

**ESTUDIO FUNCIONAL DE LA FORMALDEHÍDO
DESHIDROGENASA DEPENDIENTE DE GLUTATIÓN
DE *ARABIDOPSIS THALIANA*.
APLICACIONES EN FITOREMEDIACIÓN.**

Memoria presentada por **HAKIMA ACHKOR**, Licenciada en Ciencias Biológicas, para optar al grado de Doctora en Ciencias Biológicas.

Trabajo realizado en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Unidad de Ciencias, de la Universidad de Autónoma de Barcelona, bajo la dirección de la Doctora **María del Carmen Martínez Gómez**.

María del Carmen Martínez

Hakima Achkor

Cerdanyola (Bellaterra).

20 de Febrero de 2003

A LA MEMORIA DE MI PADRE

A MI FAMILIA POR TODO

A JOAN POR...

Quisiera expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas que han contribuido, ya sea científicamente o personalmente, a la realización de esta tesis.

- A la Dra M. Carmen Martínez, por haberme ofrecido la oportunidad de realizar la tesis doctoral bajo su dirección y por introducirme en el mundo de la investigación. Le agradezco su paciencia y el gran esfuerzo que ha hecho para la dirección, la orientación y corrección de este trabajo.

- Al Dr. Xavier Parés, el que siempre se haya interesado por este trabajo y haya aportado ideas.

- Al Dr. Josep Antoni Biosca y Dr. Jaume Farrés por su sincero interés en mi trabajo.

- A la Dra. Nicole Chaubet-Gigot por su entrañable acogida en mi corta pero intensa estancia en su laboratorio en Stransburgo.

- Al Dr. Albert Boronat, por su ayuda técnica en la producción de plantas transgénicas.

- A mis compañeras del laboratorio:

A Maykelis, a Carol, a Eva, a Trini y a Chari, gracias por estar a mi lado cuando necesitaba vuestro apoyo, y por otras cosas más...

- Al resto de los compañeros del grupo y del departamento, en especial a Sandra, a quien deseo mucha suerte, porque seguro la necesitará en la etapa que ahora inicia.

- *Una mención especial al Dr. salvador Bartolomé, por su apoyo en un momento crítico en mi vida. Además, gracias por todo el tiempo dedicado a mis figuras, diapositivas, impresiones de la tesis...etc.*

- *Gracias a mi familia, por el apoyo incondicional que me han dado. Aunque que no entendían nada de mis plantas ni de mis proteínas, sabían que eran importantes para mi, y eso era suficiente.*

- *Gracias a mi “Natiuchca” por renunciar a muchas cosas y estar a mi lado, gracias por soportarme “Te quiero hermanita”.*

- *Finalmente, gracias a ti Joan, por tu amor, tu comprensión y por compartir tu vida conmigo.*

I. Introducción	1
I. Sistema enzimático de las alcohol deshidrogenasas: propiedades y sustratos	1
1. Generalidades	1
1.1 ADH clase I (<i>ADH1</i>)	2
1.2 ADH clase II (<i>ADH2</i>).....	2
1.3 ADH clase III (<i>ADH3</i>).....	2
1.4 ADH clase IV (<i>ADH4</i>)	3
1.5 ADH clase V (<i>ADH5</i>) y ADH clase VI (<i>ADH6</i>).....	3
2. Formaldehído: formación, toxicidad y metabolismo	4
2.1 Toxicidad del formaldehído	6
2.2 Vías metabólicas de eliminación del formaldehído.....	7
2.2.1 Metabolismo del formaldehído por la formaldehído deshidrogenasa dependiente de glutatión	8
2.2.2 Metabolismo del formaldehído vía tetrahidrofolato.....	9
2.2.3 Metabolismo del formaldehído por la catalasa.....	9
2.2.4 Metabolismo del formaldehído por la aldehído deshidrogenasa mitocondrial	9
3. Formaldehído deshidrogenasa dependiente de glutatión (FALDH)	10
3.1. Generalidades	10
3.2. Características cinéticas	11
3.3 Relaciones evolutivas en el sistema ADH.....	12
3.4 Localización subcelular de la FALDH.....	13
3.5 Regulación génica de la FALDH	14
3.6 Estudios de mutagénesis dirigida sobre FALDH	14
4. Otras alcohol deshidrogenasas de plantas	16
4.1 Alcohol deshidrogenasa activa con etanol (clase P)	17
4.2 Cinnamil alcohol Deshidrogenasa.....	18
4.3 Benzil alcohol Deshidrogenasa	18
5. S-Nitrosoglutatión, un nuevo sustrato de la FALDH	18

II. Ciclo de división celular de plantas	20
1. Generalidades	20
2. El citoesqueleto en plantas durante la mitosis y la citocinesis	21
2.1 Generalidades	21
3. Utilización de líneas celulares de plantas en los estudios del ciclo celular. Sincronización celular	23
3.1 Línea celular de tabaco BY2	25
4. <i>Arabidopsis thaliana</i> como planta modelo	26
 II- Objetivos	29
 III. Materiales y Métodos	31
 1. Reactivos	31
1.1 Reactivos de análisis de proteínas.....	31
1.2 Reactivos de Biología Molecular	31
1.3 Reactivos de cultivos de plantas	32
2. Material biológico	33
2.1 Material biológico vegetal.....	33
2.2 Cepas de <i>E. Coli</i>	33
2.3 Cepa de <i>Scaccharomyces cerevisiae</i>	33
2.4 Plásmidos	33
3. Medios de cultivo y medios de conservación de las cepas	34
3.1 Medios de cultivo para bacterias.....	34
3.2 Medios de cultivo para levadura	35
3.3 Medios de cultivo del material biológico vegetal	37
3.3.1 Medio de cultivo para la línea celular T87-C3.....	37
3.3.2 Medio de cultivo para plantas de <i>A. thaliana</i>	38
3.3.3 Medio de cultivo de células de tabaco BY2.....	38

4. Condiciones de cultivo del material vegetal	39
4.1 Esterilización de las semillas de <i>A. thaliana</i>	39
4.2 Germinación de las semillas y crecimiento de las plántulas en medio líquido	39
4.3 Condiciones de cultivo de las plantas transgénicas de <i>A. thaliana</i>	39
5. Medio de conservación de levadura	40
6. Medio de conservación de <i>E. coli</i>	40
7. Determinación de la actividad enzimática de la FALDH	40
7.1 Preparación de formaldehído a partir de paraformaldehído y estandarización de la solución madre	40
7.2 Determinación de la actividad enzimática. Actividad estándar	41
8. Cuantificación de las proteínas por el método de Bradford	42
9. Métodos electroforéticos	42
9.1 Electroforesis de proteínas en geles almidón	43
9.2 Isoelectronfoque analítico	44
9.3 Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida con SDS	45
9.4 Electroforesis de DNA en geles de agarosa	46
9.5 Electroforesis de RNA en geles de agarosa-formaldehído.....	47
10. Método de tinción de proteínas en geles de electroforesis	48
10.1 Tinción de geles por actividad.....	48
10.2 Tinción con azul de Comassie	49
10.3 Tinción con sales de plata.....	50
11. Métodos generales de DNA recombinante	51
11.1 Material y soluciones.....	51
11.2 Extracción de DNA plasmídico de bacterias y de levadura	51
11.3 Extracción de DNA genómico de levadura	51
11.4 Extracción de RNA de <i>A. thaliana</i>	51
11.5 Digestión con enzimas de restricción	53
11.6 Purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa.....	53
11.7 Obtención de extremos romos por tratamiento con el fragmento Klenow de la DNA polimerasa	54

11.8 Defosforilación de DNA con la fosfatasa alcalina	55
11.9 Ligación de fragmentos de DNA	55
11.10 Transformación de células de <i>E. coli</i>	56
11.10.1 Preparación de células competentes	56
11.10.2 Transformación y selección	56
11.11 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	57
11.12 Northern blot	57
11.12.1 Marcaje radioactivo de la sonda de DNA.....	58
11.12.2 Prehibridación e hibridación	60
11.12.3 Análisis de la señal radioactiva	60
11.13 Southern blot	61
12. Expresión de la FALDH de <i>Arabidopsis thaliana</i> en <i>S. cerevisiae</i>.....	62
12.1 Construcción de un mutante por delección del gen <i>SFAI</i>	62
12.1.1 Análisis de las cepas deleccionadas	62
12.2 Clonación de la FALDH de <i>Arabidopsis thaliana</i> en el vector de expresión pYES2	62
12.2.1 Amplificación del cDNA por PCR y clonación en el vector pUC18.....	62
12.2.2 Subclonación en el vector de expresión de levadura pYES2	63
12.3 Transformación de <i>S. cerevisiae</i> y expresión de la FALDH de <i>Arabidopsis</i>	64
12.3.1 Preparación de células competentes y transformación.....	64
12.3.2 Expresión de la FALDH de <i>Arabidopsis</i> in <i>S. cerevisiae</i>	65
12.3.3 Curvas de crecimiento en presencia de formaldehído.....	65
13. Purificación de la FALDH de <i>A. thaliana</i> expresada en <i>S. cerevisiae</i>	66
13.1 Crecimiento de <i>S. cerevisiae</i> en un bioreactor	66
13.2 Procedimiento de purificación	67
14. Purificación de la FALDH de <i>A. thaliana</i> a partir de la línea celular T87-C3 ...	68
15. Métodos inmunológicos	69
15.1 Obtención de anticuerpos policlonales contra la FALDH de <i>A. thaliana</i>	69
15.2 Western blot	70

15.3 Inmunolocalización de la FALDH en células BY2.....	72
16. Obtención de plantas transgénicas de <i>A. thaliana</i>.....	73
16.1 Clonaje en el vector pDH 51	73
16.2 Construcción pBin19/FALDH.....	73
16.3 Transformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	73
16.4 Infiltración al vacío de plantas de <i>A. thaliana</i>	75
17 Extracción de proteínas de las plántulas de <i>A. thaliana</i>.....	76
18. Microscopía electrónica	77
<i>IV-Resultados</i>	79
A. PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA FALDH DE	
<i>A. THALIANA</i>	79
1. Obtención del extracto de proteínas totales	79
2. Cromatografía de intercambio iónico en DEAE-Sepharosa	79
3. Cromatografía de intercambio aniónico por HPLC.	81
4. Cromatografía de afinidad en Blue-Sepharosa	82
5. Análisis del grado de pureza del enzima	83
6. Resumen del proceso de purificación de la FALDH de <i>A. thaliana</i>.....	84
7. Estudio físico-químico de la FALDH de <i>A. thaliana</i>	84
7.1 Análisis por inmunodetección en Western blot.....	84
7.2 Determinación del punto isoeléctrico.....	85
8. Caracterización enzimática de la FALDH de <i>A. thaliana</i>.....	86
9. Expresión de la Formaldehído deshidrogenasa de <i>A. thaliana</i>	
en la levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>.....	86
9.1 Clonación en el vector pUC18	86
9.2 Subclonación en el vector de expresión pYES2.....	87

9.3 Construcción de una cepa mutante de <i>S. cerevisiae</i> (<i>sfa1Δ</i>).....	90
9.3.1 Estrategia de delección del gen <i>SFA1</i>	90
9.3.2 Análisis de homogenados de las cepas deleccionadas	91
9.3.2.1 Análisis por Isoelectroenfoque y posterior revelado por actividad FALDH.....	91
9.3.2.2 Análisis por Southern blot.....	91
9.4 Purificación de la FALDH recombinante de <i>A. thaliana</i>	92
9.4.1 Cromatografía de intercambio aniónico en DEAE-Sepharosa.....	93
9.4.2 Cromatografía en hidroxipatito	93
9.4.3 Cromatografía de afinidad en Blue-Sepharosa.....	93
9.4.4 Resumen del proceso de purificación.....	95
10. Estudios físico-químicos de la FALDH de <i>A. thaliana</i>	95
10.1 Determinación del peso molecular	95
10.2 Caracterización cinética de la FALDH recombinante de <i>A. thaliana</i>	96
11. Obtención y caracterización de anticuerpos policlonales contra la FALDH de <i>A. thaliana</i>	99
12. Efecto de la sobreexpresión del gen de la FALDH de <i>A. thaliana</i> sobre el crecimiento de <i>S. cerevisiae</i> en presencia de formaldehído	101
B. OBTENCIÓN Y ANÁLISIS DE PLANTAS TRANSGÉNICAS DE <i>A. THALIANA</i>	103
1. Sobreexpresión del gen FALDH en plantas de <i>A. thaliana</i>	103
1.1 Clonación del cDNA en el vector pDH51.....	103
1.2 Subclonación en el vector pBin 19 y transformación de <i>Agrobacterium</i>	105
1.3 Transformación de <i>A. thaliana</i> y selección de plantas homocigotas	106
2. Análisis de las plantas transgénicas de sobreexpresión	109
2.1 Análisis mediante Western blot.....	109
2.2 Ensayos de actividad FALDH.....	110
2.3 Análisis mediante Northern blot	111

3. Análisis de las plantas transgénicas control	112
3.1 Análisis mediante Western blot.....	112
4. Metabolismo de formaldehído exógeno por las líneas transgénicas	113
5. Efecto del formaldehído exógeno sobre las plantas de <i>A. thaliana</i>	117
C. INMUNOLocalización de la FALDH EN CÉLULAS BY2	118
1. Localización subcelular de la formaldehído deshidrogenasa dependiente de glutatión (FALDH) en células de tabaco BY2 no sincronizadas	118
2. Localización subcelular de la formaldehído deshidrogenasa dependiente de glutatión en células de tabaco BY2 sincronizadas	120
2.1 Sincronización de células BY2.....	120
2.2 Distribución de la FALDH en células BY2 durante el ciclo celular	121
3. Tratamiento de las células BY2 con propizamida	123
<i>V-Discusion</i>	125
1. Caracterización de la FALDH de <i>A. thaliana</i>	125
1.1 Purificación de la FALDH de <i>A. thaliana</i> a partir de la línea celular T87.....	126
1.2 Purificación de la FALDH recombinante de <i>A. thaliana</i>	127
1.3 Propiedades físico químicas de la FALDH de <i>A. thaliana</i>	127
1.4 Propiedades cinéticas de la FALDH de <i>A. thaliana</i>	128
2. Aspectos funcionales de la sobreexpresión de la FALDH de <i>A. thaliana</i> en <i>S. cerevisiae</i>	130
2.1 Efecto de la delección del gen <i>SFA1</i> de <i>S. cerevisiae</i>	130
2.2 Resistencia a formaldehído.....	131
3. Utilización de plantas transgénicas para la eliminación del formaldehído exógeno	132
3.1 Sobreexpresión del transgen CaMV/FALDH en <i>A. thaliana</i>	133
3.2 Las plantas transgénicas son más resistentes a formaldehído	134

4. Inmunolocalización de la FALDH en células de tabaco BY2.....	140
4.1 Posible función de la FALDH en el núcleo.....	142
<i>VI- Conclusiones</i>.....	145
<i>VII- Bibliografía</i>.....	147

FIGURAS

FIGURA 1.....	8	FIGURA 27	100
FIGURA 2.....	16	FIGURA 28	102
FIGURA 3	17	FIGURA 29	103
FIGURA 4	20	FIGURA 30	104
FIGURA 5	21	FIGURA 31.....	104
FIGURA 6	23	FIGURA 32	105
FIGURA 7	25	FIGURA 33	106
FIGURA 8	26	FIGURA 34	107-108
FIGURA 9	27	FIGURA 35	109
FIGURA 10	80	FIGURA 36	110
FIGURA 11.....	81	FIGURA 37	111
FIGURA 12	82	FIGURA 38	112
FIGURA 13	83	FIGURA 39.....	112
FIGURA 14	83	FIGURA 40.....	113
FIGURA 15	85	FIGURA 41.....	114
FIGURA 16	85	FIGURA 42	116
FIGURA 17	87	FIGURA 43.....	117
FIGURA 18	88	FIGURA 44	118
FIGURA 19.....	89	FIGURA 45.....	119
FIGURA 20	89	FIGURA 46.....	120
FIGURA 21	90	FIGURA 47.....	121
FIGURA 22	91	FIGURA 48.....	122
FIGURA 23	92	FIGURA 49.....	123
FIGURA 24	94	FIGURA 50.....	124
FIGURA 25	96	FIGURA 51.....	137
FIGURA 26	100	FIGURA 52.....	138
		FIGURA53.....	141

TABLAS

TABLA 1	4
TABLA 2	16
TABLA 3	84
TABLA 4	95
TABLA 5	98
TABLA 6	99
TABLA 7	129
TABLA 8	133
TABLA 9	136

Ab₂₈₀	absorbancia a 280 nm
ADH	alcohol deshidrogenasa
Amp^R	resistencia a ampicilina
APAD	dinucleótido de 3-acetilpiridina adenina
BY2	células de tabaco cv. Bright Yellow 2
BSA	albúmina de suero bovino
cpm	cuentas por minuto
Da	dalton
DEAE	dietilaminoetil
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucleico
dNTP	deoxinucleótido trifosfato
DTT	1,4-ditiotreitol
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
FALDH	formaldehído deshidrogenasa dependiente de glutatión
GSH	glutatión
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
His	histidina
IgG	Inmunoglobulina G
Kb	kilobase
k_{cat}	constante catalítica
K_m	constante de Michaelis-Menten
LB	medio Luria-Bertani (para bacterias)
NAD⁺	nicotinamida adenina dinucleótido (forma oxidada)
NADH	nicotinamida adenina dinucleótido (reducida)
NADP⁺	nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (forma oxidada)
NADPH	nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (forma reducida)
NBT	nitroblue tetrazolio
nm	nanómetro
DO₆₀₀	densidad óptica a 600 nm
PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida
Pb	pares de bases.

Abreviaturas

PEG	polietilenglicol
pI	punto isoeléctrico
PMSF	fluoruro de fenilmetilsulfonilo
ppm	partes por millón
rpm	revoluciones por minuto
SD	medio mínimo sintético
SDS	dodecil sulfato sódico
SFA1	gen que codifica por la FALDH de <i>S. cerevisiae</i>
SMM	medio mínimo suplementado (para levadura)
Tris	tris hidroximetil aminoetano
u	unidad internacional de la actividad enzimática
Ura	uracilo
Wt	wild type
YpD	medio rico o complejo para levadura

I. Sistema enzimático de las alcohol deshidrogenasas: propiedades y sustratos.

1. Generalidades.

Las alcohol deshidrogenasas (ADH) (EC 1.1.1.1.) catalizan la oxidación reversible de una amplia variedad de alcoholes primarios, secundarios y cíclicos, de origen endógeno o xenobiótico. La reacción de oxidación tiene lugar con la reducción concomitante del coenzima, que generalmente es el NAD^+ (Jörnvall y Höög, 1995; Edenberg y Bosron, 1997).

El sistema enzimático de las ADH es de localización mayoritariamente citoplasmática. Está ampliamente distribuido en todas las especies, incluyendo organismos pertenecientes a todos los reinos en los que se clasifican los seres vivos (Jörnvall y col., 1993). En vertebrados, todos los miembros de la familia ADH son metaloenzimas, que contienen Zn, y forman parte de la superfamilia de las deshidrogenasas/reductasas de cadena media (MDR). Su estructura es dimérica, compuesta por subunidades de aproximadamente 374 residuos de aminoácidos. Cada subunidad contiene un dominio catalítico y un dominio de unión al coenzima, separados por una hendidura hidrofóbica que forma el bolsillo de unión al sustrato (Edenberg y Bosron, 1997).

Diferentes formas de ADH, caracterizadas como isoenzimas, fueron inicialmente identificadas en humanos (Smith y col., 1971). La familia de las ADH ha ido aumentando con el descubrimiento de nuevas formas enzimáticas, lo que ha dado lugar al término de clase (Vallee y Bazzone, 1983). La clasificación de las clases de ADH se basa en su especificidad de sustrato y en sus propiedades cinéticas, así como en la sensibilidad al inhibidor pirazol, y la movilidad en la electroforesis en gel de almidón (técnica que se utiliza de forma clásica para la detección e identificación de diferentes formas enzimáticas con actividad ADH (Vallee y Bazzone, 1983; Jörnvall y Höög, 1995; Duester y col., 1999; Edenberg y col., 2000).

En humanos, las ADHs están codificadas por hasta siete genes diferentes cuyos productos génicos han sido agrupados en cinco clases que presentan alrededor de un 60-70% de identidad (Jörnvall y Höög, 1995). En los mamíferos, el sistema ADH constituye un sistema complejo con diferentes formas y dividido en 6 clases (*ADH1-ADH6*) que a la vez incluyen subgrupos, isoenzimas y formas alélicas. Hasta el momento, en ninguna especie se han identificado las seis clases de ADH. Por ejemplo

en humano, tan solo las clases I, II, III, IV y V o en rata las clases I, II, III, IV y VI han sido descritas (Duester, 1999).

1.1 ADH clase I (*ADH1*).

La ADH clase I se caracteriza por presentar una amplia especificidad de sustrato y una fuerte inhibición competitiva con pirazol y sus derivados (Tolf y col., 1982; Fries y col., 1979). De todas las clases de ADHs, la ADH1 es la que presenta mayor afinidad por el etanol, siendo la principal enzima responsable de metabolizar el etanol ingerido. Además, la ADH1 es activa con alcoholes alifáticos primarios y secundarios, alcoholes cíclicos y aromáticos (Von Wertburg y col., 1964; Blair y Vallee, 1966; Peitruszko y col., 1973), compuestos del metabolismo de la noradrenalina (Mardh y col., 1985), dopamina (Mardh y Valee., 1986), retinoides (Boleda y col., 1993; Yang y col., 1994), y ácidos biliares (Marschall y col., 2000).

1.2 ADH clase II (*ADH2*).

La ADH clase II muestra actividad con diversos alcoholes y aldehídos, alifáticos y aromáticos, aunque con una especificidad más restringida que la ADH1. La ADHII presenta actividad con intermediarios del metabolismo de la serotonina y de la noradrenalina (Consalvi y col., 1986; Mardh y col., 1986), así como con retinoides (Yang y col., 1994; Popescu y Napoli, 2000).

1.3 ADH clase III (*ADH3*).

La ADH clase III cataliza la oxidación del compuesto S-hidroximetilglutatiión, generado espontáneamente a partir de la reacción del formaldehído con glutatiión reducido, dando lugar al producto S-formilglutatiión (Koivusalo y Uotila, 1991). Por esta razón se le conoce con el nombre de formaldehído deshidrogenasa dependiente de glutatiión (FALDH). Estudios genéticos con ratones knock-out han demostrado su participación en el metabolismo del formaldehído (Delfour y col., 1999). Además de esta actividad, la ADH clase III cataliza eficientemente la oxidación de alcoholes primarios de cadena larga, como octanol, y especialmente los ácidos grasos ω -hidroxilados (Juliá y col., 1987). La ADH clase III se caracteriza y se distingue del resto de las ADHs por ser prácticamente insensible a la inhibición por 4-metilpirazol, y por la imposibilidad de

saturarse con alcoholes o aldehídos primarios de cadena corta (2 a 4 carbonos) (Juliá y col., 1987; Vallee y Bazzone, 1983).

La ADHIII es capaz de catalizar la degradación del ácido nítrico, previa combinación con el glutatión para dar S-nitrosoglutatión (Gow y col., 1997), en una reacción dependiente de NADH/NADPH (Jensen y col., 1998), lo que sugiere un papel en la protección frente el estrés nitrosativo.

La FALDH es un enzima ubicuo, presente en todos los animales y plantas y en numerosos microorganismos (Fernández y col., 1997). Es la ADH mayoritaria y más ampliamente distribuida en el cerebro adulto de rata y humano (Beissweger y col., 1985; Giri y col., 1989; Mori y col., 2000). Su localización no solo es citoplasmática como el resto de ADHs (Parés y col., 1984; Uotila y Koivusalo, 1989) sino que también se ha detectado en núcleo de hepatocitos de rata (Iborra y col., 1992). Se cree que una de las funciones de este enzima podría ser la protección de las estructuras celulares, inclusive la cromatina, frente al formaldehído que se produce de manera endógena en varios procesos metabólicos.

Recientemente, ensayos *in vitro* y estudios genéticos han demostrado la participación de la ADHIII en la síntesis de ácido retinoico, gracias a su actividad como retinol deshidrogenasa (Molotkov y col., 2002).

1.4 ADH clase IV (ADH4).

La ADH clase IV es la forma que presenta un valor de k_{cat} más elevado frente a alcoholes primarios alifáticos, incluido el etanol (Boleda y col., 1989; Crosas y col., 2000; Jörnvall y col., 2000). Presenta actividad con varios sustratos, como los ω -hidroxiácidos grasos, los aldehídos derivados de la peroxidación lipídica y los retinoides (Julia y col., 1986; Boleda y col., 1993; Peralba y col., 1997). De todas las ADHs, la ADH clase IV es la que presenta mayor actividad frente a los retinoides (Boleda y col., 1993; Yang y col., 1994; Crosas y col., 2000; Jörnvall y col., 2000).

1.5 ADH clase V (ADH5) y ADH clase VI (ADH6).

Estas formas enzimáticas han sido poco investigadas hasta el momento, y por tanto poco se sabe acerca de su especificidad de sustrato (Yasumani y col., 1991; Höög y Brandt, 1995). La ADH clase V no se ha detectado a nivel proteico. Su mRNA se ha

detectado en estómago, hígado y tejidos fetales humanos (Yasumani y col., 1991). No hay evidencia hasta el momento de la presencia del enzima activo en estos tejidos, pero se ha conseguido la expresión de su DNA *in vitro*. El enzima presenta una K_m para el etanol superior a la de la ADHIV, y también es activa con propanol y alcohol benzílico (Chen y Yoshida, 1991). La ADH clase VI ha sido tan sólo detectada en roedores: el mRNA en rata y la proteína activa en *Peromyscus* (Zheng y col., 1993; Höög y Brandt, 1995).

A continuación se presenta una tabla resumen de las propiedades más importantes de las diferentes clases de ADH.

Tabla 1. Sustratos fisiológicos y vías metabólicas en las que están implicadas las diferentes clases de ADH.

Sustrato	ADH	Función
Etanol y alcoholes alifáticos	ADHI, ADHII, ADHIV	Metabolismo del etanol
retinoides	ADHI, ADHIII, ADHIV	Metabolismo de retinoides. Proliferación celular. Ciclo visual.
ω -Hidroxiácidos	ADHI, ADHIII, ADHIV	Oxidación de ácidos grasos.
Esteroides	ADHI	Metabolismo del colesterol y de esteroides
S-Hidroximetilglutación S-nitrosoglutación	ADHIII	Metabolismo de formaldehído y de óxido nítrico.

2. Formaldehído: formación, toxicidad y metabolismo.

El formaldehído (HCHO) es un gas inflamable, volátil, incoloro y muy soluble en agua. Posee un olor penetrante y irritante. Es un producto químico industrial importante que tiene 4 aplicaciones básicas: **1)** como intermediario en la producción de resinas de tipo urea-formaldehído y fenol-formaldehído (Stayner y col., 1993); **2)** como intermediario en la producción de productos químicos industriales; **3)** como bactericida o fungicida; **4)** como componente en la formulación de artículos del tipo cosméticos, champúes y productos farmacéuticos. Se utiliza desde hace tiempo como fijador y preservador tisular. El formaldehído está normalmente presente en concentraciones bajas, generalmente menos de 0,03 ppm, en el aire libre y en interiores. Su concentración en el

interior de algunas viviendas puede ser superior a la del aire exterior. Se ha estimado que el número de individuos expuestos a formaldehído en Estados Unidos es de 2,2 millones de residentes en hogares móviles, con una exposición a 0,4 ppm de formaldehído, y de unos 1,7 millones en los hogares convencionales aislados con espuma del tipo urea-formaldehído, con una exposición media potencial a 0,12 ppm.

El formaldehído pertenece a la gran familia de los compuestos orgánicos volátiles o “VOCs”.

El formaldehído también puede formarse a partir de varias fuentes endógenas, intracelulares, como consecuencia de distintas actividades metabólicas normales. Las más importantes son las siguientes:

- El sistema citocromo P-450 puede producir formaldehído a partir de varios xenobióticos y de glicerol (Uotila y Koivusalo, 1989; Winters y Cederbaun, 1990; Rashba-Step y col; 1994; Kukielka y Cederbaun, 1995).

- La peroxidación lipídica es fuente de productos citotóxicos tales como formaldehído y otros aldehídos (Shara y col., 1992; Bagchi y col., 1993; Moser y col., 1993).

- El metabolismo de serina, glicina y sarcosina da lugar, en presencia de tetrahidrofolato, a N⁵,N¹⁰-metilen-tetrahidrofolato, que está en equilibrio con formaldehído libre (Benkovic, 1980; Fujiwara y col., 1984; Kvalnes-Krick y Jorns, 1987).

- Yu y col., en 1997, han propuesto la formación de formaldehído a partir de adrenalina, como consecuencia de una situación de estrés. Así, la producción de formaldehído endógeno aumenta si la secreción de adrenalina aumenta. El incremento de formaldehído en sangre durante largos períodos de tiempo provocaría un daño endotelial y arteriosclerosis asociada a estados de estrés.

- El humo de tabaco produce un aumento de metilamina endógena. La deamidación de la metilamina da lugar a la formación de amonio, peróxido de hidrógeno y formaldehído. Así pues, el aumento de los niveles de formaldehído en suero podría estar

relacionado con enfermedades cardiovasculares y cerebrovasculares asociadas al humo de tabaco (Yu y col., 1997).

- Se ha demostrado que pocas horas después del consumo de fruta, la concentración de metanol en el cuerpo humano aumenta. El metanol es metabolizado a formaldehído principalmente por la alcohol deshidrogenasa en humanos (Cooper y Kini, 1962). Concentraciones de formaldehído bastante altas, como de 3 ppm en la respiración (correspondientes a ≈ 10 mg/ml en sangre) han sido observadas en personas que han comido 0,75 Kg de melocotones y/o manzanas (Lindinger y col., 1997).

- Se ha observado que el tratamiento con diferentes xenobióticos y drogas anti-tumorales genera formaldehído, mediante demetilaciones de aquéllos por el sistema del citocromo P450 (Gillette, 1966; Kato y col., 2000).

2.1 Toxicidad del formaldehído.

El formaldehído está considerado como un factor de riesgo laboral de tipo químico, cuya presencia puede provocar una enfermedad profesional. Las rutas primarias de la exposición humana potencial al formaldehído son inhalación, contacto cutáneo e ingestión. Los efectos comunes de la exposición a este aldehído son varios síntomas agudos, como vómitos, irritación de los ojos, edema pulmonar. También se puede presentar irritación de la garganta, vértigo, dolor abdominal, diarrea, daño renal, aparición de una neumonía secundaria, y en casos extremos colapso cardiovascular y acidosis metabólica.

Hay suficientes pruebas sobre la carcinogenicidad del formaldehído en animales. Sin embargo, la Agencia Internacional para la Investigación del cáncer (IARC) limitaba la evidencia sobre su carcinogenicidad en humanos, (IARC, 1995). El formaldehído puede ser un “facilitador” para otros agentes oncogénicos (Grafström y col., 1993).

Debido a su alta reactividad, el formaldehído sufre un gran número de transformaciones biológicas importantes, como la hidratación, la reacción con el hidrógeno activo de los tioles, el cianuro de hidrógeno y el fenol. La toxicidad del formaldehído en la célula se debe a que reacciona con las proteínas produciendo entrecruzamiento entre las cadenas peptídicas, o de éstas con los grupos amino del DNA (Hayat, 1981). Esta reacción es

mucho más rápida con los nucleótidos libre o con el DNA desnaturalizado que con el DNA nativo (Stollar y col., 1962; Grossman, 1967; Hayat, 1981)

In vitro, el formaldehído induce la formación de enlaces cruzados DNA-proteínas. Este hecho ha dado lugar a que pueda utilizarse como un biomarcador de la exposición a formaldehído (Shaham y col., 1996).

En estudios *in vivo* se ha descrito que el formaldehído induce roturas de cadena sencilla en el DNA (Magaña-Schwencke y col., 1978), transversiones de pares de bases AT a CG (Liber y col., 1989) y deleciones (Le y col., 1990). También se ha detectado la formación de micronúcleos en tejidos expuestos a formaldehído (Migliore y col., 1989; Suruda y col., 1993).

2.2 Vías metabólicas de eliminación del formaldehído.

La etapa limitante en la conversión del formaldehído a CO₂ es la oxidación del ácido fórmico a CO₂, que es el mayor producto del metabolismo del formaldehído. La conversión metabólica de formaldehído a ácido fórmico es catalizada en eucariotas principalmente por la formaldehído deshidrogenasa dependiente de glutatión (FALDH). También se han descrito otras vías secundarias de metabolismo del formaldehído, como la vía del tetrahidrofolato, la vía de la catalasa, o mediante la aldehído deshidrogenasa (Figura 1).

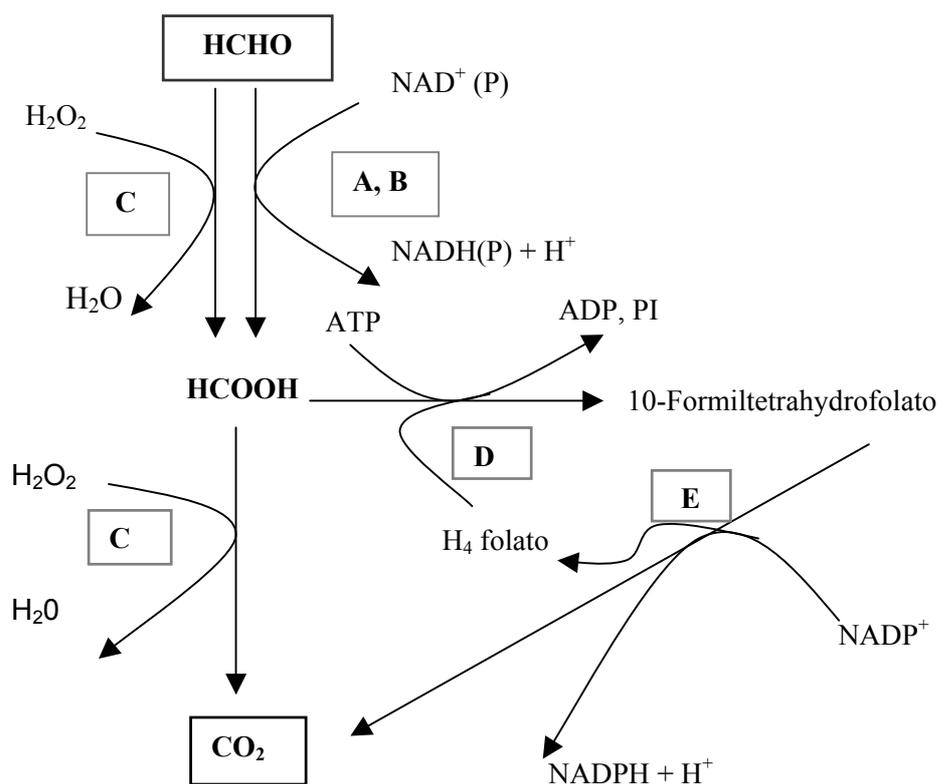
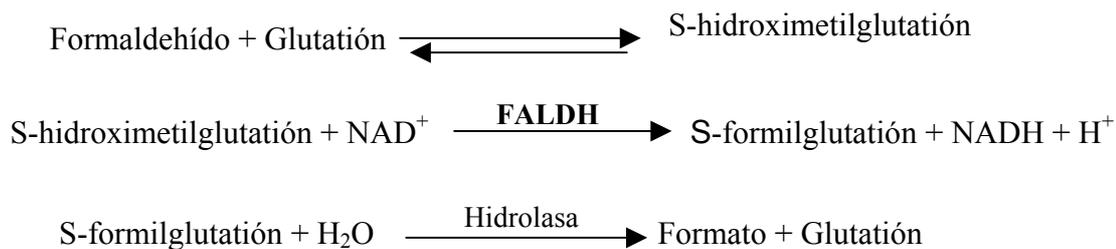


Figura 1. Diferentes vías de biotransformación del formaldehído.

A, formaldehído deshidrogenasa dependiente de glutatión. **B**, aldehído deshidrogenasa. **C**, la catalasa. **D**, 10-formiltetrahydrofolato sintasa. **E**, 10-formiltetrahydrofolato dehidrogenasa. (Waydhas y col., 1978)

2.2.1 Metabolismo del formaldehído por la formaldehído deshidrogenasa dependiente de glutatión.

La conversión de formaldehído a ácido fórmico es catalizada principalmente por la acción de la formaldehído deshidrogenasa dependiente de glutatión (FALDH) y la S-formilglutatión hidrolasa. La reacción espontánea de formaldehído con glutatión (GSH) da lugar al hemiacetal S-hidroximetilglutatión, que en presencia de NAD^+ es oxidado por la FALDH a S-formilglutatión (Uotila y Koivusalo, 1974). El S-formilglutatión es hidrolizado por la S-formilglutatión hidrolasa (EC 3.1.2.12) a formato y glutatión.



Dado el alto contenido en GSH de las células animales, vegetales y de los microorganismos (Meister, 1988), cabe esperar que la mayoría del formaldehído (50-80%) que se genera en la célula esté unido reversiblemente a GSH para formar S-hidroximetilglutación.

2.2.2 Metabolismo del formaldehído vía tetrahidrofolato.

En esta vía, hay conversión de formaldehído a CO₂ a partir de la reacción acoplada a la 10-formiltetrahidrofolato sintasa y la 10-formiltetrahidrofolato deshidrogenasa en el citosol. Mediante la 10-formiltetrahidrofolato sintasa el formato se compleja con tetrahidrofolato para dar lugar a 10-formiltetrahidrofolato, pasando a formar parte del conjunto de compuestos C1, o puede ser oxidado por la 10-formiltetrahidrofolato deshidrogenasa a CO₂ (Figura 1, vías D y E).

En términos cuantitativos, sin embargo, la vía dependiente de tetrahidrofolato sólo tiene un significado mínimo en el metabolismo del formaldehído. En el metabolismo del formato, por lo contrario, dicha vía es cuantitativamente muy importante.

En la célula, la mayoría del formaldehído se estima que está en forma de derivado del glutación, y solo un 1-3% esta unido al tetrahidrofolato en forma de 5,10-metilen-tetrahidrofolato (Heck y Casanova-Schmitz, 1984), a pesar de la importancia de este compuesto en varias vías biosintéticas.

2.2.3 Metabolismo del formaldehído por la catalasa.

Otra vía secundaria para la oxidación del formato es mediante la acción peroxidativa de la catalasa, localizada en los peroxisomas. Sin embargo, la reacción de la catalasa es dependiente de la velocidad de generación de H₂O₂ (Figura 1, vía C) (Waydhas y col, 1978). En algunos microorganismos, principalmente en levaduras metilotróficas, se ha descrito la oxidación del formato mediante una formato deshidrogenasa (Sakai y col., 1997).

2.2.4 Metabolismo del formaldehído por la aldehído deshidrogenasa mitocondrial.

Otra vía secundaria de metabolismo de formaldehído es mediante la aldehído deshidrogenasa mitocondrial (EC 1.2.1.5). La aldehído deshidrogenasa posee una amplia especificidad de sustrato. Entre otros sustratos, es capaz de metabolizar el

formaldehído a ácido fórmico (Cinti y col., 1976; Tamaki y Hama, 1980) según la reacción:



En hepatocitos aislados de rata, se ha descrito que la presencia de inhibidores de la aldehído deshidrogenasa, como la cianamida y el crotonaldehído, reducen la oxidación de formaldehído a CO₂ en un 30-40% aproximadamente (Dicker y Cederbaun, 1986). Estos estudios han sido realizados a altas concentraciones de formaldehído (0,2-1 mM), a las que la aldehído deshidrogenasa podría jugar un papel importante en su oxidación. Sin embargo, a concentraciones fisiológicas, no parece que la aldehído deshidrogenasa pueda contribuir de manera importante en la oxidación del formaldehído a formato.

3. Formaldehído deshidrogenasa dependiente de glutatión (FALDH).

3.1 Generalidades.

La formaldehído deshidrogenasa dependiente de glutatión (EC 1.2.1.1) (FALDH) fue purificada por primera vez por Strittmatter y Ball, quienes en 1955 la obtuvieron del hígado de buey y de pollo. Demostraron que la oxidación de formaldehído hasta formato era catalizada por una enzima que dependía de NAD⁺, y que, al contrario de la aldehído deshidrogenasa inespecífica, dependía de glutatión reducido para su funcionamiento. Durante veinte años no se supo el papel que jugaba el glutatión en esta reacción, hasta que en 1974 Uotila y Koivusalo describieron un nuevo método para purificar más eficazmente dicho enzima, y pudieron caracterizar el producto de la reacción.

Uotila y Koivusalo demostraron, en trabajos posteriores, que las fuentes de donde Strittmatter había purificado dicho enzima contenían una S-formilglutatión hidrolasa que hidroliza S-formilglutatión de forma irreversible para dar lugar a formato y glutatión. Esta muestra había contaminado las muestras de Strittmatter, por lo que este autor había detectado la formación de formato y no de S-formilglutatión, el verdadero producto de la reacción catalizado por la FALDH (Uotila y Koivusalo, 1989). En 1989, se secuenció parcialmente la FALDH de rata y se encontró que la FALDH y la ADHIII previamente secuenciada, eran el mismo enzima (Koivusalo y col., 1989).

La FALDH pertenece a la familia de las alcohol deshidrogenasas de cadena media, que se caracterizan por tener dos subunidades de algo más de 350 residuos de aminoácidos, con estructuras diméricas o tetraméricas y que dependen del zinc para su actividad. Las alcohol deshidrogenasas de cadena media incluyen las alcohol deshidrogenasas de vertebrados con sus clases y isoenzimas, y muchas alcohol deshidrogenasas de levaduras, plantas y bacterias.

3.2 Características cinéticas.

A pesar de tener propiedades físicas comunes con las otras clases de ADH, la ADH clase III presenta importantes características propias:

1. No es saturable con alcoholes y aldehídos primarios de cadena corta, frente a los que presenta baja actividad, por lo que su participación en el metabolismo de etanol *in vivo* es muy baja.
2. Es prácticamente insensible a la inhibición por 4-metilpirazol.
3. Se ha detectado en la mayoría de los tejidos de todos los vertebrados e invertebrados, y en todos los estados de desarrollo analizados.
4. Presenta actividad formaldehído deshidrogenasa dependiente de glutatión.

En cuanto a la especificidad de sustrato, además de la actividad formaldehído deshidrogenasa dependiente de glutatión, Holmquist y Vallee (1991) encontraron que, en conjunción con el formaldehído, otros tioles como el 8-tiooctanoato y el 6-tiohexanoato, son tan activos como el glutatión con la FALDH humana. Además de esta actividad formaldehído deshidrogenasa, la FALDH cataliza eficientemente la oxidación de alcoholes primarios de cadena larga como el ácido 12-hidroxidodecanoico (Wargner y col., 1984; Moulis y col., 1991). Es de destacar que aniones hidrofóbicos como los carboxilatos de cadena corta (pentanoato, octanoato) facilitan la unión de etanol y otros sustratos de cadena corta a la ADHIII, de forma que la actividad aumenta hasta 30 veces (Moulis y col., 1991).

Inicialmente se describió que la FALDH era absolutamente específica para el cofactor NAD^+ , pero la FALDH aislada a partir de hígado humano podía también utilizar NADP^+ bajo condiciones específicas, aunque este resultado probablemente no tiene significado fisiológico (Uotila y Koivusalo, 1974).

Recientemente, se ha demostrado que la FALDH es capaz de metabolizar el ácido nítrico, previa combinación con el glutatión, usando NADH o NADPH como cofactor (Jensen y Belka, 1997; Jensen y col., 1998; Liu y col., 2001), comportándose como una GSNO reductasa.

3.3 Relaciones evolutivas en el sistema ADH.

Actualmente se conoce la secuencia de aminoácidos de la FALDH de distintas especies, bien directamente a partir de la proteína, o bien a través de la secuencia del cDNA. Esta información, junto con la de las secuencias de otras clases de ADH, tanto humana como de otras especies, ha permitido ir perfilando las relaciones evolutivas entre ellas.

Los resultados obtenidos sugieren que la FALDH es la línea original ancestral a partir de la cual se habrían ido originando las otras clases mediante duplicaciones génicas.

En concreto, el origen común de la clase I, la clásica alcohol deshidrogenasa de hígado, y la FALDH (clase III) de vertebrados ha sido confirmado tras la elucidación de la estructura de la ADH clase I de bacalao. La ADH clase I de bacalao mostraba una naturaleza híbrida: funcionalmente era similar a una ADH clase I, con actividad etanol deshidrogenasa, y estructuralmente era más cercana a la FALDH (Danielsson y col., 1992). Sin embargo, a partir de estos resultados no quedaba claro cuál de las dos clases ADH era la ancestral. La identificación de la FALDH de bacalao (Danielsson y col., 1996) y el hecho de que la FALDH es el único representante de ADHs en cefalópodos (Fernández y col., 1993; Kaiser y col., 1993;) y en ciclóstomos, el vertebrado más antiguo que existe (Danielsson y col., 1994a), así como la ubicuidad tisular, la expresión constitutiva, y la existencia de esta clase en prácticamente todas las formas de vida estudiadas, apoyan la hipótesis de que la FALDH es la más ancestral de todas la ADHs (Uotila y Koivusalo, 1974; Uotila y Koivusalo, 1989; Julia y col., 1987; Boleda y col., 1989; Keller y col., 1990; Estonius y col., 1993).

La FALDH ha sido encontrada en plantas (Uotila y Koivusalo, 1979; Martínez y col., 1996; Dolferus y col., 1997), insectos (Luque y col., 1994), organismos invertebrados (Fernández y col., 1993), levaduras (Whener y col., 1993; Fernández y col., 1996), y en procariontes (Gutheil y col., 1992; Ras y col., 1994; Barber y col., 1996).

Todo parece indicar que la función inicial del sistema ADH está ligado a la actividad formaldehído deshidrogenasa dependiente de glutatión, hecho que relaciona estos

enzimas con los mecanismos de defensa celular comunes a muchas formas de vida. Sin embargo, las repetidas duplicaciones génicas y divergencias evolutivas han originado funciones metabólicas adicionales, relacionadas o no con mecanismos de defensa, que implican a estos enzimas en el metabolismo de etanol, esteroides, retinoides, ω -hidroxiácidos grasos, compuestos derivados de la peroxidación lipídica (Yin y col., 1991; Kedishvili y col., 1994).

Hay que destacar la gran conservación de este enzima a lo largo de la evolución, con aproximadamente un 5% de diferencias observables por 100 millones de años entre la FALDH de bacalao y humano. Por ejemplo, sólo se observa un 26% de diferencia en la secuencia de aminoácidos de pulpo y la del hombre (Farrés, 1985) y un 30% de diferencia entre la de *Drosophila* y la del hombre. Hay que tener en cuenta que esta evolución lenta se da incluso en las mutaciones silenciosas (Frezza y col., 1990), que no están sometidas a restricciones evolutivas. La FALDH se considera una enzima antigua derivada de tiempos anteriores a la divergencia procariota/eucariota, que se estima ocurrió hace 1800 millones de años.

3.4 Localización subcelular de la FALDH.

Está ampliamente aceptado que las diferentes clases de alcohol deshidrogenasas se encuentran localizadas en el citoplasma celular. De hecho la ADHI se ha venido empleando durante mucho tiempo como marcador citosólico en los experimentos de fraccionamiento subcelular. La FALDH también se ha considerado hasta muy recientemente un enzima exclusivamente citosólico (Uotila y Koivusalo, 1974; Parés y col., 1984; Farrés y col., 1988; Uotila y Koivusalo, 1989), aunque en algunos casos se ha encontrado una pequeña cantidad asociada al núcleo (en torno al 2%). En otros trabajos, empleando técnicas histoquímicas, se ha demostrado que la mayoría de la actividad se localizaba en el citoplasma de las células neurales de los hepatocitos. Keller y colaboradores (1990) describen una localización de la FALDH en núcleos de diversos tipos celulares del epitelio olfativo (Keller y col., 1990). En 1992, se demostró por primera vez que la localización de la FALDH no sólo es citoplasmática como en el resto de las ADHs, sino que también se encuentra en el núcleo de hepatocitos y astrocitos de rata (Iborra y col., 1992). Una de las funciones de esta enzima podría ser la protección

de las estructuras celulares, inclusive la cromatina, frente al formaldehído que se produce de manera endógena en varios procesos metabólicos.

3.5 Regulación génica de la FALDH.

La caracterización del gen *ADH5* (Kaiser y col., 1988) que codifica por la ADH clase III humana, ha permitido el inicio de los estudios de regulación génica. El gen *ADH5* difiere radicalmente de los genes de las otras ADHs. Su región 5' es muy rica en CG y carece de caja TATA, lo cual es consistente con su expresión constitutiva en todos los tejidos. Tampoco tiene caja CAAT ni ninguna de las regiones consenso habituales de los genes de las otras clases. En contraposición, tiene regiones de unión a factores de transcripción típicos para la activación de genes que se expresan de una manera dependiente del tejido, tales como el factor de transcripción específico de hígado LF-A1, el factor de transcripción específico de los eritrocitos NF-E1 y el factor de transcripción específico de células linfáticas y del sistema nervioso NF-A2 (Hur y Edenberg, 1992; Faisst y col., 1992). Esto es coherente con el hecho de que, a pesar de la expresión ubícuca de la FALDH, existan distintos niveles de FALDH en los tejidos. También se han encontrado regiones reguladoras en el extremo 5' del gen *ADH5* que actúan como reguladores positivos en una línea celular, y como reguladores negativos en otra (Hur y Edenberg, 1995).

Se ha observado también la presencia de un pseudogen procesado (sin intrones) de la alcohol deshidrogenasa de la clase III humana (Kaiser y col., 1988; Kaiser y col., 1991), hecho que puede explicar los indicios que apuntaban a la existencia de más de un gen que codifica por esta clase.

En plantas, la expresión de la FALDH también parece ser ubícuca en todos los tejidos, y no parece estar afectada por algunos tratamientos de estrés (Martínez y col., 1996; Dolferus y col., 1997; Fliegmann y Sandermann, 1997).

3.6 Estudios de mutagénesis dirigida sobre la FALDH.

Los estudios de mutagénesis dirigida han permitido la identificación de los residuos de aminoácidos implicados en la estructura, el plegamiento y la actividad catalítica de diversos enzimas. En la FALDH, se han estudiado por mutagénesis dirigida varios residuos muy conservados en diferentes especies, que parecen estar directamente

relacionados con las propiedades características de este enzima y que lo distinguen del resto de clases de la familia de las ADHs (Figura 2).

- El cambio de la Tyr93 de la FALDH a Phe93 [Y93F] presente en la ADH clase I, provoca una disminución de los valores de k_{cat} para todos los sustratos en general, y una mayor sensibilidad a 4-metilpirazol, un inhibidor potente de los enzimas ADH clase I (Estonius y col., 1994).

- El Asp57 parece estar implicado en la unión del S-hidroximetilglutación. El mutante [D57L] incrementa la K_m para el S-hidroximetilglutación unos 150 veces (Estonius y col., 1994).

- El papel del residuo Arg115 en la unión del S-hidroximetilglutación y la activación por ácidos grasos ha sido estudiado con dos mutantes de la FALDH, el mutante [R115D] (arginina reemplazada por ácido aspártico) y el mutante [R115A] (arginina reemplazada por alanina). Las mutaciones [R115D] y [R115A] alteran la especificidad de sustrato, ya que provocan un aumento de la K_m para sustratos aniónicos como el S-hidroximetilglutación y el ácido 12-hidroxidodecanoico, sin afectar a los parámetros cinéticos con respecto a alcoholes neutros como el etanol y el octanol. Además, la sustitución de la Arg115 por Ala o Asp disminuye o elimina, respectivamente, la activación por ácidos grasos de la oxidación de alcoholes de cadena corta (Engeland y col., 1993).

- La mutagénesis del residuo Thr48 [T48A] da lugar a un enzima prácticamente inactivo respecto a alcoholes primarios y secundarios, pero preserva la actividad FALDH (Estonius y col., 1994)

- En levadura, el doble mutante [D267E, T269I] provoca un descenso de aproximadamente 10 veces en el valor de K_m para el S-hidroximetilglutación y en la velocidad catalítica (Fernández y col., 1999).

		Residuos de interacción con el sustrato													
		48	67	93	140	141		57	115	116	294	318	110	306	309
<i>Arabidopsis</i>		T	H	Y	F	M		D	R	S	V	A	L	F	V
<i>Guisante</i>		T	H	Y	F	M		D	R	A	V	A	L	F	V
Humano		T	H	Y	Y	M		D	R	V	V	A	L	F	V

		Residuos de interacción con el coenzima										
		47	48	51	178	203	223	224	228	269	271	369
<i>Arabidopsis</i>		H	T	Y	T	V	D	I	K	I	N	R
<i>Guisante</i>		H	T	Y	T	V	D	I	K	L	N	R
Humano		H	T	Y	T	V	D	I	K	I	N	R

Figura 2. Algunos residuos funcionales importantes de la FALDH (Martínez y col., 1996).

4. Otras alcohol deshidrogenasas de plantas.

En plantas, la mayoría de las alcohol deshidrogenasas de cadena media que se han caracterizado pertenecen a 3 familias principales: la clásica alcohol deshidrogenasa clase I activa con etanol (EC 1.1.1.1), la cinamil alcohol deshidrogenasa NADP⁺ dependiente (EC 1.1.1.195) y la formaldehído deshidrogenasa dependiente de glutatión (EC 1.2.1.1). Otras alcohol deshidrogenasas estudiadas en plantas son la benzil alcohol deshidrogenasa NADP dependiente (Somssich y col., 1996), y algunas alcohol deshidrogenasas de cadena corta (250 residuos) cuya función no se sabe todavía (Theodore Chase, 1999).

Tabla 2. Alcohol deshidrogenasas de plantas.

Clase	Gen	EC No
Alcohol deshidrogenasa activa con etanol (clase P)	<i>adh1</i>	1.1.1.1
Formaldehído deshidrogenasa dependiente de glutatión	<i>adh2</i>	1.2.1.1
Cinamil alcohol deshidrogenasa 2	<i>cad2</i>	1.1.1.195
Cinamil deshidrogenasa (monomérica)	<i>cad1</i>	1.1.1.195
Benzil deshidrogenasa	<i>bad1</i>	1.1.1.91

4.1 Alcohol deshidrogenasa activa con etanol (clase P).

La alcohol deshidrogenasa clase P corresponde a la clásica alcohol deshidrogenasa clase I de animales activa con etanol. La clase P, a pesar de ser funcionalmente similar a la ADH I de vertebrados, presenta mayor similitud estructural con la FALDH que con la ADH clase I. En concreto, la ADH clase P tiene una Tyr en la posición 51 igual que la clase III humana, mientras que esta posición es His en la mayoría de las ADHs clase I de vertebrados. La posición 48 en clase P es Thr, igual que en todas las ADHs clase III, mientras que las ADHs clase I presentan una Ser en esta posición. El residuo Arg 115, uno de los residuos más importantes y característicos de las FALDH, implicado en la unión con el sustrato S-hidroximetilglutación, está también conservado en la alcohol deshidrogenasa clase P. La clase P presenta más similitud en los residuos más importantes con la ADH clase III que con la ADH clase I, tal y como se demuestra en la figura 4. Este hecho sugiere que la clase I de vertebrados y la clase P de plantas procederían de duplicaciones independientes a partir de una FALDH ancestral (Shafquat y col., 1996; Martínez y col., 1996; Fliegmann y Sanderman, 1997; Dolferus y col., 1997).

	Residuos de interacción de sustrato													Residuos de interacción de coenzima										
	48	67	93	140	141	57	115	116	294	318	110	306	309	47	48	51	178	203	223	224	228	269	271	369
Guisante P	T	H	F	F	V	G	R	I	V	F	M	M	L	H	T	Y	T	V	D	L	R	T	S	R
Humano I	S	H	F	F	V	L	D	L	V	I	Y	M	L	R	S	H	T	V	D	I	K	I	R	R
Guisante III	T	H	Y	F	M	D	R	A	V	A	L	F	V	H	T	Y	T	V	D	I	K	L	N	R
Humano III	T	H	Y	Y	M	D	R	V	V	A	L	F	V	H	T	Y	T	V	D	I	K	I	N	R
Arabidopsis III	T	H	Y	Y	M	D	R	S	V	A	L	F	V	H	T	Y	T	V	D	I	K	I	N	R

Figura 3. Comparación de los residuos funcionales más importantes entre las clases P/I (arriba) y clase III (abajo) en *Pea* y humano y *Arabidopsis* respectivamente.

4.2 Cinamil alcohol deshidrogenasa.

Dos isoenzimas con actividad cinamil alcohol deshidrogenasa han sido caracterizadas. La *CAD1*, que es un monómero de 35 kDa, es activo con cinnamilaldehído y sobre todo con coniferaldehído, para el que presenta una K_m de 25-70 μM . Tiene un papel importante en la lignificación vascular en plantas. La *CAD2*, a diferencia de la *CAD1*, es un dímero de 72 kDa, activo con varios cinnamilaldehídos. Su mejor sustrato es el coniferaldehído, con una K_m bastante más baja que la de la *CAD1* (1 μM). Recientemente se ha clonado y secuenciado el cDNA correspondiente a la *CAD1* (Goffner y col., 1998), demostrándose que está relacionada con la cinnamil-CoA reductasa. También, tiene actividad con el benzilaldehído, considerándose como “una nueva alcohol deshidrogenasa aromática”.

4.3 Benzil alcohol deshidrogenasa.

Se han identificado algunos enzimas de la familia de las alcohol deshidrogenasas que utilizan sustratos aromáticos y son NADP-dependientes, como la benzil alcohol deshidrogenasa (EC 1.1.1.91) y la geraniol deshidrogenasa. En *Arabidopsis*, se ha demostrado que la benzil alcohol deshidrogenasa es una proteína de defensa que se induce como respuesta frente a ataque por patógenos (Somssich y col., 1996).

5. S-Nitrosoglutatión, un nuevo sustrato de la FALDH.

El NO es una molécula inestable y potencialmente tóxica, debido en parte a la alta reactividad de su electrón desapareado (Gow y col., 1997). Como radical libre, reacciona con especies que contienen electrones desapareados como el oxígeno, iones superóxido (O_2^-) y metales, dando lugar a otras especies reactivas. El NO puede reaccionar con el anión súperoxido dando lugar al peroxinitrito.

Sin embargo, algunos compuestos intracelulares, como el antioxidante glutatión, protegen a las células del ataque citotóxico por NO. Así, se ha visto que las células microgliales se protegen del estrés oxidativo y nitrosativo generado por la óxido nítrico sintasa (NOS), aumentando los niveles basales de glutatión (Chatterjee y col., 2000). El glutatión (GSH) es un antioxidante importante en la detoxificación de especies reactivas del oxígeno. En las células microgliales de rata y en neutrófilos humanos, se ha descrito que la inducción de la síntesis de óxido nítrico reduce drásticamente el contenido de

glutación intracelular, y paralelamente se produce un incremento en la cantidad de S-nitrosoglutación (GSNO) (Clancy y col., 1994; Chatterjee y col., 2000).

Recientemente se ha descrito que la alcohol deshidrogenasa dependiente de glutación (FALDH) de rata (Jensen y col., 1998), levadura, *E. coli* (Liu y col., 2001), humano (Hedberg y col., 2001) y de *Arabidopsis* (Atsushi y col., 2002) es capaz de catalizar eficientemente la degradación de GSNO de forma dependiente de NADH/NADPH.

En plantas, hay bastantes evidencias de que el NO juega un papel fundamental en la cascada de transducción de señales que activa genes de defensa, y parece ser esencial para la resistencia de hipersensibilidad (HR) inducida por patógenos (Wendehenne y col., 2001; Delledonne y col., 1998). Además, se ha demostrado que el NO participa en la activación de diferentes genes relacionados con la defensa, como los que codifican para la PAL (phenilalanina ammonioliasa), la GST (glutación S-transferasa) y la PR-1 (Klessig y col., 2000; Durner y col., 1998). En plantas, el NO, junto con otras especies reactivas del oxígeno (ROS), estimula la acumulación de ácido salicílico (SA). El SA juega un papel fundamental en la resistencia a las enfermedades en las plantas (Klessig y col., 1994; Hung y col., 1996).

Hasta ahora, el papel principal de la FALDH se había considerado que era la eliminación de formaldehído. A partir de los últimos descubrimientos, se puede postular que la FALDH podría jugar un papel importante frente a los efectos citotóxicos del NO. Dado que parece ser que el NO es capaz de disminuir los niveles de glutación, dando lugar a altos niveles de GSNO, la FALDH podría participar en la eliminación de dicho GSNO y regeneración del glutación intracelular, protegiendo así a la célula de los efectos tóxicos del NO.

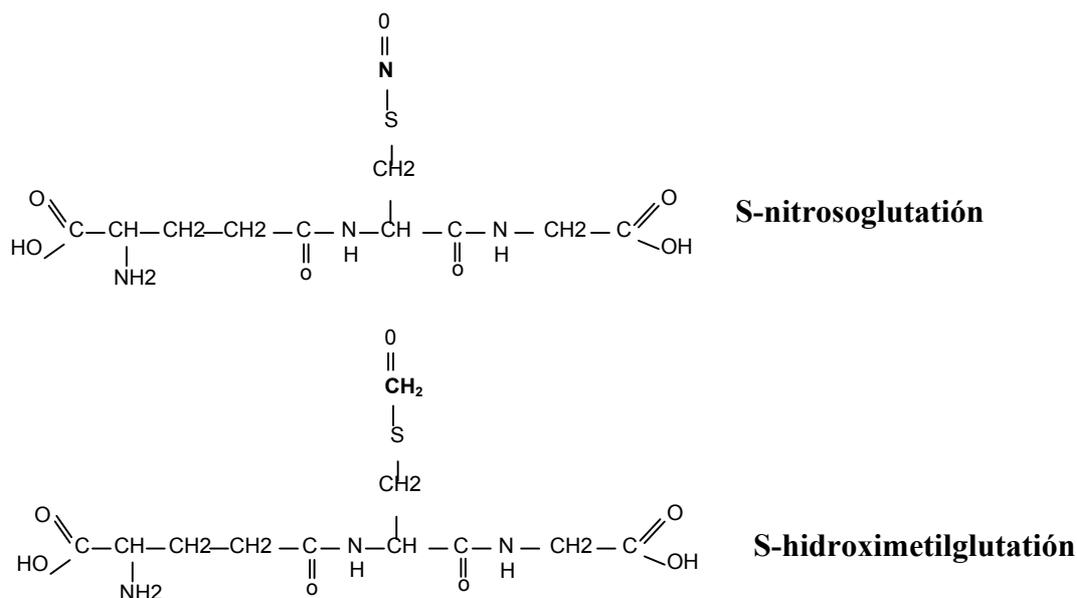


Figura 4. Similitud entre los dos principales sustratos de la FALDH, S-formilglutatión y GSNO.

II. Ciclo de división celular de plantas.

1. Generalidades.

De una manera general, el ciclo celular se define como el periodo comprendido entre dos divisiones celulares, y engloba el conjunto de procesos que permiten de forma controlada la replicación del genoma y la segregación de los cromosomas en dos núcleos hermanos, que se termina con la citocinesis.

El ciclo celular se divide fundamentalmente en dos partes, la interfase y la mitosis. La interfase comprende procesos que ocurren de forma discontinua, como la replicación de ADN, durante el periodo conocido como fase **S** (fase de síntesis), el intervalo que transcurre entre el final de la mitosis del ciclo anterior y el comienzo de la síntesis de ADN conocido como fase **G1**, y finalmente el intervalo entre el final de la fase S y la mitosis, **G2**. En la mitosis, se lleva a cabo la segregación de los cromosomas y la formación de las dos células hijas.

A lo largo del ciclo celular existen dos puntos de control llamados checkpoints. El checkpoint G1/S, tiene como papel asegurar que la maquinaria celular esta a punto para la replicación del genoma durante la fase S. El checkpoints G2/M se encarga de comprobar que el DNA se ha replicado correctamente para permitir el paso a mitosis.

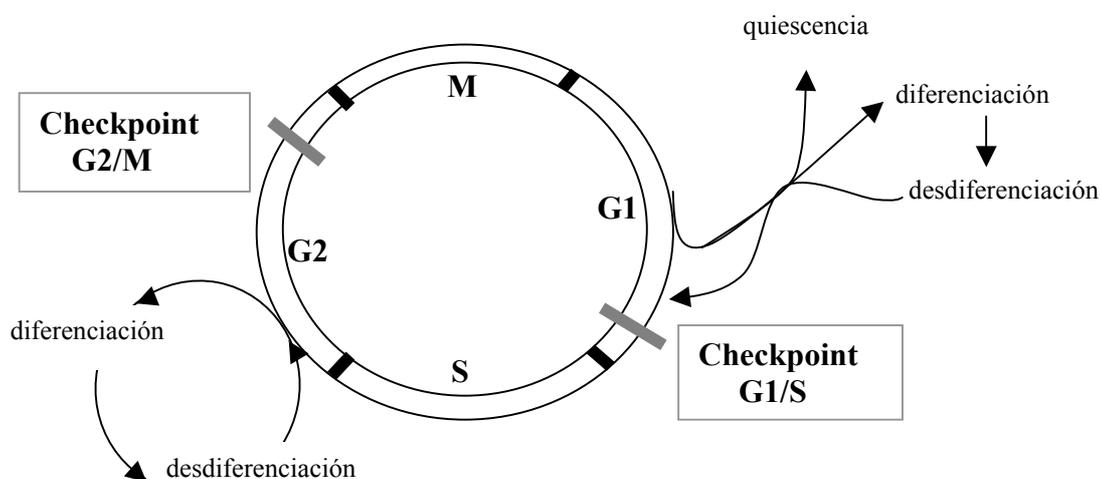


Figura 5. Representación de las diferentes etapas del ciclo celular.

2. El citoesqueleto en plantas durante la mitosis y la citocinesis.

2.1 Generalidades.

El citoesqueleto es una red de fibras proteicas con estructura tubular y filamentosa. Está formado por 3 principales familias de proteínas que al polimerizar forman redes de filamentos interconectados: los microfilamentos (MF), los microtubulos (MT) y los filamentos intermedios (FI). Se postula que los FI son los más rígidos, lo que sugiere una función más estructural que de movimiento, mientras que los MT y los MF tienen funciones estructurales y dinámicas.

El citoesqueleto de las plantas ha sido menos estudiado que el de las células animales, y en muchos casos se ha asumido que su organización y funcionamiento es similar al de éstas. Sin embargo, en el citoesqueleto de plantas se han desarrollado algunas funciones distintas de las de animales, como se señala más adelante.

El citoesqueleto tiene un papel fundamental en la mitosis, que es la etapa del ciclo celular en donde los cromosomas duplicados se separan físicamente y forman dos nuevos núcleos, y en la citocinesis, durante la partición de una célula en dos. Ambos procesos son llevados a cabo por elementos del citoesqueleto y existen diferencias

importantes entre las células animales y las de plantas. A continuación se señalan los hechos diferenciales más importantes entre las células animales y vegetales:

1) El huso mitótico de plantas y animales se organiza de forma diferente. Las plantas no tienen centrosomas, y el huso mitótico, que consiste en cientos de microtubulos y de proteínas que se asocian a éstos, tiene varios polos. En la profase, los cromosomas se condensan y los microtubulos corticales forman “la banda de la preprofase”, que es característica de las células vegetales. Esta banda marca el sitio donde se formará la nueva pared celular en la citocinesis. En la metafase desaparece la banda de la preprofase y se empieza a organizar el huso mitótico. En la telofase, la envoltura nuclear vuelve a formarse, se descondensan los cromosomas, el huso mitótico se deshace y se forma el fragmoplasto, o nueva pared celular.

2) En células animales el citoplasma se divide mediante un estrangulamiento. En el caso más típico se forma un surco de segmentación en el ecuador de la célula madre. En el interior del surco se forma un anillo contráctil de filamentos de actina y miosina, que se va estrechando y termina por separar las dos células hijas.

En cambio, en las células vegetales, la pared celular impide la formación del surco de estrangulamiento. En este caso, una serie de vesículas derivadas del complejo de Golgi, se van acumulando en el ecuador de la célula. Estas vesículas se van fusionando hasta formar una nueva pared celular o fragmoplasto, formada por filamentos de actina y miosina.

La figura 6 muestra un esquema de la mitosis y la división celular en plantas, donde solo se destacan las fases de la mitosis y de la citocinesis que son diferentes con respecto a las de células animales.

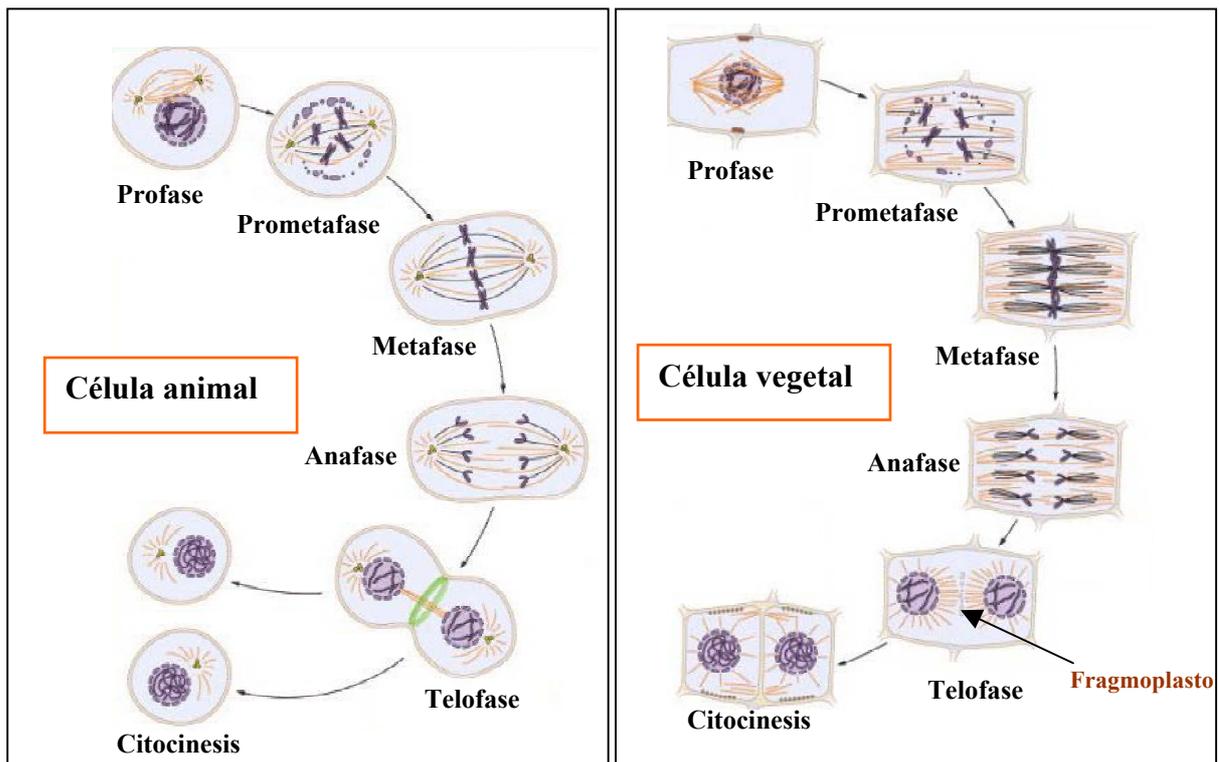


Figura 6. Diferencias más importante entre las células animales y vegetales durante la división celular.

3. Utilización de líneas celulares de plantas en los estudios del ciclo celular. Sincronización celular.

En el estudio de procesos biológicos complejos, como la proliferación celular, hacen falta sistemas experimentales que permitan la observación de las diferentes reacciones obtenidas en respuesta a la aplicación de estímulos físico-químicos externos. Para una interpretación correcta de estas respuestas, es imprescindible el cumplimiento de dos requisitos: en primer lugar, que el sistema experimental esté aislado de cualquier factor externo que pueda alterar su comportamiento mas allá del estímulo, y en segundo lugar, que la población de células sea el máximo de homogénea posible, para evitar posibles respuestas condicionadas por las características propias de cada tipo celular.

Para el estudio del ciclo celular de las plantas, es necesario poder identificar y situar en el tiempo los procesos bioquímicos que puedan tener lugar. Ante la inviabilidad de utilizar organismos vegetales enteros, es conveniente la utilización de cultivos celulares sincronizables.

Los métodos de sincronización más eficaces se basan en el bloqueo del ciclo celular en una fase concreta del ciclo, mediante la incubación de la suspensión celular con diversos compuestos químicos o drogas, que inhiben etapas claves para la regulación del ciclo celular. La incubación de una suspensión celular con una de estas drogas provoca una acumulación de las células en la etapa del ciclo anterior al punto del bloqueo. Una vez eliminada la droga del medio, teniendo en cuenta que su efecto tiene que ser reversible, las células reemprenden la división, pero de una manera sincronizada.

Las drogas más frecuentemente utilizadas en los sistemas vegetales, por su capacidad de proporcionar porcentajes de sincronización elevados, pueden agruparse en:

- Compuestos que bloquean enzimas específicas de la fase S del ciclo o etapas de transición (G1/S, inicio de la fase S, S tardía):

(i) afidilcolina, que inhibe la DNA polimerasa α (Ikegami, 1978).

(ii) hidroxiaurea, que inhibe la ribonucleótido reductasa (Slater, 1973).

- Compuestos que bloquean enzimas que actúan durante la mitosis, implicadas en la polimerización de los microtubulos, y que causan sus efectos entre la profase y la metafase:

(i) ácido okadaico (Hasezawa, 1992).

(ii) propizamida (Nagata, 1992).

La evaluación de la sincronización de una suspensión celular se hace mediante dos parámetros:

1) La incorporación de timidina tritiada en el DNA, que permite evaluar la replicación del DNA, y por lo tanto calcular el porcentaje de células en fase S.

2) Por cuantificación del índice mitótico, mediante tinción de las células con un colorante específico para los ácidos nucleicos.

Alternativamente, se puede aplicar la citometría de flujo como un método para determinar las proporciones relativas de células en G1, S ó G2, a intervalos periódicos durante el ciclo celular.

La sincronización de suspensiones celulares de plantas ha sido aplicada en diferentes especies, como *Carantheus rosaceus*, *Arabidopsis*, arroz y tabaco. El mejor resultado en relación con el grado de sincronización y la reproducibilidad experimental se ha obtenido con la línea celular BY2 (Bright-Yellow-2) de tabaco (Nagata, 1992).

3.1 Línea celular de tabaco BY2.

La línea celular BY2 fue establecida a partir de células de mesófilo de hoja, de la especie *Nicotiana tabacum* L. Cv. Bright Yellow 2, en el Instituto Central de Investigaciones de tabaco de Japón y de la Corporación de Salud Pública (Kato y col., 1972). Se caracteriza por tener una velocidad de crecimiento elevada, con un tiempo de generación de una 13 horas (tiempo que separa dos mitosis). La curva de crecimiento es de 7 días, al final de la cual se obtiene una saturación del cultivo (Figura 7).

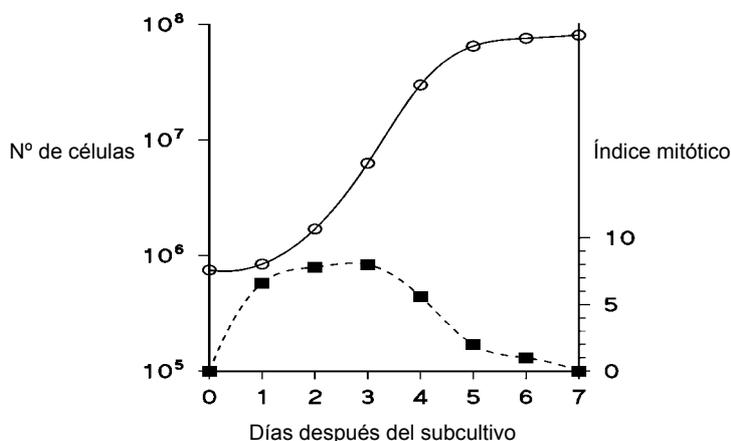


Figura 7. Curva de crecimiento e índice mitótico de las células BY2. (Espunya y col., 1999).

Cuando las células BY2 se dividen, se forman filamentos unicapa de hasta 20 células. La dilución del cultivo saturado en medio de cultivo fresco fragmenta espontáneamente los filamentos en porciones de 2 a 4 células (Figura 8).

El método más común utilizado para la sincronización de las células BY2 es el bloqueo de la replicación del DNA al inicio de la fase S, mediante afidilcolina. Con este método se pueden obtener porcentajes de sincronización del 40-50%. Es posible obtener niveles de sincronización más altos, del orden de 80-90%, mediante la combinación de dos drogas, la propizamida y la afidilcolina, de tal manera que la incubación con propizamida de un cultivo celular previamente sincronizado con afidilcolina provoca un bloqueo de las células en prometafase (para una revisión sobre el mantenimiento de la línea BY2 y la metodología de sincronización, consultar (Combettes y col., 1999; Nagata y col., 1999)).

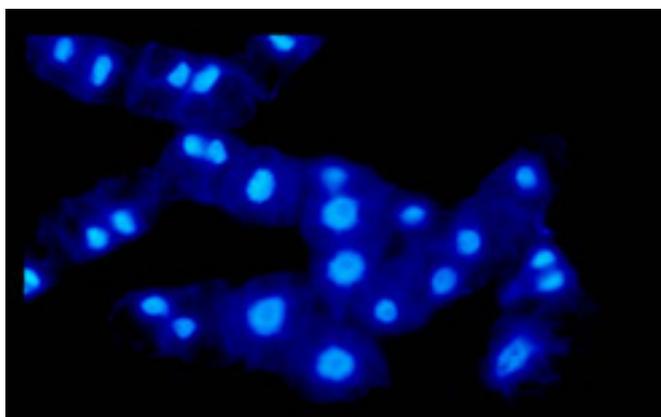


Figura 8. Células de tabaco BY2 teñidas con DAPI.

Actualmente la línea celular BY2, es un sistema modelo muy utilizado en estudios de Biología Molecular y Celular de plantas. La congelación de células como método de preservación a largo plazo aún no ha sido puesta a punto para células vegetales. Por esta razón, la suspensión celular BY2 debe mantenerse continuamente en cultivo.

4. *Arabidopsis thaliana* como planta modelo.

Arabidopsis thaliana es una planta de la familia Cruciferae (Figura 9), que ofrece muchas ventajas como modelo experimental para la genética molecular de plantas (Redel, 1975). A lo largo de la década de los 80, esta pequeña planta cosmopolita, sin ningún interés aparente, vino a convertirse en la estrella de los genetistas moleculares, precisamente por tener algunas propiedades de las que el tabaco carecía (Meyerowitz,

1989). Esta hierba crece rápidamente bajo una amplia gama de condiciones de cultivo, pudiendo completar su ciclo en solo 5 o 6 semanas, y su tamaño es tan pequeño que pueden cultivarse varios individuos en un área de 1cm². Una planta desarrolla unas 10 flores, que son bisexuales y cada silicua contiene entre 30 y 60 diminutas semillas. Se pueden obtener del orden de 10000 semillas de un solo individuo. La planta adulta puede llegar a medir 20 o 30 cm.



Figura 9. Planta de *Arabidopsis thaliana*.

Arabidopsis puede transformarse muy fácilmente por las técnicas más sencillas de transformación genética. Tiene un genoma relativamente pequeño, entre 70000 y 100000 kilopares de bases, de las que solo 18000 Kpb corresponden a secuencias de DNA repetitivo. Su genoma está organizado en 5 cromosomas, y ha sido completamente secuenciado.

Por las razones expuestas, *Arabidopsis thaliana* es actualmente la planta modelo por excelencia para realizar estudios de genética y biología molecular.

Con el objetivo general de estudiar la formaldehído deshidrogenasa dependiente de glutatión (FALDH) de *Arabidopsis thaliana* se plantearon los siguientes objetivos parciales:

- 1- Purificación y caracterización, fisicoquímica y cinética, de la FALDH de *Arabidopsis thaliana*.
- 2- Expresión del gen de *A. thaliana* en *S. cerevisiae* y estudio de su capacidad de complementación de una mutación por delección del gen *SFA1* (gen que codifica por la FALDH de *S. cerevisiae*).
- 3- Producción de un anticuerpo policlonal anti-FALDH de *A. thaliana* a partir de la proteína expresada en *S. cerevisiae* y purificada.
- 4- Estudio de la resistencia al formaldehído de cepas de *S. cerevisiae* que sobreexpresan la FALDH de *A. thaliana*
- 5- Obtención de plantas transgénicas que sobreexpresan la FALDH de *A. thaliana*, y estudio de su resistencia al formaldehído exógeno.
- 6- Estudio de la localización subcelular de la FALDH en células de tabaco.

1. Reactivos.

1.1 Reactivos de análisis de proteínas.

- Amicon División, W. R. Grace & Co. (Danvers, MA, EE.UU): concentradores para ultracentrifugación, y membrana de Diaflo PM .
- Bio-Rad Laboratories (Richmond, CA, EE.UU): SDS, TEMED, acrilamida, bis-acrilamida, Tris para electroforesis, reactivo de Bradford, Immun-Start Substrate, y Hydroxyapatite Biogel HT.
- Carlo-Erba (Milán, Italia): Nitrato de plata.
- Merck (Darmstadt, Alemania): paraformaldehído, etanol, metanol, isopropanol, glicerol, otros reactivos y tampones.
- Millipore Corporation, Waters Chromatography División (MA, EE.UU): Protein-pack Q8 HR, membrana para filtración de tampones de 0,22 μm tipo GVWP.
- Pharmacia Fine Chemicals (Uppsala, Suecia): DEAE-Sepharose CL-6B, Blue-Sepharose CL-6B, columnas PD10 y PhastGel IEF 3-9.
- Shleicher & Schuell GmbH (Dassel, Alemania): membrana para transferencia de proteínas " Selex 20, polypropylen".
- Serva (Heidelberg, alemania): anfolinas Servalyte.
- Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EE.UU): NAD^+ (grade III y grade AA-1), NADH (grade III), PMS, NBT, ácido pirúvico, DTT, ácido 10-hidroxidecanoico, ácido 12-hidroxidodecanoico, octanal, glutatión, 4-metilpirazol, Trizma Base (Tris), EDTA, BSA, Almidon
- para electroforesis, BCIP, bolas de vidrio de 0,5 mm de diámetro para la rotura de levaduras.

1.2. Reactivos de Biología Molecular.

- Amersham Ibérica, S.A. (Madrid, España): $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ y película para autorradiografía Hyperfilm-MP.
- Boehringer-Mannheim GmbH (Mannheim, Alemania): Tris, glicina, agarosa, bromuro de etidio, fosfatasa alcalina de intestino de ternera, RNAsa A, T4 DNA ligasa, fragmento de Klenow de la DNA polimerasa I, Quick SpinTM Columns Sephadex® G50 Fine, patrones de peso molecular de DNA, y la mayoría de enzimas de restricción.

- Difco laboratories (Detroit, MI, EE.UU): peptona, triptofano, extracto de levadura, agar, base de nitrógeno de levadura sin aminoácidos y con sulfato amónico.
- ICN Biomedicals, Inc. (CA, EE. UU): zimoliasa-100T de *Arthrobacter luteus*.
- CodaK-Pathé (Paris, Francia): revelador para radiografías LX 24 y fijador para radiografías AL 4.
- Promega Corporation (Madison, WI, EE.UU), Pharmacia Biotech: algunas enzimas de restricción.
- Qiagen GMBH (Hilden, Alemania): columnas para midipreparaciones y maxipreparaciones de DNA (Plasmid Maxi Kit).
- Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, EE.UU): glucosa, acetato de litio, aminoácidos. Adenina hemisulfato, uracilo, polietilenglicol (PEG) 3350, acetato potásico, EDTA, formaldehído, formamida .
- United States Biological (Swampscott, MA, USA): Base de nitrógeno de levadura sin aminácidos y con sulfato amónico (Medio Wickerham).

1.3. Reactivos de cultivos de plantas.

- Duchefa Biochemie BV (Netherlands): MS (Murashige & Skoog Salt Mixture), ácido nicotínico, piridoxina, sacarosa.
- Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EE.UU): 1-Cloro-2,4-dihidro-benzeno (2,4 D), mioinositol, tiamina, KH_2PO_4 .

2. Material biológico.

2.1 Material biológico vegetal.

- *Arabidopsis thaliana* (ecotipo Columbia)
- Línea celular T87-C3 de *Arabidopsis thaliana* (Axelos y col., 1992).
- Línea celular de *Nicotna tabacum* L. Cv. Bright Yellow 2 (BY2) (Ngata y col., 1992)

2.2 Cepas de *E. coli*.

- **DH51 α** (supE44 Δ lacU169 (ϕ 80lacZ Δ M15) hsdR17 recA1 endA1gyrA96 thi-1relA1), deficiente en recombinación. Permite, además, la α -complementación con el extremo amino terminal de la β -galactosidasa codificada en los vectores derivados de pUC.
- **MC1061** (hsdR mcrB ara Δ 139 Δ (araABC-leu)7679 Δ lacX74 galU galK rpsL thi) con una eficiencia de transformación superior a la de la cepa DH5 α .

2.3 Cepa de *Saccharomyces cerevisiae*.

La delección de la FALDH (*SFA1*) se realizó en la cepa haploide *W303D* (MAT a ade2-1his 3-11,15 leuc2-3,112 trp1-1ura3-1can1-100).

2.4 Plásmidos.

- **pUC18**. Los plásmidos pUC carecen del gen *rop*, que normalmente está localizado cerca del origen de replicación y está implicado en el control del número de copias. Su tamaño es de 2,69 Kb. Los vectores pUC expresan el fragmento amino terminal de la β -galactosidasa y muestran α -complementación en los huéspedes apropiados (Messing, 1983). Este vector se utilizó en una etapa intermedia de clonaje para facilitar el clonaje del cDNA de *A. thaliana* en el vector de expresión de levadura pYES2.
- **pYES2**. Es un vector derivado de pUC que contiene el origen de replicación del vector de 2 μ m de *S. cerevisiae*, y el origen de replicación de *E. coli*. Dicho vector, de 6000 pb, posee una región con múltiples sitios de clonación, adyacente al promotor inducible por galactosa (GAL1). Como marcadores para la selección del vector, contiene el gen de

resistencia a ampicilina (Amp^R), para la selección en bacterias, y el gen URA3 para la selección en levadura. En este trabajo, este vector se utilizó para expresar el gen de la FALDH de *A. thaliana* en *S. cerevisiae*.

- **pDH51.** Vector derivado de pUC 18, que contiene el origen de replicación de *E. coli*. Es un vector de 3476 pb, posee una región con múltiples sitios de clonación que procede de pUC18, contiene el promotor del gen del RNA 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) y el terminador de la transcripción. Como marcadores para la selección del vector, contiene el gen de resistencia a ampicilina (Amp^R). En este trabajo, este vector se utilizó en una etapa intermedia de clonaje para preparar la construcción CaMV-FALDH, ya que posee el promotor y el terminador 35S, elementos necesarios para la expresión de genes en plantas, de los cuales carece el vector binario pBin19 (Peitrzak y col., 1986).

- **pBin19.** Es un vector que se caracteriza por contener las secuencias LB y RB necesarias para la integración del T-DNA en el genoma de la planta (previa transformación de *Agrobacterium tumefaciens*). Contiene el gen de la neomicina fosfotransferasa (NPTII), que confiere resistencia al antibiótico kanamicina, permitiendo una selección rápida y sencilla de las plantas transformadas (Bevan, 1984).

3. Medios de cultivo y medios de conservación de las cepas.

3.1 Medios de cultivo para bacterias.

- Medio Luria-Bertani (LB).

Este es el medio rico de uso más generalizado. Fue utilizado en todas las manipulaciones de *E. coli*. Su composición es la siguiente:

Bacto-triptona (1%)	10 g
Extracto de levadura (0,5%)	5 g
NaCl (1%)	10 g
Agua destilada hasta	1 l

El pH se ajustó a 7,2 con NaOH, y a continuación se autoclavó durante 20 min a 121°C y 1 kg/cm². Para los cultivos en placas, se añadieron 15 g/l de bacto-agar (1,5%).

- Medio de cultivo con antibiótico.

Cualquier cepa debe ser sometida a selección para mantener un vector plasmídico. La selección más habitual en organismos procariotas, es la selección de plásmidos con resistencia a algún antibiótico, mediante la adición del mismo al medio de cultivo. Dado que los antibióticos no pueden ser autoclavados es aconsejable preparar una disolución madre esterilizada por filtración, a partir de la cual se podrá añadir un pequeño volumen en el medio de cultivo ya autoclavado.

- **Ampicilina.** La solución madre se preparó a 50 mg/ml en agua destilada. Una vez disuelta, se esterilizó por filtración con filtros de 0,22 μm , se alícuotó en tubos Eppendorf estériles y se guardó a -20°C . La concentración final de Ampicilina empleada en los medios de cultivo fue generalmente de 50-75 $\mu\text{g/ml}$.

- **Rifampicina.** Es un antibiótico muy tóxico y fotosensible. La solución de rifampicina se preparó en metanol a una concentración stock de 34 mg/ml. La rifampicina se utilizó en cultivos de *Agrobacterium* para evitar contaminaciones con *E. coli*. La concentración final utilizada fue 150 $\mu\text{g/ml}$.

- **Kanamicina.** La solución madre se preparó a una concentración de 10 mg/ml en agua. Se esterilizó por filtración con filtros de 0,22 μm , a continuación se alícuotó en tubos Eppendorf estériles y se guardó a -20°C . La concentración final de kanamicina empleada varió entre 30 $\mu\text{g/ml}$ (en cultivos de medio líquido) y 60 $\mu\text{g/ml}$ (en placas de Petri).

3.2 Medios de cultivo para levadura.

Los medios para cultivo en placas se prepararon añadiendo 20 g de agar a 1 l de medio líquido.

Los componentes se autoclavaron durante 20 minutos a 121°C y 1 Kg/cm^2 de presión. Los que no se podían autoclavar, fueron esterilizados por filtración. Las placas se dejaron a secar a temperatura ambiente 1 día antes de su utilización. Alternativamente podían ser conservadas en bolsas de plástico hasta 3 meses. Para la preparación del medio líquido, el agar fue omitido. A continuación se listan las cantidades necesarias

(en gramos) de cada componente para preparar un litro de medio, y la concentración final de cada componente.

- Medio YPD ó YEYPD.

Es un medio completo utilizado en crecimiento rutinario. Su composición es:

Extracto de levadura (1%)	10 g
Bacto-peptone (2%)	20 g
Bacto-agar (2%)	20 g
Agua destilada hasta	1 l

- Medio mínimo sintético (SD).

Base de nitrógeno de levadura sin aminoácidos (0,67%)	6,7 g
Glucosa (2%)	20 g
Bacto-agar (2%)	20 g
Agua destilada hasta	1 l.

- Medio mínimo suplementado (SMM) ó medio de Wickerham.

Este medio se utiliza para seleccionar levaduras por alguna auxotrofia. Consiste en medio mínimo sintético (SD) al que se le añaden varios suplementos de crecimiento.

El medio mínimo suplementado (SMM) se prepara añadiendo los volúmenes apropiados de la solución madre que contiene los suplementos (previamente esterilizados por autoclave o por filtración) al medio SD previamente autoclavado. Las concentraciones de las soluciones madre de los suplementos utilizados durante este trabajo, el volumen de solución madre que es necesario añadir a un litro de medio, y el volumen de la solución que se ha de extender en una placa de SD, junto con la concentración final de cada constituyente se listan a continuación.

Constituyente	Concentración de la solución madre (g/100ml)	Volumen de solución madre para 1 litro de medio (ml)	Concentración final en el medio (mg/l)	Volumen de la solución madre (ml)
Hemisulfato de				
Adenina	0,2 ^a	10	20	0,2
L-Triptófano				
L-Leucina	1	2	20	0,1
L-Arginina	1	3	20	0,1
HCl	1	2	20	0,1
L-Metionina	1	2	20	0,1
L-Tirosina	0,2	15	30	0,2
L-Isoleucina	1	3	30	0,1
L-Lisina HCl	1	3	30	0,1
L-Fenilalanina	1 ^a	5	50	0,1
L-Glutámico	1 ^a	10	100	0,2
L-Aspártico	1 ^{a,b}	10	100	0,2
L-Valina	3	5	150	0,1
L-treonina	4 ^{a,b}	5	200	0,1
L-Serina	8	5	400	0,1

a. guardar a temperatura ambiente

b. Añadir tras autoclavar el medio.

3.3 Medios de cultivo del material biológico vegetal.

3.3.1 Medio de cultivo para la línea celular T87-C3.

MS (Murashige & Skoog Salt Mixture) 4,05 g

Sacarosa 30 g

MES 0,5 g

Agua MilliQ hasta 1 l

Equilibrar a pH 7,5 con NaOH, y autoclavar.

3.3.2 Medio de cultivo para plantas de *A. thaliana*.

- Medio líquido.

La composición para 200 ml de medio de cultivo es la siguiente:

MS (Murashige & Skoog Salt mixture)	0,86 g
Sacarosa	0,1 g
Mioinositol	0,1 g
Glicina (Stock 20 mg/ml)	20 µl
Acido nicotínico (Stock 10 mg/ml)	10 µl
Piridoxina (Stock 10 mg/ml)	10 µl
Tiamina (Stock 10 mg/ml)	2 µl
Agua MilliQ hasta	200 ml

- Medio Solido GM.

MS (Murashige & Skoog Salt mixture)	4,4 g
Sacarosa	5 g
MES	0,5 g
Agar	8 g
Agua MilliQ	1 l

Equilibrar el pH a 5,7 con KOH. Autoclavar.

El medio GM se utilizó para crecer plántulas de *A. thaliana* en general. Cuando fue necesario crecer o seleccionar plantas transgénicas, el medio GM se suplemento con el antibiótico.

3.3.3 Medio de cultivo de células de tabaco BY2.

La composición para 1 l de medio de cultivo es la siguiente:

Medio MS (Murashige & Skoog Salt mixture)	4,3 g
Tiamina (10 mg/ml)	100 µl
KH ₂ PO ₄	200 mg
2,4 D (2mg/ml)	100 µl
Mioinositol	100 mg
Sacarosa	30 g
Agua hasta	1 l

Ajustar a pH 5,0 con KOH 1M y autoclavar.

Cada 7 días, 1,5 ml del cultivo en fase estacionaria se transfirieron a 100 ml de medio fresco. Esta operación se realizó siempre en condiciones estériles, en la campana de flujo laminar y junto a la llama. El cultivo nuevo se mantuvo en la oscuridad, en agitación continua a 145 r.p.m, y a 27°C de temperatura.

4. Condiciones de cultivo del material vegetal.

4.1 Esterilización de las semillas de *A. thaliana*.

1. Incubar las semillas durante 2 min en etanol al 70%
2. Incubar las semillas durante 20 min en lejía comercial al 15% con 0,02% de Tween 20.
3. Lavar las semillas en agua MilliQ estéril durante 30 minutos, realizando cambios del agua cada 5 minutos.
4. Dejar las semillas a 4°C durante 12 horas antes de ponerlas a germinar. Esta etapa es necesaria si se quiere sincronizar la germinación.

4.2 Germinación de las semillas y crecimiento de las plántulas en medio líquido.

Las semillas se pusieron a germinar en placas estériles de 6 pocillos. En cada pocillo se adicionaron 5 ml de medio de cultivo líquido, y aproximadamente 2-3 mg de semillas previamente esterilizadas. El crecimiento se realizó siempre a 22°C, con un ciclo de luz/oscuridad de 16h/8h (día largo).

En los tratamientos con formaldehído, se añadieron 2 ml de medio fresco, 24 horas antes de aplicar el formaldehído. En el momento en que se recolectó el material vegetal, éste se secó con cuidado sobre un papel de filtro con el objetivo de eliminar la mayor cantidad posible de medio líquido, se pesó inmediatamente en una balanza, y se congeló en nitrógeno líquido. Las muestras se guardaron a -80°C hasta su uso.

4.3 Condiciones de cultivo de las plantas transgénicas de *A. thaliana*.

La siembra de semillas de *A. thaliana* transgénicas se llevó a cabo en placas de Petri con medio de cultivo sólido GM (nunca directamente en tierra) y en condiciones estériles. Las semillas esterilizadas se sembraron con una pipeta Pasteur estéril. Las placas ya sembradas se sellaron con esparadrapo transpirable (Leukopor®) y se

vernalizaron durante 3 días a 4°C. El crecimiento de las plantas en placas de Petri se realizó siempre a 22°C con un ciclo de luz/oscuridad de 16/8h.

Las plantas destinadas a completar su ciclo biológico y producir semillas fueron transplantadas a tiestos con tierra, aproximadamente a los 10 días de edad. El crecimiento en tierra se realizó siempre a 22° C, y se utilizaron condiciones de ciclo corto (8h luz/16h oscuridad) o de ciclo largo de luz (16h de luz/ 8h oscuridad), según los casos.

Las plantas transplantadas a tierra y destinadas a ser transformadas con *Agrobacterium* mediante infiltración, se crecieron primero en ciclo corto para potenciar el crecimiento vegetativo, y después se cambiaron a ciclo largo de luz para inducir la fase reproductiva.

5. Medio de conservación de levadura.

Las células de levadura fueron conservadas indefinidamente en 15% (v/v) de glicerol a -80°C. Para ello se crecieron primero en placas de SMM, y a continuación se resuspendieron en 1 ml de solución 15% de glicerol. Los viales fueron cerrados y agitados antes de ser congelados. La levadura puede ser revivida transfiriendo una pequeña porción de muestra congelada sobre una placa de YPD o SMM si es necesaria la selección de un plásmido.

6. Medio de conservación de *E. coli*.

Las cepas de uso continuo se mantuvieron en placas a 4°C durante unas pocas semanas (no más de un mes). Para el mantenimiento indefinido, las cepas se guardaron a -80°C en glicerizados con una concentración final de glicerol del 15%.

7. Determinación de la actividad enzimática de la FALDH.

7.1 Preparación de formaldehído a partir de paraformaldehído y estandarización de la solución madre.

El formaldehído utilizado en la medida de las actividades enzimáticas fué preparado mediante hidrólisis de paraformaldehído. Para ello se mezclaron 5 ml de agua y 0,5 g de paraformaldehído en un tubo pírex. El tubo fue cerrado e incubado a 100°C durante aproximadamente 16 horas. Posteriormente, el tubo fue retirado de la estufa y se dejó enfriar. La concentración de formaldehído presente en la solución fué determinada

enzimáticamente con la formaldehído deshidrogenasa independiente de glutatión (EC 1.2.1.46) de *Pseudomona putida*. Para ello se determinó la concentración final de NADH producida tras mezclar 10-50 μl de solución de formaldehído diluida 1000 veces, con una solución que contenía NAD^+ en exceso (4 mM) y 0,05 unidades de formaldehído deshidrogenasa de *P. putida* en tampón fosfato de sodio 0,1 M a pH 8,0, y en un volumen final de 1 ml. La cantidad final de NADH producido es equivalente a la del formaldehído presente inicialmente en la mezcla de reacción, cuando se trabaja con un exceso de NAD^+ respecto al formaldehído.

7.2 Determinación de la actividad enzimática. Actividad estándar.

Las medidas de actividad enzimática se llevaron a cabo en un espectrofotómetro Cary (Varian Associates, Inc., Palo Alto, CA, EEUU) y en un espectrofotómetro diode array Hewlett Packard 8452 A (Hewlett Packard 8452 A diode-array). Se utilizaron cubetas de cuarzo o de vidrio de 1 ml con 1 cm de paso óptico, y a 25°C. La actividad enzimática se detectó por el incremento de la absorbancia a 340 nm (longitud de onda a la que absorbe el NADH) producido por la reducción enzimática del NAD^+ , utilizando un coeficiente de extinción molar para el NADH de $6,220 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a 340 nm.

La actividad estándar de la FALDH fue ensayada con formaldehído 1 mM, glutatión reducido 1 mM y concentraciones saturantes de NAD^+ (2,4 mM) en tampón fosfato de sodio a pH 8,0.

Las medidas de actividad frente a diferentes alcoholes se realizaron en tampón glicina/NaOH 0,1 M, pH 10. La actividad formaldehído deshidrogenasa dependiente de glutatión (FALDH) (Koivusalo y col., 1989) se midió en tampón fosfato de sodio 0,1 M, pH 8,0. Excepto para la determinación de K_m para el NAD^+ , todas las actividades se determinaron a la concentración saturante de NAD^+ de 2,4 mM.

Para la determinación de la constante de Michaelis (K_m) se utilizaron concentraciones saturantes del coenzima NAD^+ (2,4 mM) y 5 concentraciones diferentes de sustrato. Los ensayos se realizaron por duplicado, y la K_m fué determinada un mínimo de 3 veces. Para el cálculo de los valores de K_m y V_{max} , se utilizó el programa ENZFITTER, A Non-Linear Regression Data Analysis Program (Leatherbarrow, 1987).

En condiciones de poca actividad FALDH y mucha actividad interferente por parte de otros enzimas, se utilizó como coenzima el APAD que permite aumentar la sensibilidad

de la detección de la actividad FALDH entre 4 y 22 veces, debido a que la liberación del APAD reducido (APADH) es más rápida que la del NADH. La cantidad de APAD reducido producida por minuto se calculó teniendo en cuenta el coeficiente de extinción molar $9100 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a 363 nm (Uotila y Koivusalo, 1989).

8. Cuantificación de las proteínas por el método de Bradford.

Este método se basa en el desplazamiento del máximo de absorbancia de una solución ácida del colorante " Coomassie Blue G-250 " desde 465 a 595 nm cuando el reactivo se une a una proteína (Bradford, 1976). La variación de la absorbancia es lineal para concentraciones de proteína entre 1 y 25 $\mu\text{g/ml}$. La recta de calibrado se realizó con albúmina de suero bovina (BSA) a concentraciones entre 1 y 16 $\mu\text{g/ml}$.

- Procedimiento.

Se prepararon diferentes concentraciones de proteína patrón (BSA) y de muestra en un volumen de 0,2 ml. Cada concentración, tanto de la recta patrón como de la muestra, se preparó por duplicado. Se diluyó el colorante (Bio-Rad laboratories) en agua destilada (1:4 v/v) y se añadieron 0,8 ml del reactivo diluido a cada una de las muestras. Se agitaron enérgicamente todos los tubos y se dejaron reaccionar durante 5 min. Seguidamente se midió la absorbancia a 595 nm.

9. Métodos electroforéticos.

La electroforesis es una técnica que se basa en la movilidad de las macromoléculas cuando se las somete a la acción de un campo eléctrico. Esta movilidad obedece en general al tamaño, la conformación y la carga neta de las macromoléculas. La separación entre diferentes macromoléculas depende del tipo y del tamaño de los poros de la matriz empleada.

9.1 Electroforesis de proteínas en geles almidón.

La detección e identificación inicial de la FALDH en extractos proteicos de *A. thaliana* se realizó mediante electroforesis en geles de almidón y posterior tinción por actividad enzimática.

- Preparación del gel.

Se preparó el gel de almidón de la siguiente manera:

Almidón hidrolizado para electroforesis (11,8%)	26 g
Tris para electroforesis (20 mM)	0,533 g
NAD ⁺ (grade AA1) (0,74 mM)	0,108 g

Agua destilada hasta un volumen total de 220 ml, ajustando el pH a 7,2 con HCl, a temperatura ambiente.

La solución se calentó a la llama, mientras se agitaba ininterrumpidamente. Una vez transparente, se desgasificó con una trompa de vacío y se extendió sobre una placa de refrigeración de metacrilato diseñado por J.L.Ferre (Ferre. J.L, 1983) sobre la que previamente se había construido un molde (3x120x240 mm) con cuatro separadores de teflón de 3 mm de grosor. Finalmente, se tapó con un vidrio y se mantuvo durante dos horas a temperatura ambiente y un mínimo de dos horas a 4°C. El tampón utilizado en la electroforesis fué Tris/HCl 0,3 M, pH 8,0 a 4°C.

- Electroforesis.

Las cubetas del equipo Multiphor 2117 LKB para electroforesis horizontal se llenaron con el tampón de electroforesis a 4°C. En el compartimento catódico se añadieron 200 mg de NAD⁺ grade AA1. Los extremos del gel se conectaron a las cubetas con papel Whatman nº 1 (104 x 253 mm).

Las muestras se aplicaron en papeles Whaman nº 3 (10 µl de cada papel) en el centro del gel. El gel se cubrió con una lámina de plástico PVC Reynolon (Insa, Izurzum, Navarra) y una segunda placa refrigerante de vidrio del equipo Multiphor (LKB) conectada a la primera y al baño refrigerante RWC 50 (Savant Instruments Inc., Hichsville, NY, EEUU). El sistema se cubrió con una placa anticondensadora. Los electrodos se conectaron a una fuente de alto voltaje (LKB, Bromma, IZASA, S. L), y la electroforesis se efectuó a 720 V, 60 mA y 60 W durante 5 horas, a 4°C.

9.2 Isoelectrofoque analítico.

Esta técnica permite la separación de las proteínas en condiciones no desnaturizantes, según su punto isoeléctrico, mediante un gradiente de pH formado por anfolitos. Utilizando los marcadores adecuados, se puede determinar el valor del punto isoeléctrico de una proteína.

El isoelectrofoque se realizó en el equipo electroforético PhastSystem™. Este sistema es bastante rápido, y se obtiene una buena resolución. El equipo contiene un microprocesador que controla y monitoriza la etapa de separación de las proteínas de acuerdo con el método programado. Tiene un sistema de refrigeración por efecto "Peltier" que impide que el gel se caliente excesivamente durante la etapa de separación de la muestra. En el lecho de separación se deposita el gel, con una matriz de poliacrilamida unida a una lámina transparente de polyester. Existen tres tipos de geles (PhastGel media), que cubren los rangos de pH 3-9, 4-6,5 y 5-8. Nosotros utilizamos el rango de pH 3-9. La muestra se aplicó mediante unos peines capaces de absorber la muestra por capilaridad (4 µl por pocillo). El peine con la muestra ya absorbida se deposita sobre un brazo aplicador, que tras un tiempo de preenfoco, baja el peine poniendo la muestra en contacto con la superficie del gel. El campo eléctrico empuja las proteínas al interior del gel, y posteriormente se eleva el brazo aplicador.

El programa utilizado en la separación fue el descrito en el manual de usuario como "separación technique file nº 100"

Tras el isoelectrofoque los geles fueron teñidos por actividad FALDH tal y como se describe en el apartado correspondiente (Apartado 10.1).

Para la determinación del punto isoeléctrico de la FALDH, se utilizaron marcadores de punto isoelectrico ("Kit" de calibración de isoelectrofoque, Pharmacia LKB Biotechnology). El Kit consiste en varios viales que contienen una mezcla de proteínas de punto isoelectrico (pI) conocido. Cada vial contiene de 20 a 50 µg de cada proteína marcadora de pI. Antes de su utilización, se reconstituyó el contenido del vial con 100 µl de agua desionizada, y se aplicaron en el gel 4 µl. El carril donde se encontraban los marcadores de punto isoeléctrico fue recortado y las proteínas teñidas con tinción Azul de Coomassie (Apartado 10.2).

9.3 Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida con SDS.

La electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS fue realizada según el procedimiento descrito por Laemmli (1970), en un sistema minigel vertical (Bio-Rad, Miniprotean II).

Como patrones de peso molecular se utilizó una mezcla de proteínas compuesta por albúmina de suero bovino (66.000 Da), ovoalbúmina (45.000 Da), alcohol deshidrogenasa de caballo (40.000 Da), anhidrasa carbónica (29.000 Da) y inhibidor de tripsina de soja (20.100 Da).

- Preparación del gel.

1. Ensamblar el sistema Mini-Protean de Bio-Rad y preparar el gel separador. Verter el gel con una pipeta Pasteur (sin que se formen burbujas) hasta que el frente alcance los 5 cm de altura. Acto seguido, añadir sobre el frente aproximadamente 0,5 ml de agua destilada de manera que se forme una capa regular sobre el gel. Dejar polimerizar el gel durante 30 min.
2. Desechar el agua destilada y añadir el gel concentrador hasta arriba del todo. Introducir el peine y dejar polimerizar durante 20-30 min.
3. Retirar el peine, ensamblar el sistema de electroforesis y añadir tampón de electroforesis 1x.

- Electroforesis.

1. Diluir las muestras en tampón de aplicación, a una relación 3:1 (muestra:tampón). A continuación, calentar las muestras durante 3 min a 100°C. Finalmente, aplicar las muestras en los bolsillos del gel.
2. Conectar la electroforesis a una fuente de alimentación eléctrica a 15 mA, hasta que el colorante haya travesado el gel concentrador. A continuación, aumentar el amperaje a 50 mA. Cuando el colorante haya travesado el gel separador, parar la electroforesis.

Gel separador (12.5%)		Gel concentrador	
Solución A	3 ml	Solución A	300 µl
Solución C	1,9 ml	Solución B	444 µl
Persulfato amónico 10%	112 µl	Persulfato amónico 10%	28 µl
TEMED	5 µl	TEMED	5 µl
Agua	2,5 ml	Agua	1 ml

**Tampón de electroforesis
10x (1 litro)**

Tris/HCl pH 8,4	30 g
Glicina	144 g
SDS 10%	100 ml
Agua hasta	1 l

**Tampón de aplicación de
de muestras 3x (100 ml)**

Glicerol	30 ml
SDS 10%	30 ml
Azul de bromofenol	3,75 mg
β- mercaptoetanol	7,5 ml
Solución B	32,5 ml
Agua hasta	100 ml

Solución A

Acrilamida	30 %
Bisacrilamida	0,8%

Solución B

Tris/HCl pH 8,8	1,5 M
SDS	0,4%

Solución C

Tris/HCl pH 6,8	1,5 M
SDS	0,4 %

9.4 Electroforesis de DNA en geles de agarosa.

La electroforesis horizontal en geles de agarosa se utilizó como método general de análisis de preparaciones de DNA, y para separar, identificar o purificar fragmentos de DNA. La concentración de agarosa utilizada varió entre 0,8 y 2%, según el intervalo de tamaño de los fragmentos a separar. En general se utilizó agarosa de calidad biológica suministrada por Promega (Madison, USA).

- Preparación del gel y electroforesis.

1. Pesar la cantidad necesaria de agarosa (dependiendo del % del gel), y añadir el volumen correspondiente de tampón TBE 1x
2. Disolver la agarosa calentándola en un horno microondas. Agitar de vez en cuando para tener una disolución homogénea.
3. Cuando la disolución empieza a enfriarse, añadir bromuro de etidio hasta una concentración final de 0,2 µg/ml (a partir de una solución stock de 10 mg/ml). Alternativamente los geles se pueden teñir después de la electroforesis.
4. Cuando la disolución esté tibia, llenar la placa de vidrio horizontal, colocar el peine para formar los bolsillos y dejar enfriar y solidificar durante 20 a 30 min.
5. Cuando el gel esté sólido, colocar la placa dentro de la cubeta de electroforesis y llenar con el tampón de electroforesis hasta cubrir el gel (2-3 mm).
6. Diluir las muestras en el tampón de muestras.
7. Aplicar las muestra en los bolsillos. Juntamente con las muestras, se aplica 1 µg de marcadores de peso molecular.

8. Conectar la electroforesis a 70-90 V y dejar hasta que el colorante azul de bromofenol llegue a 2/3 del gel.

Tampón de electroforesis		Tampón de muestras 6x	
TBE 10x			
Tris	108 g	Azul de bromofenol	0,25 %
Ácido bórico	55 g	Xileno cianol	0,25 %
EDTA 0,2 M, pH 8,0	100 ml	Glicerol	30 %
Agua MilliQ hasta	1 l		

- Visualización de las bandas de DNA.

1. Si no se añadió el bromuro de etidio durante la preparación del gel, al finalizar la electroforesis se sumerge en una solución de bromuro de etidio de 0,5 µg/ml, durante 10 a 20 min. A continuación, se destiñe con agua.
2. Los geles se iluminan con luz ultravioleta a 302 nm, para analizar las bandas de DNA.

Nota. Los colorantes Xileno cianol y azul de bromofenol se utilizan para visualizar el proceso de electroforesis y como marcadores aproximados de peso molecular. Para un gel de agarosa de 1.5% el xileno cianol tiene una movilidad similar a la de un fragmento de DNA de 1,9 kb y el azul de bromofenol una movilidad similar a la de un fragmento de aproximadamente 0,4 kb.

El bromuro de etidio contiene un grupo que se intercala entre las bases de DNA durante la tinción. Esta fijación permite detectar las bandas de DNA con luz ultravioleta (302 nm), debido a que el bromuro de etidio es fluorescente a esta longitud de onda.

9.5 Electroforesis de RNA en geles de agarosa-formaldehído.

El RNA aislado puede separarse en función de su tamaño mediante electroforesis en geles de agarosa. Esta electroforesis se lleva acabo en condiciones que aseguren la desnaturalización del RNA, para minimizar la formación de estructuras secundarias y conseguir así que su migración electroforética sea proporcionalmente lineal a su masa molecular. Para ello se recurre a agentes desnaturalizantes del tipo formaldehído, que es añadido tanto en el gel como en las muestras.

- Preparación del gel y electroforesis.

1. Disolver 1 g de agarosa en 72 ml de H₂O y calentar en el microondas hasta que la agarosa se haya fundido. No dejar hervir. Termostatar a unos 60°C.
2. En el interior de la campana de gases, añadir 10 ml de MOPS 10x y 18 ml de formaldehído 37%. Mezclar hasta que la solución sea homogénea y verter en el molde de electroforesis. Dejar solidificar unos 30 min.
3. Mientras gelifica el gel, ajustar el volumen final de las muestras de RNA a 10 µl con H₂O, y entonces añadir 5 µl de tampón MOPS 10x, 6% de formaldehído y 50% de formamida. Preparar también una muestra en la que se añadan unos 2 µg de un marcador de RNA, que sirva como patrón de peso molecular.
4. Una vez solidificado el gel, quitar el peine y colocar el gel en la cubeta de electroforesis. A continuación llenar la cubeta con tampón MOPS 1x hasta que cubra ligeramente el gel.
5. Aplicar 60 V durante 15-30 min, antes de cargar las muestras en el gel.
6. Incubar las muestras a 70°C durante 10 min. Inmediatamente dejar en hielo hasta que se aplican en el gel.
7. Aplicar las muestras en el gel. Conectar la electroforesis a 60V durante una hora, y a continuación durante 2 horas a 100V.

MOPS 10x.

MOPS	0,4 M
Acetato sódico	100 mM
EDTA	10 mM
Ajustar a pH 7,0 con NaOH y autoclavar	

10. Método de tinción de proteínas en geles de electroforesis.

10.1 Tinción de geles por actividad.

La tinción de los geles de almidón por actividad enzimática se basa en el hecho de que en el lugar donde se encuentra el enzima se produce una oxidación del sustrato (alcohol) y una reducción del coenzima (NAD⁺), el cual cede a continuación el electrón a una sustancia que, al aceptarlo, produce coloración.

Se utilizaron dos sustratos para la tinción: formaldehído y alcohol crofílico. Para ello, una vez terminada la electroforesis, se dividió horizontalmente el gel en dos láminas

idénticas de 1,5 mm de grosor, mediante un cortador de BUCHLER Instruments (EEUU).

La composición de la disolución de tinción fue la siguiente:

Tris/HCl 50mM pH 8,6	500 ml
NAD ⁺ grade AA1	200 mg
NBT (Nitroblue tetrazolium)	100 mg
PMS (phenazine metosulfate)	10 mg

La preparación de esta disolución debe realizarse en oscuridad. Se dividió la disolución de tinción en dos recipientes grandes (de 250 ml cada uno), y se añadió el volumen de sustrato correspondiente para tener una concentración final de 100 mM de alcohol crofílico, y de 4,8 mM de formaldehído respectivamente.

Los recipientes cerrados y protegidos de la luz que contenían cada una de las dos laminas del gel de almidón, se incubaron con las disoluciones de tinción a 42°C en un baño metálico, durante una hora aproximadamente, pudiendo aumentar o disminuir el tiempo de incubación según la intensidad de las bandas obtenidas. La tinción se detuvo por un lavado con agua corriente. El gel se fijó por inmersión en líquido de fijación (ácido acético 10,7% y metanol 44,6%) durante dos horas, siendo a continuación etiquetado y empaquetado en plástico PVC Reynolon y conservado en la cámara fría a 4°C.

10.2 Tinción con Azul de Comassie.

Una vez terminada la electroforesis, se sumergen los geles en la disolución colorante y se mantienen durante 20 min. La decoloración se realiza por medio de varios lavados con la disolución decolorante, que finalizan cuando el contraste entre el azul de las bandas electroforéticas y el del fondo es adecuado.

La composición de las soluciones utilizadas fue la siguiente:

Disolución colorante

Metanol	30 %
Ácido acético	8 %
Azul de Coomasie	0,15 %

Disolución decolorante

Etanol	30 %
Ácido acético	8 %

10.3 Tinción con sales de plata.

Este método de tinción, aunque resulta más laborioso que el de tinción clásica con azul de Coomassie, es 50 a 100 veces más sensible y por lo tanto permite detectar cantidades de proteína menores. Nosotros utilizamos el método del carbonato sódico descrito por Blum y colaboradores (1987), con algunas modificaciones (Blámquez,1988).

- Procedimiento.

1. Fijación: una vez finalizada la electroforesis, el gel se mantiene durante 1 h en la solución de fijación.
2. Deshidratación: mantener el gel 10 min en 100 ml de etanol 50%. Esta operación se repite 3 veces.
3. Pretratamiento: mantener el gel 1 min en una solución de trisulfato sódico 0,02% (p/v).
4. Lavado: Se lava el gel 3 veces con agua MilliQ.
5. Impregnación con nitrato de plata: sumergir el gel en 100 ml de la solución de impregnación durante 60 min.
6. Lavado: lavar el gel 3 veces con agua MilliQ.
7. Revelado: mantener el gel 1 a 5 min en una solución reductora a pH alcalino, hasta que aparecen todas las bandas de proteína. Añadir la solución de parada de revelado.
9. Lavado: un mínimo de 20 min con etanol 50%.

Solución de fijación

Metanol	50 %
Ácido acético	12 %
Formaldehído al 37%	0,5 %

Solución de impregnación

AgNO ₃ 0,1 M	12 %
Formaldehído al 37%	0,07 %

Solución de revelado

Na ₂ CO ₃	3 %
Formaldehído al 37%	0,05 %
Trisulfato sódico	1 cristal/100ml

Solución de parada de revelado

Metanol	50 %
Ácido acético	12 %

11. Métodos generales de DNA recombinante.

11.1 Material y soluciones.

Todo el material de vidrio y plástico se autoclavó durante 20 min a 120°C y 2 atm de presión antes de su uso.

Las soluciones se autoclavaron en las mismas condiciones. Las soluciones termolábiles se esterilizaron por filtración a través de un filtro de 0,22 µm. Todas las soluciones se prepararon con agua desionizada MilliQ (Millipore).

11.2 Extracción de DNA plasmídico de bacterias y de levadura.

Se utilizaron los Kits de extracción plasmídica suministrados por Promega: Maxipreps y Wizard Minipreps (Madison, USA). Es un método sencillo basado en la lisis alcalina (Sambrook y col., 1989), que utiliza a continuación unas pequeñas columnas con matriz de fibra de vidrio a las que se une el DNA. De esta manera se obtiene un buen rendimiento y una alta calidad de DNA libre de RNA.

11.3 Extracción de DNA genómico de levadura.

Se utilizó un método de lisis celular que pasaba por la etapa de preparación de esferoblastos (Current Protocols in Molecular Biology). A partir de un cultivo saturado de 5 ml proveniente de una colonia única se preparan los esferoblastos digiriendo la pared celular de levadura con zymoliasa durante 1 hora a 37°C y con agitación 220 rpm. A continuación se lisan con SDS y se recupera el DNA genómico precipitándolo con etanol. Este paso es muy lento, con lo que se deja resuspender durante toda la noche. Esta solución se trata con RNAsa durante 1 hora a 37°C y después se precipita con isopropanol. El precipitado de DNA se transfiere a un tubo de microcentrífuga y se resuspende en TE. El DNA que se obtiene es de suficiente calidad para ser utilizado en restricciones enzimáticas y Southern blot.

11.4 Extracción de RNA de *A. thaliana*.

El material de vidrio utilizado fue horneado durante 8 h a 200°C, y el material de plástico autoclavado dos veces seguidas. Las soluciones se prepararon en agua MilliQ RNAsa free y se autoclavaron. Es imprescindible el uso de guantes siempre que se manipule material exento de RNAsas.

El tejido vegetal fue triturado con un émbolo metálico especialmente adaptado para Eppendorf de 1,5 ml.

- Procedimiento.

1. Enfriar el émbolo del homogeneizador con N₂ líquido y triturar el tejido vegetal previamente congelado hasta que se forme un polvo fino. Adicionar a continuación 200 µl de tampón Z6 y 20 µl de β-mercaptoetanol, y macerar hasta descongelar el tejido vegetal.

Es importante que el tejido no se descongele durante la trituración, antes de adicionar el tampón Z6 y el β-mercaptoetanol.

2. Adicionar 200 µl más de tampón Z6 y continuar la maceración hasta disgregar completamente las partículas de tejido.

3. Adicionar 400 µl de una mezcla de fenol/clorofomo/alcohol isoamílico 25/24/1. y agitar vigorosamente con Vortex.

4. Centrifugar a 13.000 rpm durante 30 minutos a 4°C. Transferir la fase acuosa a otro tubo.

5. Adicionar 0,1 volumen de CH₃COOH 1 M y 1 volumen de etanol 100%. Centrifugar a 13.000 rpm durante 20 minutos.

6. Descartar el sobrenadante y adicionarle 200 ml de CH₃COONa 3 M pH 5,3. Agitar vigorosamente en el vortex hasta desprender el precipitado de RNA de las paredes del tubo.

Este paso se realiza para eliminar polisacáridos que coprecipitan con el RNA, por eso es importante lavar bien el precipitado con la solución de acetato de sodio.

7. Centrifugar nuevamente el tubo. Descartar el sobrenadante y lavar el precipitado de RNA con 500 µl de etanol 70%.

8. Dejar que se evapore el exceso de etanol y resuspender el precipitado de RNA en 100 µl de agua RNAsa free.

Tampón Z6

Guanidina. HCl pH 7,0	8 M
MES	20 mM
EDTA	20 mM

11.5 Digestión con enzimas de restricción.

Las enzimas de restricción se fijan de manera específica al DNA de doble cadena y cortan en sitios específicos. Las enzimas de restricción cortan el DNA creando extremos que permiten la ligación posterior con otros fragmentos de DNA. Se añade aproximadamente 1 unidad de enzima por 1 µg de DNA y se incuba la mezcla de la reacción durante 1 hora a 37°C.

Nota. La especificidad de las enzimas se ve alterada si se modifican las condiciones necesarias para la actividad de la enzima. Se recomienda controlar las condiciones de digestión, tales como la concentración final de glicerol, que no debe superar el 5% del volumen total de la reacción, la cantidad de enzima no superior a 10 u/µg de DNA, la fuerza iónica, el pH del tampón de digestión o la presencia de solventes orgánicos como etanol.

11.6 Purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa.

Para la purificación de fragmentos de DNA una vez separados en geles de agarosa, se realizó el método de electroelución en sacos de diálisis. Para ello se utilizó el siguiente protocolo:

- Procedimiento.

1. Tras separar los fragmentos de DNA en un gel de agarosa, cortar las bandas deseadas con una hoja de bisturí.
2. Colocar cada banda individual en un saco de diálisis, con la base pinzada utilizando una pinza de diálisis. Añadir 0,5 ml de tampón de electroforesis, TBE 0,5x, y a continuación extraer el aire del saco y cerrar con una segunda pinza de diálisis.
3. Colocar los sacos de diálisis en posición horizontal dentro de la misma cubeta de electroforesis en la que se realizó el gel de agarosa. El saco debe estar en posición perpendicular al campo eléctrico, y la banda de agarosa desplazada en el interior del saco hacia el polo negativo.
4. Electroeluir a 100 V, durante un tiempo de 20 min a 1h (según la densidad del gel de agarosa y el tamaño del fragmento). El DNA eluirá del gel y quedará en el interior del saco.
5. Masajear el saco y extraer con una pipeta los 0,5 ml de tampón y depositarlos en un tubo Eppendorf. Repetir la misma operación con 0,5 ml más de tampón, y depositarlo en el mismo Eppendorf. Mezclar el contenido del tubo.

6. Repartir el tampón que contiene el DNA en dos tubos Eppendorf (0,5 ml cada uno), hacer una extracción fenol:cloroformol:alcohol isoamílico (25:24:1). Centrifugar durante 5 min y transferir la capa acuosa, que contiene el DNA, a un nuevo tubo.
7. Añadir 1 µl de glicógeno (20 mg/ml) y 0,1 volúmenes de acetato de sodio 3 M, pH 5,2. Mezclar. Precipitar el DNA con 2 volúmenes de etanol. Tras centrifugar a 12000 rpm durante 15 min, lavar el sedimento con etanol 70% y secar el DNA al vacío durante 10 min.
8. Resuspender el DNA en el volumen adecuado de TE o agua.

TBE 10 x.

Tris	48,4 g
Acido bórico	55 g
EDTA 0,2 M, pH 8,0	100 ml
Agua MilliQ hasta	1 l

TE

Tris/HCl pH 8	100 mM
EDTA	10 mM

11.7 Obtención de extremos romos por tratamiento con el fragmento Klenow de la DNA polimerasa.

1. A 200-500 ng de DNA purificado se le añade 1 µl de cada uno de los dNTP 2 mM, 5 µl de tampón para Klenow 10x y 2 µl del fragmento de Klenow. Completar el volumen hasta 50 µl con agua.
2. Incubar la muestra a 37°C durante 15-20 min, en un baño de agua termostaticado.
3. Añadir 150 µl de agua y 200µl de fenol:cloroformol:alcohol isoamílico (25:24:1) y vortexar durante 1 min.
4. Centrifugar a 12000xg durante 5 min en una centrífuga Eppendorf. A continuación, extraer con cuidado el sobrenadante y depositarlo en un nuevo tubo Eppendorf.
5. Añadir 1 µl de glucógeno (20 mg/ml), 20 µl de acetato de sodio 3M, pH 5,2 y 400 µl de etanol absoluto. Agitar e incubar durante 30 min a -80°C, ó 2h a -20°C.
6. Centrifugar a 12000 rpm en una centrifuga Eppendorf durante 15 min. Extraer con cuidado el sobrenadante y lavar el sedimento con etanol 70% frío.
7. Secar el sedimento al vacío durante 10 min y resuspenderlo en 5-10 µl de TE o agua.

11.8 Defosforilación de DNA con la fosfatasa alcalina.

Para mejorar la eficiencia de la ligación vector-inserto, un método muy utilizado es la defosforilación del extremo 5' del vector y así evitar la ligación consigo mismo. El procedimiento utilizado para la defosforilación fue el siguiente:

1. Resuspender el vector linealizado y purificado en 70 μ l de agua.
2. Añadir 10 μ l de tampón de fosfatasa alcalina 10x, y la mitad de la cantidad apropiada de fosfatasa alcalina (relación 1:1 pmoles de vector: unidades de fosfatasa alcalina). Ajustar el volumen hasta 100 μ l con agua e incubar a 37°C durante 15 min.
3. Añadir la otra mitad de fosfatasa alcalina e incubar a 55°C durante 45 min.
4. Añadir 26 μ l de EDTA (20 mM) e incubar a 75°C durante 10 min para inactivar el enzima.
5. Dejar que se atempere la solución a temperatura ambiente y extraer 2 veces con fenol:cloroformol:alcohol isoamilico. Añadir 0,1 volumen de acetato de sodio 3 M (pH 5,2), mezclar, y añadir 2 volúmenes de etanol absoluto. Mezclar e incubar a -20°C durante 2 horas. Centrifugar a 12000 rpm durante 15 min y secar el sedimento al vacío durante unos 10 min.
6. Disolver el vector defosforilado en el volumen apropiado de TE o agua.

11.9 Ligación de fragmentos de DNA.

Para la ligación de fragmentos de DNA dentro de un vector se utilizó el protocolo siguiente:

1. A 100-200 ng de vector linealizado añadir la cantidad de inserto necesaria para obtener una relación molar vector:inserto 1:2 ó 1:3.
2. Añadir 2 μ l de tampón de ligación 10x y 5 u de T4 ligasa para la ligación de extremos romos ó 1 u de T4 ligasa para la de extremos cohesivos. Ajustar el volumen hasta 20 μ l con agua destilada.
3. Incubar a 16°C durante toda la noche.

11.10 Transformación de células de *E. coli*.

11.10.1 Preparación de células competentes.

La preparación de células competentes se realizó siguiendo el protocolo de tratamiento con CaCl₂ frío (Sambrook y col., 1989).

- Procedimiento.

1. Inocular una colonia de *E. coli* en 2 ml de LB e incubar a 37°C durante 12h con agitación a 300 rpm.
2. Transferir 1 ml del cultivo anterior a 100 ml de LB, e incubar a 37°C (300 rpm). Hay que controlar el crecimiento por medida de la densidad óptica a 600 nm hasta que se obtenga un valor de $DO_{600} = 0,5$
3. Transferir el cultivo a dos tubos de polipropileno de 50 ml estériles y mantener durante 10 min en hielo. A continuación, centrifugar durante 10 min a 2000xg y 4°C. Decantar el sobrenadante.
4. Resuspender suavemente cada sedimento en 10 ml de 0,1 M $CaCl_2$ frío (en hielo). La resuspensión se realiza añadiendo suavemente primero 1 ml y después el resto hasta 10 ml. Agitar suavemente sin utilizar el vórtex.
5. Centrifugar durante 10 min a 2000xg y 4°C. Decantar el sobrenadante y mantener los tubos en posición invertida durante unos segundos.
6. Resuspender cada sedimento en 2 ml de 0,1 M $CaCl_2$ frío. Dejar reposar en hielo durante un mínimo de 1 hora.
7. Las células así preparadas, pueden utilizarse inmediatamente para la transformación, o guardarse en alícuotas a -80°C, para su utilización posterior.

11.10.2 Transformación y selección.

1. Tomar una alícuota de 200 μ l de células competentes. Añadir aproximadamente 1 ng de DNA plasmídico por cada 50 μ l de células competentes. Mezclar suavemente y dejar en hielo durante 30 min.
2. Transferir el tubo a un baño a 42°C durante exactamente 60 seg. Transferir rápidamente el tubo a un baño de hielo y mantener de 1 a 2 min.
3. Añadir 800 μ l de LB a cada tubo e incubar durante 1 hora a 37°C con agitación suave (200 rpm máximo) para permitir que las bacterias se recuperen y expresen el marcador de resistencia al antibiótico.
4. Transferir unos 200 μ l del cultivo de células transformadas a placas de LB+agar con el antibiótico adecuado, y repartir las células en la superficie del medio sólido.
5. Mantener las placas a temperatura ambiente durante 15 a 20 min para que absorban el líquido.

6. Invertir las placas e incubar a 37°C durante 12 h (máximo 20 h). Si la selección se realiza por resistencia a la Ampicilina, el tiempo de incubación no ha de exceder de las 20 h, ya que la β -lactamasa, que es secretada al medio por los transformantes resistentes, inactiva al antibiótico en los alrededores de las colonias, y pueden aparecer colonias sensibles a la Ampicilina llamadas colonias satélite.

11.11 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La técnica de PCR se ha llevado a cabo para amplificar el cDNA de la FALDH de *A. thaliana* y clonarlo posteriormente en el vector de expresión de levadura, pYES2. Las condiciones de la reacción se explican con detalle en el apartado 8.2.1. Se utilizó un Termociclador PTC-100TM Programmable Thermal Controller (MJ. Research, Inc).

11.12 Northern blot.

Una vez separado por tamaño, mediante una electroforesis en gel de agarosa, el RNA es transferido a una membrana, de forma que no se altera la distribución de las diferentes moléculas de RNA en el gel.

- Procedimiento.

1. Colocar el gel de electroforesis en una cubeta y cubrir con H₂O. Mantener en agitación suave y hacer frecuentes cambios del H₂O, con el fin de eliminar el formaldehído del gel.
2. Reemplazar el H₂O por SSC 20x y mantener al menos durante 30 min.
3. Mientras tanto, cortar una porción de membrana Nylon NY13N Nytran de 0,45 μ m (Scheicher & Schuell GMBH, Dassel, Alemania) de un tamaño algo mayor que el del gel y sumergir en H₂O. A continuación, sumergirla en tampón de transferencia SSC 20x durante 5 min.
4. Recortar papel de filtro (tamaño similar al del gel) hasta obtener un montón de 7-8 cm de altura. Recortar también 4 trozos de papel Whatman del mismo tamaño que el gel.
5. Del mismo modo, recortar también 2 tiras de papel Whatman de anchura superior al gel y lo suficientemente largas como para servir de puente entre el gel y la solución de transferencia una vez montado el sistema.

Componente	Volumen	concentración final
Labeling buffer 5X	10 μ l	1x
*Mezcla de los dNTP fríos	2 μ l	20 μ M de cada uno de ellos
DNA molde desnaturalizado		25-50 ng
BSA	2 μ l	400 μ g/ml
$[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$	5 μ l	333 nM
Enzima Klenow	2 μ l	100 u/ml
<hr/>		
H ₂ O estéril hasta un volumen de	50 μ l	

*Para preparar la mezcla de nucleótidos no marcados, mezclar 1 μ l de las soluciones madre de cada uno de ellos (dATP, dTTP y dGTP, 1,5 mM) para obtener una concentración final de 500 μ M de cada dNTP.

4. Mezclar e incubar la mezcla durante 2 h a temperatura ambiente.

La eficiencia de incorporación es siempre inferior al 100%, por lo que al final de la reacción se dispone de una mezcla de nucleótidos no incorporados y de DNA marcado. Estos nucleótidos no incorporados se han de eliminar de la mezcla para evitar un fondo inespecífico durante la hibridación con la sonda..

Para purificar el DNA marcado separándolo de los nucleótidos no incorporados, se utilizó una columna de cromatografía de exclusión molecular Sephacryl S-400 (Amersham Pharmacia Biotech Inc, New Jersey, EEUU), siguiendo las instrucciones de la casa comercial. La sonda marcada se eluyó en un volumen de 100 μ l y los nucleótidos no incorporados quedaron retenidos en la resina.

El porcentaje de incorporación de radioactividad al DNA se determinó utilizando filtros circulares de 2-3 cm de diámetro de celulosa (Whatman®; Whatman Internacional Ltd). Para ello, 1 μ l de sonda purificada, y 1 μ l de sonda antes de purificar se depositaron en filtros, y se dejaron secar totalmente. Las membranas se introdujeron en viales de centelleo, teniendo 5 ml de líquido de centelleo biodegradable (BETAMAX™; ICN). Se realizó el recuento en un contador de centelleo 1211 Minibeta (LKB Wallac).

El porcentaje de incorporación de radioactividad se calculó por la formula siguiente:

$$\frac{\text{cpm incorporadas (después de purificar la sonda)} \times 100\%}{\text{cpm totales (antes de pasar por la columna)}} = \% \text{ incorporación}$$

La actividad especifica del producto se calculó por la fórmula:

$$\frac{\text{cpm totales incorporadas (cpm incorporadas} \times 1 \mu\text{l} \times 50 \mu\text{l)}}{(\text{ng DNA sintetizado} + \text{ng DNA molde}) \times 0,001 \mu\text{g/ng}} = \text{cpm}/\mu\text{g}$$

11.12.2 Prehibridación e hibridación.

1. Etapa de prehibridación: a 65°C durante 1 h como mínimo, para bloquear la unión inespecífica de la sonda marcada sobre la superficie de la membrana.
2. Etapa de hibridación: a 65°C durante 16-20 h. La concentración de la sonda ha de ser de al menos 10⁶ cpm/ml de solución de hibridación. Desnaturalizar la sonda de DNA a 95°C durante 5 min antes de añadirla a la solución de hibridación.
3. Lavados post-hibridación: después de la hibridación, hay que hacer varios lavados para eliminar el exceso de sonda que no ha hibridado. Se realizaron 2 lavados sucesivos, a 65°C durante 1h aproximadamente (30 min x 2).

Solución de hibridación.

Fosfato sódico pH 7,2	0,2 M
EDTA	1 mM
SDS	7 %
BSA	1 %

Solución de lavado.

Fosfato sódico pH 7,2	40 mM
EDTA	1 mM
SDS	1%

11.12.3 Análisis de la señal radioactiva.

La detección de los híbridos RNA-sonda marcada, se determinó por exposición del filtro a una hoja de película fotosensible para autoradigrafía, y utilizando una pantalla intensificadora durante un tiempo variable en función de la intensidad de la señal, a – 80°C. El tamaño relativo de los transcritos se determinó utilizando marcadores de RNA de pesos moleculares conocidos. Además, este método permite estimar la cantidad de

RNA presente en las células de que deriva, de forma que la intensidad de la banda en la película de rayos X es proporcional a la cantidad de RNA presente.

11.13 Southern blot.

- Electroforesis.

1. Depositar 10 µg de DNA genómico digerido con enzimas de restricción en un gel de agarosa 0,7%. En un bolsillo independiente, depositar también un marcador de peso molecular de DNA.
2. Desarrollar la electroforesis durante 16h a 20V, de forma que el DNA recorra el espacio suficiente para asegurar una buena resolución.
3. Una vez acabada la electroforesis, fotografiar el gel con una regla a su lado (haciendo coincidir el 0 cm con la altura de los pocillos del gel), utilizando un trasluminador de luz ultravioleta (302 nm). Con la fotografía se puede establecer una relación entre el recorrido electroforético de las bandas detectadas en la película autoradiográfica, y su tamaño, gracias al marcador de peso molecular.
4. Incubar el gel durante 30 min con agitación en una solución de HCl 0,25 M.
5. Incubar el gel durante 40 min con agitación en la solución de desnaturalización. Realizar un cambio de solución a los 20 min.
6. Incubar el gel durante 40 min con agitación en la solución de neutralización. Realizar un cambio a los 20 min.

Los procesos de transferencia de DNA genómico a la membrana, el marcaje radioactivo de la sonda de DNA y las diferentes etapas de hibridación y lavados se realizaron igual que en el Northern blot (ver el apartado anterior **11.11**).

Solución de desnaturalización.

NaCl	1,5 M
NaOH	0,5 M

Solución de neutralización.

Tris/HCl pH 7,0	0,5 M
NaCl	1,5 M

12. Expresión de la FALDH de *Arabidopsis thaliana* en *S. cerevisiae*.

12.1 Construcción del mutante por delección del gen *SFA1*.

La delección se realizó por sustitución de la zona codificante del gen *SFA1* por la del gen *HIS3*. El fragmento *PstI/EcoRI*, conteniendo el gen de la FALDH de *S. cerevisiae* (*SFA1*) fue clonado en el vector pBR322 previamente digerido con los mismos enzimas de restricción. La zona codificante fue extraída por digestión con *ScaI* y en su lugar se subclonó el gen *HIS3*, que fue obtenido del vector YDp-H (Berben y col., 1991) por digestión con *BamHI* y cuyos extremos se hicieron romos por tratamiento con T4 polimerasa. Digiriendo la construcción anterior con *ScaI/EcoRI*, se liberó un fragmento lineal conteniendo el gen *HIS3* más las secuencias flanqueantes 5' y 3' del gen *SFA1*. La cepa haploide derivada de la cepa diploide W303D fue transformada con dicho fragmento lineal. Tras la recombinación, la zona codificante de *SFA1* fue sustituida por el gen *HIS3*, permitiendo el crecimiento de la levadura en medio mínimo sin histidina.

12.1.1 Análisis de las cepas deleccionadas.

Las colonias fueron crecidas en 20 ml de medio YPD durante una noche, centrifugadas a 3000 x g durante 10 min, y lisadas con bolas de vidrio de 0,5 mm de diámetro en tampón Tris/HCl 0,1 M, DTT 0,5 mM, a pH 7,5. Los homogenados fueron analizados por isoelectroneofoco, y revelados por actividad FALDH.

También se realizó una comprobación por Southern-blot. Para ello, se preparó DNA genómico de 6 colonias y se digirió con *PstI/EcoRI*. Tras la transferencia del DNA digerido a una membrana de nitrocelulosa, se llevó a cabo la hibridación con 50 ng de sonda marcada con [γ^{32} -P]dCTP (3×10^8 cpm/ μ g). Se utilizó como sonda el fragmento *PstI/NcoI* del gen *SFA1*, conteniendo la zona codificante de *SFA1* más las zonas flanqueantes que dirigieron la recombinación en la delección.

12.2 Clonación de la FALDH de *Arabidopsis thaliana* en el vector de expresión pYES2.

12.2.1 Amplificación del cDNA por PCR y clonación en el vector pUC18.

Basándonos en la secuencia del cDNA de la FALDH de *A. thaliana* (Martínez y col., 1996), se diseñaron los siguientes oligonucleótidos para amplificar la zona codificante del gen:

ARAB1: 5'GCCGGTACCATGGCGATCAAGGTAGG 3'

ARAB2:5'CGCCGTCGACTCATTGCTGGTATCGAGG 3'

El oligonucleotido ARAB1 contenía en su extremo 5' la diana de restricción *KpnI*, para facilitar el clonaje en la etapa posterior. El segundo oligonucleotido, ARAB2, incluía el codón complementario al de la parada de la traducción. La reacción de PCR se realizó en las condiciones siguientes:

0,2 mM de cada dNTP, 1 μ M de los cebadores ARAB1 y ARAB2, 0,2 μ g de cDNA y 0,5u de Taq polimerasa. La mezcla de la reacción (100 μ l) se cubrió con una capa de aceite mineral. La amplificación del cDNA se efectuó en dos etapas:

1^a) 5 minutos a 93°C, 2 minutos a 54,5°C y 2 minutos a 72°C, durante 5 ciclos.

2^a) 1 minuto a 93°C, 2 minutos a 61,4°C y 2 minutos a 72°C, durante 25 ciclos.

El producto de la amplificación se analizó en un gel de agarosa al 1% y la banda de DNA del tamaño esperado se cortó y se purificó por electroelución. El DNA eluido se sometió a una extracción con fenol-cloroformol, seguida de una precipitación con etanol y resuspensión en TE pH 8. Tras comprobar el rendimiento de la electroelución con una nueva electroforesis, la banda purificada se reparó para obtener extremos romos, utilizando el fragmento de Klenow de la DNA polimerasa I, según el protocolo incluido en el "Sure cloneTM ligation Kit" (Promega). El DNA reparado se ligó en el vector pUC18 cortado con el enzima *SmaI* y defosforilado. La mezcla de ligación se utilizó para transformar células competentes de la cepa de *E. coli* MC1061. Los transformantes se seleccionaron en placas de LB agar, con 75 μ g/ml de Ampicilina. La presencia del inserto de DNA se comprobó mediante la reacción de la PCR, y también por digestión con el enzima de restricción *KpnI*.

12.2.2 Subclonación en el vector de expresión de levadura pYES2.

A partir del DNA de uno de los clones positivos obtenidos en pUC18 se liberó el fragmento clonado por digestión con el enzima de restricción *KpnI*. El vector de expresión pYES2, se digirió con el mismo enzima de restricción, y se defosforiló con fosfatasa alcalina para evitar su recircularización. Se realizó la ligación a una relación molar DNA vector: DNA inserto de 1:3. La mezcla de ligación se utilizó para transformar células competentes de la cepa de *E. coli* MC 1061, y los transformantes se seleccionaron en placas de LB agar conteniendo 75 μ g/ml de Ampicilina. La presencia

del inserto se comprobó por digestión con *KpnI*. Para averiguar la orientación con respecto al promotor GAL1, se utilizó el enzima de restricción *BamHI*, que corta en el interior del cDNA de la FALDH de *Arabidopsis*.

12.3 Transformación de *S. cerevisiae* y expresión de la FALDH de *Arabidopsis*.

12.3.1 Preparación de células competentes y transformación.

El método utilizado fue el del acetato de litio, descrito por Becker y Lundblad en 1994. Este es un método rápido con una eficiencia de transformación de 10^5 a 10^6 transformantes/ μg .

Tras una breve incubación de las células de levadura en acetato de litio tamponado, el DNA plasmídico es introducido en la célula junto con DNA de alto peso molecular (DNA de salmon). La adición de polietilenglicol (PEG) y un choque térmico provocan la entrada del DNA.

- Preparación de las células competentes.

1. Dos días antes de la transformación, inocular una colonia de levadura en 5 ml de SMM sin Histidina.
2. La noche anterior a la transformación, se inoculan 3 ml del cultivo anterior (dilución 1/100) en 300 ml de medio YPD, y se deja crecer durante toda la noche a 30°C, hasta obtener una densidad óptica de 0,3 a 0,5, dependiendo de la cepa.
3. Centrifugar el cultivo a 4000 rpm durante 5min, y resuspender el sedimento en 10 ml de agua MilliQ estéril.
4. Transferir la suspensión a un tubo de centrifuga y peletear las células por centrifugación a 4000 rpm durante 5 min.
5. Resuspender las células en 1,5 ml de solución de acetato de litio frío, preparada recientemente.

- Transformación.

1. Mezclar 200 μg de DNA de esperma de salmón (previamente desnaturalizado a 95°C) con 2 μg de DNA plasmídico en un tubo estéril de microcentrifuga de 1,5 ml.
2. Añadir 200 μl de células de levadura competentes al mismo tubo de microcentrifuga.

3. Añadir 1,2 ml de PEG preparado recientemente.
4. Agitar 30 min a 30°C (preferentemente a bajas revoluciones).
5. Someter las células a un choque térmico a 42°C durante 15 min exactamente. A continuación centrifugar durante 10 segundos a temperatura ambiente.
6. Resuspender las células transformadas en 200 µl de TE 1x preparado recientemente. A continuación, plaquear las células en placas SMM (-His,-Ura) e incubar a 30°C hasta que aparezcan los transformantes (2-5 días).

TE 10x.

Tris/HCl pH 7,5	100 mM
EDTA	10 mM

Acetato de Litio 10x.

Acetato de Litio pH 7,5 1 M
ajustar el pH con ácido acético
y esterilizar por filtración.

Solución de acetato de Litio.

TE 10x pH 7,5	1 vol
Acetato de Litio 10x	1 vol
Agua estéril	8 vol

Solución de PEG.

PEG 50%	8 vol
TE 10x pH 7,5	1 vol
Acetato de Litio 10x	1 vol

12.3.2 Expresión de la FALDH de *Arabidopsis* en *S. cerevisiae*.

Uno de los clones positivos obtenidos en pYES2, se utilizó para transformar una cepa haploide de *S. cerevisiae* con el gen *SFA1* delecionado (*sfa1::His3*) (Apartado 11.1). Como control, se utilizó el vector de expresión pYES2 sin inserto. La siembra se realizó en placas de SMM en ausencia de histidina y uracilo y a una concentración de glucosa del 2%. A continuación, las placas se incubaron a 30°C durante 2 o 3 días. De cada placa (pYES2 con inserto y pYES2 sin inserto) se escogió una colonia y se preparó un cultivo de noche, en 20 ml en medio mínimo (His⁻, Ura⁻) y un 2% de rafinosa, obteniéndose así los cultivos saturados.

12.3.3 Curvas de crecimiento en presencia de formaldehído.

Con el fin de partir del mismo numero de células de levadura, se realizó un recuento del número de células existentes en cada cultivo saturado, utilizando una cámara de Neubauer. EL experimento se inició sembrando 10⁶ células/ml de cultivo saturado en

medio mínimo sin uracilo ni histidina y en presencia de 2% de galactosa con el fin de inducir el promotor GAL1. A continuación los dos cultivos se incubaron a 30° C y 300 rpm en presencia de formaldehído. La concentración de formaldehído utilizada en este trabajo fue 1 mM y 2 mM. Se siguió el crecimiento de levadura en presencia de formaldehído, por medida de la absorbancia a 600_{nm}. La concentración de formaldehído restante en el medio se calculó tal y como se explicó en el apartado 3.1.

13. Purificación de la FALDH de *A. thaliana* expresada en *S. cerevisiae*.

13.1 Crecimiento de *S. cerevisiae* en un bioreactor.

Con el objetivo de obtener un rendimiento máximo en la expresión es conveniente trabajar en condiciones que permitan un buen crecimiento de las levaduras. En un erlenmeyer, el factor principal que limita el crecimiento es la disminución del pH durante el crecimiento celular. En cambio, el cultivo en fermentador permite controlar automáticamente el pH entre otros factores, y alargar el tiempo de incubación, aumentando así el nivel de crecimiento celular y la expresión.

Para la purificación de la FALDH recombinante de *A. thaliana* fue necesario hacer un cultivo de 50 l, para poder obtener la cantidad de proteína necesaria para su caracterización cinética. Este crecimiento fué realizado en el servicio de fermentación del Departamento de Ingeniería Química de la Universidad Autónoma de Barcelona, con el soporte técnico del Dr. Pau Vila.

El procedimiento utilizado fue el siguiente:

Se seleccionó una colonia a partir de una placa de SMM-agar sin His y sin Ura, y se transfirió a un erlenmeyer conteniendo 20 ml de medio SMM (- His,- Ura). Se incubó a 30°C con agitación (250 rpm.), durante 10 horas. Este cultivo se inoculó en 100 ml de SMM sin histidina y sin uracilo, y se incubó a 30°C , 250 rpm, durante 24 h. Este segundo cultivo, se inoculó en 2 l de SMM sin His y sin Ura en un biorreactor (Biostat-B, B. Braun Biotech, Welsugen, Alemania). La temperatura fue mantenida a 30°C, y el pH se midió con un electrodo de vidrio (Ingold) y se ajustó a pH 5,5 ± 0,05 con NaOH. El oxígeno disuelto se midió utilizando un electrodo de oxígeno polarográfico (Ingold), y la pO₂ fue mantenida por encima del 50% de saturación, mediante aumento automático de la velocidad de agitación, debido a un sistema de control. La agitación inicial fue de 300 rpm y con un límite máximo programado de 1000 rpm.

Tras 16 h de cultivo se utilizaron los 2 l del bioreactor anterior para inocular un bioreactor de 50 l (Biostat-UD, open-frame pilot plant bioreactor, B. Braun Biotech, Welsugen, Alemania) equipado con unidad de control digital y software de monitorización y control MFCS3.1 de Braun Biotech, que contenía 30 l de medio SMM sin His y sin Ura. La temperatura programada fue de 30°C, el pH fue mantenido a 5,5 mediante adición de NaOH, y la pO₂ se mantuvo por encima del 50% de saturación, a un flujo constante de 50 litros de aire por minuto, con una agitación constante de 350 rpm. Durante 26 h se dejó crecer el cultivo hasta la fase estacionaria.

El crecimiento fue seguido por medida de la densidad óptica a 600 nm utilizando un espectrofotómetro Cary 219 (Varian Associates Inc., Palo Alto, CA, EEUU). Cuando fue necesario, se hicieron diluciones con medio fresco para obtener valores en el rango usual entre 0,5 y 0,7 unidades de densidad óptica.

Una vez crecido el cultivo se procedió a la separación de las células de levadura del resto del medio mediante una centrífuga (Modelo CSA.1-06-475, Westfalia separator AG, oelde, Alemania). La separación se realizó a 10.000 r.p.m. y un caudal de 10 litros por minuto, con períodos de descarga de 30 min.

13.2 Procedimiento de purificación.

Una vez separadas las células de levadura del medio de cultivo, se volvieron a centrifugar (3000 xg durante 1 h a 4°C) para eliminar el exceso de medio. Se recogieron unos 300 g de células (en peso húmedo). Las células fueron homogeneizadas en 400 ml de tampón Tris/HCl 10 mM pH 7,5, DTT 0,5 mM, 1 mM de benzamidina y 1 mM PMSF a 4°C, utilizando un homogeneizador “Bead-Beater” (Biospec Products, Inc), con bolas de vidrio de 0,5 mm de diámetro, mediante 4 ciclos de 1 min separados por 2 min de reposo.

El homogenado así obtenido se centrifugó en una centrífuga Beckman J2-HS a 29.000 xg durante 1 h. El sobrenadante fue filtrado a través de lana de vidrio para eliminar pequeñas partículas sólidas y posibles restos lipídicos. El filtrado fue entonces dializado frente a 2 l de tampón de homogeneización durante 6 horas. El tampón de diálisis se renovó cada 2 h.

Se procedió a aplicar el dializado en una columna de DEAE-Sepharosa CL-6B (36,5 x 4 cm), previamente equilibrada con el tampón de homogeneización. Tanto esta

cromatografía como las siguientes fueron realizadas a 4°C. Se recogieron fracciones de 10 ml a un flujo de 42 ml/h. Se realizó un lavado de la columna con 1100 ml del mismo tampón y a continuación se eluyó el enzima con un gradiente lineal de NaCl 0-0,18 M (800:800 ml). Se midió la $A_{280\text{ nm}}$ de estas fracciones y se ensayó la actividad FALDH en condiciones estándar. Las fracciones del pico de actividad FALDH resultante de la cromatografía se mezclaron y se concentraron por filtración a través de un concentrador Amicon con una membrana Diaflo PM 10 hasta un volumen de unos 45 ml.

El concentrado fue entonces dializado frente a 2 l de tampón KH_2PO_4 10 mM a pH 6,8, DTT 0,5 mM y 1 mM benzamidina, durante 6 h. El tampón de diálisis se renovó cada 2 h. Se aplicó el dializado a una columna de Hidroxiapatito Bio-Gel HT (16 x 2cm), previamente equilibrada en este tampón. El flujo de la cromatografía fue de 36 ml/h. Tras el lavado, con 250 ml del mismo tampón, se aplicó un gradiente lineal de KH_2PO_4 de 10-400 mM (600:600 ml). Las fracciones que mostraron actividad se mezclaron y concentraron hasta un volumen final de 25 ml. El concentrado fue dializado frente a 2 l de tampón Tris/HCl 10 mM pH 7,5, DTT 0,5 mM durante 6 h (renovándose el tampón cada 2 h). A continuación el dializado fue aplicado a una columna de Blue-Sepharosa (15,5 x 1,8 cm). Tras el lavado con 300 ml del tampón de diálisis, se aplicó un gradiente lineal de NADH de 0-750 μM (300:300ml). Las fracciones con actividad FALDH fueron concentradas hasta un volumen de 16 ml y dializadas frente a Tris/HCl 100 mM, DTT 0,5 mM a pH 7,5, con el objetivo de eliminar el NADH presente en la muestra. La FALDH purificada se conservó a -80°C .

Previamente a la caracterización cinética del enzima, se descongeló una fracción que fue pasada a través de una columna de gel filtración PD-10 para la eliminación del NADH residual.

14. Purificación de la FALDH de *A. thaliana* a partir de la línea celular T87-C3.

La homogeneización de la suspensión celular de *A. thaliana* (460 g) se realizó manualmente en un mortero, utilizando nitrógeno líquido para mantener el tejido congelado. A continuación, el homogenado se resuspendió en 100 ml de tampón Tris/HCl 10 mM, pH 7,5, 0,5 mM DTT y se centrifugó a 29000xg, durante 1 hora a 4°C. El sobrenadante se recogió y precipitó con sulfato amónico al 90% de saturación. El precipitado se recolectó mediante una centrifugación a 10000xg durante 30 minutos, a

4°C y se resuspendió en 80 ml del mismo tampón de homogeneización, dializándose a continuación frente a tampón Tris/HCl 10 mM pH 7,5, DTT 0,5 mM, durante una noche.

A continuación se aplicó el dializado a una columna de DEAE-Sepharosa (11 x 3 cm) previamente equilibrada con el mismo tampón. Se lavó la columna con 500 ml de tampón y se conectó un gradiente de NaCl de 0 a 0,3 M (80:80 ml) a un flujo constante de 20 ml/h. Se colectaron fracciones de 5 ml y se midió la absorbancia a 280 nm, así como la actividad FALDH en condiciones estándar, utilizando 0,6 mM de APAD como cofactor. Las fracciones que presentaban actividad FALDH fueron mezcladas y concentradas hasta un volumen de 9 ml.

El concentrado fue dializado frente a tampón Tris-acetato 20 mM, pH 6,6, 0,5 mM DTT, 1 mM PMSF y cromatografiado en una columna Proteín-PacK equilibrada con el mismo tampón de diálisis. Se realizó un lavado de 20 ml, y a continuación se aplicó un gradiente de acetato de sodio de 0-300 mM (30:30 ml), a un flujo de 1ml/min, colectándose fracciones de 0,5 ml.

Las fracciones activas se recogieron y se dializaron frente a tampón Tris/HCl 10 mM pH 7,5, DTT 0,5 mM y se aplicaron a una columna de Blue-Sepharosa equilibrada con el mismo tampón. Se realizó un lavado de 200 ml con el tampón anterior. A continuación se aplicó un gradiente de NADH de 0-750 µM (40:40ml). Las fracciones que mostraron actividad, fueron recogidas y mezcladas, y el exceso de NADH fue extraído aplicando la muestra a una columna PD-10, previamente equilibrada con tampón Tris/HCl 10 mM, DTT 0,5 mM, a pH 7,5.

15. Métodos inmunológicos.

15.1 Obtención de anticuerpos policlonales contra la FALDH de *A. thaliana*.

Para la producción de anticuerpos policlonales contra la FALDH de *A. thaliana* se utilizó un conejo hembra de la cepa NZW, de unas 7 semanas de edad y un peso aproximado de 1,7 Kg. El conejo se mantuvo en el Servicio de Estabulario de la Universidad de Autónoma de Barcelona.

- Inmunización de los conejos y obtención del antisuero.

1. El volumen máximo de inyección fue de 1 ml, compuesto por 0,5 ml de proteína (50 µg) y 0,5 ml de coadyuvante de Freud. Las inyecciones se realizaron cada 15 días, con 6 inyecciones en total. Se utilizó el coadyuvante completo de Freud solamente en la primera inyección. El primer sangrado se realizó 3 días antes de la cuarta inyección. El segundo sangrado se realizó 15 días después del primero.

Como suero control se utilizó el suero extraído del mismo conejo antes de la inmunización.

15.2 Western blot.

- Método.

1. Hacer una electroforesis en gel de poliacrilamida/SDS al 12,5%
2. Cuando las muestras hayan llegado al final del gel, desechar el gel concentrador e incubar el gel separador en solución de transferencia durante 15 minutos aproximadamente.
3. Cortar la membrana del mismo tamaño que el gel de poliacrilamida, y sumergirla en metanol 100% durante 5min. A continuación, lavarla bien con la solución de transferencia.
4. Cortar papeles absorbentes Whatman 3 MM de igual tamaño que la membrana y empaparlos en el tampón de transferencia.
5. Preparar el sistema de transferencia. Se utilizó un sistema vertical de transferencia por aplicación de voltaje, donde el gel y la membrana se sitúan uno junto al otro con tres recortes de papeles absorbentes y una esponja (todo bien empapado en solución de transferencia) a cada lado. La transferencia se realizó durante 1 hora a 100 V y a 4°C, con agitación magnética.
6. Teñir la membrana con la solución de tinción y desteñir con metanol al 50%. Así podemos comprobar como se ha realizado la transferencia. Se puede fotografiar para cuantificar la cantidad de proteína transferida en cada carril.
7. Desteñir la membrana con metanol 100%, tratando de que no quede nada del colorante.
8. Lavar la membrana con solución PBS 1x.

9. Bloquear la membrana durante 2 horas con solución de bloqueo, a temperatura ambiente y con agitación lenta.
10. Incubar toda la noche con el primer anticuerpo (anti-FALDH de *A. thaliana* obtenido en conejos) disuelto en la solución de lavado I a la dilución deseada.
11. Lavar con agitación lenta durante 2 horas aproximadamente con la solución de lavado I, cambiándola cada 10 minutos.
12. Incubar con el segundo anticuerpo (anti-IgG de conejo, conjugado con fosfatasa alcalina, “Bio-Rad”) preparado a una dilución 1:3000 en la solución de lavado I, durante 1 hora.
13. Lavar de 4 a 6 veces con la solución de lavado II, cambiándola cada 10 minutos.
14. Lavar de 2 a 3 veces con la solución de lavado III, cambiándola cada 10 minutos.
15. Lavar 10 minutos con PBS 1x.
16. Secar con cuidado la membrana sobre un papel.
17. Aplicar la solución de detección (Immun-Star Substrato, “Bio-Rad”) sobre la membrana. Mantenerla durante 5 minutos, evitando que se seque durante este tiempo.
18. Escurrir un poco la membrana y ponerla en el cassette de exposición en contacto con una película autoradiográfica. Esperar de 10-15 minutos y revelar.

Tampón de transferencia 10x.		Solución de tinción	Solución de bloqueo
Ácido Bórico	500 mM	Metanol 50 %	Leche en polvo 5 %
Tris	500 mM	Ácido acético 7 %	PBS 1x pH 7,4
		Coomassie Blue 0,1 %	

Solución de lavado I		Solución de Lavado II	Solución de lavado III
Leche en polvo	5 %	Leche en polvo	5 %
Tween 20	0,1 %	Tween	0,2 %
PBS 1x pH 7,4		PBS 1x pH 7,4	Tween 20 0,2 %
			PBS 1x pH 7,4

PBS 10x (1l)

- NaCl 80 g
- KCl 2 g
- Na₂HPO₄ 14,4 g
- KH₂PO₄ 2,4 g
- Agua MilliQ hasta completar 1l.
- Ajustar a pH 7,4.

15.3 Inmunolocalización de la FALDH en células BY2.

- Método.

1. En un tubo de 15 ml incubar las células con solución fijadora (paraformaldehído al 3,7%), durante 1 hora a temperatura ambiente.
2. Lavar durante 15 min la preparación con la solución de lavado, cambiándola cada 5 min.
3. Colocar las células BY2 en los portaobjetos previamente tratados con poli-L-lisina, y dejar secar el exceso de medio de fijación durante 20 min.
4. Incubar las células durante 5 min a temperatura ambiente con una solución que contiene las siguientes enzimas, disueltas en el tampón de digestión:

Pectoliasa	0,02 %
Macérozyme	0,1 %
Celulasa	0,3 %
5. Lavar con la solución de lavado, 2 x 10 min.
6. Incubar con la solución de bloqueo, durante 1 hora a temperatura ambiente.
7. Incubar toda la noche en una cámara húmeda a 4°C, con el anticuerpo anti-FALDH de *A. thaliana* a una dilución 1:1000, en la misma solución de lavados.
8. Lavar 3 x 10 min con la solución de lavado.
9. Incubar con el segundo anticuerpo (anti-IgG conjugado cianina) a una dilución 1:300, durante 30 min y en oscuridad.
10. Lavar durante 15 min con la solución de lavado, cambiándola cada 5 min.
11. Lavar 2 X 5 min con la solución de lavado.
12. Montar el cubreobjetos utilizando la solución de montaje.

Solución de lavado

PBS	1 x
Triton	0,1 %

Solución de bloqueo

PBS	1 x
Triton	0,1 %
BSA	1 %
Suero normal de cabra	5 %

Tampón de digestión.

MES	25 mM
CaCl ₂ pH 5,5	8 mM
Manitol	0,6 M

Solución de montaje

Glicerol	6 g
Mowiol 40-88	2,4 g
Tris pH 8,5	0,2 M
H ₂ O	6 ml

- Tratamiento de los portaobjetos con poli-L-Lisina.

1. Limpiar los portaobjetos con HCl
2. Lavar con H₂O varias veces
3. Añadir una solución de poli-L-lisina, MW > 300000, a una concentración de 1mg/ml en agua estéril. Incubar un mínimo de 2h a temperatura ambiente.

16. Obtención de plantas transgénicas de *A. thaliana*.

16.1 Clonaje en el vector pDH 51.

El vector pDH51 se cortó con el enzima *Sma*I para crear extremos romos. Al mismo tiempo, el cDNA previamente clonado en el vector pBluescript SK +/- (Martínez. M. C, y col, 1996) se digirió con *Xho*I-*Eco*RI y se reparó con la T4 polimerasa para obtener extremos romos. Se realizó la ligación a una relación molar DNA vector: DNA inserto de 1:3. La mezcla de ligación se utilizó para transformar células competentes de la cepa de *E. coli* MC 1061, y los transformantes se seleccionaron en placas de LB-agar conteniendo 75 µg/ml de Ampicilina. La presencia del inserto se comprobó por digestión con *Eco*RI. Para averiguar la orientación de la FALDH con respecto al promotor 35 S, se utilizó el enzima de restricción *Bam*HI.

16.2 Construcción pBin19/FALDH.

Se digirió el vector pBin19 con el enzima de restricción *Eco*RI y la construcción pDH51- FALDH con el mismo enzima. Se realizó la ligación a una relación molar 1:3. La mezcla de ligación se utilizó para transformar células competentes de la cepa de *E. Coli* 1061, y los transformantes se seleccionaron en placas LB-agar conteniendo 30 µg/ml de kanamicina.

16.3 Transformación de *Agrobacterium tumefaciens*.

- Preparación de células competentes.

1. Inocular una colonia de *A. tumefaciens* C58C1(Zambryski y col., 1983) en 10 ml de YEP conteniendo 150 µg/ml de rifampicina. Incubar a 28°C con agitación, durante 24 h aproximadamente.
2. Inocular 50 µl del cultivo anterior en 50 ml de YEP conteniendo 150 µg/ml de rifampicina. Incubar a 28°C hasta obtener una DO₆₀₀ de 0,5 (20 h aproximadamente).

3. Centrifugar las células a 5000 rpm durante 5min a 4°C. A partir de este momento hay que mantener las células en frío y manipularlas con cuidado.
4. Resuspender suavemente el sedimento de células en 10 ml de solución de NaCl 0,15 M, atemperada a 4°C.
5. Repetir la misma centrifugación que en el punto 3 y resuspender el sedimento de células en 1ml de solución de CaCl₂ 20 mM, previamente enfriada en hielo.
6. Repartir las células competentes en alícuotas de 200 µl, congelarlas en nitrógeno líquido y guardarlas a -80°C.

- Transformación.

1. Añadir 1 µg de DNA plasmídico a una alícuota de 200 µl de células competentes, mezclar e incubar en hielo durante 30min.
2. Introducir la muestra en nitrógeno líquido durante 1 min y seguidamente en un baño a 37°C durante otro minuto.
3. Añadir 1 ml de medio YEP a la muestra e incubar durante 3-4 horas a 28°C con agitación suave.
4. Sedimentar las células transformadas centrifugando 5 min a 2000 r.p.m en una centrifuga Eppendorf .
5. Resuspender las células en 200 µl de medio YEP y sembrarlas en una placa de Petri con YEP suplementado con rifampicina (150 µg/ml) y kanamicina (25 µg/ml). Incubar las placas a 28°C protegidas de luz, durante 3 días aproximadamente (hasta la aparición de colonias).
6. Seleccionar algunas colonias e inocular con un cultivo de 3 ml de YEP con rifampicina (150 µg/ml) y kanamicina (60 µg/ml). Crecer los cultivos hasta saturación a 28°C y con agitación.

16.4 Infiltración al vacío de plantas de *A. thaliana*.

1. Crecer las plantas a 22°C con un fotoperiodo de 8 horas de luz y 16 horas de oscuridad, para potenciar el crecimiento de las hojas de la roseta basal. Al cabo de 4 semanas cambiar el fotoperiodo para que las plantas inicien el ciclo de reproducción.
2. Cuando las plantas tengan ya el tallo primario desarrollado, seccionarlo con un bisturí en la base para promover la aparición de tallos secundarios (interesa que las plantas a

transformar sean frondosas y contengan el mayor número posible de inflorescencias). Repetir esta operación 3 a 4 veces.

3. Cuando las plantas estén listas para ser infiltradas (8-9 semanas desde que fueron transplantadas), realizar una estría a partir de un cultivo congelado de *Agrobacterium* transformado con el DNA de interés, en una placa de medio YEP suplementado con kanamicina 30 µg/ml y rifampicina 50 µg/ml. Incubar a 28°C hasta que crezcan las colonias (aproximadamente dos días).

4. Escoger una colonia individual e inocular con ella un cultivo de 10 ml de medio YEP con kanamicina (30 µg/ml) y rifampicina (100 µg/ml). Crecer el cultivo durante 24 h con agitación a 200 rpm, y 28°C.

5. Inocular 1 ml del cultivo anterior en 750 ml de YEP con rifampicina (100 µg/ml) y kanamicina (30 µg/ml). Crecer el cultivo durante 24 h con agitación a 200 rpm, y 28°C.

6. Controlar el crecimiento del cultivo por determinación de la densidad óptica a 600 nm hasta que se obtenga un valor de 0,8 a 1. Sedimentar las células a 3000 rpm durante 15 min y 4°C.

7. Resuspender el sedimento celular en el volumen correspondiente de la solución de infiltración. Las células deben quedar resuspendidas en aproximadamente 1/3 de su volumen inicial.

8. Preparar los tiestos con las plantas a infiltrar retirando las hojas muertas y presionando la tierra fuertemente.

9. Montar el sistema de infiltración al vacío. Para ello es necesario una bomba de vacío (Teslar), un desecador y una trampa de frío situada entre ambos. Colocar en el interior del desecador un recipiente del tamaño adecuado, de manera que la parte aérea de las plantas quede sumergida en la solución de infiltración. Llenar el recipiente con la solución de infiltración y introducir la totalidad de la planta en el líquido. Cerrar el desecador, conectarlo mediante un tubo de goma a la bomba de vacío (70 msH) y aplicar 3 ciclos de vacío de 7 min cada uno (es importante romper el vacío entre cada ciclo, ya que las pequeñas heridas que se producen aumentan la eficacia de la infiltración).

10. Lavar las plantas con agua. Ponerlas a crecer en el incubador a 22°C en ciclo de día largo hasta la recolección de las semillas.

11. Para la selección de las semillas transgénicas, sembrar las semillas obtenidas en placas de Petri con medio GM-kanamicina (60 µg/ml), y transplantarlas después a tierra.

Solución de infiltración.

MS (Murashige & Skoog)	2,2 g
Gamborg	3,7 g
Sacarosa	50 g
MES	0,5 g
6-benzilaminopurina	0,044 µM
Tensioactivo Silwet L-77	0,002 %
Agua MilliQ hasta	1 l
Ajustar el pH a 7,5 con KOH	

La solución de infiltración se prepara en el momento de utilizarla y no es necesario autoclavarla.

17 Extracción de proteínas de las plántulas de *A. thaliana*.

Los extractos de proteínas para realizar medidas de actividad enzimática se utilizaron de inmediato, sin congelarlos, pues de lo contrario se observaban pérdidas importantes de actividad enzimática. Los extractos de proteínas para analizar por Western blot se guardaron a -20°C hasta su uso.

- Método.

1. Introducir la muestra (1,5-2 g) en un tubo Eppendorf y adicionar nitrógeno líquido. A continuación pulverizar con un émbolo metálico especialmente adaptado para tubos Eppendorf de 1,5 ml. Evitar que se evapore todo el nitrógeno antes de que la muestra este bien homogeneizada.
2. Una vez pulverizada la muestra, adicionar 150-200 µl de tampón de extracción y agitar bien en un Vórtex para que se disperse en el tampón, evitando la aparición de espuma.
3. Centrifugar durante 10 min a 15000 rpm y a 4°C.
4. Recuperar el sobrenadante y pasarlo a un tubo Eppendorf limpio.

Tampón de extracción de proteínas.

Tampón fosfato sódico, pH 8,0	0,1 M
DTT	0,5 mM.
PMSF	1 mM

18. Microscopía electrónica.

Se utilizaron plantas crecidas en medio líquido tal y como se explicó en el apartado 4.2.

- Procedimiento.

1. Fijación: incubar las muestras en la solución fijadora durante 24 h a 4°C.
2. Post fijación: tras varios lavados en tampón fosfato de sodio 0,1 M, incubar las muestras durante toda la noche en la solución de post fijación.
3. Lavados: lavar las muestras varias veces con agua destilada. El último lavado puede prolongarse toda la noche a 4°C si se desea.
4. Deshidratación:
 - Incubar las muestras en acetona al 50% durante 10 min a 4°C.
 - Incubar las muestras en acetona al 70% durante 20 min a 4°C, cambiando la solución cada 10 min.
 - Incubar las muestras en acetona al 90% a 4°C durante 30 min, cambiando de solución cada 10 min.
 - Incubar las muestras en acetona al 96% a 4°C durante 30 min, haciendo cambios de la solución cada 10 min.
 - Por último, incubar las muestras en acetona al 100% a 4°C durante 45 min, haciendo cambios de la solución cada 15 min.
5. Inclusión: se utilizó la resina Spurr's (Sigma- Aldrich):
 - Incubar las muestras en solución acetona 100%/resina (3/1) durante un mínimo de 1 hora.
 - Incubar las muestras en acetona 100%/resina (1/1) durante 6 horas.
 - Incubar las muestras en acetona 100%/resina (1/3) durante toda la noche, a 4°C.
 - Incubar las muestras en resina pura durante 7 hora.
 - Finalmente, realizar una nueva incubación de las muestras en resina pura durante toda la noche.

6. Observación al microscopio: Secciones ultra finas (60-80 nm) fueron montadas en las rejillas con 2% de acetato de uranilo y citrato de plomo. A continuación, las muestras fueron observadas en microscopio electrónico Hitachi H-600 AB (Hitachi, Ltd, Tokio, Japón).

Solución de fijación

Fosfato de sodio pH 7,4	0,1 M
Paraformaldehído	2 %
Glutaraldehído	2,5 %

Solucion de post-fijación

Fosfato de sodio pH 7,4	0,1 M
Tetróxido de osmio	1%
Ferrocianuro de potasio	0,8%