *Methods* 35: 188-198.

Rosche E., Westhoff P. (1995) **Genomic structure and expression of the pyruvate, orthophosphate dikinase gene of the dicotyledonous C4 plant *Flaveria trinervia* (Asteraceae).** *Plant Mol Biol* 29: 663-678.

Rouster J., Leah R., Mundy J., Cameron-Mills V. (1997) **Identification of a methyl jasmonate-responsive region in the promoter of a *lipoxygenase 1* gene expressed in barley grain.** *Plant J* 11: 513-523.

Rushton P. J., Torres J. T., Parniske M., Wernert P., Hahlbrock K., Somssich I. E. (1996) **Interaction of elicitor-induced DNA-binding proteins with elicitor response elements in the promoters of parsley *PR1* genes.** *EMBO J* 15: 5690-5700.

Ryan J. A., Hightower L. E. (1996) **Stress proteins as molecular biomarkers for environmental toxicology.** In: Feige U., Morimoto R. I., Yahara I., Polla B. (Eds.), *Stress-Inducible Cellular Responses*. Birkhäuser Verlag, Basel Switzerland, pp. 411–424.

Sachs M.M., Ho T-H.D. (1986) **Alteration of gene expression during environmental stress in plants.** *Annu Rev Plant Physiol* 71: 215-222.

Saidi Y., Domini M., Choi F., Zryd J. P., Schwitzguebel J. P., Goloubinoff P. (2007) **Activation of heat shock response in plants by chlorophenols: transgenic *Physcomitrella patens* as a sensitive biosensor for organic pollutants.** *Plant Cell Environ* 30: 753-763.

Scharf K. D., Siddique M., Vierling E. (2001) **The expanding family of *Arabidopsis thaliana* small heat stress proteins and a new family of proteins containing a-crystallin domains (Acd proteins).** *Cell Stress Chaperon* 6: 225–237.

Schöffl F., Prändl R., Reindl A. (1998) **Regulation of heat shock response.** *Plant Physiol* 117: 1135–1141.

Schöffl F., Rieping M., Baumann G., Bevan M., Angermüller S. (1989) **The function of plant heat shock promoter elements in the regulated expression of chimaeric genes in transgenic tobacco.** *Mol Gen Genet* 217: 246-253.

Severin K., Schöffl F. (1990) **Heat-inducible hygromycin resistance in transgenic tobacco.** *Plant Mol Biol* 15: 827–833.

Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K., Seki M. (2003) **Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses.** *Curr Opin Plant Biol* 6:410-417.

Siddique M., Gernhard S., von Koskull-Döring P., Vierling E., Scharf K.-D. (2008) **The plant sHSP superfamily: five new members in *Arabidopsis thaliana* with unexpected properties.** *Cell Stress Chaperon* 13: 183–197.

Skriver K., Olsen F. L., Roger J., Mundy J. (1991) **Cis-acting DNA elements responsive to gibberellin and its antagonist abscisic acid.** *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 7266-7270.

Sommer H., Saedler H. (1986) **Structure of the chalcone synthase gene of *Antirrhinum majus*.** *Mol Gen Genet* 202: 429-434.

Sorger P. K., Pelham H. R. (1988) **Yeast heat shock factor is an essential DNA-binding protein that exhibits temperature dependent phosphorylation.** *Cell* 54: 855–864.

Stokinger E. J., Gilmour S. J., Thomashow M. F. (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.

Stringham E. G., Candido E. P. (1994) **Transgenic hsp 16-Lacz strains of the soil nematode *Caenorhabditis elegans* as biological monitors of environmental stress.** *Environ Toxicol Chem* 13: 1211-1220.

Stringham E. G., Dixon D. K., Candido E. P. (1992) **Temporal and spatial expression patterns of the small heat shock (*hsp16*) genes in transgenic *Caenorhabditis elegans*.** *Mol Biol Cell* 3: 221-233.

Sun W., Catherine B., Van de Cotte B., Van Montagu M., Verbruggen N. (2001) ***At-HSP17.6A*, encoding a small heat-shock protein in *Arabidopsis*, can enhance osmotolerance upon over-expression.** *Plant J* 27: 407- 415.

Sun W., Van Montagu M., Verbruggen N. (2002) **Small heat shock proteins and stress tolerance in plants.** *Biochim Biophys Acta* 1577: 1-9.

Takaiwa F., Oono K., Wing D., Kato A. (1991) **Sequence of three members and expression of a new major subfamily of *glutelin* genes from rice.** *Plant Mol Biol* 17: 875-885.

Tissieres A., Mitchell H. K., Tracy V. M. (1974) **Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*. Relation to chromosome puffs.** *J Mol Biol* 84: 389-398.

Vauterin M., Frankard V., Jacobs M. (1999) **The *Arabidopsis thaliana dhdds* gene encoding dihydrodipicolinate synthase, key enzyme of lysine biosynthesis, is expressed in a cell-specific manner.** *Plant Mol Biol* 39: 695-708.

Wang W. X., Vinocur B., Shoseyov O., Altman A. (2004) **Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response.** *Trends Plant Sci* 9: 244-252.

Waters E. R., Lee G. J., Vierling E. (1996) **Evolution, structure and function of the small heat shock proteins in plants.** *J Exp Bot* 47: 325-338.

Waters E.R. (1995) **The molecular evolution of the small heat-shock proteins in plants.** *Genetics* 141: 785-795.

Weisshaar B., Armstrong A., Block A., Da Costa e Silva O., 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.

White A. J., Dunn M. A., Brown K., Hughes M. A. (1994) **Comparative analysis of genomic sequence and expression of a lipid transfer protein gene family in winter barley.** *J. Exp Bot* 45: 1885-1892.

Wiederrecht G., Seto D., Parker C. S. (1988) **Isolation of the gene encoding the *S. cerevisiae* heat shock transcription factor.** *Cell* 54: 841–853.

Williams G. T., Morimoto R. I. (1990) **Maximal stress-induced transcription from the human HSP70 promoter requires interactions with the basal promoter elements independent of rotational alignment.** *Mol Cell Biol* 16: 3125-3136.

Wu C. (1984) **Activating protein factor binds in vitro to upstream control sequences in heat shock gene chromatin.** *Nature* 311: 81-84.

Wu C. (1995) **Heat shock transcription factors: structure and regulation.** *Annu Rev Cell Dev Biol* 11: 441–469.

Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. (1994) **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.

Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. (2006) **Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses.** *Annu Rev Plant Biol* 57: 781-803

Yamamoto Y. Y., Ichida H., Abe T., Susuki Y., Sugano S., Obokata J. (2007) **Differentiation of core promoter architecture between plants and mammals revealed by LDSS analysis.** *Nucleic Ac Res* 35: 6219-6226.

Yoshida K., Kasai T., Garcia M. R. C., Sawada S., Shoji T., Yamazaki S., Komeda Y., Shinmyo A. (1995) **Heat-inducible expression system for a foreign gene in cultured tobacco cells using the HSP18.2 promoter of *Arabidopsis thaliana*.** *Appl Microbiol Biol* 44: 466-472.

Zhu J., Gong Z., Zhang C., Song C-P., Damsz B., Inan G., Koiwa H., Zhu J. K., Hasegawa P. M., Bressan R. A. (2002). **OSM1/SYP61: a syntaxin protein in *Arabidopsis* controls abscisic acid-mediated and non-abscisic acid-mediated responses to abiotic stress.** *Plant Cell* 14: 3009-3028.

ABBREVIAZIONI

HS: *Heat Shock*

HSP: *Heat Shock Protein*

smHSP: *Small Heat Shock Protein*

ACD: Dominio alfa cristallino

HSE: *Heat Shock Element*

HSF: *Heat Shock Factor*

CMV: *Citomegalovirus*

GFP: *Green Fluorescent Protein*

CD: Citosina Deaminasi

TC: Timidina Chinasi

NLS: Segnale di Localizzazione Nucleare

ORF: *Open Reading Frame*

SA: Acido Salicilico

ABA: Acido Abscissico

EtOH: Etanolo

CS: *Cold Shock*

DEPC: Dietilpirocarbonato

LB: Luria Bertani

CaMV: *Cauliflower Mosaic Virus*

MRE: *Metal Responsive Element*

LTR: *Low Temperature Responsive*

DRE: *Deydration Responsive Element*

ABRE: *Abcissic Acid Responsive Element*

ARE: *Anaerobic Responsive Element*

CBF: *C-repeat Binding Factor*

CRT: *C-repeat*

bp: paia di basi

kDa: kiloDalton

HMW-HSP: *High Molecular Weight- Heat Shock Protein*

LMW-HSP: *Low Molecular Weight- Heat Shock Protein*

PM: Peso Molecolare

IPTG: Isopropiltiogalattoside

X-Gal: 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galattoside

Nos: *Nopaline synthase*