

5. Expresión y purificación de la proteína recombinante FALDH de *Arabidopsis thaliana*.

La expresión de la proteína recombinante se realizó mediante el vector pGEX-4T-2. La FALDH purificada se utilizó para la posterior purificación del anticuerpo anti-FALDH por cromatografía de afinidad.

La purificación se realizó en una sola etapa, mediante la unión a la resina de la GST, que se une al glutatión presente en el módulo “Bulk and RediPack” (casa comercial Amersham Pharmacia Biotech), quedando así la proteína de fusión recombinante retenida en la columna. La elución de la proteína de fusión se llevó a cabo mediante la digestión con trombina. Al final del proceso se obtuvo una proteína con un grado de pureza muy elevado, como puede comprobarse en la electroforesis en el gel de poliacrilamida-SDS, teñido con Coomassie Blue. Se observa una única banda de proteína con un peso molecular de aproximadamente 45 kDa, propio de la FALDH de *Arabidopsis* (Figura 30). A partir de 2 litros de cultivo de *E. coli* saturado se obtuvieron 4,84 mg de proteína pura. La actividad específica obtenida fue de 6.58 U/mg según los ensayos de actividad estándar. El rendimiento del proceso fue del 62.96 % (Tabla 11).

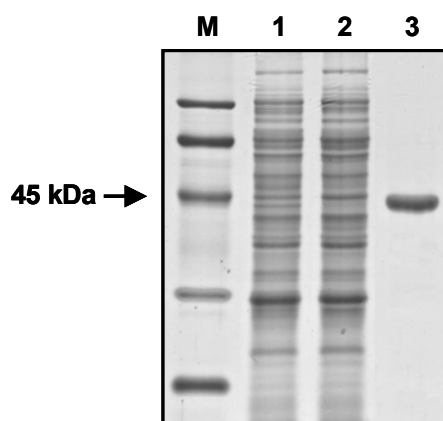


Figura 30. Determinación del grado de pureza y del peso molecular de la FALDH recombinante de *A. thaliana* mediante electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS al 12,5 % y tinción con Coomassie Blue. M: marcador de peso molecular (Bio-Rad); 1: homogenizado celular después de sonicar y centrifugar; 2: fracción de proteínas que no se unió a la resina; 3: proteína pura FALDH (2 μ g).

Etapa	Volumen (ml)	Proteína total (mg)	Actividad (U/ml)	Actividad total (U)	Actividad Esp. (U/mg)	Rendimiento (%)
Homogenado	97.50	825.82	0.52	50.70	0.06	100
Glutación-Sepharose	5.51	4.84	5.79	31.92	6.58	62.96

Tabla 11. Purificación de la FALDH recombinante de *A. thaliana*.

6. Purificación del anticuerpo anti-FALDH de *Arabidopsis thaliana*. Experimentos de competición para demostrar su especificidad.

En nuestro grupo se había obtenido y caracterizado un anticuerpo contra la FALDH de *Arabidopsis thaliana*, pero para usarlo en experimentos de inmunolocalización en tejidos decidimos purificarlo por cromatografía de afinidad. Para ello se utilizó una columna HiTrap NHS activada, de la casa comercial Amersham Pharmacia Biotech, en la cual se inmovilizó la proteína FALDH purificada.

Para determinar la dilución óptima de trabajo con el anticuerpo purificado utilizamos la técnica ELISA, donde diferentes diluciones del anticuerpo se incubaron con 10 ng de antígeno (FALDH pura) fijados en los pocillos de una placa multiter. Las diluciones utilizadas fueron: 1/50, 1/100, 1/250, 1/500, 1/1000, 1/2000, 1/3000 y 1/5000. Todas las diluciones se realizaron por duplicado. Las mediciones se realizaron con diferentes alícuotas de elución de la columna (Figura 31).

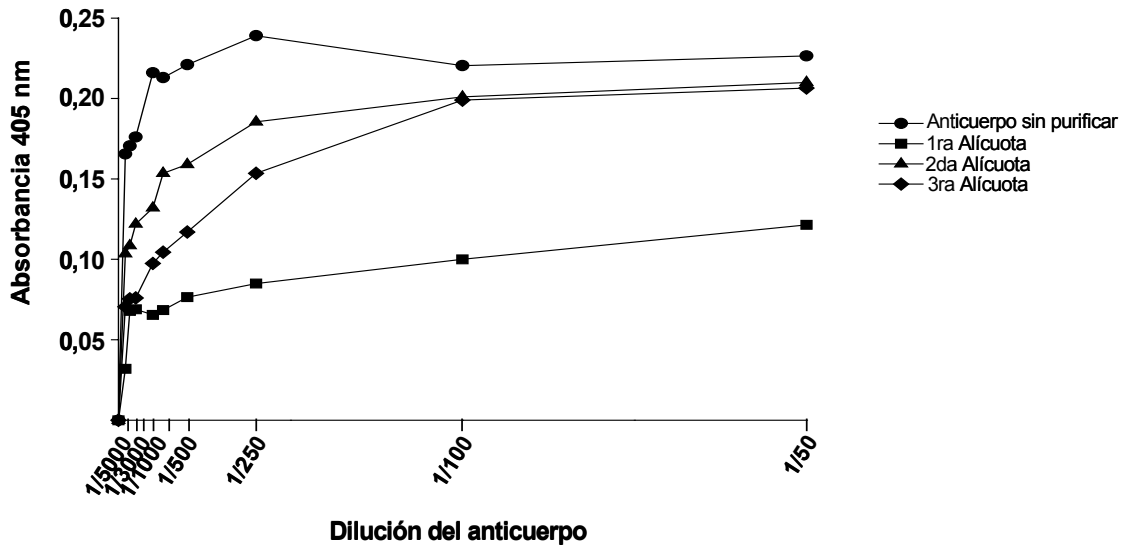


Figura 31. Determinación del título del anticuerpo anti-FALDH mediante ensayo inmunoenzimático ELISA. Se muestran las diferentes fracciones de elución de la columna HiTrap NHS activada de la casa comercial Amersham Pharmacia Biotech.

Como se puede apreciar en la figura 32, el anticuerpo purificado presenta un título menor que el anticuerpo sin purificar, siendo la segunda alícuota la que mayor título presenta.

7. Localización celular de la FALDH en plantas.

El enzima FALDH presenta una expresión elevada en todos los tejidos que se han analizado hasta el momento. Sin embargo, nunca se ha estudiado su expresión a nivel de tipo celular en plantas. Con la finalidad de conocer el patrón de expresión de la proteína de la FALDH se realizó en primer lugar un experimento de Western Blot utilizando extractos proteicos de raíz, tallo, hoja (caulinar y basal) y flor de plantas de *Arabidopsis thaliana* (Figura 32).

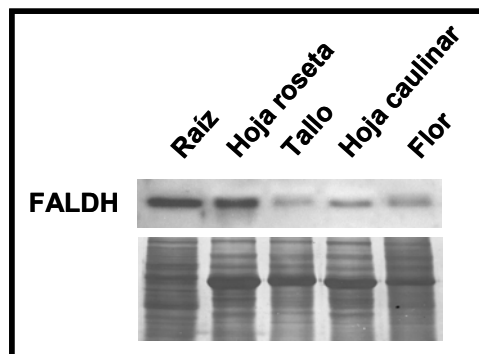


Figura 32. Análisis mediante Western Blot de la expresión de la FALDH en diferentes tejidos de la planta de *Arabidopsis thaliana*. Se analizaron 20 μg de un extracto de proteínas totales de cada uno de los tejidos en estudio. En la parte inferior se muestra la membrana teñida con Coomassie Blue.

Tal como se muestra en la Figura 32, observamos la presencia de la FALDH en todos los tejidos aunque la expresión en raíz y en la hoja de la roseta es mucho mayor. Estos resultados difieren de los obtenidos anteriormente en nuestro grupo, donde se mostraba que los niveles de RNA eran similares en todos los tejidos (Martínez et al., 1996).

7.1 Inmunolocalización de la FALDH en secciones de raíz de *Raphanus sativus*.

El estudio de la expresión de la FALDH en raíces se realizó en la crucífera *Raphanus sativus*. Esta especie tiene la ventaja de presentar una raíz mucho más gruesa que la de *Arabidopsis* lo que facilita su manipulación y la posterior observación al microscopio.

A nivel anatómico, se puede diferenciar la raíz madura en tres regiones: la región meristemática, la región de elongación y la región de diferenciación (Figura 33). La zona meristemática comprende el meristemo apical de la raíz y regiones cercanas, donde la frecuencia de división celular es alta. La zona de elongación se sitúa por encima de la región meristemática, y se caracteriza porque las células aumentan en longitud, lo que permite la elongación de la raíz y su penetración en el suelo. Esta región va seguida de

la región de diferenciación o maduración, en la cual tiene lugar la diferenciación definitiva de todos los tipos celulares y se caracteriza por la aparición de pelos en la epidermis.

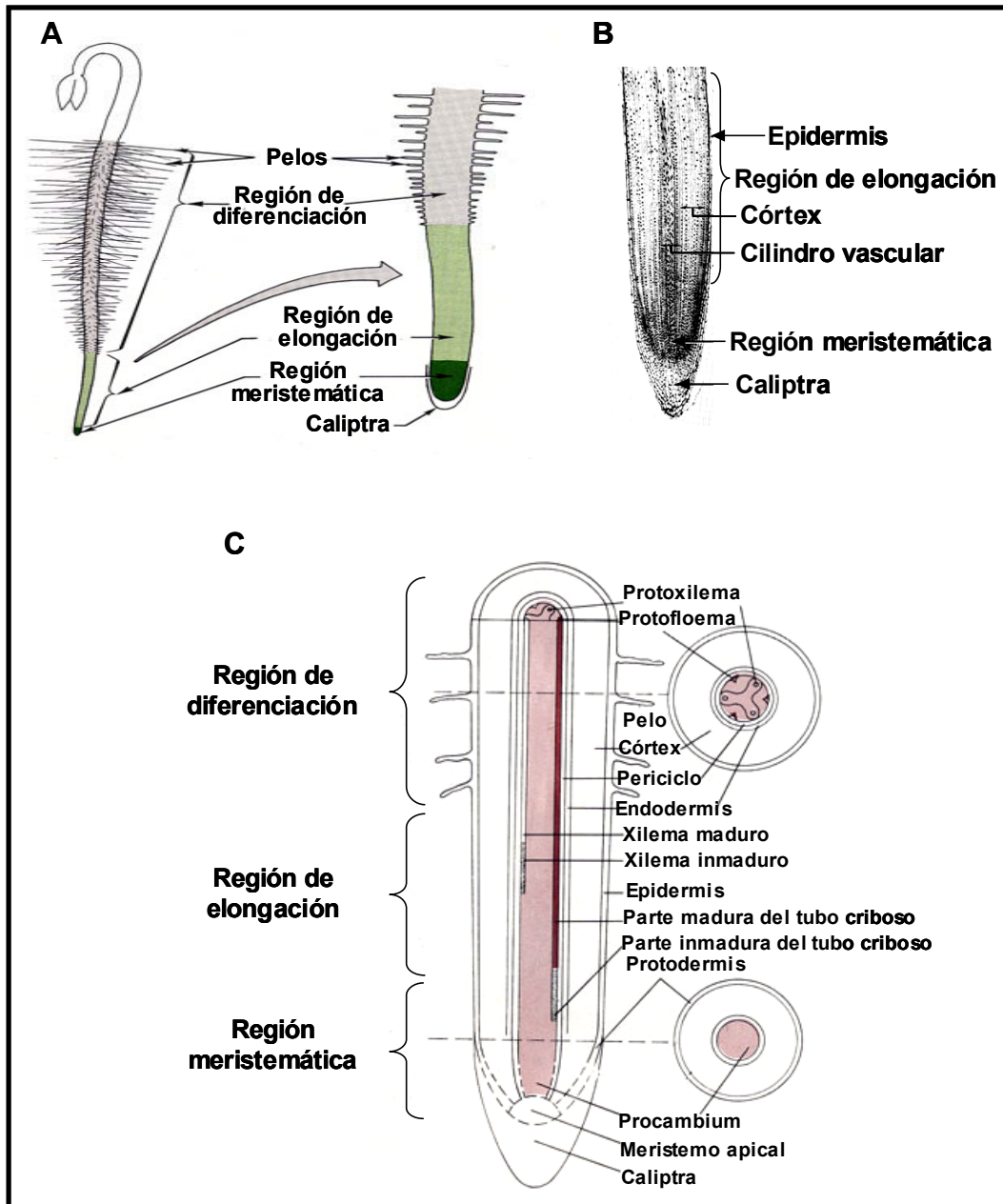


Figura 33. A: Diagrama general que muestra las diferentes regiones de la raíz de rábano. B: Representación fotográfica de un corte longitudinal de la raíz de rábano. C: Esquema detallado de los distintos tipos celulares en cada región.

El meristemo apical de la raíz ocupa una posición subterminal ya que se encuentra recubierto por la caliptra, un conjunto de células con función de resistencia. En la raíz de rábano, la región meristemática está formada por 3 capas de células denominadas iniciales, la división continuada de las cuales origina los diferentes tipos celulares de la raíz: la más apical da lugar a la caliptra y a la epidermis, la capa intermedia al córtex y a la endodermis y la más interna al sistema vascular y al periciclo.

La zona de elongación es a la vez una zona de división celular y una zona de expansión celular. El balance de estos procesos varía a lo largo de la raíz, decantándose a favor de la división en la proximidad a la zona meristemática. No obstante, ya es posible distinguir los tipos celulares parcialmente diferenciados (protodermis, córtex y procambium) que darán lugar a los tres tejidos principales de la raíz madura (epidermis, córtex y tejido vascular). La endodermis, que consta de una capa celular, representa el límite interno de la raíz y separa el córtex del procambium. Las células del córtex se vacuolizan rápidamente y muestran planos de división periclinales y anticlinales que permiten el crecimiento de las raíces tanto longitudinalmente como en anchura. El procambium se encuentra en activa división celular y no se diferenciará a vasos funcionales (floema y xilema) hasta la región de diferenciación. Las células fundamentales del floema son los elementos cribosos, que conducen los productos de la fotosíntesis. Además de estos elementos, el floema contiene células parenquimáticas especializadas, conocidas como células acompañantes. Cada segmento de tubo criboso puede estar unido a una o varias células acompañantes.

En la parte más distal de la región de elongación, la protodermis da lugar a la epidermis. En esta región, las células del córtex se encuentran ya completamente diferenciadas y no presentan actividad mitótica. En el cilindro vascular, puede distinguirse el periciclo, el parénquima estelar y los vasos conductores denominados floema y xilema. El periciclo es una capa de células adyacentes a la endodermis que conserva la capacidad de dividirse, y es el lugar a partir del cual se originan las raíces

laterales. El parénquima estelar tiene la función de apoyo de los vasos conductores y suministra células precursoras durante los procesos de maduración del floema y el xilema.

Para determinar la localización de la FALDH se utilizó el anticuerpo anti-FALDH purificado (Apartado 6). En todos los ensayos de inmunolocalización, se utilizaron 2 controles: el primero fue realizando un experimento de competición, por medio de la pre-incubación del anticuerpo con 30 μ g de la proteína pura FALDH (purificada tal y como se describe en el Apartado 5 de este capítulo); el segundo control se realizó incubando el tejido sólo con el anticuerpo secundario, que proveía la casa comercial (Kit Universal Elite Vectastain ABC, Vector Laboratories). La dilución utilizada del anticuerpo anti-FALDH fue de 1/100. Todas las imágenes fueron capturadas con la cámara Hamamatsu C5310 CCD adaptada al microscopio óptico Leica DMRD.

Cuando se estudiaron cortes transversales de la región de elongación de la raíz de *Raphanus sativus*, pudimos apreciar una señal intensa en la epidermis, el cambium y el periciclo (Figuras 34 y 35). Además se observó señal en la primera capa de células del córtex adyacente a la epidermis y en las células acompañantes del floema. Sin embargo, en las células más internas del córtex no encontramos presencia de la proteína FALDH. La aparente señal que se observa en el xilema es inespecífica y se debe a la refringencia de la gruesa pared celular que rodea a este tipo celular.

Para tener más información acerca de la localización de la FALDH en raíz de rábano, realizamos el mismo experimento de inmunolocalización en cortes longitudinales. En la Figura 36 se puede observar que la FALDH está presente en todos los tipos celulares de la región meristemática, y también en la caliptra y la epidermis. En la zona más distal de la región de elongación, se localiza solamente en el periciclo y en la epidermis, pero no en el córtex (Figura 36 E y F).

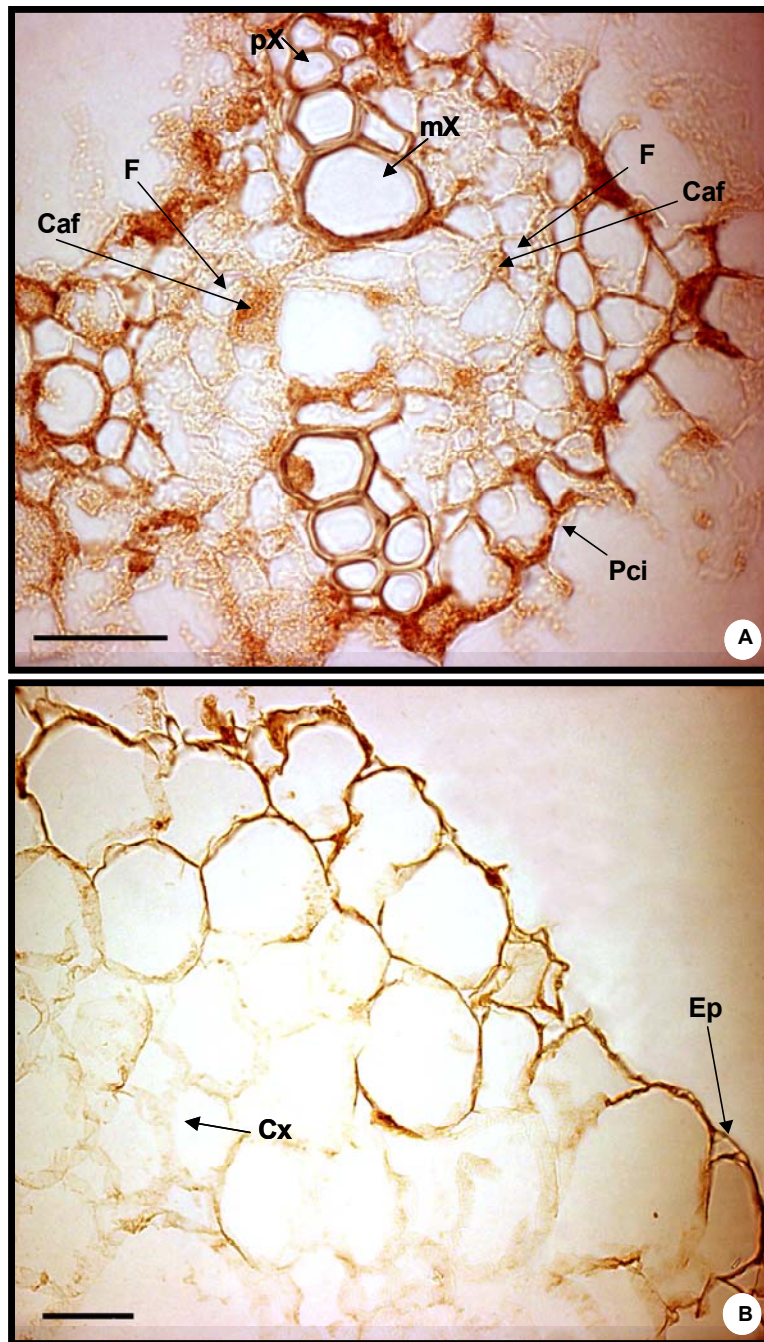


Figura 34. Inmunolocalización de la FALDH en secciones transversales de raíz de *Raphanus sativus*. Las abreviaturas utilizadas son las siguientes: pX, protoxilema; mX, metaxilema; F, floema; Caf; célula acompañante del floema; Pci, periciclo; Ep, epidermis; Cx, córtex. Barras de calibración: A 25 μm ; B, 50 μm .

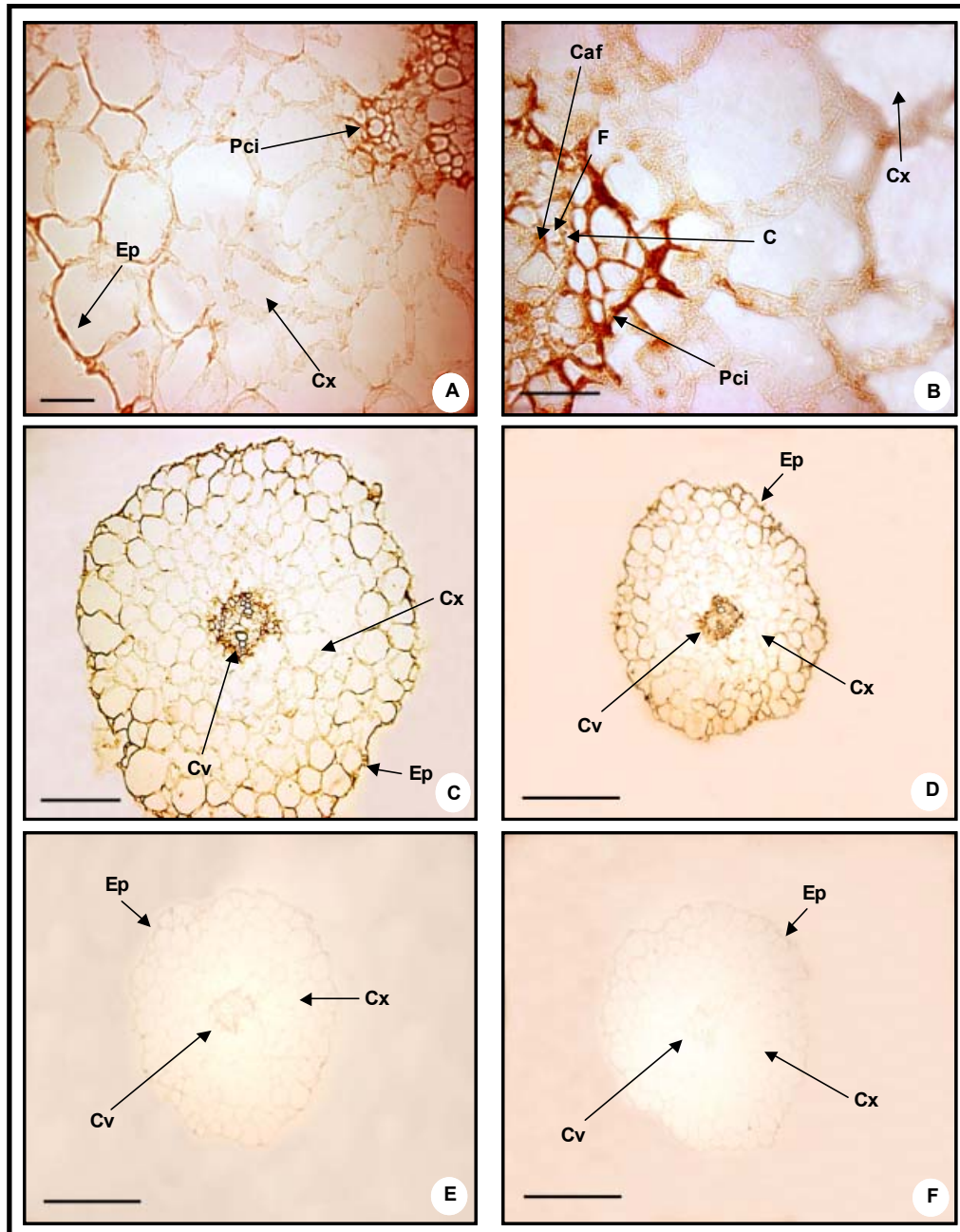


Figura 35. Inmunolocalización de la FALDH en secciones transversales de raíz de *Raphanus sativus*. A, B, C y D corresponden a la inmunodetección de la FALDH. E es el control negativo correspondiente al experimento de competición, donde el anticuerpo anti-FALDH fue pre-incubado durante 1 hora con 30 μg de la proteína recombinante pura (FALDH). F representa el control negativo utilizando solamente el anticuerpo secundario. Las abreviaturas utilizadas son las siguientes: Ep, epidermis; C, cambium; F, floema; Caf; célula acompañante del floema; Pci, periciclo; Cx, córtex, Cv, cilindro vascular. Barras de calibración: A, 50 μm ; B, 25 μm ; C, 150 μm ; D, E y F, 300 μm .

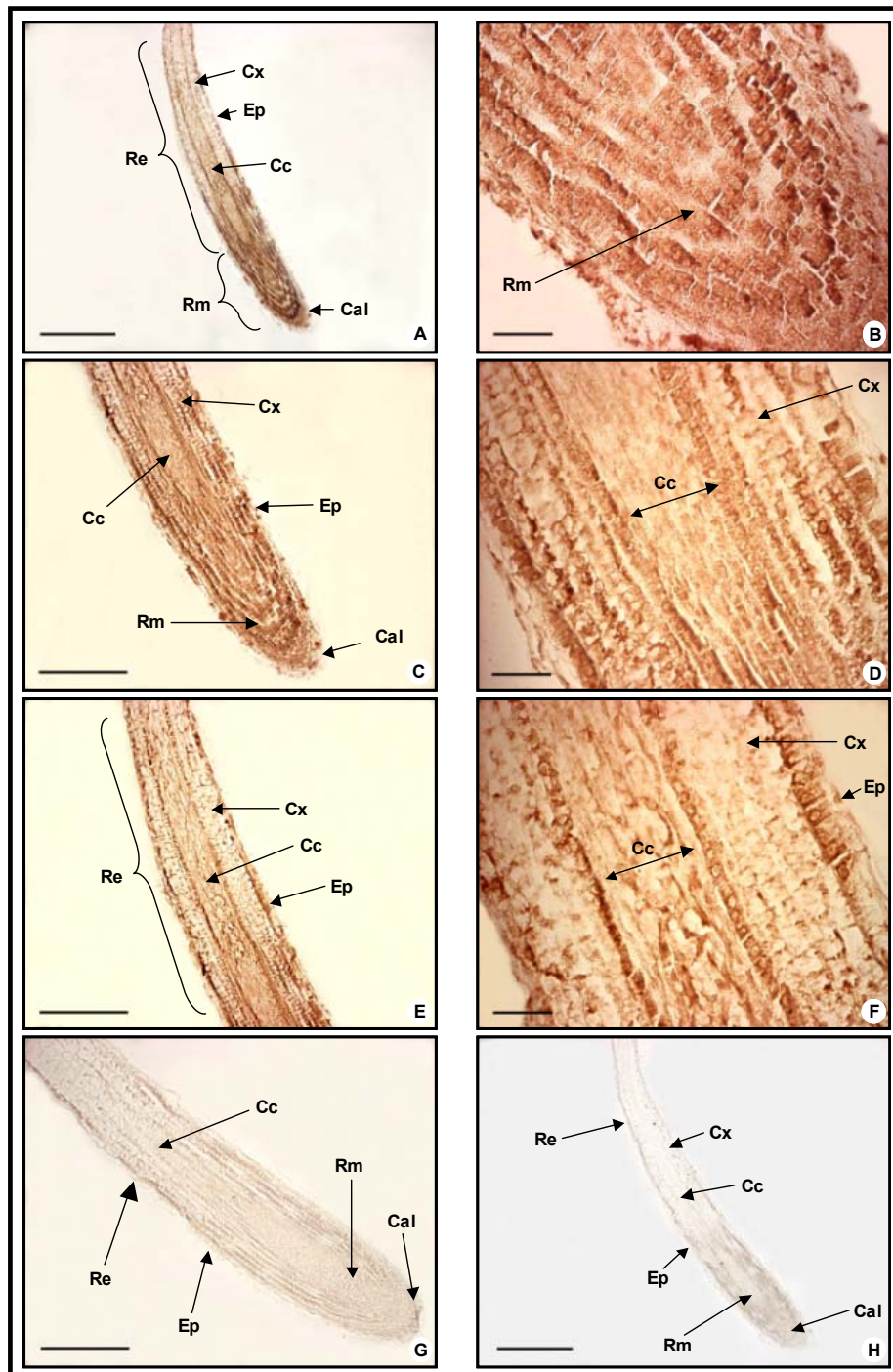


Figura 36. Inmunolocalización de la FALDH en secciones longitudinales de raíz de *Raphanus sativus*. A, B, C, D, E y F corresponden a la inmunodetección de la FALDH. D corresponde a la región de elongación más cercana a la región meristemática. F corresponde a la región de elongación más alejada de la región meristemática. G es el control negativo correspondiente al experimento de competición, donde el anticuerpo anti-FALDH fue pre-incubado durante 1 hora con 30 μg de la proteína recombinante pura (FALDH). H representa el control negativo utilizando solamente el anticuerpo secundario. Las abreviaturas utilizadas son las siguientes: Ep, epidermis; Cx, córtex; Cc, cilindro central; Cal, caliptra; Rm, región meristemática; Re, región de elongación. Barras de calibración: A y H, 500 μm ; B, D y H, 50 μm ; C, E y G 300 μm .

7.2 Inmunolocalización de la FALDH en secciones transversales de hoja de *Arabidopsis thaliana*.

Histológicamente, la hoja está compuesta de tres tipos de sistemas de tejidos: epidermis, mesófilo y tejidos vasculares (Figura 37).

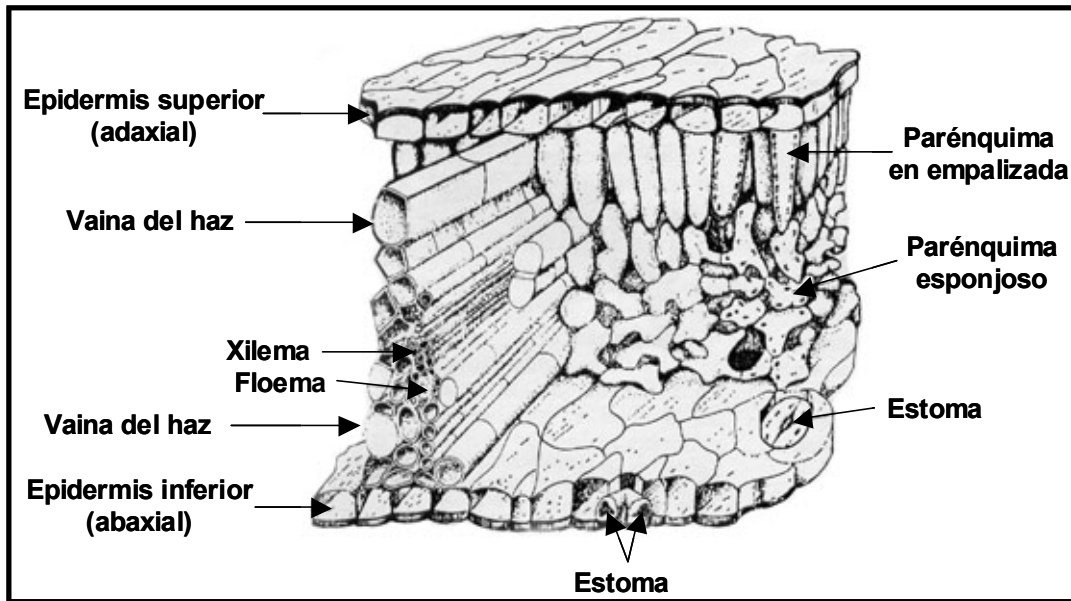


Figura 37. Representación tridimensional de una corte de hoja (Extraído de Fahn, 1985).

La epidermis de hojas de distintas plantas varía en cuanto a número de capas, forma, estructura, disposición de los estomas, tipos y disposición de tricomas y existencia de células especializadas. Dada la estructura normalmente aplanada de la hoja, se hace una distinción entre los tejidos epidérmicos de las dos superficies foliares: la superficie de la hoja más próxima al entrenudo superior, y que normalmente mira hacia arriba, se denomina epidermis adaxial; la otra superficie se denomina epidermis abaxial.

El mesófilo es el tejido parenquimático situado entre la epidermis adaxial y la abaxial. Normalmente el mesófilo sufre una diferenciación para dar lugar a los tejidos

fotosintéticos y, por ello, sus células contienen cloroplastos. En plantas dicotiledóneas, pueden distinguirse dos tipos de parénquima: el parénquima en empalizada y el parénquima esponjoso. Las células del parénquima en empalizada son alargadas, y en una sección transversal de la hoja tienen apariencia tubular y se encuentran dispuestas en hileras. Las células en empalizada se encuentran inmediatamente debajo de la epidermis, pueden disponerse en una o varias capas y la altura de las células de las distintas capas puede ser igual o hacerse menor hacia el centro del mesófilo. El tejido en empalizada se encuentra normalmente en la superficie adaxial de la hoja. Las células del parénquima esponjoso tienen distintas formas. Pueden parecerse a las células del parénquima en empalizada o ser isodiamétricas, o alargadas en dirección paralela a la superficie de la hoja. Sin embargo, es una característica del parénquima esponjoso la presencia de lóbulos que contactan con los de las células vecinas. La posibilidad de distinguir entre parénquima en empalizada y esponjoso no siempre es fácil, especialmente cuando el primero tiene varias capas. En este último caso, las células más internas se parecen mucho a las del parénquima esponjoso. El sistema vascular principal o nervio central se localiza en el centro de la hoja y se desarrolla de manera similar al mesófilo (Fahn, 1985).

La formación y maduración de las hojas adultas a partir de los primordios foliares del meristemo apical vegetativo, es un proceso que en *Arabidopsis* se prolonga durante 20 días aproximadamente (Donnelly et al., 1999) por lo que es importante conocer con exactitud en que momento se recolecta la muestra para la inmunolocalización. Los resultados que se presentan a continuación se han obtenido trabajando con la tercera y cuarta hoja de la roseta de *Arabidopsis*, recolectadas y fijadas 10 días después de la germinación de las semillas. En este estadio, las hojas no han completado su desarrollo, lo que determina las características de las diferentes tipologías celulares.

Se trabajó con el anticuerpo anti-FALDH purificado (Apartado 6) para evitar la obtención de señales inespecíficas. En todos los ensayos de inmunolocalización, se utilizaron 2 controles: el primero fue realizando un experimento de competición, por

medio de la pre-incubación del anticuerpo con 30 μg de la proteína pura FALDH (purificada tal y como se describe en el Apartado 5 de este capítulo); el segundo control se realizó incubando el tejido sólo con el anticuerpo secundario, que proveía la casa comercial (Kit Universal Elite Vectastain ABC, Vector Laboratories). La dilución utilizada del anticuerpo anti-FALDH fue de 1/100. Todas las imágenes fueron capturadas con la cámara Hamamatsu C5310 CCD adaptada al microscopio óptico Leica DMRD.

En la hoja de *Arabidopsis* observamos expresión de la FALDH en la mayoría de los tejidos. En la Figura 38 se puede apreciar una señal intensa en las células del mesófilo, particularmente en los cloroplastos. En cuanto al cilindro vascular sólo se detectó señal en el cambium y el floema. La aparente señal que se observa en el xilema es inespecífica debido a la refringencia de la pared celular (el xilema presenta una pared celular gruesa lo que hace que aumente la refringencia). En la Figura 39 A y C se puede observar también una señal muy intensa en un tricoma, lo que es compatible con el elevado contenido de glutatión en este tejido y su función en defensa. Sin embargo, no observamos señal ni en la epidermis adaxial ni en la abaxial (Figuras 39 B, C, y D). Tampoco detectamos la FALDH en la capa de células parenquimáticas que se encuentran justo debajo del cilindro vascular (Figuras 38, 39 B).

Para confirmar estos resultados y estudiar si el patrón de expresión variaba por sobreexpresión de la FALDH, realizamos la inmunolocalización en hoja de una línea transgénica de sobreexpresión, utilizando como control la planta sin transformar (wt). Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 40. Como se puede apreciar el patrón de expresión es exactamente idéntico en ambas líneas, observándose señal en el mesófilo, especialmente en los cloroplastos, el cambium y también en el floema. No se observó la proteína en estudio en las epidermis adaxial y abaxial y tampoco en la capa de células parénquimáticas que se encuentran justo debajo del cilindro vascular. En estos experimentos, el tiempo de incubación con el sustrato de la peroxidasa fue menor debido a una mayor cantidad de antígeno en la línea de sobreexpresión (Figura 40 A y B).

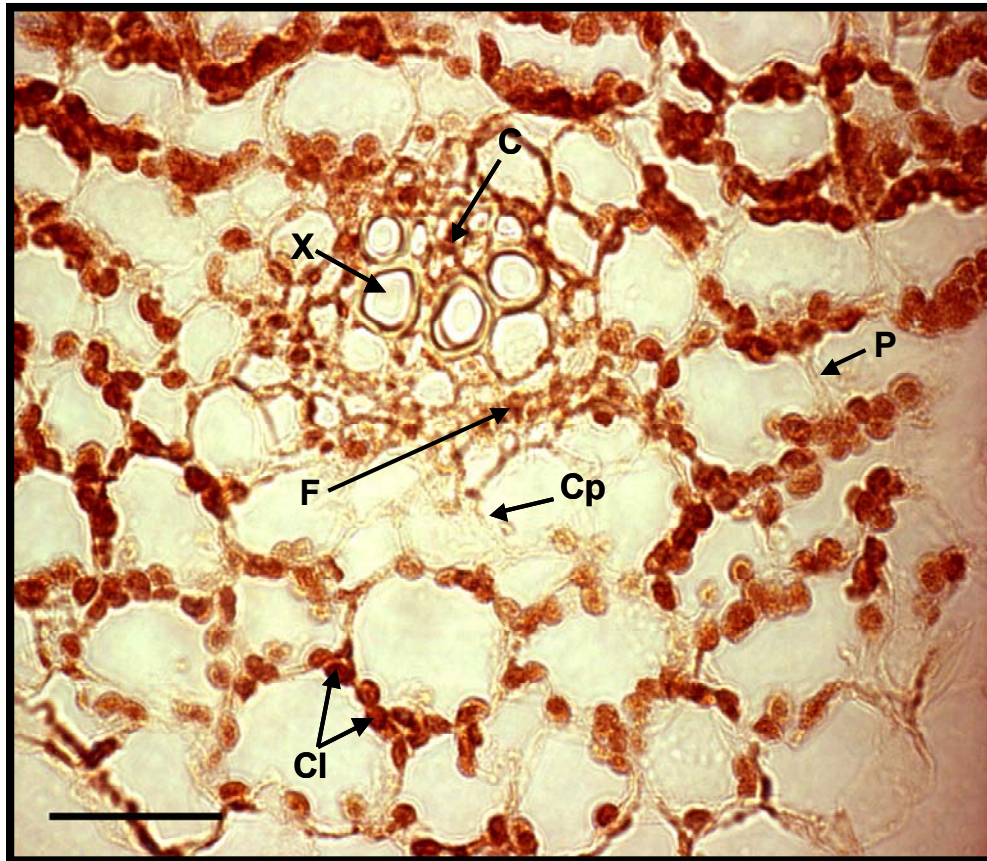


Figura 38. Inmunolocalización de la FALDH en hoja de *Arabidopsis thaliana*. Las abreviaturas utilizadas son las siguientes: C, cambium; X, xilema; F, floema; P, pared celular; Cl, cloroplasto; Cp, capa celular parenquimática. Barra de calibración: 25 μ m.

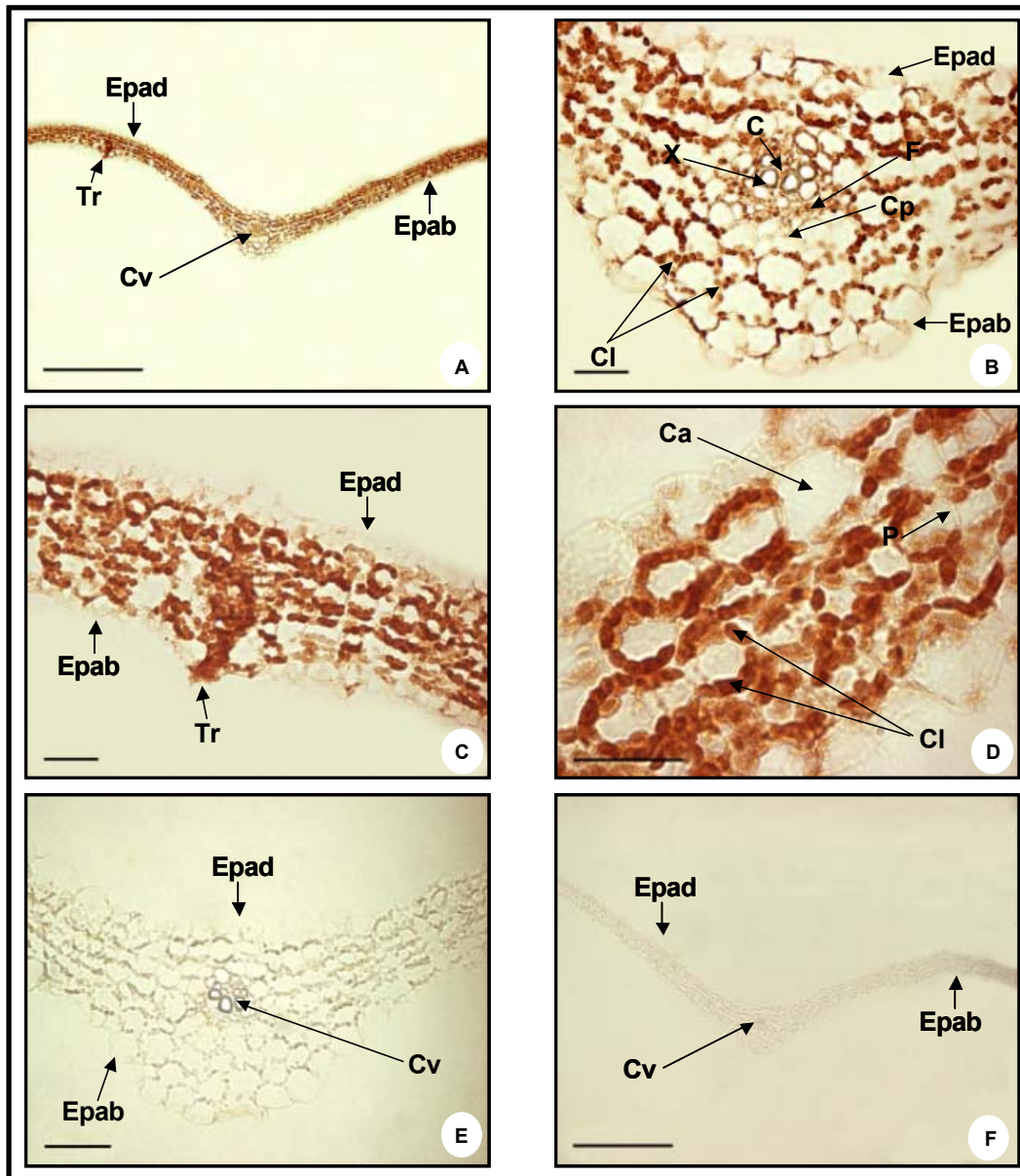


Figura 39. Inmunolocalización de la FALDH en hoja de *Arabidopsis thaliana*. A, B, C y D corresponden a la inmunodetección de la FALDH. E es el control negativo correspondiente al experimento de competición, donde el anticuerpo anti-FALDH fue pre-incubado durante 1 hora con 30 μg de la proteína recombinante pura (FALDH). F representa el control negativo utilizando solamente el anticuerpo secundario. Las abreviaturas utilizadas son las siguientes: C, cambium; X, xilema; F, floema; P, pared celular; Cl, cloroplasto; Cp, capa celular parenquimática; Epad, epidermis adaxial; Epab, epidermis abaxial; Cv, cilindro vascular; Tr, tricoma; Ca, cavidad de aire. Barras de calibración: A y F, 300 μm ; B y C, 25 μm ; D, 20 μm ; E, 50 μm .

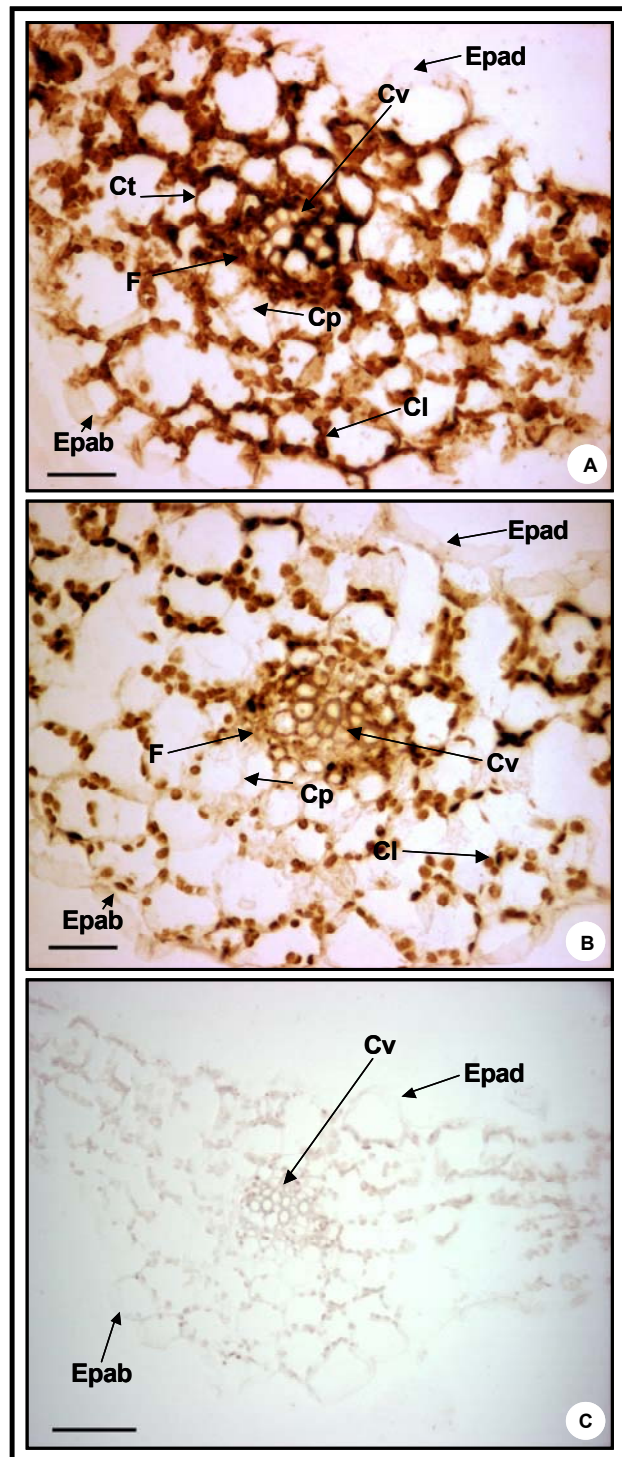


Figura 40. Inmunolocalización de la FALDH en hoja de *Arabidopsis thaliana*. A y B indican la inmunodetección de la FALDH. A corresponde a la línea transgénica de sobreexpresión de la FALDH. B corresponde a la línea sin transformador (wt). C es el control negativo correspondiente al experimento de competición, donde el anticuerpo anti-FALDH fue pre-incubado durante 1 hora con 30 μg de la proteína recombinante pura (FALDH). Las abreviaturas utilizadas son las siguientes: F, floema; Cl, cloroplasto; Ct, citoplasma; Cp, capa celular parenquimática; Epad, epidermis adaxial; Epab, epidermis abaxial; Cv, cilindro vascular. Barras de calibración: A y B, 25 μm ; C, 50 μm .

7.3 Localización de la FALDH en hoja de *Arabidopsis* por técnicas de microscopía electrónica.

Como se ha mostrado en apartados anteriores, la hoja de *Arabidopsis thaliana* presenta un elevado nivel de proteína FALDH. Por tal motivo, decidimos estudiar su localización subcelular por microscopía electrónica.

Los ensayos de inmunodetección se llevaron a cabo con el anticuerpo anti-FALDH purificado (Apartado 6) obteniéndose los mejores resultados a una dilución de 1:250. Como anticuerpo secundario se utilizó la proteína A unida a partículas de oro. Los controles negativos utilizados fueron el anticuerpo secundario solamente y el anticuerpo anti-FALDH pre-incubado con 30 μ g de proteína pura recombinante (FALDH).

Las Figuras 41, 42 y 43 muestran que la proteína FALDH está presente en los cloroplastos, el núcleo y el citoplasma. En cambio, no observamos marcaje en la pared celular, ni en la vacuola, ni en las mitocondrias. Los experimentos se realizaron en plantas de *Arabidopsis* wt y en plantas transgénicas de sobreexpresión, portadoras de una construcción de fusión entre el promotor CaMV35S y el cDNA de la FALDH (Achkor et al., 2003), observándose la misma localización en ambos casos.

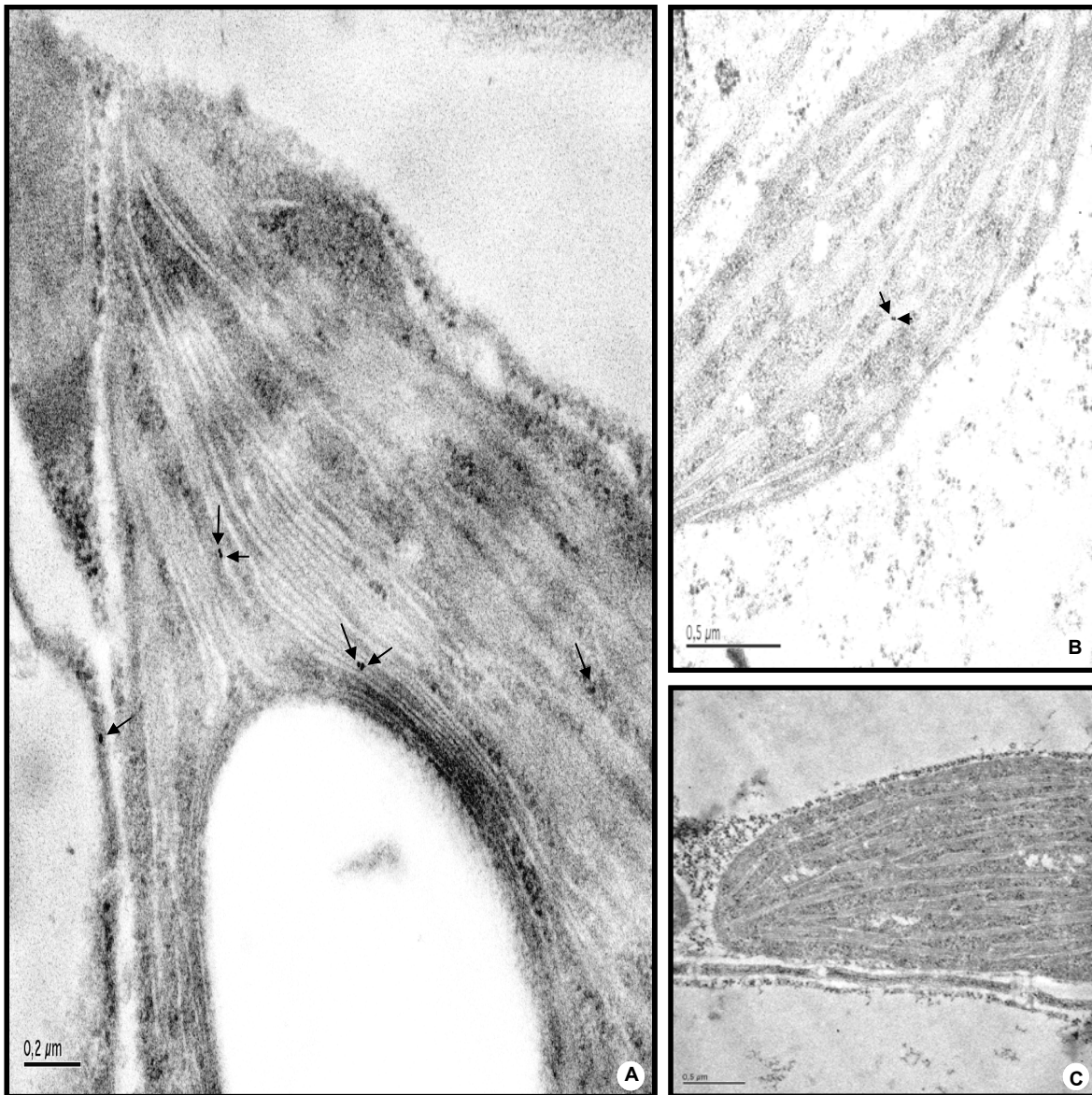


Figura 41. Microfotografías electrónicas de cloroplastos en cortes ultrafinos del mesófilo de hoja de 8 días. La inclusión se realizó en la resina Lowicryl K4M. Las flechas indican la presencia de las partículas de oro unidas a la proteína A, que fue utilizada como anticuerpo secundario. La dilución del anticuerpo primario fue de 1:250. A: corresponde al corte de la hoja de la planta transgénica de sobreexpresión. B: corte de la hoja de la planta de *Arabidopsis* sin transformar (wt). C: control negativo donde el anticuerpo anti-FALDH fue pre-incubado con 30 μg de proteína pura recombinante FALDH.

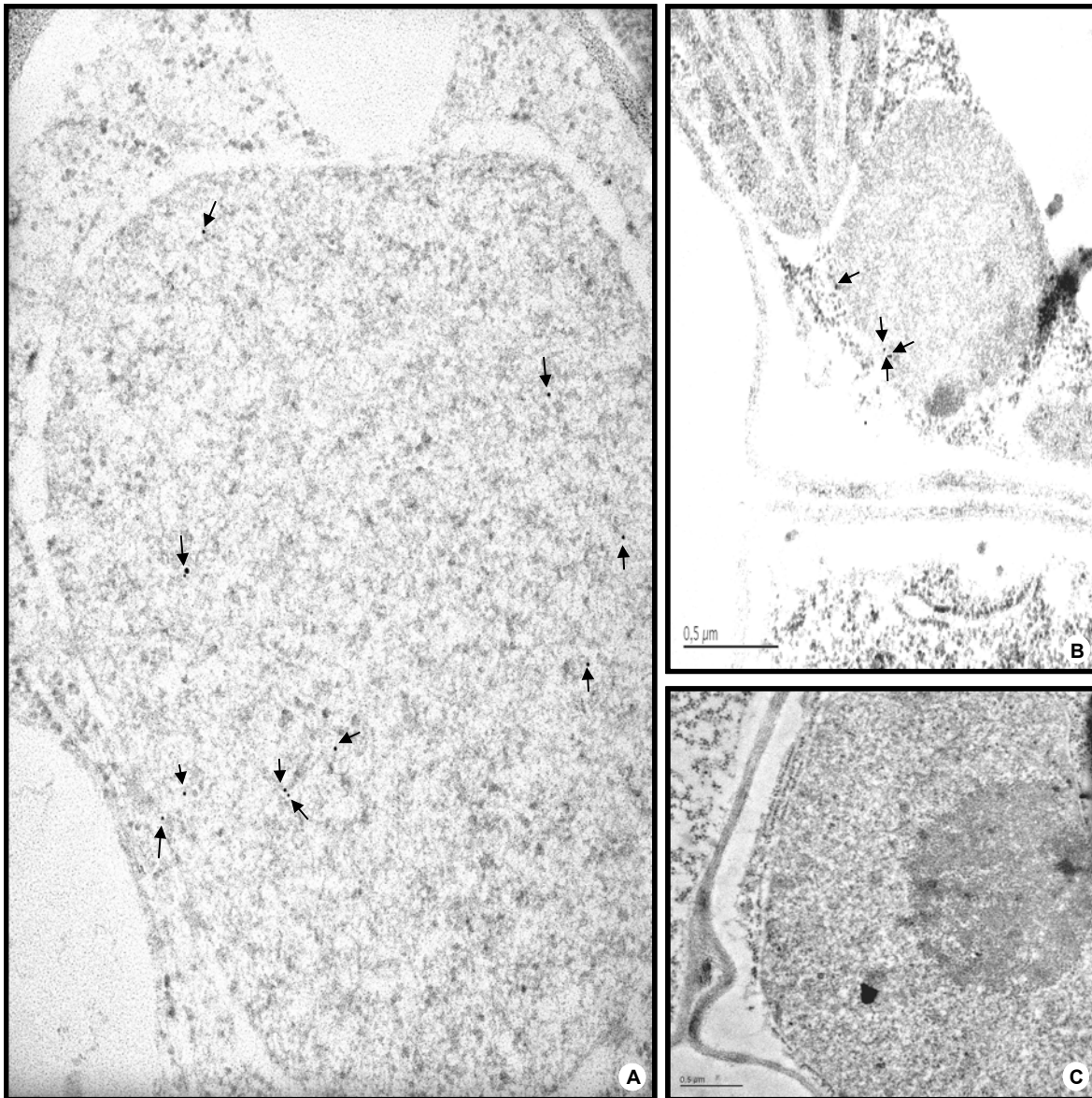


Figura 42. Microfotografías electrónicas de núcleos en cortes ultrafinos del mesófilo de hoja de 8 días. La inclusión se realizó en la resina Lowicryl K4M. Las flechas indican la presencia de las partículas de oro unidas a la proteína A, que fue utilizada como anticuerpo secundario. La dilución del anticuerpo primario fue de 1:250. A: corresponde al corte de la hoja de la planta transgénica de sobreexpresión. B: corte de la hoja de la planta de *Arabidopsis* sin transformar (wt). C: control negativo donde el anticuerpo anti-FALDH fue pre-incubado con 30 μg de proteína pura recombinante FALDH.

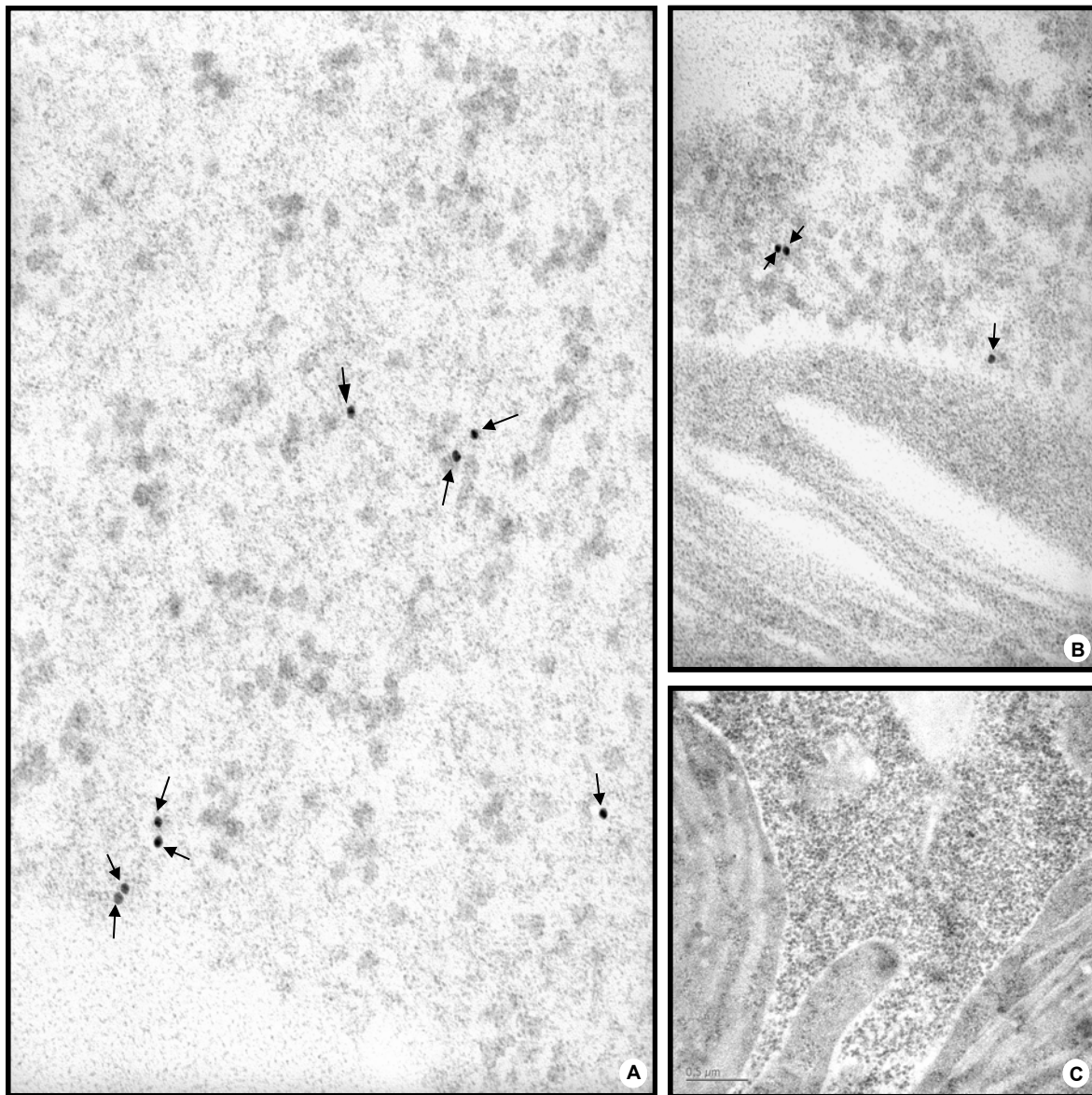


Figura 43. Microfotografías electrónicas del citoplasma en cortes ultrafinos del mesófilo de hoja de 8 días. La inclusión se realizó en la resina Lowicryl K4M. Las flechas indican la presencia de las partículas de oro unidas a la proteína A, que fue utilizada como anticuerpo secundario. La dilución del anticuerpo primario fue de 1:250. A: corresponde al corte de la hoja de la planta transgénica de sobreexpresión. B: corte de la hoja de la planta de *Arabidopsis* sin transformar (wt). C: control negativo donde el anticuerpo anti-FALDH fue pre-incubado con 30 μ g de proteína pura recombinante FALDH.