

A. PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA FALDH DE *A. THALIANA*

1. Obtención del extracto de proteínas totales.

Se partió de un extracto proteico obtenido a partir de células en cultivo de *A. thaliana* (línea T87-C3). La homogeneización del tejido era uno de los factores importantes durante el proceso de la extracción proteica, debido a la dificultad que presenta la pared celular vegetal. En el homogenado no pudimos detectar actividad formaldehído deshidrogenasa debido a la gran dilución de la muestra. Por ello, se concentró la misma empleando distintos métodos como la liofilización, la ultrafiltración (Amicon), y la precipitación con sulfato amónico.

Los resultados obtenidos mostraron que con la liofilización la FALDH perdía el 100% de su actividad enzimática, al contrario de lo que sucede con otras alcohol deshidrogenasas (Bicsak y col., 1982). La ultracentrifugación con el Amicón dió lugar a una pérdida del 30% de la actividad de la proteína. En cambio, la precipitación con sulfato amónico, a una concentración del 90% de saturación, permitió conservar el 90% de la actividad enzimática.

Los primeros intentos para detectar la presencia de la actividad formaldehído deshidrogenasa dependiente de glutatión (FALDH) en homogenado concentrado, no tuvieron éxito. Sin embargo, se detectó una ligera actividad oxidante de glutatión cuando se ensayaba la actividad en presencia de glutatión reducido y NAD^+ (actividad glutatión reductasa), y una actividad oxidante de formaldehído en presencia de NAD^+ que no necesitaba la presencia de glutatión (actividad formaldehído deshidrogenasa independiente de glutatión).

Por esta razón se optó por continuar adelante el proceso de purificación y determinar la actividad FALDH después de la primera etapa de purificación a través de una columna de DEAE-Sepharosa.

2. Cromatografía de intercambio iónico en DEAE-Sepharosa.

El homogenado concentrado de *A. thaliana* se aplicó a una columna de DEAE-Sepharosa CL-6B equilibrada con el tampón 10 mM Tris/HCl pH 7,5, 0,5 mM DTT. Se efectuó un lavado con el mismo tampón y posteriormente se aplicó un gradiente

lineal de 0 a 0,18 M de NaCl. El perfil de esta cromatografía se presenta en la figura 10. La actividad formaldehído deshidrogenasa se eluyó a una conductividad de 6 mS/cm. Las fracciones con actividad FALDH fueron recogidas y concentradas. Tras concentrar las fracciones correspondientes al pico de actividad FALDH, el concentrado se dializó frente al tampón 10 mM Tris/HCl, pH 7,5, 0,5 mM DTT. A continuación se aplicó sobre una columna de intercambio aniónica por HPLC.

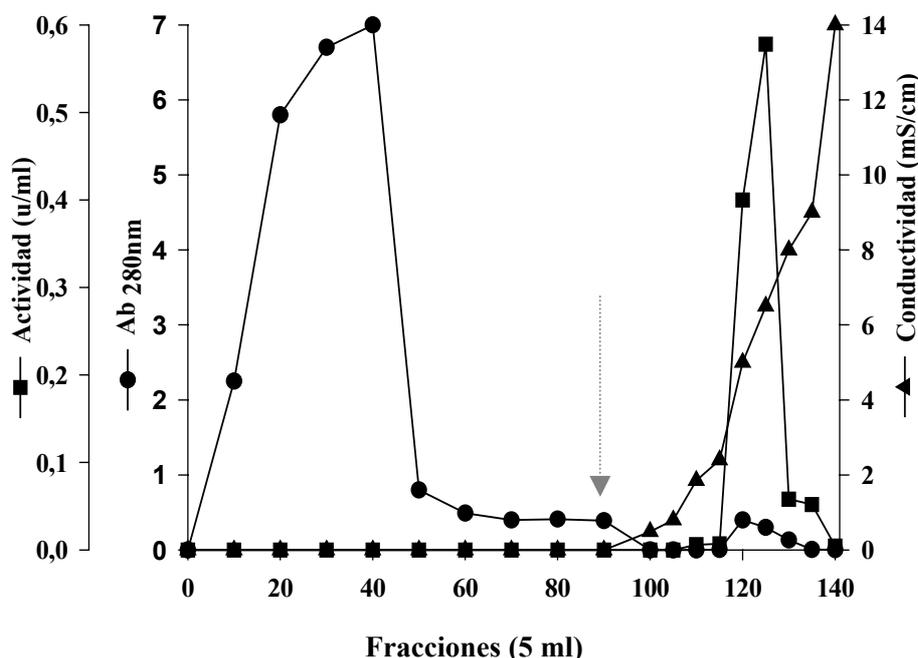


Figura 10. Perfil de la cromatografía en DEAE-Sepharosa a pH 7,5. La flecha indica el inicio del gradiente de NaCl.

El pico de actividad enzimática FALDH procedente de la cromatografía sobre DEAE-Sepharosa, se analizó también por electroforesis en geles de almidón y posterior tinción con dos tipos de sustratos, el formaldehído (preparado a partir de paraformaldehído) y el alcohol crótilico. La tinción por actividad formaldehído deshidrogenasa, con formaldehído y glutation como sustratos, mostró la presencia de dos bandas mayoritarias con migración anódica a pH 8 (Figura 11, carril 2). La tinción con alcohol crótilico mostró la presencia de una banda adicional con migración mas anódica que las anteriores (Figura 11, carril 1), que correspondería a la actividad alcohol deshidrogenasa activa con etanol (alcohol deshidrogenasa clase P) (Shafqat y

col., 1996). Como control, se utilizó homogenado de *S. cerevisiae* revelado por tinción con formaldehído, glutatión reducido y NAD⁺, detectándose la presencia de varias bandas anódicas, tal como se describe en Fernández y col., (1995) (Figura 11, carril 3).

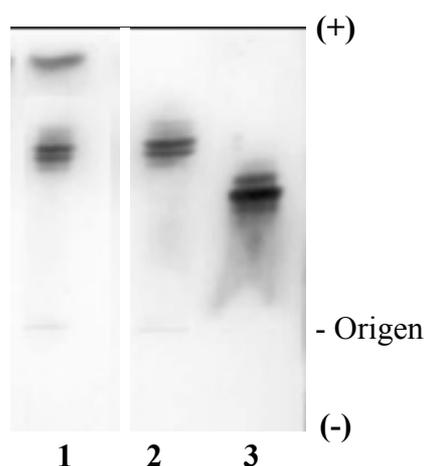


Figura 11. Análisis de la FALDH mediante electroforesis en geles de almidón teñidos por actividad.

1. Bandas de actividad alcohol deshidrogenasa de *A. thaliana* detectadas por tinción con alcohol crotilico.
2. Bandas de actividad FALDH de *A. thaliana* detectadas por tinción con formaldehído más glutatión.
3. Bandas de actividad FALDH a partir de extractos crudos de *S. cerevisiae* detectadas por tinción con formaldehído más glutatión.

3. Cromatografía de intercambio aniónico por HPLC.

El pico de actividad FALDH procedente de la cromatografía en DEAE-Sepharosa fué introducido en una columna de intercambio aniónico fuerte, Protein-Pack Q 8HR (Biorad). La columna se equilibró con el tampón Tris/Acetato 1 M, DTT 0,5 mM, pH 6,6. Antes de aplicarse a la columna, la muestra fue centrifugada a 14.000 rpm para eliminar posibles partículas sólidas. La actividad FALDH quedó totalmente retenida en la resina, siendo posteriormente eluída con un gradiente de acetato de sodio 0-300 mM. La actividad FALDH se correspondió con el pico eluído a partir del minuto 25 (Figura 12).

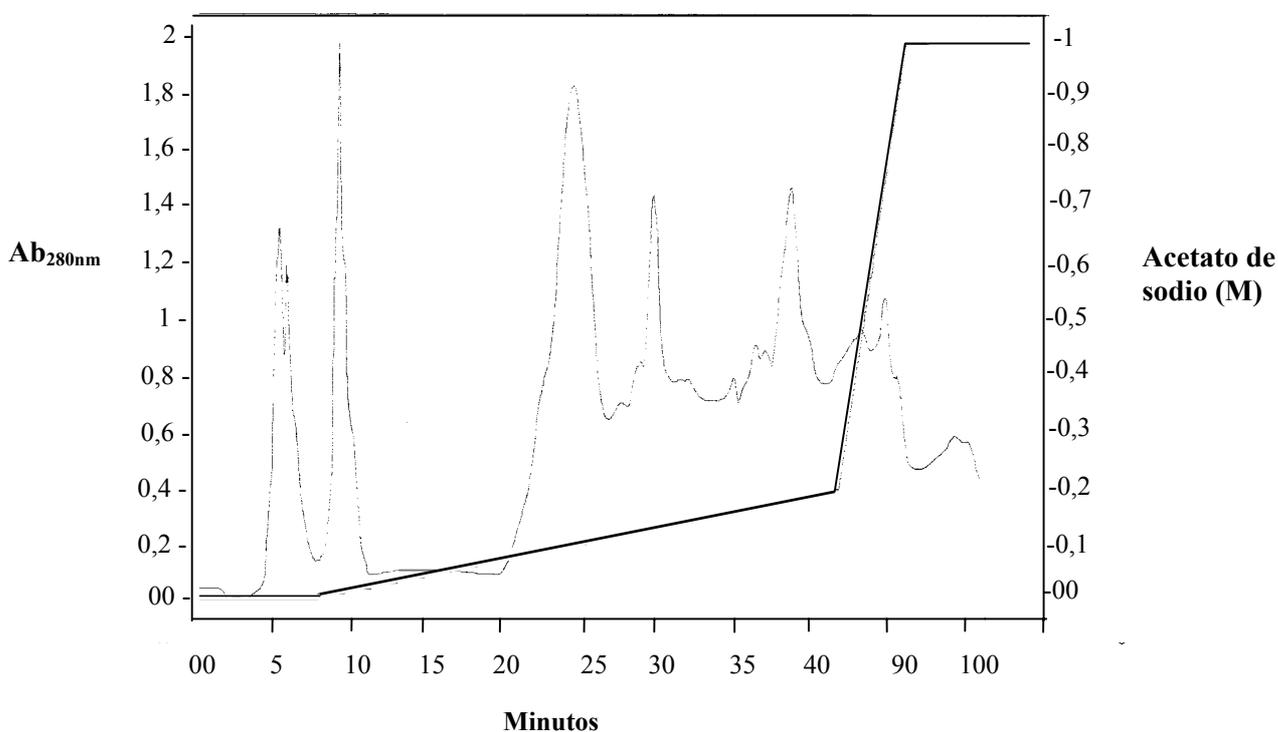


Figura 12. Perfil de elución de la cromatografía en Protein-Pack Q 8HR.

4. Cromatografía de afinidad en Blue-Sepharosa.

La siguiente etapa de purificación consistió en una cromatografía de afinidad sobre Blue-Sepharosa. El pico procedente de la cromatografía de HPLC, fue concentrado y a continuación dializado y aplicado sobre una columna de Blue-Sepharosa, equilibrada con el tampón Tris/HCl 10 mM pH 7,5, 0,5 mM DTT. El pico de actividad se obtuvo después de aplicar un gradiente lineal de NADH de 0-0,5 M (Figura 13).

Una vez recogidas las fracciones correspondientes al pico de actividad, el exceso de NADH fue extraído aplicando la muestra sobre una columna PD-10 equilibrada con el tampón Tris/HCl 10 mM pH 7,5, DTT 0,5 mM.

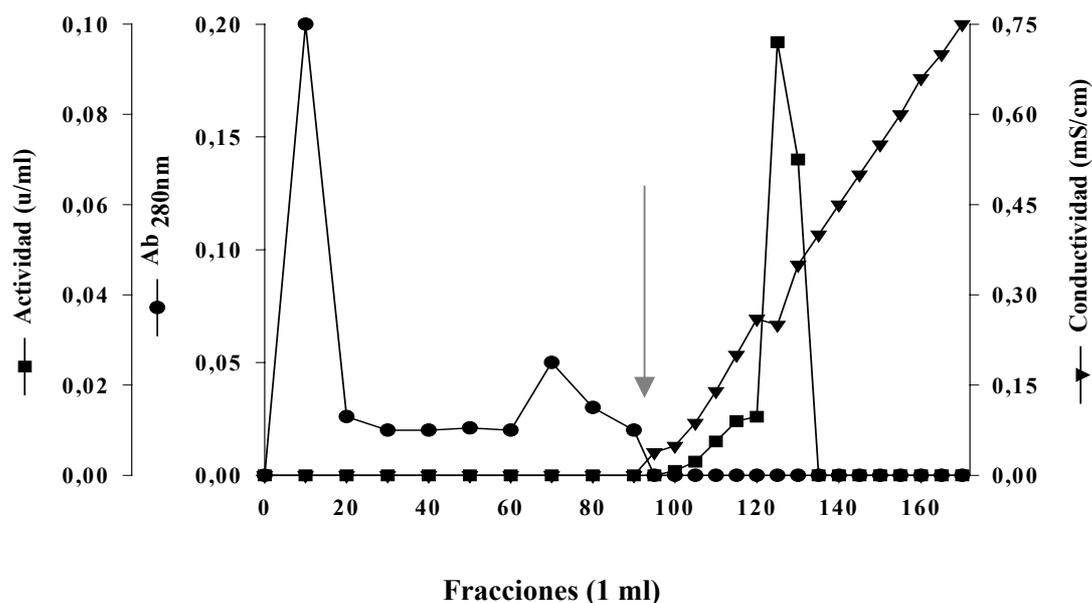


Figura 13. Perfil de elución de la cromatografía en Blue-Sepharosa. La flecha indica el inicio del gradiente de NADH

5. Análisis del grado de pureza del enzima.

El grado de pureza de la FALDH al final del proceso de purificación se determinó por electroforesis en un gel de poliacrilamida con SDS, que se tiñó con sales de plata. Se obtuvo como resultado una sola banda, que correspondió a un peso molecular de unos 45.000 Da (Figura 14).

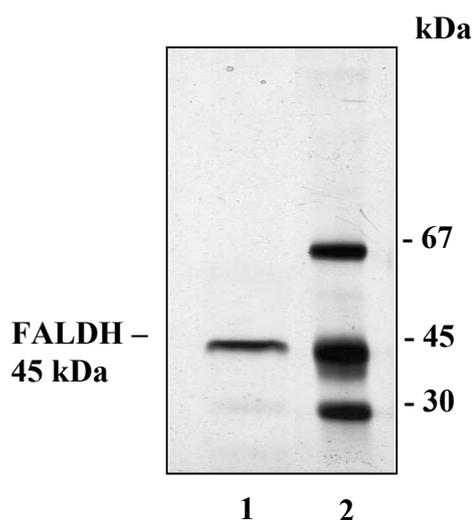


Figura 14. Determinación del grado de pureza y del peso molecular de la FALDH en condiciones desnaturalizantes, mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS y tinción con sales de plata.

1. Fracción eluida de la cromatografía en Blue-Sepharosa.
2. Patrones de Peso Molecular.

6. Resumen del proceso de purificación de la FALDH de *A. thaliana*.

En la tabla 1 se exponen los resultados obtenidos a lo largo del proceso de purificación, y que se comentan a continuación.

A partir de 459 g de células de *A. thaliana* (línea celular T87), se obtuvieron, tras la cromatografía en HPLC, 0,67 mg de proteína de elevado grado de pureza, aunque no totalmente homogénea. De éstos, solo una fracción fue aplicada a una columna de Blue-Sepharosa, obteniéndose 0,14 mg de FALDH totalmente homogénea, según la electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS, teñida con sales de plata. Ya que los datos finales corresponden sólo a una fracción de la proteína de partida, no se ha podido calcular el rendimiento del proceso de purificación

Tabla 3. Resumen del proceso de purificación de la FALDH de *A. thaliana*.

| Etapa | Proteína total (mg) | Actividad total (u) | Actividad específica (u/mg) | Factor de purificación |
|-------------------|---------------------|---------------------|-----------------------------|------------------------|
| Sobrenadante | 459 | 4,2 | 0,009 | 1 |
| DEAE-Sepharosa | 7,4 | 6,12 | 0,8 | 88,8 |
| Protein-PackQ 8HR | 0,67 | 0,64 | 0,95 | 105,5 |
| Blue-Sepharosa* | 0,14 | 0,4 | 2,8 | 311 |

Se utilizaron ~ 459 g de células de *A. thaliana* T87. Las actividades se midieron en tampón fosfato de sodio 0,1 M, pH 8,0, a 25°C, en presencia de formaldehído 1 mM, glutatión 1 mM y NAD⁺ 4 mM. Los valores de proteína total se determinaron mediante Bradford.

* Solo una fracción de 10 ml (la que presentaba la máxima actividad FALDH) procedente de la cromatografía en Protein Pack Q 8HR se utilizó para la cromatografía en Blue-Sepharosa.

7. Estudio físico-químico de la FALDH de *A. thaliana*.

7.1 Análisis por inmunodetección en Western blot.

Se probó si el anticuerpo anti-FALDH de rata era capaz de reconocer la FALDH de *A. thaliana* en preparaciones de proteína parcialmente pura. Para ello se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS, se transfirieron las proteínas a una membrana y seguidamente se realizó la detección, utilizando como anticuerpo primario un anticuerpo policlonal anti-FALDH de rata (Boleda, 1990) a una dilución de 1:1000.

Como sistema de detección se utilizó un anticuerpo secundario conjugado con la fosfatasa alcalina (BioRad).

El anticuerpo anti-FALDH de rata reconoció una banda de 45.000 Da, indicando una similitud estructural entre la FALDH de *A. thaliana* y de rata (Figura 15).

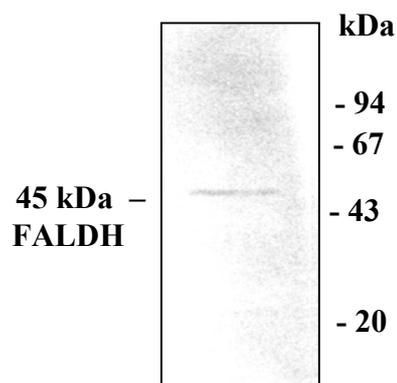


Figura 15. Western blot de la FALDH después de la última etapa de purificación en Blue-Sepharosa.

7.2 Determinación del punto isoeléctrico.

La electrofocalización analítica de la FALDH de *A. thaliana* en un gel de isoelectroenfoque de intervalo de pH 3-9, mostró la existencia de dos bandas con valores de punto isoeléctrico de 5,3 y 5,6 respectivamente (Figura 16).

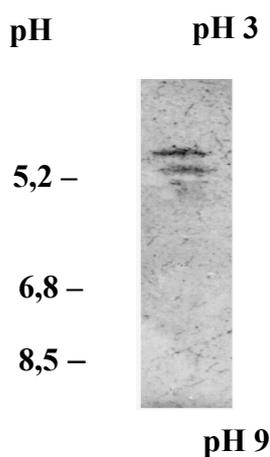


Figura 16. Electrofocalización analítica de la FALDH *A. thaliana*. El gel de electroforesis fue revelado por actividad, en presencia de formaldehído 1 mM, glutatión 1 mM y NAD^+ 4 mM.

8. Caracterización enzimática de la FALDH de *A. thaliana*.

La purificación de la FALDH de *A. thaliana* a partir de la línea celular T87, nos permitió extraer muy poca cantidad de proteína (140 µg), por lo que nos fue imposible realizar un estudio cinético completo del enzima.

Sin embargo, pudimos demostrar que la FALDH de *A. thaliana* presenta una gran afinidad por el S-hidroximetilglutatió, obteniendo una Km de 7 µM. El enzima es también activo con 1 mM octanol. En cambio es inactivo con etanol a una concentración de 33 mM.

9. Expresión de la Formaldehído deshidrogenasa de *A. thaliana* en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

La expresión de proteínas en sistemas heterólogos es una moderna metodología que ha abierto infinitas posibilidades en el tradicional campo de la química de proteínas. Esta técnica permite la obtención de grandes cantidades de proteína o péptido objeto de estudio.

En nuestro caso, la purificación de la FALDH a partir de tejido de la planta, dió como resultado la obtención de muy poca cantidad de proteína (140 µg), hecho que no nos permitió realizar la determinación de las constantes cinéticas del enzima en diferentes condiciones de experimentación. Frente a este problema, pensamos en expresar el enzima en un sistema heterologo, como es *S. cerevisiae*. Esto nos permitió tener un sistema de sobreproducción de la proteína para poder purificarla y estudiar su comportamiento cinético, así como para obtener un anticuerpo.

9.1 Clonación en el vector pUC18.

El clonaje se realizó en dos etapas: primero se clonó la zona codificante del cDNA de la FALDH de *A. thaliana* en el vector pUC18 de *E. coli*, y a continuación el fragmento de DNA correspondiente se clonó en el vector de expresión de *S. cerevisiae* pYES2.

Se utilizó la reacción de PCR para amplificar la zona codificante del cDNA de la FALDH de *A. thaliana* previamente clonado en el vector pBluescript SK +/- (Martínez y col., 1996). Con los cebadores ARAB1 y ARAB2, se introdujo el sitio de restricción *KpnI* en el extremo 5', previo al ATG. El sitio de restricción *KpnI* era necesario para poder clonar fácilmente el cDNA en el vector de expresión pYES2. Una vez finalizada

la reacción de PCR, se realizó un análisis electroforético de los productos resultantes, para comprobar la existencia del DNA del tamaño esperado (1200 pb) (Figura 17).

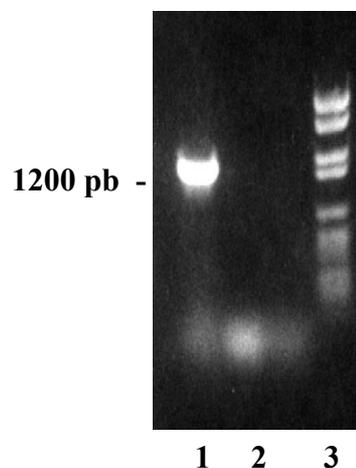


Figura 17. Electroforesis en gel de agarosa al 1%, del producto de amplificación por PCR obtenido a partir del cDNA de *A. thaliana*.

1. Producto de la amplificación
2. Control negativo: contiene toda la mezcla de la amplificación excepto el DNA.
3. Marcadores de Peso molecular.

Para realizar el primer clonaje, el producto de amplificación se reparó con el fragmento de Klenow de la DNA polimerasa I, con el fin de obtener extremos romos. El DNA reparado se ligó en el vector pUC18 cortado con el enzima *Sma*I. La presencia del fragmento FALDH en los clones seleccionados como positivos se comprobó mediante la reacción de la PCR, y también por digestión con el enzima de restricción *Kpn*I.

9.2 Subclonación en el vector de expresión pYES2.

Elegimos como vector de expresión en levadura el pYES2, un vector multicopia que dirige un gran nivel de expresión en levadura. Dicho plasmido, de 6000 pb, posee una región con múltiples sitios de clonación, adyacente al promotor inducible por galactosa GAL1. Además posee el gen uracilo como marcador de selección (Figura 18).

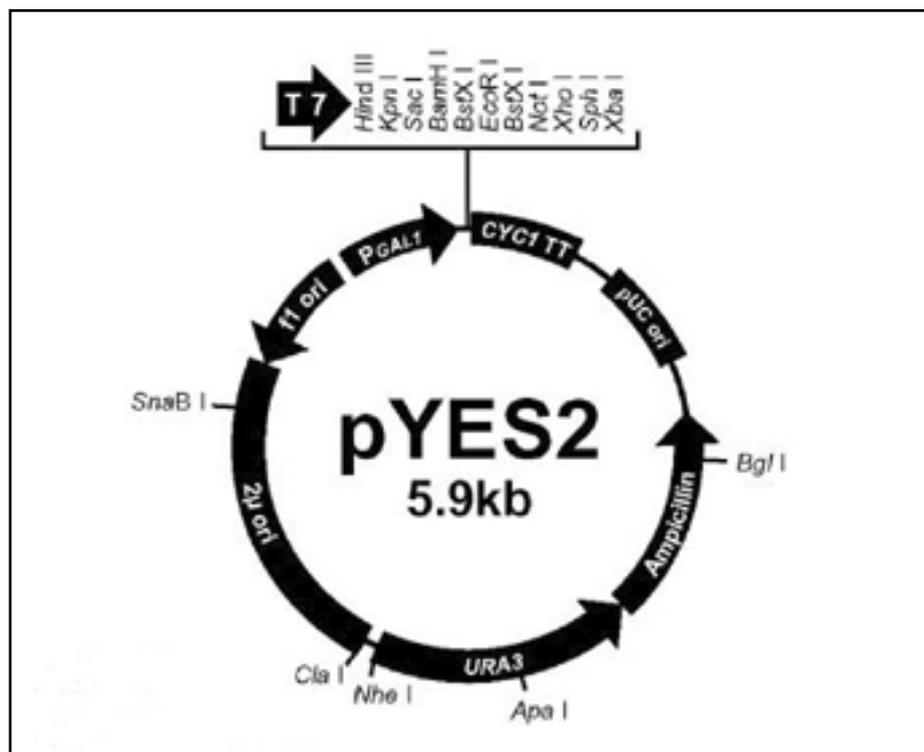


Figura 18. Vector usado en la expresión de la FALDH de *A. thaliana* en levadura.

El plasmido pYES2 se cortó con el enzima de restricción *KpnI*. La construcción pUC18-FALDH fue digerida también con *KpnI* para liberar el DNA a clonar. El DNA liberado del vector pUC18 fue subclonado en el vector de expresión pYES2 bajo el control del promotor GAL1. La figura 19 muestra el mapa de restricción del inserto y de las zonas adyacentes a él, y la figura 20 las digestiones realizadas para comprobar la presencia del inserto en uno de los clones seleccionados y su orientación frente al promotor. La orientación del inserto FALDH con respecto al promotor GAL1 era importante para que la expresión pudiera tener lugar.

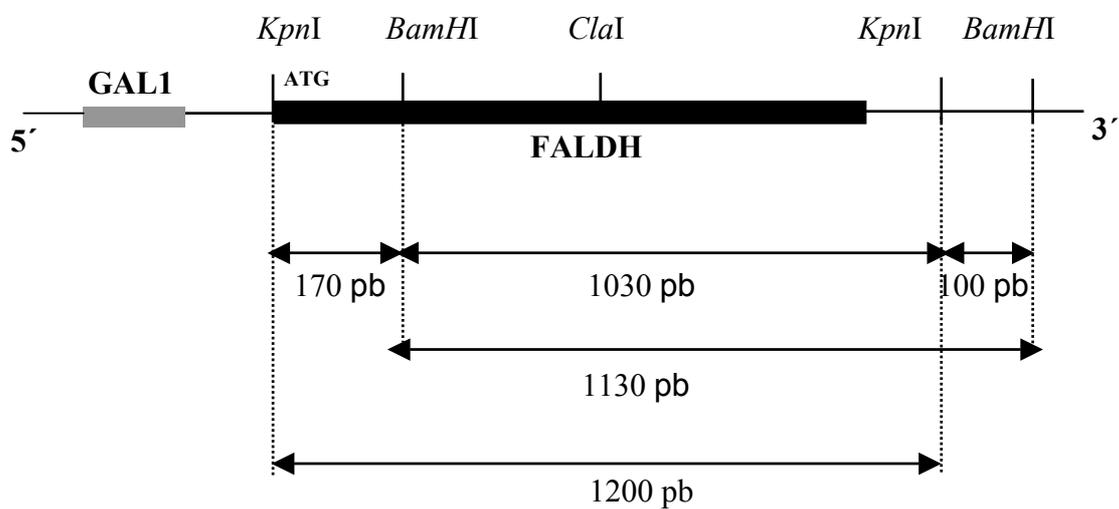


Figura 19. Mapa de restricción del inserto y zonas adyacentes en el vector pYES2.

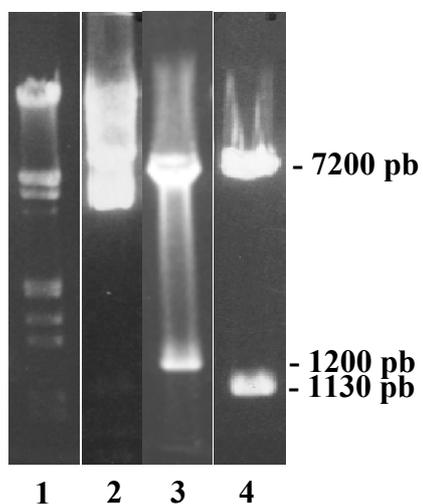


Figura 20. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de las minipreparaciones de DNA de uno de los clones obtenidos en pYES2.

1. Marcadores de Peso molecular.
2. pYES2-FALDH sin digerir.
3. Digestión con *KpnI*.
4. Digestión con *BamHI* (comprobación de la orientación).

9.3 Construcción de una cepa mutante de *S. cerevisiae* *sfa1Δ*

9.3.1 Estrategia de delección del gen *SFA1*.

La delección se llevó a cabo mediante la sustitución de la zona codificante y una parte del promotor del gen *SFA1* por el gen *HIS3*.

Para ello se transformó la cepa haploide de *S. cerevisiae* W303D, que presenta auxotrofia para *HIS3*, con un fragmento de DNA lineal que contenía el gen *HIS3* flanqueado por las regiones 5' y 3' no codificantes del gen *SFA1*, que serían las que dirigirían la recombinación homóloga (Figura 21). Las colonias de levadura transformadas con dicho fragmento lineal fueron después cultivadas en placas SMM sin histidina, seleccionando de esta manera aquellas colonias que habían incorporado el gen *HIS3*. Algunas de las colonias seleccionadas se analizaron mediante isoelectroenfoque revelado por actividad FALDH y mediante Southern-blot.

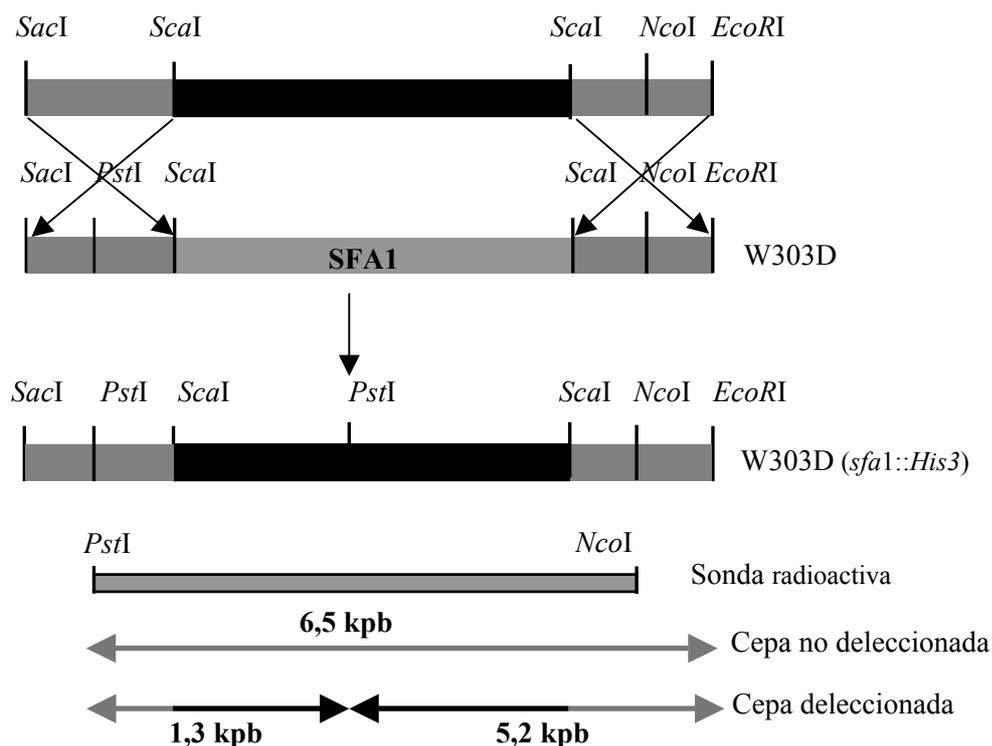


Figura 21. Esquema mostrando la estrategia seguida para deleccionar el gen *SFA1*. Se substituyó la región codificante del gen *SFA1*, comprendida entre dos dianas de restricción *ScaI*, por el gen *HIS3*. Para ello, se utilizó un fragmento lineal que fue obtenido por digestión con los enzimas *SacI* y *EcoRI* y que fue introducido dentro de la cepa haploide de levadura *W303D*. Las secuencias que flaquean el gen *HIS3*, son las regiones 5' y 3' no codificantes del gen *SFA1*, que dirigen la recombinación homóloga en el cromosoma de levadura.

9.3.2 Análisis de homogenados de las cepas deleccionadas.

9.3.2.1 Análisis por Isoelectroenfoque y posterior revelado por actividad FALDH.

Las colonias seleccionadas fueron crecidas en medio rico y lisadas con bolas de vidrio en tampón de homogenización. Los correspondientes homogenados fueron analizados por isoelectroenfoque revelado por actividad FALDH. En la figura 22 se muestra el resultado para una de las colonias deleccionadas (carril 1), así como el correspondiente a una colonia de *S. cerevisiae* W303D utilizada como control (carril 2). Las colonias seleccionadas no presentaron actividad FALDH, tal como se esperaba si el reemplazo del gen *SFA1* por el gen *HIS3* había tenido lugar.

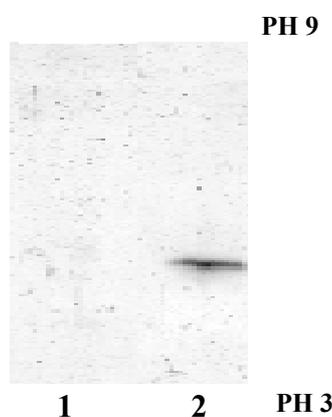


Figura 22. Isoelectroenfoque en un gradiente de pH 3-9 y posterior tinción por actividad FALDH.
 1. Homogenado de la cepa transformada con el fragmento lineal de *HIS3* (cepa deleccionada).
 2. Homogenado de la cepa inicial haploide W303D.

9.3.2.2 Análisis por Southern blot.

El DNA genómico fue digerido con los enzimas de restricción *EcoRI* y *PstI* e hibridado con el fragmento *NcoI/PstI* procedente del gen *SFA1* (véase figura 21), que contenía toda la zona codificante del gen más las zonas flanqueantes. Puesto que el gen *HIS3* contiene un sitio de restricción interno para *PstI*, que no está presente en *SFA1*, el patrón de bandas esperado era un fragmento de 5,2 Kb y otro de 1,3 Kb en las cepas deleccionadas, mientras que la cepa silvestre revelaría la presencia de un único fragmento de 6,5 kb. EL resultado del Southern blot (Figura 23) confirmó que todas las colonias seleccionadas tenían deleccionado el gen *SFA1* y sustituido por el gen *HIS3*.

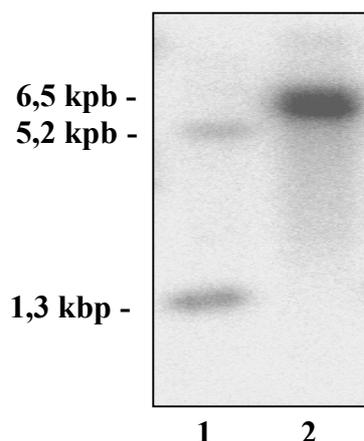


Figura 23. Análisis por Southern blot. El DNA genómico de distintas colonias de *S. cerevisiae* fue digerido con *Pst*I y *Eco*RI.

1. Colonia con el gen *SFA1* delecionado (*sfal::HIS3*)
2. Cepa haploide original W303D, que contiene el gen *SFA1*.

9.4 Purificación de la FALDH recombinante de *A. thaliana*.

El cDNA correspondiente a la FALDH de *A. thaliana* clonado en el vector pYES2, fue utilizado para transformar la cepa delecionada de *S. cerevisiae* (*sfal::HIS3*).

La expresión y posterior purificación de la proteína se realizó a partir de un cultivo aeróbico de 50 l, crecido en un bioreactor, con el fin de asegurar la obtención de una cantidad de proteína suficiente como para realizar su caracterización cinética. El cultivo se creció hasta la fase estacionaria, obteniéndose un valor de la $O.D_{600nm} = 4,45$. El análisis de la composición del medio reveló que la llegada a la fase estacionaria se correlacionaba con el agotamiento de galactosa en el medio. Tras la separación de las células de levadura del resto del medio mediante una centrifugación, se centrifugó de nuevo el sedimento a 3000 x g, obteniéndose unos 300 g de células (en peso húmedo).

Las células fueron resuspendidas en tampón de homogenización y lisadas en un homogeneizador "bead-beater", con bolas de vidrio de 0,5 mm de diámetro. A continuación fueron centrifugadas y el sobrenadante dializado con el tampón correspondiente para su posterior cromatografía en una columna de DEAE-Sepharosa.

9.4.1 Cromatografía de intercambio aniónico en DEAE-Sepharosa.

La primera etapa de purificación consistió en una cromatografía líquida sobre DEAE-Sepharosa a pH 7,5. La totalidad de la actividad FALDH quedó retenida en la columna y fue eluída mediante la aplicación de un gradiente de NaCl 0-0,18 M (Figura 24a). El pico de actividad FALDH se obtuvo a una fuerza iónica de 6 mS/cm. Se recolectaron las fracciones correspondientes, se concentraron, y se dializaron con el correspondiente tampón para aplicarlas a una columna de hidroxapatito.

9.4.2 Cromatografía en hidroxapatito.

En esta cromatografía la enzima FALDH quedó totalmente retenida en la resina y fue eluída con un gradiente de fuerza iónica de KH_2PO_4 (10-400 mM) (Figura 24b). El pico de actividad FALDH se obtuvo a una fuerza iónica de 7 mS/cm. En esta etapa de purificación se consiguió eliminar por completo la actividad reductora de formaldehído, que interfiere en la determinación de la actividad FALDH. Por otro lado, ésta es una etapa imprescindible para la unión de la FALDH a la columna de afinidad sobre Blue-Sepharosa, que se utiliza en la siguiente etapa de purificación.

Las fracciones que mostraron actividad FALDH fueron concentradas y dializadas en el tampón adecuado, y la muestra fue aplicada sobre una columna de afinidad de Blue-Sepharosa.

9.4.3 Cromatografía de afinidad en Blue-Sepharosa.

Igual que en las cromatografías anteriores, toda la actividad FALDH quedó retenida en la columna y fue eluída mediante un gradiente de NADH (0-750 μM) (Figura 24c). Como consecuencia de la aplicación del gradiente, se eluyó un pico de actividad que dio lugar a una fracción homogénea de FALDH.

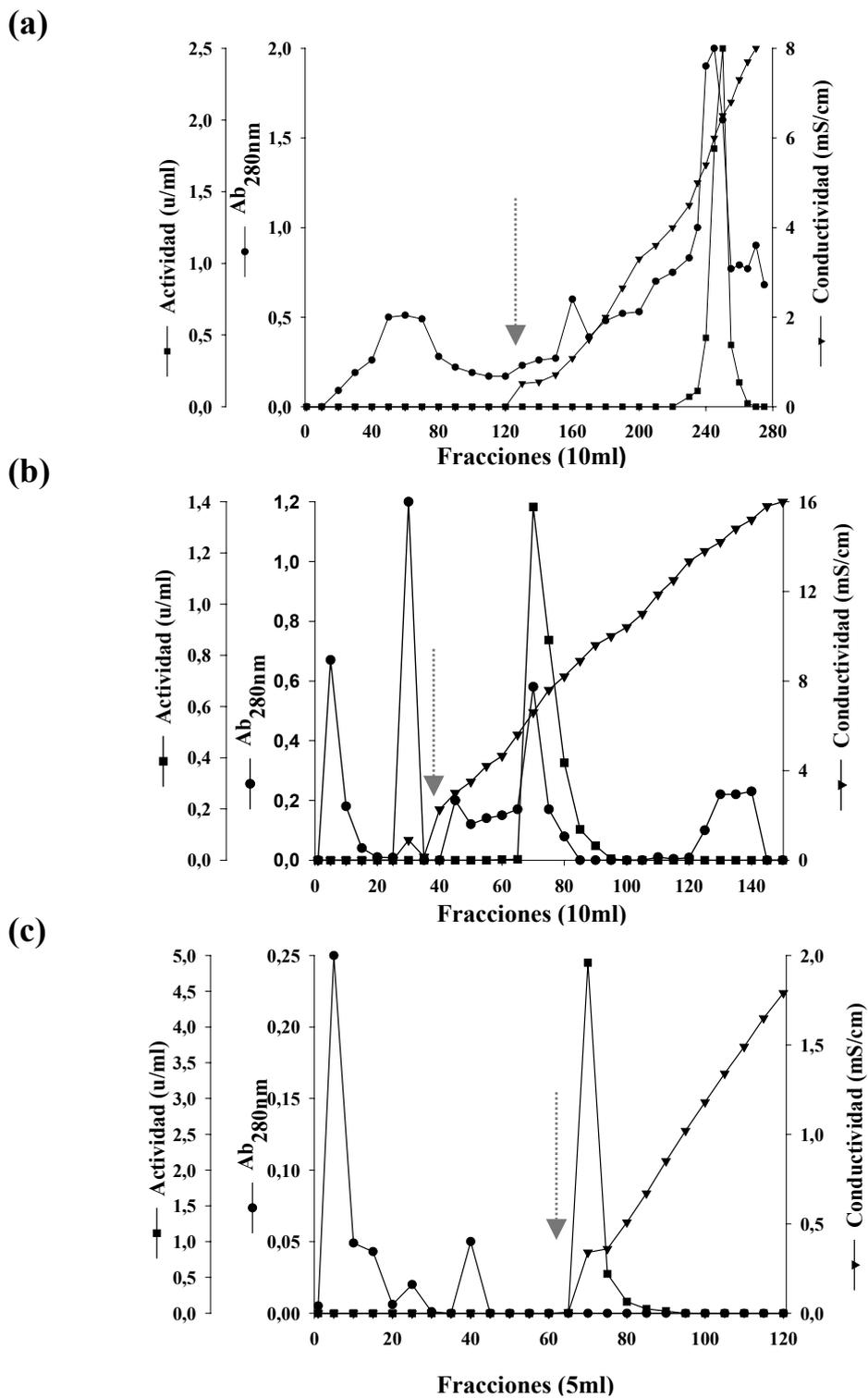


Figura 24. Purificación de la FALDH recombinante de *A. thaliana*.

(a) Cromatografía en DEAE-Sepharosa.

(b) Cromatografía en BioGel-HT hidroxipatito.

(c) Cromatografía en Blue-Sepharosa.

Las flechas indican el inicio del gradiente.

9.4.4 Resumen del proceso de purificación.

En la tabla 4 se exponen los resultados que se obtuvieron a lo largo del proceso de purificación, y que se comentan a continuación.

A partir de 300 g de células de levadura transformada se obtuvieron 4,1 mg de FALDH de *A. thaliana* con una actividad específica de 15 u/mg de proteína, según los ensayos de actividad estándar. El rendimiento del proceso fue del 20,6%.

Hay que anotar que el valor de la actividad específica de la FALDH recombinante encontrado (15 u/mg), es bastante superior al encontrado para la FALDH purificada a partir de la línea celular T87 (2,8 u/mg). Esto puede ser debido a un mayor grado de pureza obtenido en la preparación de la FALDH recombinante en comparación con la proteína no recombinante.

Tabla 4. Tabla de purificación de la FALDH recombinante de *A. thaliana*.

| Etapa | Volumen (ml) | Actividad total (unidades) | Proteína total (mg) | Actividad específica (u/mg) | Rendimiento % |
|----------------|--------------|----------------------------|---------------------|-----------------------------|---------------|
| Sobrenadante | 300 | 300 | 510 | 0,58 | 100 |
| DEAE-Sepharosa | 45 | 360* | 60,3 | 5,9 | 120 |
| Hidroxiapatito | 35 | 120 | 27,3 | 4,4 | 40 |
| Blue-Sepharosa | 16 | 62 | 4,1 | 15 | 20,6 |

Las actividades se midieron en tampón fosfato de sodio 0,1M, pH 8,0, a 25°C, utilizando formaldehído 1 mM, glutatión 1 mM y NAD⁺ 4 mM. Los valores de proteína total se determinaron por Bradford.

* El aumento de actividad es presumiblemente debido a la eliminación de inhibidores de la FALDH o de actividades que enmascaraban la FALDH

10. Estudios físico-químicos de la FALDH de *A. thaliana*.

10.1 Determinación del peso molecular.

Mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes se determinó un peso molecular aproximado de 45000 Da para el monómero de la FALDH de *A. thaliana*. Esta electroforesis sirvió también para verificar el grado de pureza obtenido.

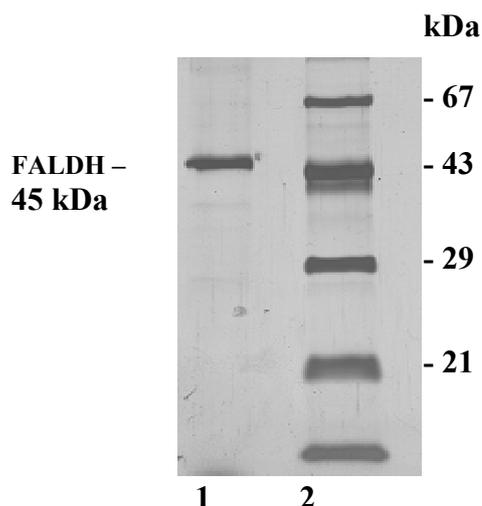


Figura 25. Determinación del grado de pureza y del peso molecular del monómero de la FALDH recombinante de *A. thaliana* mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS y tinción con sales de plata.

1. Alícuota del pico de actividad FALDH después de la cromatografía en Blue- Sepharosa.
2. Marcadores de Peso molecular.

10.2 Caracterización cinética de la FALDH recombinante de *A. thaliana*.

Para analizar la especificidad de sustrato de la FALDH de *A. thaliana*, se ensayaron diversos sustratos fisiológicos descritos para este enzima en otras especies. En general, la FALDH muestra preferencia por los alcoholes primarios hidrofóbicos de cadena larga, como el octanol, y por los ω -hidroxiácidos grasos como el ácido 12-hidroxidodecanoico (Norin y col., 1997). De los datos obtenidos para cada sustrato (Tabla 5) podemos destacar lo siguiente.

- El mejor sustrato ensayado es el S-hidroximetilglutación, procedente de la reacción espontánea entre el formaldehído y el glutatión (Koivusalo y col., 1989), ya que presenta la K_m más baja y la eficiencia catalítica más alta, tanto a pH óptimo (8,0) como a pH 7,5.

- Los alcoholes alifáticos de cadena larga, como el octanol, y los ácidos grasos ω -hidroxilados (ácido 12- hidroxidodecanoico), no son buenos sustratos para la FALDH de *A. thaliana*. Lo mismo pasa en levadura (Fernández y col., 1997), humano (Danielsson y col., 1994b) y otras especies de plantas (Shafqat y col.,1996), que

presentan altos valores de K_m para estos sustratos, hecho que hace que sus eficiencias catalíticas (k_{cat}/K_m) sean relativamente bajas (Tabla 6).

En *Arabidopsis*, La K_m calculada frente al ácido 12-hidroxidodecanoico es mucho más alta que en otras especies. Esta diferencia podría ser debida a la imposibilidad de saturar el enzima con dicho sustrato debido a su baja solubilidad, y por lo tanto la dificultad de determinar con exactitud la eficiencia catalítica de a este sustrato.

- El farnesol y el geraniol son compuestos intermediarios en la ruta biosintética de los terpenoides. Además son las estructuras básicas a partir de las cuales se originan las distintas subclases de terpenos, y son componentes importantes de los aceites esenciales, acumulándose en estructuras especializadas de las plantas.

A pH 10, la FALDH mostró un valor de K_m frente al farnesol muy bajo y una eficiencia catalítica bastante alta. Sin embargo, a pH 7,5, la eficiencia catalítica (k_{cat}/K_m) fué bastante baja, por lo que probablemente este dato no tenga un significado funcional.

El geraniol no resultó ser un buen sustrato para la FALDH de *A. thaliana*, ya que presentó valores de k_{cat}/K_m bastante bajos, tanto a pH 10 como a pH fisiológico.

El cinnamyl alcohol, tampoco resultó ser buen sustrato para la FALDH, ya que tanto a pH fisiológico (pH 7,5) como a pH 10, presentó una K_m bastante alta y una eficiencia catalítica muy baja.

Tabla 5. Constantes cinéticas de la FALDH de *A. thaliana*.

| Sustrato | K_m (μM) | k_{cat} (min^{-1}) | k_{cat}/K_m ($\text{mM}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) |
|-------------------------------|----------------------------|---|--|
| pH = 8 | | | |
| HM-GSH | 7 | 1351 | 193.000 |
| ^a NAD ⁺ | 57 | 1975 | 35.000 |
| pH = 10 | | | |
| Farnesol | 3 | 126 | 42.000 |
| Geraniol | 800 | 1188 | 1485 |
| Cinnamylalcohol | 3500 | 1220 | 348 |
| Octanol | n.s | — | 130 |
| 12-hidroxiodecanoico | 4700 | 335 | 71 |
| pH = 7.5 | | | |
| HM-GSH | 7 | 905,6 | 129.378 |
| Farnesol | 7.7 | 6 | 780 |
| Geraniol | n.s | — | 38 |
| Cinnamylalcohol | 22000 | 324 | 15 |
| 12-hidroxiodecanoico | n.s | — | 18 |

Las actividades con alcoholes fueron medidas en tampón glicina/NaOH 0,1 M a pH 10, y en tampón fosfato de sodio 0,1 M a pH 7,5. La actividad con S-hidroxiometilglutacion se determino en tampón fosfato de sodio 0,1 M pH 8,0 y pH 7,5.

^a se determino en presencia de formaldehído 1mM y glutation 1mM.

ns: no saturable.

HM-GSH: S-hidroxiometilglutación.

Tabla 6. Comparación de las constantes cinéticas, de diferentes especies, frente a octanol y 12-hidroxidodecanoico.

| Sustrato | <i>Guisante</i> | | Humano | | <i>S. cerevisiae</i> | | <i>A. thaliana</i> | |
|-----------------------|----------------------------|---|----------------------------|---|----------------------------|---|----------------------------|---|
| | k_m (μM) | k_{cat}/K_m ($\text{mM}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$) |
| Octanol | 840 | 226 | 1200 | 183 | 2400 | 460 | ns | 130 |
| 12-hidroxidodecanoico | 80 | 611 | 60 | 2833 | 1800 | 1000 | 4700 | 71 |

Las actividades fueron medidas en tampón glicina/NaOH 0,1 M a pH 10.

11. Obtención y caracterización de anticuerpos policlonales contra la FALDH de *A. thaliana*.

La proteína FALDH purificada tal como se describe en el apartado anterior, se utilizó como antígeno para la obtención de anticuerpos policlonales.

Se comprobó que el suero de los conejos no presentaba anticuerpos inmunoreactivos contra la FALDH antes de la inyección del antígeno. Este suero se consideró como el suero control (Preimmune).

Se obtuvieron cuatro fracciones de antisuero diferentes, producto de las cuatro sangrías efectuadas a diferentes tiempo (Ver Materiales y Métodos).

La inmunoreactividad específica del anticuerpo contra su antígeno FALDH se comprobó mediante experimento de Western blot. Con el fin de determinar el título del anticuerpo y su especificidad, se incubó el homogenado de *A. thaliana* con diferentes concentraciones de anticuerpo a diluciones 1:500, 1:1000, 1:2500 y 1:3000. Se realizó otro ensayo con idénticas diluciones del suero control. La dilución óptima de trabajo del antisuero para la detección de la FALDH en un homogenado de *A. thaliana* fue de 1:3000 (Figura 26).

Hay que señalar que en las 4 sangrías, el anticuerpo obtenido fue capaz de reconocer una única banda de 45 kDa correspondiente a la FALDH.

También, se analizó la especificidad del anticuerpo en un homogenado de células de tabaco BY2. Igual que en el caso de *A. thaliana*, el anticuerpo a una dilución 1:3000 fue capaz de reconocer una sola banda de 45kDa, correspondiente a la FALDH de tabaco (Figura 27).

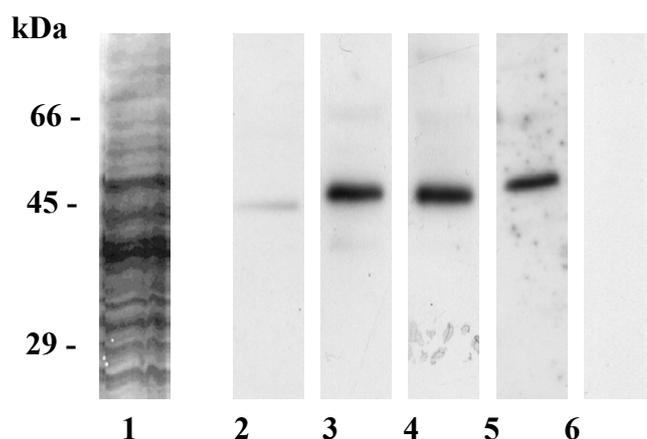


Figura 26. Detección de la FALDH en homogenado de *A. thaliana* (10 μ g de proteína total) utilizando

los antisueros obtenidos en cada una de las 4 sangrías. La dilución óptima de los antisueros fue 1:3000.

1. Homogenado de *A. thaliana* (membrana teñida con coomasie después de la transferencia).
2. Membrana revelada con el suero procedente de la 1^a sangría, dilución 1:3000.
3. Membrana revelada con el suero procedente de la 2^a sangría, dilución 1:3000.
4. Membrana revelada con el suero procedente de la 3^a sangría, dilución 1:3000.
5. Membrana revelada con el suero procedente de la 4^a sangría, dilución 1:3000.
6. Membrana revelada con el suero preimmune, dilución 1:3000.

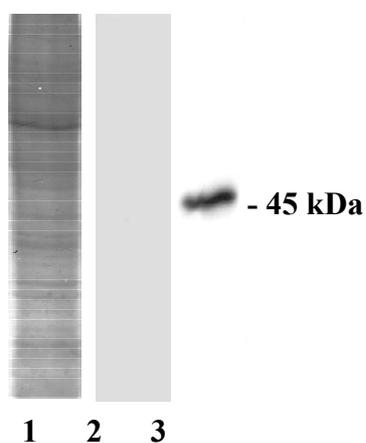


Figura 27. Western blot de homogenado de células de tabaco BY2 (10 μ g de proteína total), mostrando la especificidad del anticuerpo anti-FALDH de *A. thaliana*.

1. Homogenado de células BY2 (membrana teñida con Coomasie Blue después de la transferencia).
2. Membrana revelada con el suero preimmune, dilución 1:3000
3. Membrana revelada con el suero procedente de la 3^a sangría, dilución 1:3000.

12. Efecto de la sobreexpresión del gen de la FALDH de *A. thaliana* sobre el crecimiento de *S. cerevisiae* en presencia de formaldehído.

Con el fin de averiguar si la sobreexpresión del gen FALDH de *A. thaliana* en una cepa de levadura permitía a ésta metabolizar concentraciones altas de formaldehído exógeno, se comprobó el crecimiento, en presencia de diferentes concentraciones de formaldehído, de la cepa delecionada (*sfa1::His3*) transformada con la construcción pYES2-FALDH (FALDH⁺⁺) y de la cepa salvaje con el gen *SFA1* intacto (FALDH⁺). Para evitar diferencias en la composición del medio, la cepa FALDH⁺ se transformó con el vector pYES2 sólo, sin el gen FALDH, de manera que las dos cepas (FALDH⁺ y FALDH⁺⁺) fueron crecidas en medio SMM sin uracilo, en presencia y en ausencia de formaldehído.

El crecimiento de ambas cepas (FALDH⁺⁺, FALDH⁺) se siguió a dos concentraciones de formaldehído (1 y 2 mM), midiendo la densidad óptica a 600 nm, hasta llegar a la saturación (Figura 28a).

Los resultados mostraron que una concentración de 1 mM de formaldehído en el medio resultaba bastante tóxica para la cepa de levadura salvaje (FALDH⁺), que era incapaz de crecer en estas condiciones. Después de 60 horas de crecimiento, la absorbancia de la cepa salvaje continuó siendo la misma que en el tiempo inicial (T₀). En cambio, la cepa FALDH⁺⁺, a 1 mM formaldehído fue capaz de crecer a la misma velocidad que en su ausencia.

La concentración 2 mM de formaldehído tampoco resultó ser tóxica para la cepa FALDH⁺⁺, aunque la curva de crecimiento mostró un periodo de latencia superior.

La medida de la concentración de formaldehído en el medio de cultivo demostró que a 1 mM formaldehído, la cepa FALDH⁺⁺ metabolizaba aproximadamente todo el formaldehído añadido al medio en 50 h.

A 2 mM formaldehído, la misma cepa fue capaz de metabolizar el 50% de formaldehído presente inicialmente en sólo 10 horas de incubación, y el 100% en 60 horas. Sin embargo, la cepa FALDH⁺, como era de esperar, no lo metabolizaba, ya que la concentración de formaldehído en el medio permaneció constante durante todo el periodo de incubación (Figura 28 b).

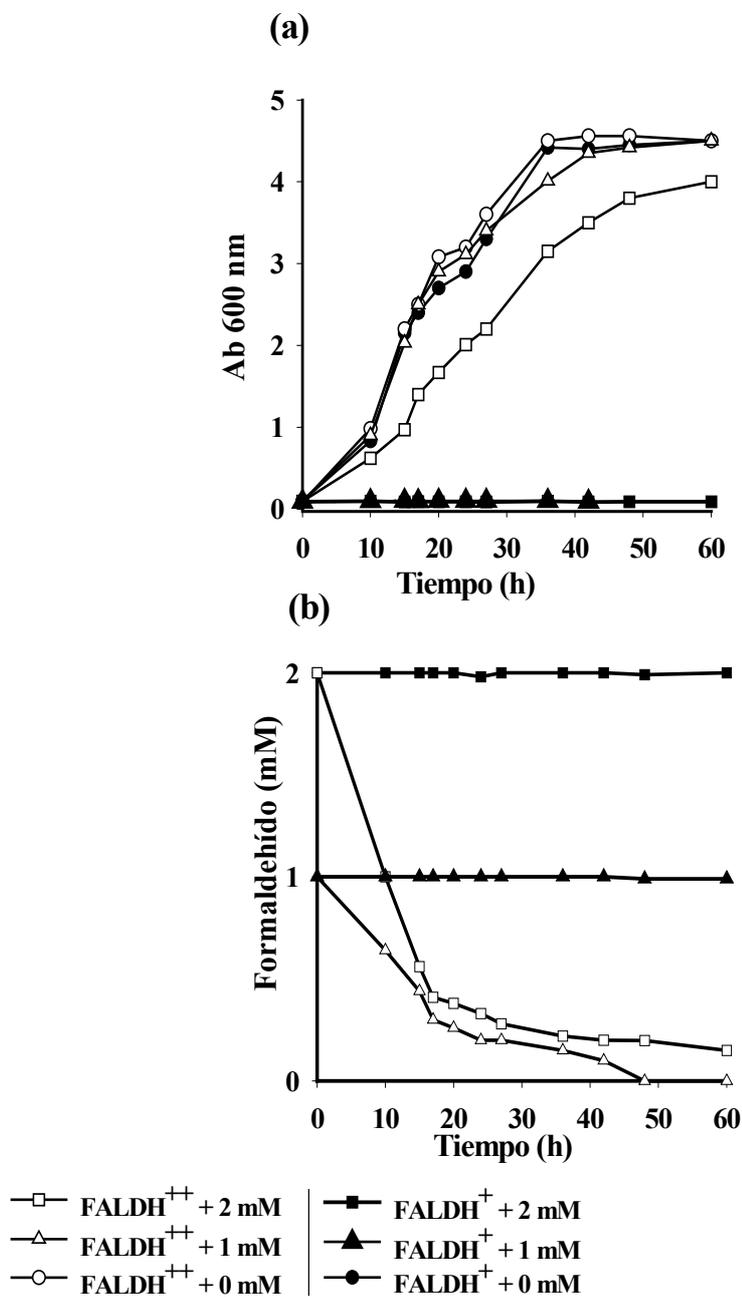


Figura 28. Efecto de la sobreexpresión de la FALDH de *A. thaliana* sobre el crecimiento de *S. cerevisiae* en presencia de formaldehído.

(a) Curvas de crecimiento de las cepas FALDH⁺⁺ y FALDH⁺ en ausencia de formaldehído, y en presencia de formaldehído 1 mM y 2 mM.

(b) Eliminación de formaldehído del medio de cultivo por parte de las cepas FALDH⁺⁺ y FALDH⁺.

B. OBTENCIÓN Y ANÁLISIS DE PLANTAS TRANSGÉNICAS DE *A. THALIANA*.

1. Sobreexpresión del gen FALDH en plantas de *A. thaliana*.

Se generaron plantas transgénicas de *A. thaliana* portadoras de construcciones en las que el cDNA de la FALDH fue clonado en sentido codificante bajo el control del promotor CaMV35S. También se generaron plantas transgénicas control de *A. thaliana* transformadas sólo con el vector binario, sin inserto, pBin19, cuyo T-DNA contiene el gen de la neomicina fosfotransferasa II (NPTII), que confiere resistencia al antibiótico kanamicina, permitiendo así la selección de los transformantes de un modo rápido y sencillo.



Figura 29. Esquema de la construcción para la sobreexpresión de la FALDH realizada en el vector pBin19.

A las plantas portadoras de la construcción FALDH se las denominó plantas transgénicas de sobreexpresión, y a las portadoras del vector pBin19 sin inserto plantas transgénicas control. En las primeras se esperaba observar un aumento de la actividad FALDH, mientras que en las segundas se esperaba una actividad enzimática similar a la de la planta salvaje.

1.1 Clonación del cDNA en el vector pDH51.

El clonaje se realizó en dos etapas: primero se clonó el cDNA de la FALDH de *A. thaliana* en el vector pDH51, y a continuación el fragmento de DNA correspondiente se clonó en el vector de expresión de plantas, pBin19.

El vector pDH51 contiene el promotor del gen del RNA 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) y el terminador de la transcripción. Para realizar el primer clonaje, el cDNA procedente del vector pBluescript SK +/- (Martínez y col., 1996) fue digerido con *XhoI-EcoRI*, y reparado con la T4 polimerasa para obtener extremos romos. A

continuación, se ligó en el vector pDH51 cortado con el enzima *SmaI*. La presencia del inserto en los clones seleccionados como positivos se comprobó por digestión con el enzima de restricción *EcoRI*. La orientación frente al promotor CaMV 35S, se comprobó mediante digestión con *BamHI*. Las Figuras (30 y 31) muestran el mapa de restricción del inserto y de las zonas adyacentes en el vector pDH51.

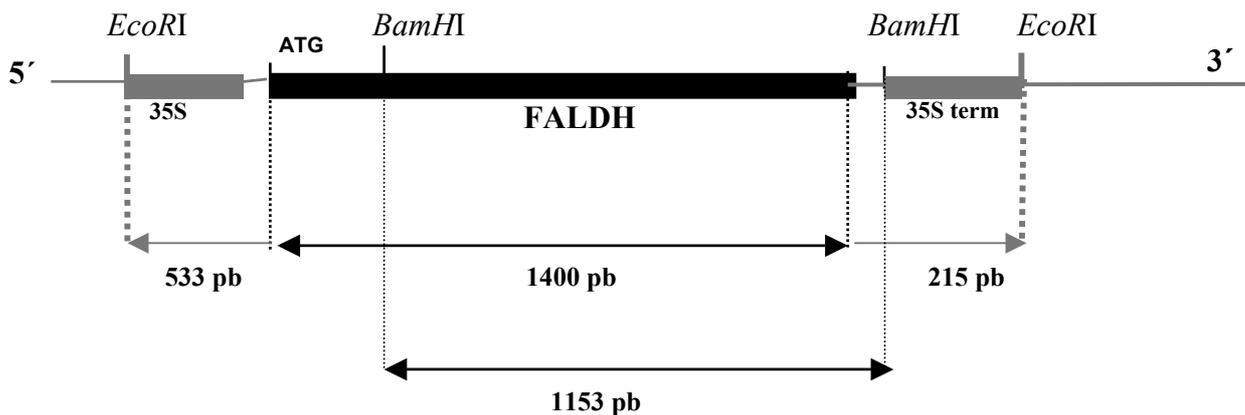


Figura 30. Mapa de restricción del inserto y zonas adyacentes en el plasmido pDH51.

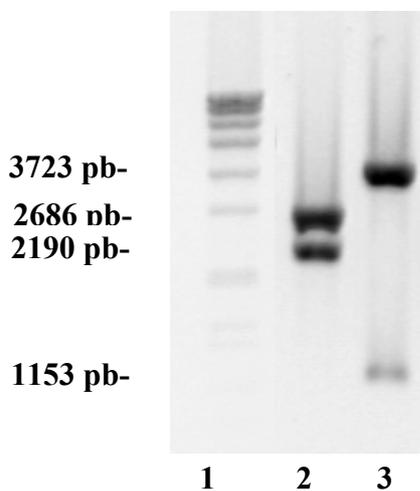


Figura 31. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de las minipreparaciones de DNA de uno de los clones obtenidos en pDH51.

1. Marcadores de peso molecular.
2. Digestión con *EcoRI*.
3. Digestión con *BamHI* (comprobación de la orientación).

1.2 Subclonación en el vector pBin 19 y transformación de *Agrobacterium*.

Elegimos como vector de expresión en plantas el pBin19 (Figura 32). Para su utilización, se cortó el vector pBin19 con el enzima de restricción *EcoRI*. La construcción pDH51-FALDH fué digerida también con *EcoRI*, lo cual liberó un fragmento que contenía el cDNA de FALDH a clonar junto con el promotor y el terminador CaMV35S. Este fragmento fué subclonado en el vector de expresión pBin19.

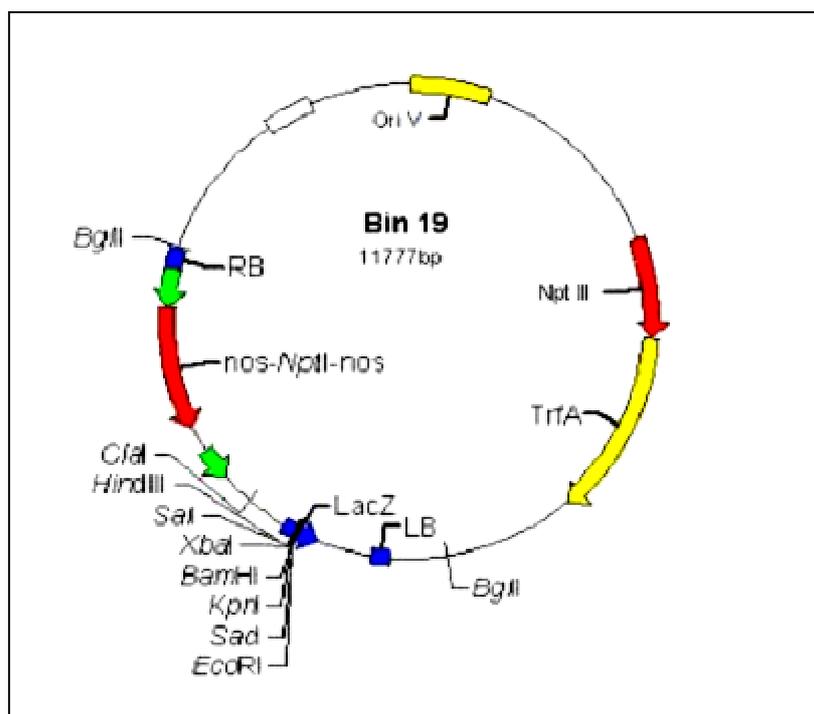


Figura 32. Mapa del vector usado para transformar plantas de *A. thaliana*.

La presencia del fragmento FALDH en los clones seleccionados como positivos se comprobó mediante la reacción de PCR (Figura 33).

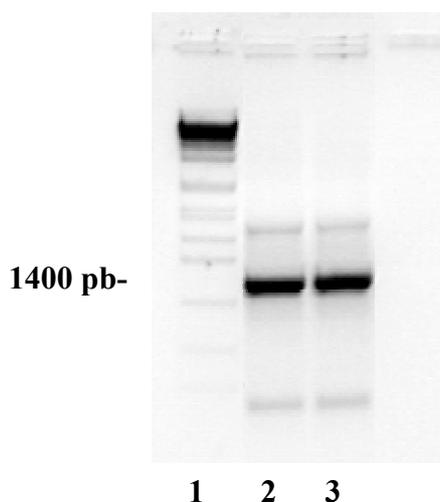


Figura 33. Electroforesis en gel de agarosa al 1%, del producto de amplificación por PCR obtenido a partir de uno de los clones positivos.

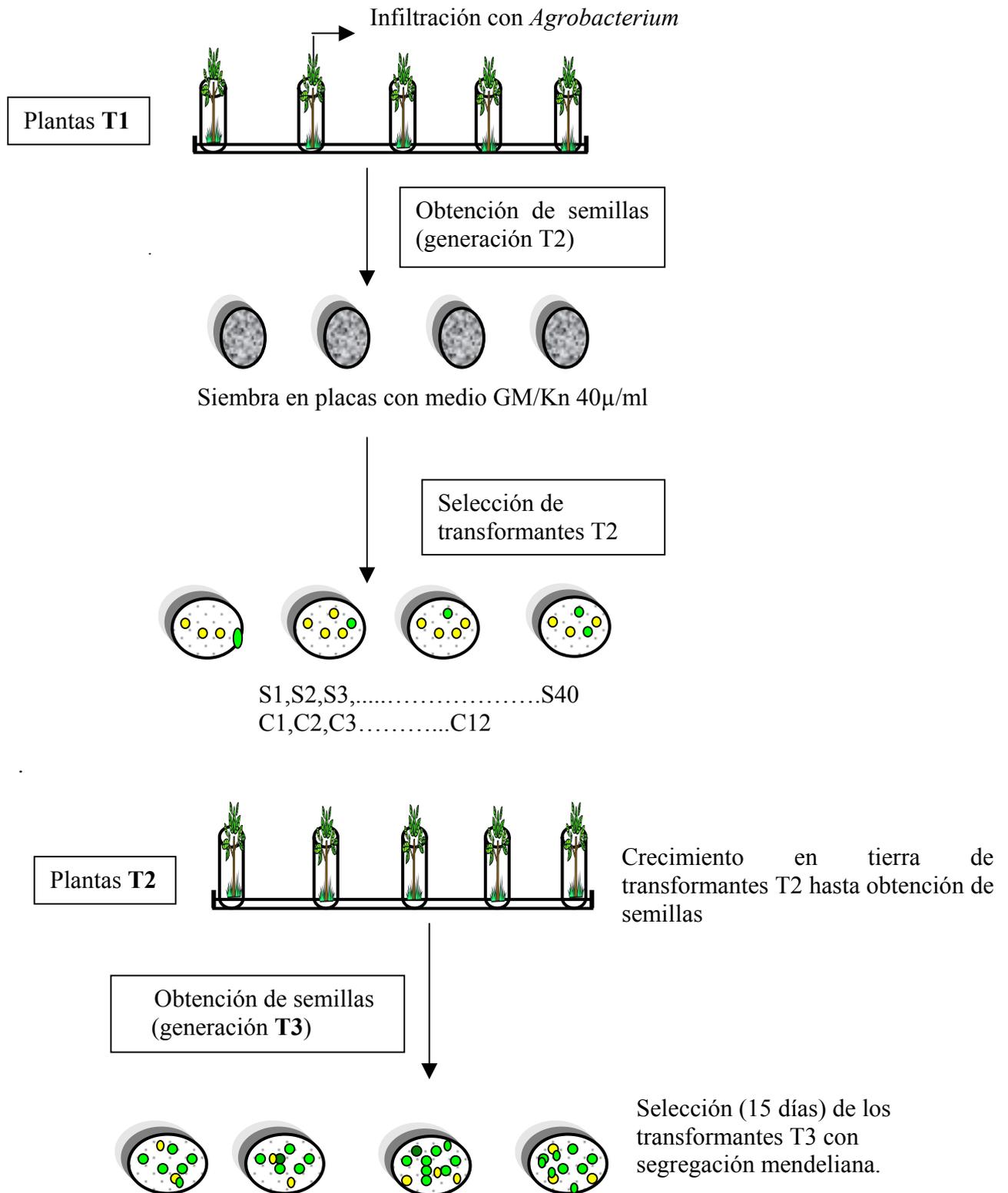
1. Marcadores de peso molecular.
2. Control positivo (pDH51-FALDH)
3. Producto de amplificación de uno de los clones positivos.

1.3 Transformación de *A. thaliana* y selección de plantas homocigotas.

El método de transformación consistió en infiltrar al vacío plantas de *A. thaliana* con un cultivo *A. tumefaciens* conteniendo la construcción esquematizada en la figura 30 o sólo con el vector pBin19 (generación T1). Estas plantas infiltradas se dejaron crecer hasta la producción de semillas (generación T2). Las semillas obtenidas se sembraron en placas con medio GM con kanamicina (Kn), y se seleccionaron las plántulas resistentes al antibiótico. Se obtuvieron un total de 40 transformantes T2 de sobreexpresión y 12 de plantas control. Los transformantes obtenidos se transplantaron individualmente a tierra y se dejaron crecer hasta la obtención de semillas (generación T3).

En total se obtuvieron 16 líneas de sobreexpresión y 6 líneas control de la generación T3. Para obtener plantas homocigotas correspondientes a estas líneas hemicigotas con segregación de tipo mendeliana, se crecieron hasta la madurez 12 plantas resistentes de cada una de las 16 líneas iniciales de la generación T3 (S1, S2, S3, S4, S6, S10, S11, S12, S13, S14, S15, S19, S21, S22) y 12 plantas de cada una de las 6 líneas control (C1, C2, C3, C4, C5, C6). El análisis de todas estas plantas se llevo a cabo por Western blot.

En la figura 34 se presenta un esquema de todo el proceso de selección, desde la infiltración de las plantas T1 hasta la obtención de las líneas homocigotas.

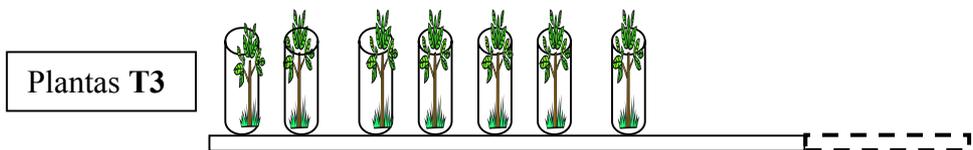


Western blot de la progenie T3 con segregación mendeliana (16 líneas de sobreexpresión y 6 plantas control).



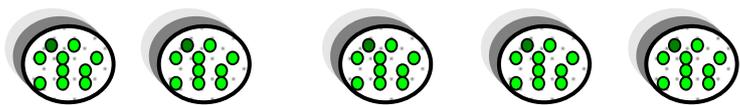
Selección de 16 líneas de sobreexpresión y 6 de control, en base a los experimentos de Western blot.

Crecimiento en tierra hasta la obtención de semillas de 12 plantas resistentes de cada una de las 16 líneas de sobreexpresión y otras tantas de cada una de las 6 plantas control.



12 x 16 sentido
12 x 6 control

Obtención de semillas (generación T4)



- Plantas resistentes a kanamicina
- Plantas sensibles a kanamicina

Selección de plantas homocigotas T3.

Figura 34. Esquema de todo el proceso de selección de las plantas transgénicas.

2. Análisis de las plantas transgénicas de sobreexpresión.

2.1 Análisis mediante Western blot.

Como paso previo a obtener plantas transgénicas homocigotas, se decidió analizar por Western blot el nivel de expresión del transgen de las líneas de la generación T3. Este experimento se realizó con 16 líneas seleccionadas al azar y sus resultados se muestran en la figura 35.

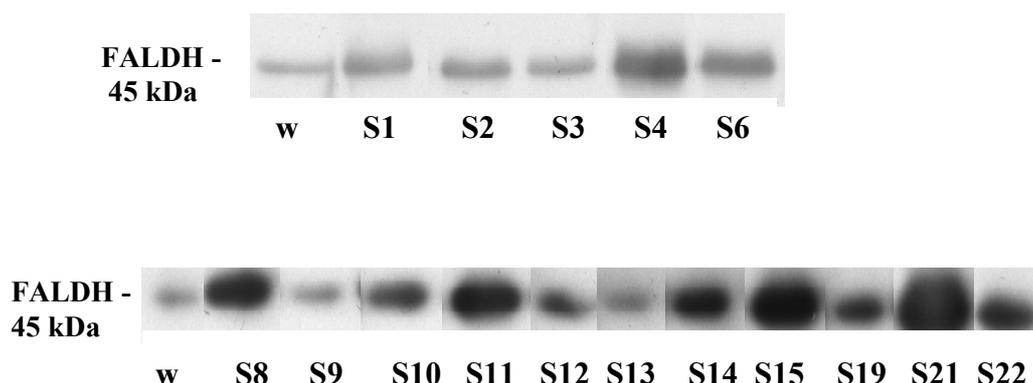


Figura 35. Análisis mediante Western blot de las líneas transgénicas de sobreexpresión (generación T3). Los extractos proteicos (10 μ g de proteína total) de plántulas de 15 días de edad de las diferentes líneas transgénicas de sobreexpresión y de *A. thaliana* sin transformar (w), se fraccionaron mediante un gel de SDS-PAGE al 12%. Las proteínas se transfirieron a una membrana de nylon (Immobilon-P, Millipore) y se incubaron con el anticuerpo policlonal anti-FALDH a una dilución 1:3000 y posteriormente con el anticuerpo secundario (Bio-Rad) a una dilución 1:3000. El complejo antígeno-anticuerpo se detectó mediante quimioluminiscencia (Bio-Rad).

La mayoría de las líneas analizadas presentaron un incremento de los niveles de la proteína FALDH, a excepción de las líneas S9 y S13 que presentaban niveles de proteína similares a los de la planta salvaje. Se seleccionaron las líneas S1, S2, S3, S4, S6, S9, S10, S11, S12, S21 y S22 para obtener líneas homocigotas. Las líneas S14 y S15 no pudieron llevarse a homocigosis debido a la escasez de semillas.

De cada una de estas líneas seleccionadas se crecieron 12 plantas resistentes correspondientes a la progenie T3, esperando como mínimo una línea homocigota en cada caso.

De esta manera se crecieron alrededor de 132 plantas y se analizó la descendencia T4 de cada una de ellas. En todas las líneas seleccionadas, se encontró descendencia homocigota. Se realizó entonces un experimento de Western blot, utilizando las plantas

homocigotas de la progenie T4. Tal como se observa en la Figura 36, la sobreexpresión se mantiene en la mayoría de las líneas transgénicas, pero parece disminuir en las líneas S9, S11, S12, S13, y S22. La disminución de expresión sufrida por las líneas S9 y S13 es la más drástica, y parece insinuar la existencia de un mecanismo de silenciamiento génico.

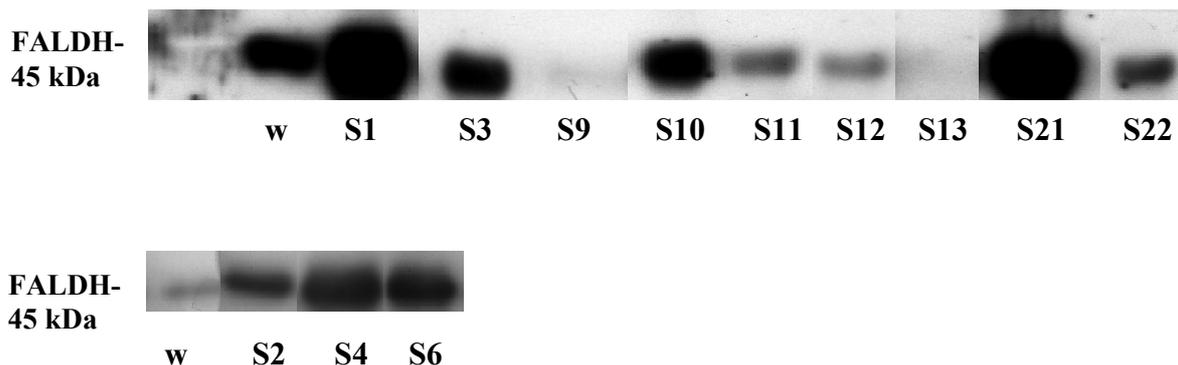


Figura 36. Análisis mediante Western blot de las líneas transgénicas de sobreexpresión homocigotas. Los extractos proteicos (10 µg de proteína total) de plántulas de 15 días de edad de las líneas transgénicas de sobreexpresión y de la planta control se fraccionaron en SDS-PAGE al 12%. Las proteínas se transfirieron a continuación a una membrana de nylon (Immobilon-P, Millipore) y se incubaron con el anticuerpo policlonal anti-FALDH a una dilución 1:3000 y con un anticuerpo secundario (Bio-Rad) a una dilución de 1:3000. El complejo antígeno-anticuerpo se detectó mediante quimiolumiscencia (Bio-Rad).

2. 2 Ensayos de actividad FALDH.

Se seleccionaron las líneas transgénicas que presentaban un mayor incremento en los niveles de proteína para realizar ensayos de actividad formaldehído deshidrogenasa dependiente de glutatión (FALDH). Con ello se pretendía averiguar si los niveles de proteína FALDH se correspondían con un aumento de la actividad enzimática correspondiente. La actividad se midió en el extracto proteico procedente de plántulas de 15 días de edad, crecidas en placas GM con kanamicina.

Los resultados de los ensayos de actividad FALDH de estas líneas homocigotas se resumen en la Figura 37.

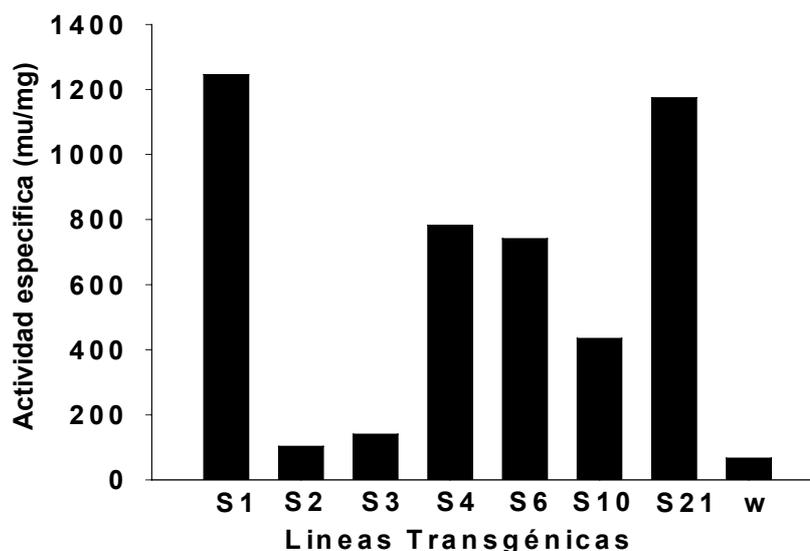


Figura 37. Representación de la actividad FALDH de las plantas homocigotas de sobreexpresión. En la grafica se presentan las actividades FALDH de 7 líneas transgénicas homocigotas y de la planta de *A. thaliana* sin transformar (w). El ensayo de actividad se realizó tal y como se describe en el apartado Materiales y Métodos. Se partió en todos los casos de 2 g de tejido fresco previamente congelado en nitrógeno líquido.

Los resultados obtenidos indican aumentos espectaculares de la actividad FALDH en algunas de las líneas transgénicas, que llegan a superar hasta 18 veces la actividad de las plantas sin transformar. Las líneas que muestran un aumento de actividad FALDH mayor son las líneas S1, S4, S6 y S21, que a su vez son las que muestran niveles mas altos de proteína FALDH en el experimento de Western blot (Figura 36).

2.3 Análisis mediante Northern blot.

Como ultimo paso de caracterización de las líneas transgénicas, se realizaron ensayos mediante Northern blot para comparar si existía una correlación entre los niveles de proteína FALDH, el aumento de actividad observado, y los niveles de RNA mensajero de la FALDH. En la Figura 38, se muestra el experimento de Northern-blot realizado con las líneas transgénicas más representativas.

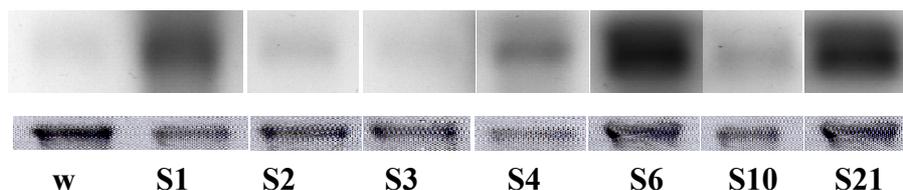


Figura 38 Análisis mediante Northern blot de las plantas transgénicas homocigotas. El RNA total (10 μ g) de plántulas de 15 días de edad se sometió a electroforesis en gel de agarosa con formaldehído y se transfirió a un filtro de nylon. El filtro se hibridó con la sonda correspondiente al cDNA de la FALDH. El carril w corresponde al RNA control (planta no transformada). En la parte inferior de la figura se muestra el RNA transferido a la membrana y teñido con Azul de metileno, como control de carga.

3. Análisis de plantas transgénicas control.

3.1 Análisis mediante Western blot.

De las líneas transformadas con el vector pBin19 sin inserto, se seleccionaron 6 líneas con segregación de tipo mendeliana y se realizó un experimento de Western blot con la progenie T3. Estas 6 líneas analizadas por Western blot, se llevaron a homocigosis. Tras analizar la generación T4 de dichas plantas se identificó descendencia homocigota en todos los casos. A continuación se realizó un experimento de Western blot utilizando plantas de la progenie T4.

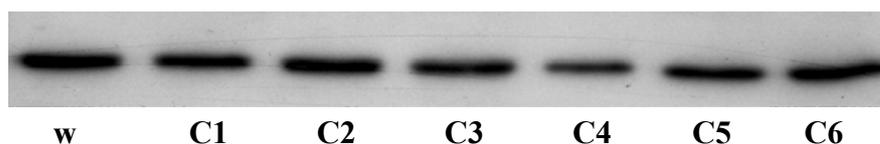


Figura 39. Análisis mediante Western blot de las líneas transgénicas control (homocigotas). Los extractos proteicos (10 μ g de proteína total) de plántulas de 15 días de edad de las líneas transgénicas transformadas con pBin19 se fraccionaron en geles de SDS-PAGE al 12%. Las proteínas se transfirieron a continuación a una membrana de nylon (Immobilon-P, Millipore) y se incubaron con el anticuerpo policlonal anti-FALDH a una dilución 1:3000 y posteriormente con el anticuerpo secundario (Bio-Rad) a una dilución de 1:3000. El complejo antígeno-anticuerpo se detectó mediante quimiolumiscencia (Bio-Rad).

Los resultados por Western blot mostraron que los niveles de proteína en las plantas transformadas con el vector pBin19 eran iguales que los de la planta salvaje.

A continuación se realizaron ensayos de actividad FALDH. En la Figura 40 se muestra que no se observó diferencia entre los niveles de actividad de la planta salvaje y los de las plantas transformadas. La actividad FALDH detectada es debida al gen FALDH endógeno de *A. thaliana*.

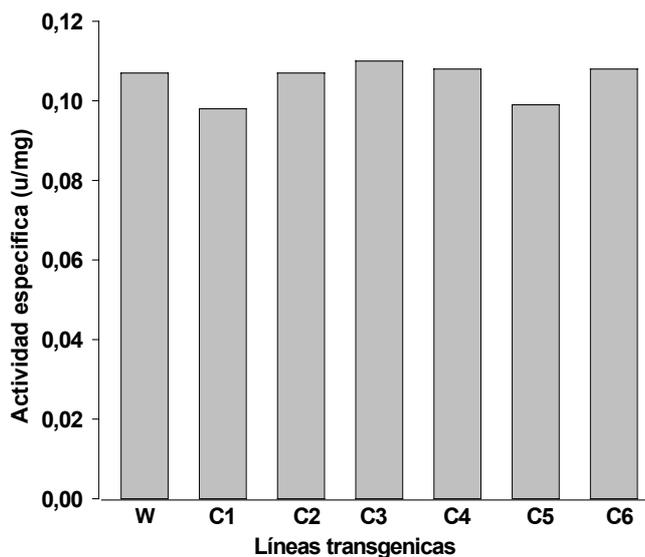


Figura 40. Representación de la actividad FALDH de las plantas homocigotas control. El ensayo de actividad se realizó tal como se describe en Materiales y Métodos. Se partió en todos los casos de 2 g de tejido fresco, previamente congelado en nitrógeno líquido.
w: *A. thaliana* salvaje.

4. Metabolismo de formaldehído exógeno por las líneas transgénicas.

Se seleccionaron las líneas transgénicas que presentaban un mayor aumento de la actividad FALDH (S1, S4, S6 y S21), para estudiar si la presencia de grandes cantidades del enzima en la planta permitía a éstas una mejor capacidad de metabolizar concentraciones elevadas de formaldehído exógeno. Utilizamos plántulas de *A. thaliana* crecidas en medio líquido, debido a la alta reproducibilidad de las condiciones de crecimiento y a la facilidad de aplicación del formaldehído, que se adicionó directamente al medio de cultivo. Además, las plantas crecen más rápido que en tierra ya que se les suministra en el medio todos los nutrientes necesarios para su desarrollo.

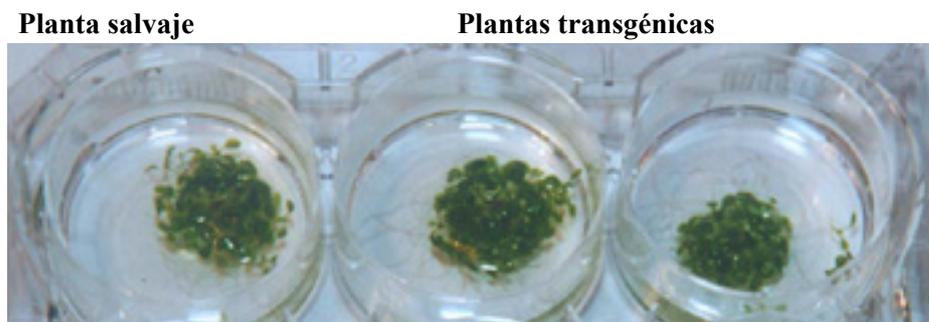


Figura 41. Plantas de *A. thaliana* germinadas y crecidas en medio líquido en condiciones estériles (aproximadamente 3-4 mg de semillas por pocillo).

Se utilizaron plantas de *A. thaliana* transgénicas de sobreexpresión en el día 9 de su crecimiento. Como control, se utilizaron plantas de *A. thaliana* (ecotipo Columbia) de fenotipo salvaje, también en el día 9 de su crecimiento.

Los primeros ensayos de formaldehído se realizaron a una concentración de 0,6 mM. A esta concentración, no se observó ninguna diferencia significativa entre las plantas transgénicas y la planta salvaje, ya que después de 24 horas de incubación, los dos tipos de plantas habían metabolizado el 80% de formaldehído presente inicialmente en el medio de crecimiento. Teniendo en cuenta este resultado, se decidió aumentar la concentración de formaldehído.

Se añadió formaldehído al medio a una concentración de 2 mM y se realizaron mediciones de la concentración del formaldehído restante en el medio a los tiempos 0, 7, 24 y 48 horas después del tratamiento. Los tiempos y las concentraciones de formaldehído fueron las mismas en el caso de las plantas salvaje (sin transformar). En paralelo, se realizó un control consistente en medio de crecimiento sólo (sin plantas) con la misma concentración de formaldehído, con el fin de descartar una disminución de formaldehído por evaporación.

En la Figura 42 se observa que las líneas transgénicas de sobreexpresión (S1, S4, S6, S21) son capaces de metabolizar el formaldehído añadido de forma exógena más rápidamente que las plantas salvajes. El efecto más elevado se observa a las 48 horas, tiempo al que las líneas transgénicas han metabolizado el 100% del formaldehído añadido, mientras que las plantas salvajes han metabolizado el 80% (Figura 42a y 42 c). La diferencia es significativa también a tiempos más cortos, a 6 horas para la línea

transgénica 4, y a 24 horas para todas las líneas de sobreexpresión. Cabe destacar que, durante este experimento, no se detectó una correlación directa entre la actividad FALDH de las líneas transgénicas y la capacidad de metabolizar el formaldehído exógeno. La línea 4, por ejemplo, a pesar de que presenta nivel de actividad FALDH casi dos veces menor que las líneas 1 y 21, es más eficiente metabolizando el formaldehído, ya que en solo 24 horas de incubación, metabolizó el 89 % de formaldehído.

Teniendo en cuenta estos resultados, decidimos aumentar la concentración de formaldehído exógeno hasta 5 mM. A esta concentración, la diferencia entre el metabolismo del formaldehído en las diferentes líneas transgénicas y en la planta salvaje es aun más significativa. A las 24 horas, las líneas transgénicas metabolizan entre el 30 y el 45 % de formaldehído presente en el medio, en contraposición con sólo el 15 % del formaldehído metabolizado por la planta salvaje. A las 48 horas, las líneas transgénicas llegaron a metabolizar hasta el 50% del formaldehído presente en el medio, mientras que la planta salvaje llegó a metabolizar tan solo el 20% de formaldehído añadido al medio (Figura 42b, 42d).

Durante el tratamiento con 5 mM formaldehído también se ha visto que no hay necesariamente una correlación entre la capacidad de metabolizar el formaldehído y el nivel de actividad de la formaldehído deshidrogenasa dependiente de glutation. La línea 21, por ejemplo, presenta hasta 17 veces más de actividad FALDH, mientras que la línea 6 presenta solo 11 veces más de actividad FALDH. Sin embargo, como se ve en la grafica 42b, a las 48 h la línea 6 metaboliza casi un 48% de formaldehído mientras que la línea 21 metaboliza un 36%.

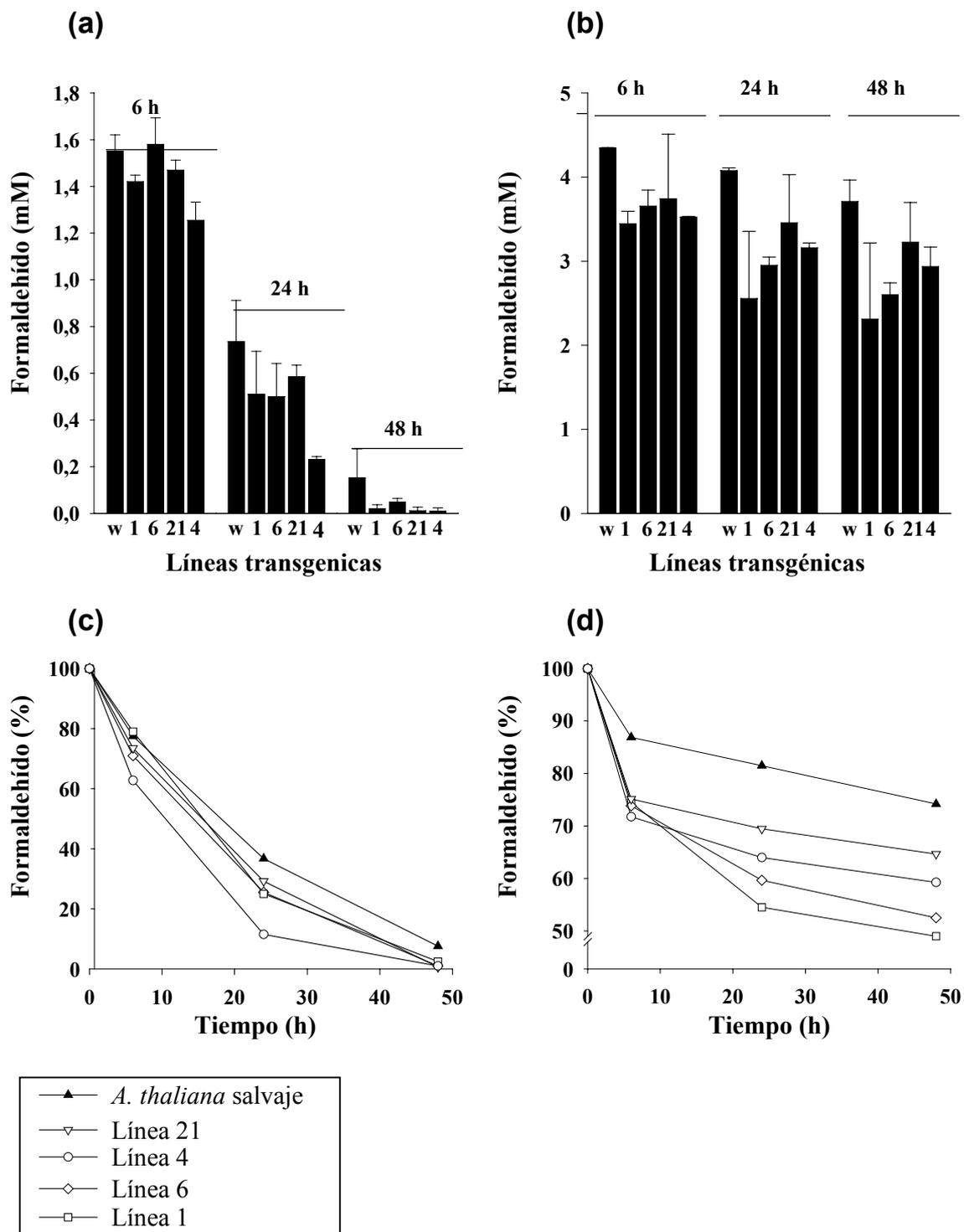


Figura 42. Metabolismo de formaldehído exógeno por las líneas transgénicas de sobreexpresión crecidas en medio líquido.

5. Efecto del formaldehído exógeno sobre las plantas de *A. thaliana*.

Durante los tratamientos de las plantas con 2 mM formaldehído, no se observó ningún efecto tóxico sobre las líneas transgénicas ni sobre las plantas salvajes. Sin embargo a 5 mM formaldehído tanto las plantas transgénicas como las salvajes empezaron a presentar manchas foliares de color amarillo a partir de las 24 horas de incubación. A las 48 horas, las plantas se pusieron totalmente amarillas, presentando signos de haber perdido totalmente la clorofila (clorosis) (Figura 43).

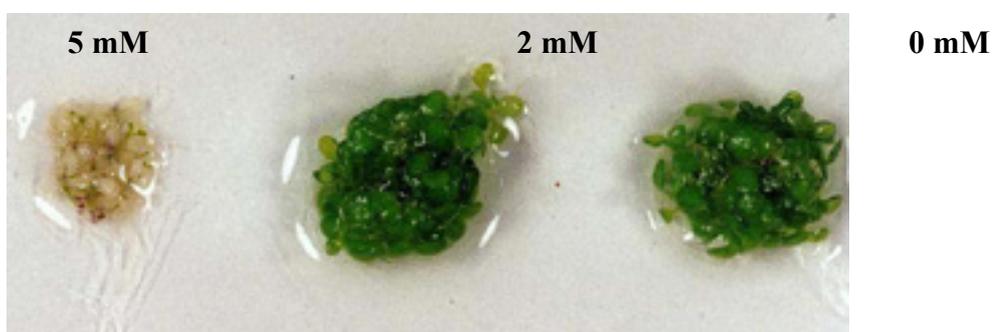


Figura 43. Plantas transgénicas de *A. thaliana* de sobreexpresión (línea 4), después de 48 h de incubación con 5 mM formaldehído.

El análisis más detallado de estas plantas al microscopio electrónico, mostró que en presencia de 5 mM Formaldehído, las plantas presentaban una destrucción de los cloroplastos (Figura 44), mientras que el cloroplasto de las plantas tratadas con 2 mM formaldehído presentaba un aspecto normal, igual que el de las plantas crecidas en medio sin formaldehído.

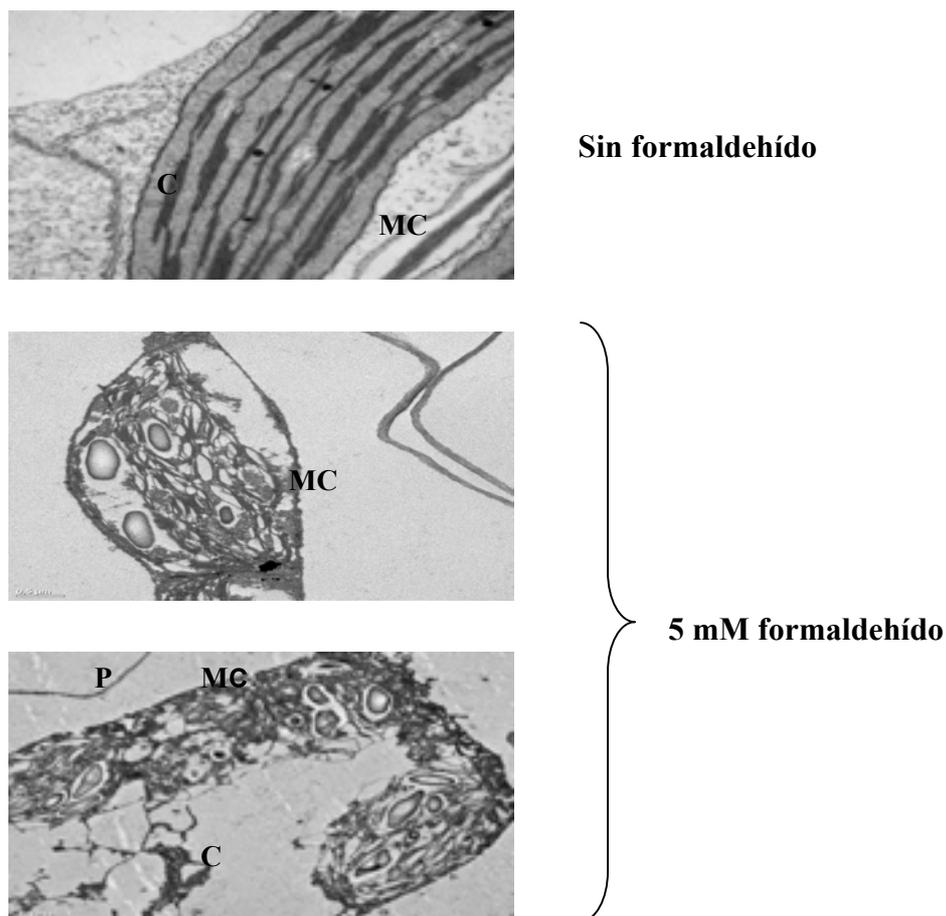


Figura 44. Cortes ultrafinos de hojas de *A. thaliana* (60-80 nm) observados al microscopio electrónico.

C. Cloroplasto, P. Pared celular, MC. Membrana celular.

C. Ensayos de inmunolocalización en células BY2.

1. Localización subcelular de la formaldehído deshidrogenasa dependiente de glutatión (FALDH) en células de tabaco BY2 no sincronizadas.

Los ensayos de inmunolocalización de la FALDH se realizaron en la línea celular BY2. Se utilizaron células en el día 2 de la curva de crecimiento, ya que experimentos previos en nuestro laboratorio habían demostrado que éste era el punto donde se observaba el máximo de proteína FALDH. Además, las células se encontraban en crecimiento exponencial.

Los ensayos de inmunodetección se llevaron a cabo con el anticuerpo policlonal específico contra la FALDH de *A. thaliana* obtenido en esta tesis, a una dilución

1:1000. Como segundo anticuerpo, se utilizó un anticuerpo de rata contra IGg de conejo conjugado con el fluoróforo cianina (color rojo).

Los experimentos de inmunolocalización realizados con células BY2 no sincronizadas, nos permitieron observar que la localización de la FALDH no era solo citoplasmática, si no que, además, presentaba una localización nuclear (Figura 45B). Nos llamó la atención que la FALDH parecía una localización similar a la de los microtubulos de las células tal y como se muestra en la figura 45D. En esta figura, se ve una célula en final de anafase o principio de telofase, la señal correspondiente a la FALDH se detectó en las zonas adyacentes al DNA, que corresponden al huso mitótico o al inicio de la formación del fragmoplasto. El fragmoplasto es una estructura característica de las plantas, constituida por microtubulos y por filamentos de actina.

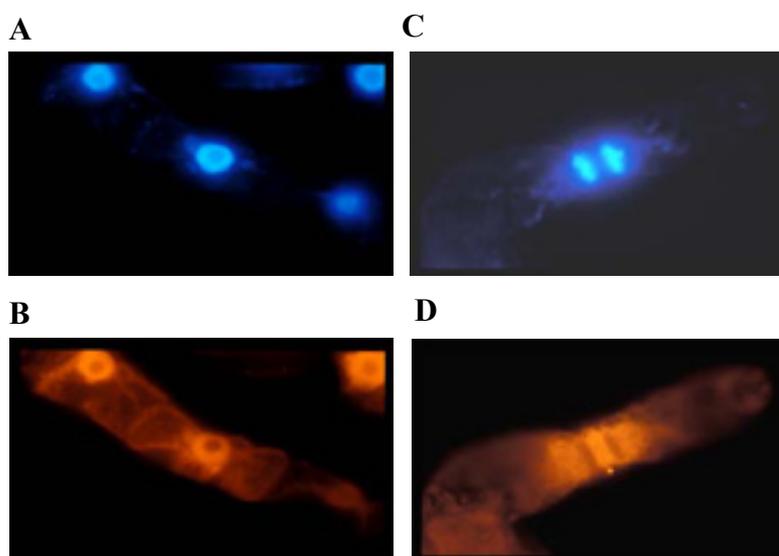


Figura 45. Inmunolocalización subcelular de la FALDH en células BY2.

B. Localización citoplasmática y nuclear.

D. Localización en las estructuras microtubulares.

A y C. Tinción con DAPI.

B y D. Detección con cianina.

Con la finalidad de profundizar más en la localización de la FALDH y averiguar su relación con los microtubulos, decidimos sincronizar las células de tabaco y analizar la distribución de la FALDH en las diferentes fases del ciclo celular. También se analizó la distribución de la tubulina utilizando un anticuerpo monoclonal anti- α -tubulina de rata a

una dilución 1:1000, y como segundo anticuerpo se utilizó un anticuerpo contra IGg de rata conjugado con el fluoróforo FITC (color verde).

2. Localización subcelular de la formaldehído deshidrogenasa dependiente de glutatión en células de tabaco BY2 sincronizadas.

2.1 Sincronización de células BY2.

La sincronización de las células de tabaco se realizó incubando las células con afidilcolina. La afidilcolina es una droga que inhibe la síntesis de la α -polimerasa, de manera que todas las células quedan bloqueadas en la fase de síntesis del DNA (Fase S) (Sala y col., 1982; Spadari y col., 1982).

La evaluación de la sincronización se realizó mediante la determinación del índice mitótico. Para ello, después de eliminar la afidilcolina del medio, las células fueron teñidas con DAPI, y observadas al microscopio para determinar el índice mitótico según la siguiente formula:

$$\text{Índice mitótico} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de células en división}}{\text{N}^\circ \text{ total de células}} \times 100$$

Los resultados se presentan en la Figura 46, donde se puede observar que se consiguió obtener casi un 45% de células sincronizadas.

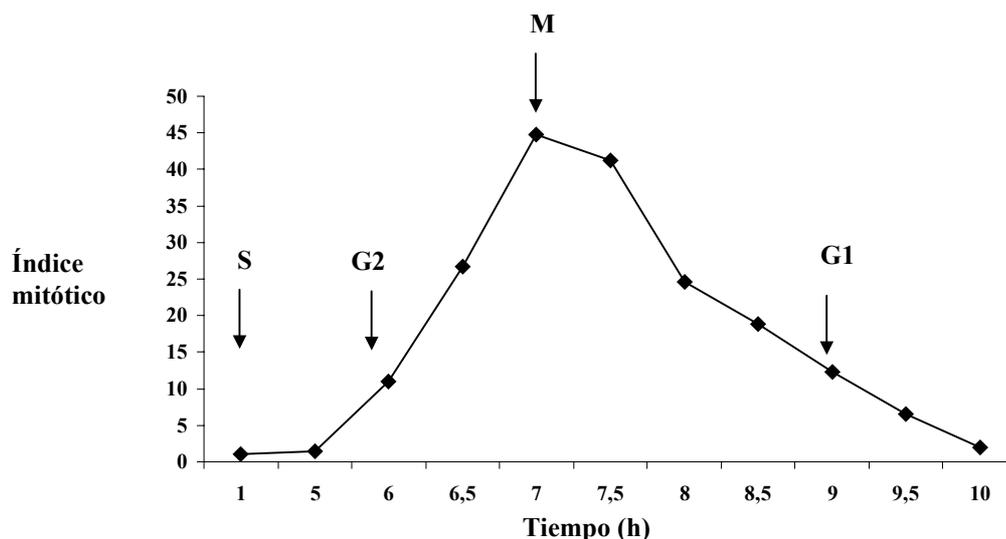


Figura 46. Representación del índice mitótico obtenido en la sincronización de las células BY2 con afidilcolina.

2.2 Distribución de la FALDH en células BY2 durante el ciclo celular.

Se realizó un doble marcaje de las células. Por un lado un marcaje con el anticuerpo policlonal anti-FALDH para ver la localización de la FALDH, y por otro un segundo marcaje con un anticuerpo monoclonal anti- α -tubulina. En todas las etapas del ciclo celular, los marcajes mostraron una colocalización de la FALDH con la α -tubulina.

- Interfase (S, G2).

La FALDH presenta una localización principalmente nuclear, aunque también se observa que está localizada en los microtubulos que radian del núcleo hacia el citoplasma (Figura 47B, E). La señal obtenido fue idéntico a la de la α -tubulina (Figura 47C, F).

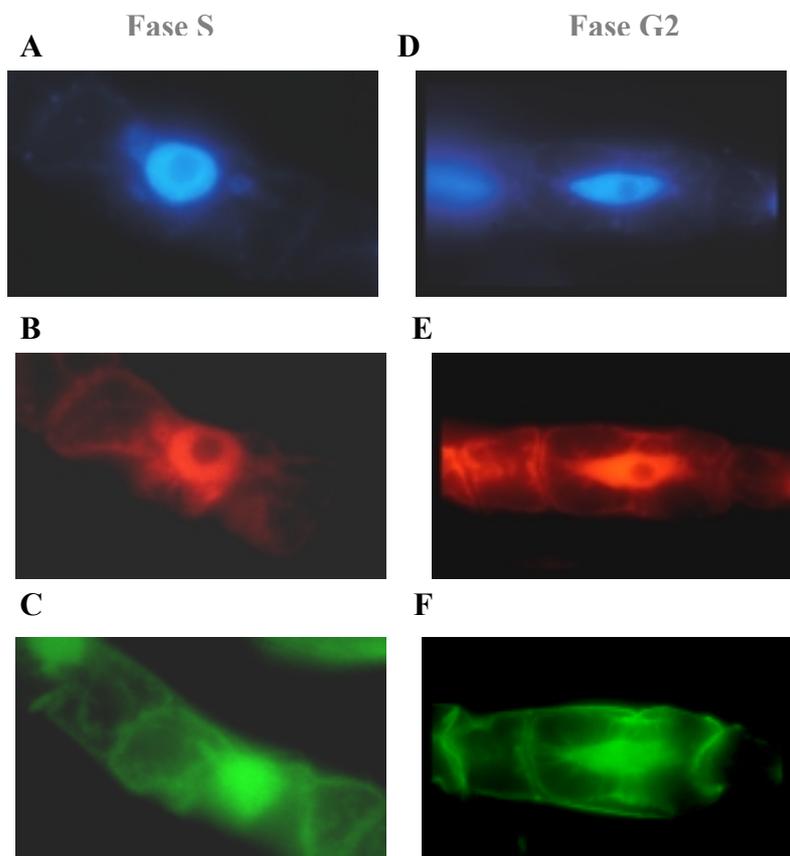


Figura 47. Localización subcelular de la FALDH y de la α -tubulina durante la interfase (S,G2).

A y D. Tinción con DAPI.

B y E. Señal correspondiente a la FALDH (cianina).

C y F. Señal correspondiente a la α -tubulina (FITC).

- Mitosis.

Profase. La FALDH se localiza en la zona donde se encuentran los cromosomas condensados (Figura 48B) de la misma manera que la α -tubulina (Figura 48C).

Metafase. La FALDH se localiza en el huso mitótico (Figura 48E), formado por haces de microtubulos, de manera similar a la α -tubulina (Figura 48F).

Telofase. La FALDH parece estar localizada igual que la α -tubulina en el fragmoplasto (Figura 48H, I, K y L).

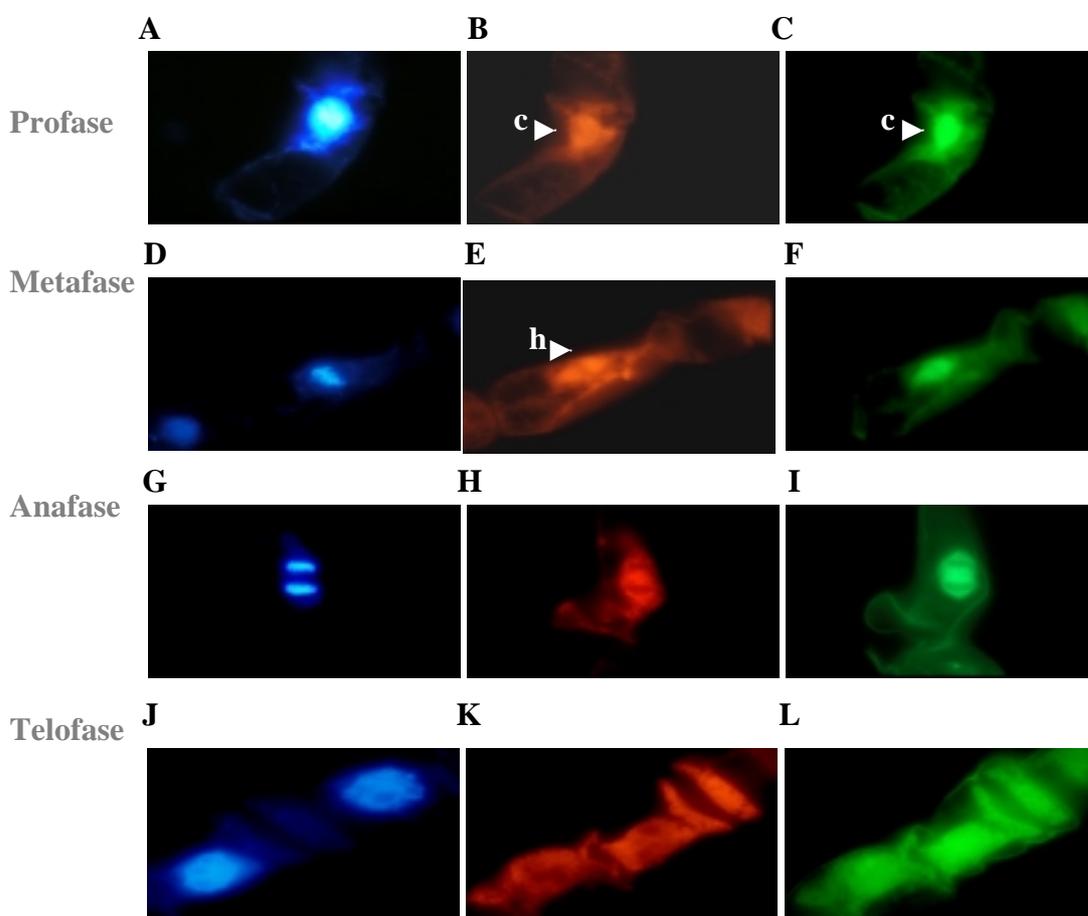


Figura 48. Localización subcelular de la FALDH y la α -tubulina durante la mitosis en células BY2.

A, D, G y J. Tinción con DAPI

B, E, H y K. Señal correspondiente a la FALDH durante las diferentes etapas de la Mitosis.

C, F, I y L. Señal correspondiente a la α -tubulina durante las diferentes etapas de la Mitosis. Metafase, Anafase y Telofase.

c. Cromosomas condensados, h. Huso mitótico, f. Fragmoplasto.

Se utilizaron dos controles para comprobar la especificidad del marcaje (Figura 49). El primer control consistió en incubar las células BY2 con el suero preimmune del conejo a una dilución 1:1000 (Figura 49B). El segundo control consistió en incubar las células BY2 se incubaron con el anticuerpo anti-FALDH preincubado anteriormente con la proteína FALDH pura (Figura 49D). En ninguno de los dos casos se detectó señal fluorescente confirmando de esta manera la especificidad del marcaje de la FALDH.

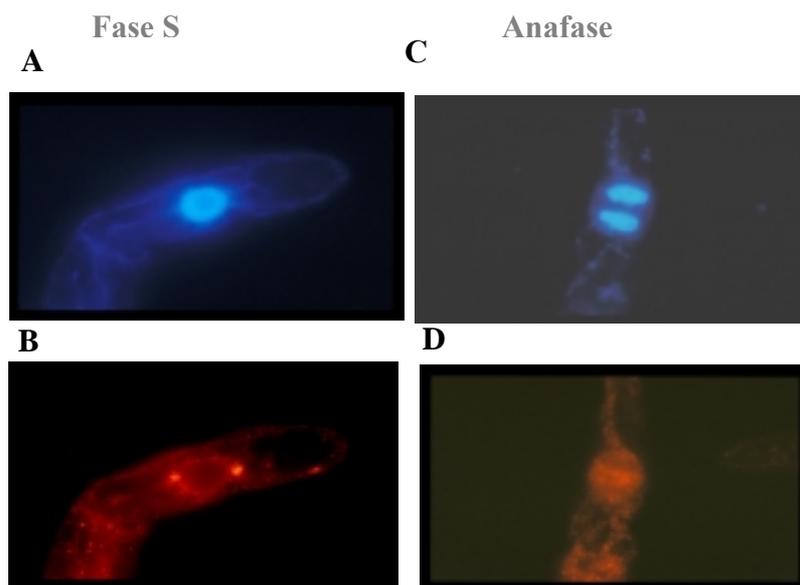


Figura 49. Controles negativos usados en los experimentos de inmunolocalización.
B. Células BY2 incubadas con el suero preimmune.
D. Células BY2 incubadas con el anticuerpo anti-FALDH preincubado con 1,6 μ M de proteína FALDH pura.
A y C. Tinción con DAPI.

3. Tratamiento de las células BY2 con propizamida.

Con el fin de corroborar los datos que muestran una localización de la FALDH en los microtubulos, nos planteamos hacer un tratamiento de las células BY2 con una droga anti-microtubular. Se utilizó la propizamida (Hasezawa, 1997), que actúa bloqueando enzimas implicadas en la polimerización de los microtubulos durante la mitosis.

Células BY2 en el día 2 de su crecimiento fueron incubadas con 100 μ M propizamida. En este experimento las células no fueron sincronizadas, y por lo tanto era difícil encontrar células en las diferentes etapas de la mitosis. Sin embargo, los resultados expuestos en la figura 50, demuestran claramente que con la despolimerización de los

microtúbulos se obtiene un marcaje disperso de la FALDH, lo mismo que ocurre en el caso de la α -tubulina.

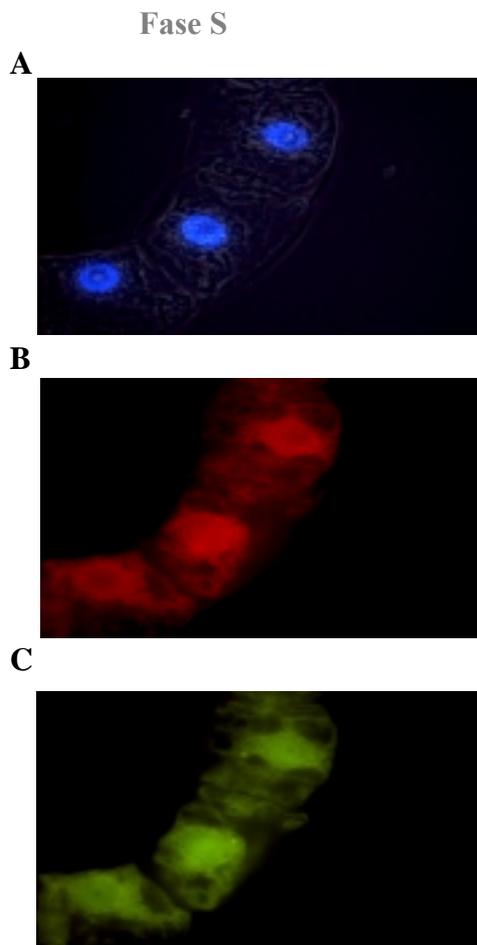


Figura 50. Inmunolocalización de la FALDH y de la α - tubulina en células BY2 tratadas con propizamida.

A. Tinción con DAPI.

B. Señal correspondiente a la α -tubulina

C. Señal correspondiente a la FALDH.

El objetivo general de esta tesis consistió en el estudio en profundidad de la formaldehído deshidrogenasa dependiente de glutatión (FALDH) de *Arabidopsis thaliana*. Para ello fue necesario poner a punto una serie de técnicas que permitieron llevar a cabo los siguientes objetivos parciales:

- 1) Purificación de la FALDH de *A. thaliana* y su caracterización cinética.

- 2) Estudio del papel del enzima en la protección de la célula frente al formaldehído:
 - a) Sobreexpresión del gen FALDH en una cepa delecionada de levadura, y análisis de la resistencia de esta cepa frente a concentraciones altas de formaldehído.
 - b) Obtención de plantas transgénicas de sobreexpresión del gen de la FALDH de *A. thaliana*, con el fin de estudiar la presencia de grandes cantidades del enzima en la planta transgénica permitían a esta una mejor capacidad de descontaminación de formaldehído exógeno.

- 3) Estudio de la localización subcelular del enzima.

1. Caracterización de la FALDH de *A. thaliana*.

El gen que codifica por la FALDH de *A. thaliana* fue el primer gen FALDH de plantas clonado (Martínez y col., 1996). Sin embargo, desde entonces y hasta el inicio de este trabajo, no se había purificado a homogeneidad ni caracterizado en profundidad la FALDH de esta planta.

La FALDH de *A. thaliana* se detecta en forma de varias bandas anódicas en geles de almidón teñidos por actividad (Figura 11, carril 2). Este patrón de bandas es característico de las FALDHs (Fernández y col., 1993; Kaiser y col., 1993; Danielsson y col., 1994b; Fernández y col., 1995). Se ha sugerido que la modificación post-traducciona sea la explicación de la presencia de estas múltiples formas, ya que la FALDH está codificada por un único gen en todas las especies estudiadas (Smith, 1986; Uotila y Koivusalo, 1987; Hur y Edenberg, 1992; Fernández y col., 1993; Martínez y col., 1996;). La determinación de la secuencia de aminoácidos de la FALDH de pulpo no presentó ninguna evidencia de heterogeneidad estructural (Kaiser y col., 1993).

En los extractos de proteína de *A. thaliana*, también se pudo detectar la alcohol deshidrogenasa activa con etanol, llamada clase P (Shafqat y col., 1996) por tinción con alcohol crotilico (Figura 11, carril 1). Este enzima, a pesar de ser funcionalmente similar a la ADH clase I de vertebrados, presenta mayor similitud estructural con la FALDH (Martínez y col., 1996; Shafqat y col., 1996).

1.1 Purificación de la FALDH de *A. thaliana* a partir de la línea celular T87.

La purificación del enzima a partir de la línea celular de *Arabidopsis* T87, nos permitió su caracterización preliminar.

Extractos proteicos crudos mostraron la presencia de actividad formaldehído deshidrogenasa dependiente de glutatión en cantidades relativamente bajas (5 mu/mg de proteína). El valor obtenido es aproximadamente del mismo orden que el encontrado en guisante (4 mu/mg) (Shafqat y col., 1996), y casi dos veces mas alto que en la cinta "spider plant" (Giese y col., 1994).

El procedimiento de purificación se inició con una cromatografía de intercambio iónico (DEAE-Sepharosa), en que la FALDH quedó retenida en la columna y fué eluída al aplicar un gradiente de fuerza iónica. Esta etapa es necesaria para separar otras actividades enzimáticas que interfieren en las medidas de actividad FALDH, principalmente la de la formaldehído deshidrogenasa independiente de glutatión y la de la glutatión reductasa. La cromatografía en Blue-Sepharosa, que normalmente se realiza a continuación en los procedimientos de purificación de la FALDH de las distintas especies, en nuestro caso no unía el 100% de la actividad FALDH del extracto, por lo cual, se buscaron cromatografías alternativas. La cromatografía de intercambio aniónico (Protein-Pack 8HR en HPLC), resultó ser una buena alternativa, seguida de una cromatografía de afinidad en Blue-Sepharosa como última etapa de purificación.

Según se indicó anteriormente, la purificación de la FALDH de *A. thaliana* nos permitió extraer pocas cantidades de proteína. Pudimos demostrar, sin embargo, que el enzima de *Arabidopsis* presenta una alta afinidad por el S-hidroximetilglutatión, obteniéndose una K_m de 7 μ M. El valor de la actividad específica obtenido fué de 2,8 u/mg.

1.2 Purificación de la FALDH recombinante de *A. thaliana*.

La purificación de la FALDH recombinante, mediante sobreexpresión del gen FALDH de *A. thaliana* en una cepa de levadura previamente deleccionada, nos permitió obtener 4 mg de enzima y poder realizar un estudio cinético completo. En este caso, se incluyó una cromatografía en hidroxapatito que permitió separar por completo la actividad reductora de formaldehído en presencia de NADH (metanol deshidrogenasa) de la actividad oxidante de formaldehído (FALDH).

1.3 Propiedades físico químicas de la FALDH de *A. thaliana*.

El peso molecular de la cadena polipeptídica de la FALDH, determinado mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS, fué de 45000 Da. Este valor es ligeramente superior al deducido a partir de la secuencia del cDNA. El cDNA contiene una fase abierta de lectura de 1136 pb, que corresponde a un polipéptido de 379 aminoácidos y a un peso molecular de 40500 Da (Martínez y col., 1996). Esta discrepancia también ha sido observada en otras alcohol deshidrogenasas de cadena media (Julía y col., 1987; Moreno y col., 1994; Fernández y col., 1995).

El punto isoeléctrico determinado por electrofocalización analítica fue de 5,3-5,6. Al igual que en los geles de almidón, también por este método se observó la presencia de varias formas electroforéticas de la FALDH, siendo ésta una característica de las ADHIII de animales (Parés y Vallee, 1981; Kaiser y col., 1991; Danielson y col., 1994b) y de plantas (Shafqat y col., 1996; Wippermann y col., 1999). Respecto a este fenómeno, ya se había descrito que las diferencias en el punto isoelectrico de las bandas electroforéticas no correspondían a variaciones en la estructura primaria del enzima, lo que sugería que estas variantes deberían ser el resultado de modificaciones post-traduccionales de la misma cadena polipeptídica (Giri y col., 1989). Trabajos posteriores realizados por Iborra (Iborra, 1994), demostraron que ninguna de las modificaciones posttraduccionales típicas, como la fosforilación y la glicosilación, tienen lugar en la FALDH.

La FALDH de *A. thaliana* es reconocida por un anticuerpo policlonal obtenido contra la FALDH de rata (Figura 15). Este resultado indica que es estructuralmente similar a la FALDH de rata. Este resultado concuerda con la información bibliográfica de que la FALDH está muy conservada a lo largo de la evolución (Martínez y col., 1996; Shafqat y col., 1996; Dolferus y col., 1997; Wippermann y col., 1999).

1.4 Propiedades cinéticas de la FALDH de *A. thaliana*.

Nuestros resultados han demostrado que la FALDH de *A. thaliana* presenta las características enzimáticas típicas de todas las FALDH estudiadas hasta el momento en mamíferos, invertebrados, microorganismos y plantas. Las propiedades enzimáticas más importantes son las siguientes:

- Es prácticamente inactiva a moderadas concentraciones de etanol, y muy activa en presencia de formaldehído y glutatión.
- A pH 10, cataliza de forma eficiente la oxidación de alcoholes específicos de plantas, como farnesol y geraniol. Sin embargo, a pH fisiológico (7,5) solamente con el farnesol presenta una actividad significativa, con una k_{cat}/K_m bastante baja, de $780 \text{ mM}^{-1}\text{min}^{-1}$.
- Otros alcoholes de cadena larga, como el 12-hidroxidodecanoico, no son buenos substratos para el enzima.
- El enzima es específico para el NAD^+ como coenzima, no pudiendo utilizar NADP^+ .
- La K_m para el S-hidroximetilglutathion es de $7 \mu\text{M}$. Este valor es del mismo orden que el obtenido para otras especies de plantas, como el guisante ($2 \mu\text{M}$) o el maíz ($12 \mu\text{M}$). El valor de la constante de velocidad, k_{cat} , frente al S-hidroximetilglutathion es relativamente alto en comparación con el que presentan otras especies de plantas. Tal como puede verse en la Tabla 7, en general los valores de la K_m para el hidroximetilglutathion son inferiores en los organismos pluricelulares que en los unicelulares. Sin embargo, el incremento simultáneo de la k_{cat} , hace que la relación k_{cat}/K_m (eficiencia catalítica) para el S-hidroximetilglutathion sea del mismo orden para la mayoría de especies.

Tabla 7. Comparación de las propiedades enzimáticas de las FALDH de diferentes especies.

| Organismo | K_m (μM) | k_{cat} (min^{-1}) | k_{cat}/K_m ($\text{mM}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) |
|---------------------------|----------------------------|------------------------------------|---|
| Humano | 4 | 200 | 50.000 |
| Rata | 0,92 | 216 | 235.000 |
| Pulpo | 1,5 | 300 | 200.000 |
| <i>S. cerevisiae</i> | 25 | 3.300 | 132.000 |
| <i>E. coli</i> | 94 | 9.350 | 100.000 |
| <i>D. melanogaster</i> | 6 | 960 | 160.000 |
| Guisante | 2 | 380 | 190.000 |
| Maiz | 12 | 473 | 40.000 |
| <i>A. thaliana</i> | 7 | 1351 | 193.000 |

Las actividades fueron medidas a pH 8,0 con S-hidroximetilglutación como sustrato. Los datos de *E.coli*, *Drosophila*, guisante, maiz, pulpo, rata y humano proceden de (Koivusalo y col., 1989; Holmquist y Vallee, 1991; Gutheil y col., 1992; Fernández y col., 1993; Danielsson y col., 1994a; Shafqat y col., 1996; Wipperman y col., 1999).

La levadura, las bacterias y en general todos los microorganismos, están expuestos a ambientes con cantidades de formaldehído que potencialmente pueden ser elevados. En estas condiciones, un enzima con valores altos de K_m y de k_{cat} podría ser catalíticamente más eficiente. En cambio, el ser humano, las plantas y en general todos los organismos pluricelulares, están expuestos a bajos niveles de formaldehído, generado endógenamente por el funcionamiento normal de varias vías metabólicas (ver Introducción). Por lo tanto, es de esperar que las FALDH de los organismos pluricelulares presenten valores de K_m más bajos, adaptados a estas condiciones.

Los datos obtenidos para la FALDH de *A. thaliana* apoyan la hipótesis formulada por Parés y col., (Fernández y col., 1999), de una estrecha correlación entre los valores catalíticos de la FALDH y la necesidad de una eliminación eficiente del formaldehído en el organismo correspondiente, manteniendo una relación óptima de k_{cat}/K_m que parece tender a un valor de aproximadamente $200.000 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ (Tabla 7). Esta correspondencia indica una fuerte restricción evolutiva en las constantes catalíticas, y

confirma el papel central de la FALDH en la detoxificación del formaldehído (Martínez y col., 1996; Shafqat y col., 1996; Fliegman y col., 1997).

2. Aspectos funcionales de la sobreexpresión de la FALDH de *A. thaliana* en *S. cerevisiae*.

Nos propusimos averiguar:

1. Si la expresión del gen de *A. thaliana* en *S. cerevisiae* era capaz de complementar una mutación por delección del gen *SFAI* (gen que codifica por la FALDH de *S. cerevisiae*).
2. Si la sobreexpresión del enzima FALDH de *A. thaliana* en *S. cerevisiae* aumenta la resistencia de ésta última al formaldehído exógeno.

2.1 Efecto de la delección del gen *SFAI* de *S. cerevisiae*.

Nuestros resultados corroboran los resultados previos de otros autores de que la delección del gen FALDH no es letal para la levadura crecida en condiciones de laboratorio (Fernández y col., 1999). Este resultado parece contradictorio cuando se considera el alto grado de conservación de la FALDH entre los distintos organismos estudiados y su presencia ubícua en la naturaleza. Sin embargo, no resulta difícil pensar que frente a tóxicos potentes como el formaldehído, la naturaleza opte por disponer de varias vías de desintoxicación alternativas, con el fin de asegurar la vida celular.

Tal y como se ha mencionado en la Introducción de esta tesis, existen varias vías alternativas que permiten la eliminación del formaldehído. Entre ellas la vía del tetrahidrofolato, ya que entre el 1% y el 3% del formaldehído libre reacciona con tetrahidrofolatos para dar lugar a 5,10-metilen-tetrahidrofolato (Blakley, 1960; Heck y col., 1984). En términos cuantitativos, sin embargo, la vía dependiente de tetrahidrofolato tiene un significado mínimo en el metabolismo del formaldehído, mientras que en el metabolismo del formato dicha vía es cuantitativamente muy importante. En levaduras metilotróficas, se ha descrito una metilformato sintasa que cataliza la formación de metilformato a partir de formaldehído y metanol, en presencia de NAD^+ (Sakai y col., 1995; Murdanoto y col., 1997). Por otra parte, la aldehído

deshidrogenasa mitocondrial (EC 1.2.1.5) (Cinti y col., 1976; Tamaki y Hama, 1980), tiene una contribución individual pequeña en la eliminación del formaldehído en condiciones normales, aunque podría jugar un papel importante a concentraciones elevadas de este compuesto, debido al alto valor de su K_m (Dicker y col., 1986). También se ha descrito que la sobreexpresión de la alcohol deshidrogenasa I de *S. cerevisiae* confiere resistencia frente a los efectos tóxicos del formaldehído, y que el mutante nulo es más sensible al formaldehído que la levadura salvaje. Sin embargo, la resistencia a formaldehído obtenida al expresar la alcohol deshidrogenasa I en un plásmido multicopia de levadura es sensiblemente inferior a la obtenida con la FALDH (Grey y col., 1996).

En conclusión, a partir de nuestros estudios y de otros previos realizados por diferentes autores (Wehner y col., 1993; Fernández y col., 1995), parece claro que la FALDH es el principal enzima implicado en la eliminación del formaldehído intracelular. Aunque la deleción de la FALDH no es letal en condiciones de laboratorio, cabe esperar que, en la naturaleza, donde la levadura puede estar expuesta a concentraciones elevadas de formaldehído procedente del medio exterior, la ausencia de FALDH representara un factor de selección negativo para su supervivencia..

2.2 Resistencia a formaldehído.

Trabajos efectuados por Fernández y col., en levadura (Fernández y col., 1999), demostraron claramente que existe un metabolismo basal de formaldehído en una cepa con el gen *SFAI* deleciónado, ya que ésta puede crecer a concentraciones de 0,3 mM de formaldehído en el medio, aunque con clara desventaja en comparación con la cepa salvaje. Además, en el mismo trabajo se demostró que, a 0,6 mM de formaldehído, sólo la cepa salvaje era capaz de crecer tras 34 horas de cultivo.

Teniendo en cuenta estos resultados, decidimos averiguar la capacidad de metabolizar formaldehído exógeno de una cepa de levadura que sobreexpresaba el gen FALDH de *A. thaliana*.

Nuestros resultados demostraron que, a una concentración de 1 mM de formaldehído en el medio de crecimiento, la cepa de levadura que sobreexpresaba el gen FALDH de *A. thaliana* era capaz de crecer a la misma velocidad que en ausencia de formaldehído, mientras la cepa salvaje era incapaz de crecer (Figura 28a). A una concentración de 2

mM de formaldehído, la cepa salvaje de *S. cerevisiae*, como era de esperar, fué incapaz de crecer. En cambio, la cepa que sobreexpresaba el gen de *A. thaliana* fué capaz de crecer, aunque su tiempo de latencia fué superior al que mostraba la misma cepa en ausencia de formaldehído, o en presencia de 1 mM de formaldehído.

La cuantificación del formaldehído presente en el medio de cultivo a distintos tiempos confirmó que la cepa que sobreexpresaba la FALDH de *Arabidopsis* tenía una gran capacidad de eliminar el formaldehído exógeno, ya que en sólo 10 horas de cultivo era capaz de reducir casi el 50% del formaldehído presente en el medio, y al cabo de 40 horas de eliminarlo en su totalidad. Aparentemente, durante la fase de latencia, la cepa de sobreexpresión es capaz de metabolizar activamente el formaldehído, y en el momento en que la concentración de formaldehído del medio ha descendido lo suficiente, la levadura puede iniciar la fase de crecimiento exponencial (Figura 28b).

Todo lo expuesto anteriormente apoya la idea de que la FALDH tiene un papel esencial en el metabolismo del formaldehído intracelular, y que, si bien no es imprescindible para la vida celular, su presencia es claramente ventajosa para ella en presencia de formaldehído.

3. Utilización de plantas transgénicas para la eliminación del formaldehído exógeno.

Cuando respiramos el aire interior de un automóvil, de casa, de la escuela o de la oficina, la cantidad de contaminantes que entra en nuestros pulmones puede ser mucho mayor que en muchos lugares al aire libre (<http://www.naturvida.com>). El formaldehído es, tal como se mencionó en la introducción, uno de los contaminantes más abundantes y que está estrictamente asociado a la contaminación de interiores. Su elevada solubilidad le permite ser absorbido por las vías respiratorias altas, aunque pequeñas cantidades pueden penetrar en los pulmones.

Hace ya algunos años, la NASA descubrió que algunas variedades de plantas podían disminuir la concentración de un amplio espectro de contaminantes, entre ellos el formaldehído (Tabla 8)

Tabla 8. Algunas de las plantas más efectivas en la eliminación de formaldehído.

| Nombre común | Nombre científico |
|--------------------|--------------------------|
| Palma enana | Chamadorea |
| Perenne china | Aglaonema Modestum |
| Hiedra | Hedera Helix |
| Marginata gerbera | Gerbera Jamesonii |
| Margarita dracanea | Marginata |
| Planta del maíz | Dracaena Massangeana |
| Crisantemo | Chrysanthemum morifolium |
| Sanseveria | Sansevieria Laurenti |

Basándonos en estudios realizados por otros autores sobre el uso de plantas de interior para revitalizar y purificar espacios cerrados (Dingle y col., 2000), decidimos estudiar si la presencia de grandes cantidades del enzima FALDH en una planta como *A. thaliana* permitía a ésta una mejor capacidad de descontaminación de cantidades elevadas de formaldehído exógeno.

3.1 Sobreexpresión del transgen CaMV/FALDH en *A. thaliana*.

Se generaron plantas transgénicas de *A. thaliana* portadoras de la construcción CaMV/FALDH, es decir con el cDNA de la FALDH clonado en sentido codificante respecto al promotor CaMV35S (plantas transgénicas de sobreexpresión).

La sobreexpresión del transgen se comprobó por experimentos de Western blot, utilizando primero extractos proteicos de plantas transgénicas hemicigotas para el transgen, y de plantas homocigotas posteriormente.

El experimento de Western blot de la generación hemicigota demostró que la mayoría de las líneas aisladas, 16 líneas de un total de 40 líneas que habían sufrido segregación de tipo mendeliana, presentaban un aumento de proteína respecto a la planta sin transformar, aumento debido a la expresión del cDNA de la FALDH dirigida por el promotor fuerte CaMV35S.

El análisis de las plantas homocigotas, demostró que la sobreexpresión se mantenía en la mayoría de las líneas transgénicas, a excepción de las líneas S9, S11, S12 S13 y S22,

en las que se observaron niveles más bajos de la proteína FALDH que en *Arabidopsis* sin transformar.

Esta disminución de la expresión del gen con la homocigosis, puede ser debida a un proceso de silenciamiento. En general la mayoría de los procesos de silenciamiento se deben a la actuación de mecanismos post-transcripcionales, en los que aumenta la tasa de degradación del transcrito (DeCarvalho y col., 1995). También puede ser debido a un mecanismo de tipo transcripcional, evitando la transcripción del gen mediante metilación (Wassenger y col., 1994). El silenciamiento de tipo transcripcional se ha asociado a genes que presentan homología en su región promotora, y el silenciamiento de tipo post-transcripcional a genes que presentan homología en su región codificante. De este modo, el silenciamiento observado en las líneas anteriormente mencionadas podría deberse a un mecanismo de regulación post-transcripcional.

De las 11 líneas homocigotas analizadas por Western blot, se seleccionaron 7 líneas entre aquellas que presentaban mayor nivel de sobreexpresión de la FALDH, y se realizaron estudios de actividad formaldehído deshidrogenasa dependiente de glutatión, para averiguar si los niveles de proteína FALDH correspondían a un aumento similar de la actividad enzimática. Los resultados obtenidos mostraron que existe una correlación entre los niveles de proteína FALDH detectada por Western blot y la actividad enzimática FALDH. Se consiguió obtener plantas con niveles de actividad FALDH muy elevadas (Figura 38).

Posteriormente se realizaron ensayos mediante Northern blot para comparar si existía una correlación entre los niveles de proteína FALDH, el aumento de actividad FALDH observado y los niveles de RNA mensajero. Se observó que los niveles de RNA eran, como se esperaba, superiores a los de la planta control.

3.2 Las plantas transgénicas son más resistentes a formaldehído.

Desde hace poco tiempo, como consecuencia de la alta contaminación ambiental, se está comenzando a aplicar la fitoremediación como una tecnología innovadora (Cunningham, 1996; Salt y col., 1998). Esta técnica utiliza las características naturales de las plantas para extraer del medio ambiente compuestos orgánicos volátiles (VOCs), en particular aquellos que abundan en el interior de ambientes de trabajo como industrias o laboratorios (Raskin, 1996), o bien para degradar y metabolizar

compuestos que pueden ser tóxicos en suelos o en aguas, como los metales pesados (Nieboer y col., 1980; Nriagu y col., 1988; Bizili y col., 1999; Blaylock, 2000) o elementos radioactivos (Ebbs y col., 1998; Huang y col., 1998).

El formaldehído, como ya se ha descrito en la Introducción, es un contaminante altamente reactivo, que está presente en el medio ambiente en concentraciones elevadas, como resultado de las actividades industriales humanas. Está listado por la IARC (Internacional Agency for Research on Cancer) y por la OSHA (Occupational Safety and Health Administration) como un probable carcinógeno en humanos (IARC, 1995). El NTP (National Toxicology Program, USA) incluye el formaldehído en el Catálogo Anual de Carcinógenos.

Las plantas modificadas por métodos biotecnológicos han demostrado ser útiles en la fitoremediación. Uno de los objetivos de esta tesis fue estudiar la posible aplicación de plantas modificadas genéticamente en la protección medioambiental. Para ello generamos plantas transgénicas que sobreexpresan el gen FALDH, y conseguimos niveles de actividad formaldehído deshidrogenasa dependiente de glutatión espectaculares, llegando a superar 17 veces la actividad FALDH de las plantas sin transformar. Seleccionamos 4 de las líneas transgénicas que presentaban un mayor aumento de actividad FALDH, con el fin de estudiar si la presencia de grandes cantidades del enzima permitía una mejor capacidad de metabolizar elevadas concentraciones de formaldehído exógeno. Nuestros resultados muestran que en presencia de 2 mM formaldehído (50 ppm), las 4 líneas transgénicas de sobreexpresión eran capaces de metabolizar el formaldehído añadido mas rápidamente que la planta salvaje. Sin embargo, sorprendentemente, la planta salvaje fue capaz de reducir casi en un 80% el formaldehído añadido al medio al cabo de 48 h de incubación. *A. thaliana* parece ser una planta bastante eficaz en absorber contaminantes atmosféricos, como en este caso el formaldehído. Cabe destacar que el formaldehído a una concentración de 2 mM no resultó ser toxico para las plantas después de 48 horas de incubación (Figura 43).

En presencia de 5 mM de formaldehído (125 ppm), un valor de concentración que excede en mucho los límites de la tolerancia humana (Tabla 9), algunas de las líneas transgénicas (líneas 1 y 6) pudieron metabolizar hasta el 50% del formaldehído

presente en el medio en solo 48 horas. En cambio, la planta salvaje sólo pudo metabolizar el 20% del formaldehído exógeno al cabo de 48 horas.

Tabla 9. Relación entre la concentración de formaldehído y su efecto sobre la salud humana.

| Concentración ambiental (ppm) | Efectos |
|-------------------------------|---|
| < 0.05- 1,5 | No se observan efectos en el 50-70% de las personas expuestas |
| 0,05-2 | Irritación ocular |
| 0,1-25 | Irritación de las vías respiratorias bajas (nariz y garganta) |
| 5-30 | Irritación de las vías respiratorias bajas |
| 50-100 | Edema pulmonar, neumonía |
| > 100 | Muerte |

Datos ofrecidos por la sociedad anatómica española. **Acta de Barcelona 1996.**

Estos resultados confirman una vez más el papel esencial del enzima en el metabolismo de formaldehído *in vivo*.

Durante el tratamiento de las plantas con 5 mM formaldehído se observó que, a partir de las 24 horas de tratamiento, tanto las plantas transgénicas como las plantas salvajes presentaban clorosis. El análisis al microscopio electrónico demostró un deterioro de los cloroplastos, lo que puede explicar el fenotipo observado.

Como se muestra en la figura 51, el formaldehído es metabolizado principalmente por oxidación a ácido fórmico, que a continuación es oxidado a CO₂. La conversión metabólica de formaldehído a ácido fórmico es catalizada en eucariotas principalmente por la formaldehído deshidrogenasa dependiente de glutatión (FALDH) (Vía 1), aunque se cree, como se mencionó anteriormente, que la aldehído deshidrogenasa mitocondrial, a altas concentraciones de formaldehído, también podría participar en su metabolismo (Dicker y col., 1986) (Vía 2). Otra vía secundaria alternativa es mediante la acción de la catalasa (Vía 3), aunque esta reacción es dependiente de la velocidad de regeneración de H₂O₂ (Waydhas y col., 1978).

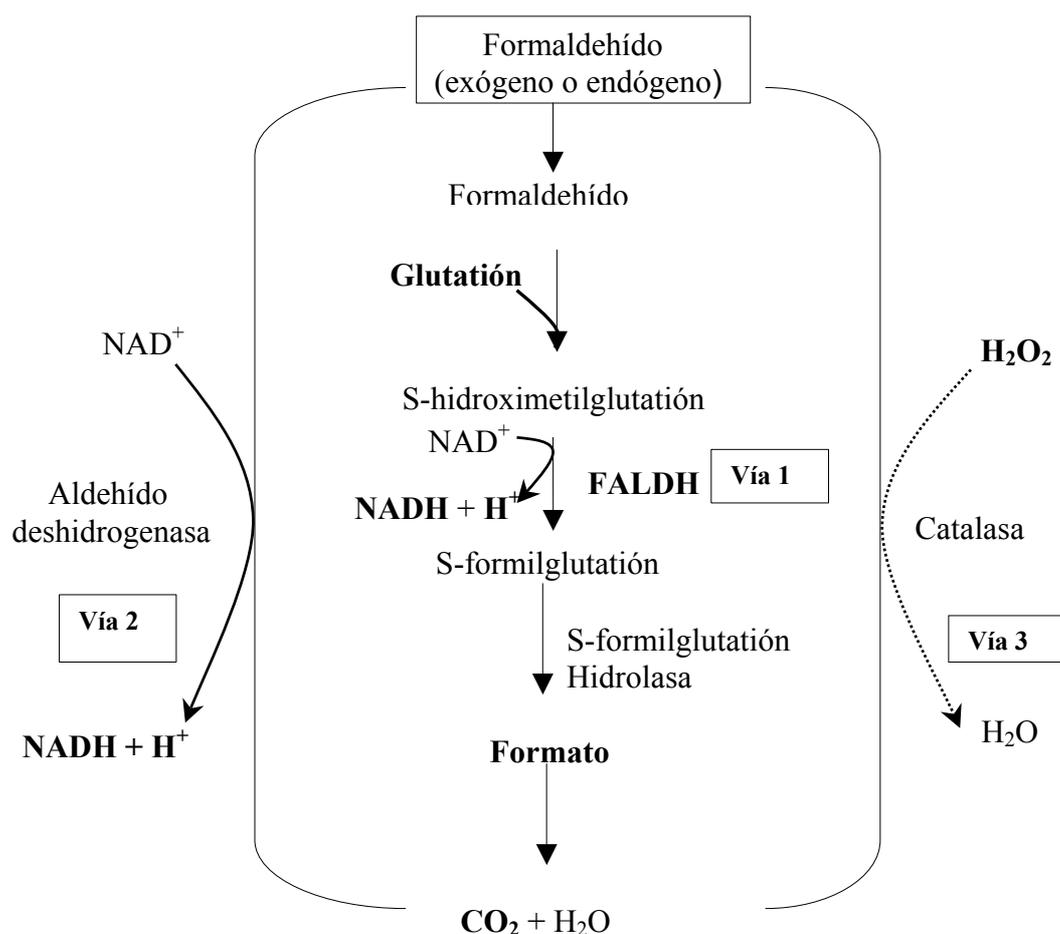


Figura 51. Diferentes vías de metabolismo del formaldehído.

Basándonos en las reacciones de la figura 51, hemos propuesto varias hipótesis para explicar la clorosis observada en las plantas transgénicas de sobreexpresión sometidas a concentraciones elevadas de formaldehído:

1) La oxidación de un exceso de formaldehído por la FALDH (vía 1), o por la aldehído deshidrogenasa (vía 2) puede alterar el equilibrio redox NAD^+/NADH generando un exceso de NADH. Este exceso de NADH puede dar lugar a la formación de superóxido y otras especies reactivas del oxígeno si no hay disponibilidad suficiente de aceptores electrónicos para regenerar el NAD^+ (Kukielka y col., 1994). Tanto el O_2^- como sus derivados, peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radical hidroxilo (OH^\cdot), son especies de oxígeno muy reactivas que causan la oxidación de los lípidos de membrana, proteínas y otras biomoléculas, pudiendo provocar la muerte celular.

2) Otro efecto que podría explicar la clorosis observada en las hojas de las plantas es una disminución en los niveles de glutatión (GSH), como consecuencia de su utilización para formar el S-hidroximetilglutatión.

Los cloroplastos poseen una vía de disipación del O_2^- y del H_2O_2 en la que participan el ascorbato y el glutatión. La enzima superóxido dismutasa, que es muy abundante en los cloroplastos, cataliza la conversión de O_2^- en H_2O_2 . Los cloroplastos apenas tienen catalasa (vía 3), por lo cual la mayor parte del H_2O_2 generado en los cloroplastos es reducido a H_2O por la ascorbato peroxidasa (Foyer y col., 1997). Los niveles de GSH son mantenidos por reducción del glutatión oxidado mediante la glutatión reductasa (GSSH) (Figura 52).

La presencia de un exceso de formaldehído, podría producir un agotamiento de GSH, lo que podría conducir a una alteración en la relación GSH/GSSG, y por lo tanto a una defensa interna baja contra las especies reactivas del oxígeno, creando una situación de estrés oxidativo.

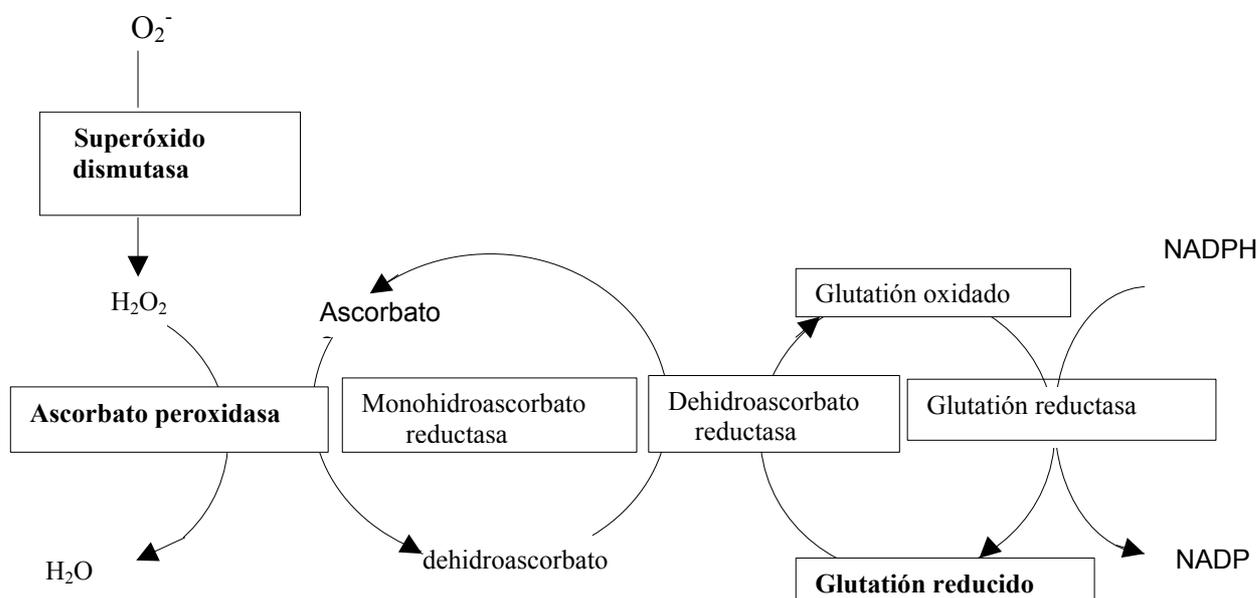


Figura 52. Mecanismo principal de detoxificación del radical superóxido y del peróxido de hidrógeno que se genera en los cloroplastos.

3) Recientemente se ha demostrado que la actividad de las aquaporinas, proteínas responsables del transporte del agua al interior celular, puede ser inhibida a valores de

pH bajos (Gerbeau y col., 2002). Un desequilibrio en el funcionamiento de las aquaporinas, o una inhibición de su actividad, puede llevar a una situación de estrés osmótico. La observación de las plantas incubadas con 5 mM formaldehído en el microscopio electrónico (Figura 43), muestra una separación entre la membrana celular y la membrana plasmática, aspecto característico de las células después de sufrir un choque osmótico. Podría ocurrir que la oxidación de altas concentraciones de formaldehído provocara una acumulación de ácido fórmico (Figura 51, vía 1) que diera lugar a una acidificación excesiva del citoplasma celular. Ello provocaría la inhibición de las aquaporinas, creando una situación de estrés osmótico.

A lo largo de esta tesis hemos venido defendiendo la idea de que la FALDH tiene un papel esencial en el metabolismo del formaldehído, y que su función principal dentro de la célula es la protección de ésta frente a la toxicidad del formaldehído, tanto endógeno como exógeno. La construcción de plantas transgénicas que expresan altos niveles de formaldehído deshidrogenasa dependiente de glutatión (FALDH) puede ser, por tanto, de gran interés para remediar la contaminación atmosférica en espacios interiores.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha definido el Síndrome del Edificio Enfermo (Sick Building Syndrome), como un conjunto de molestias y enfermedades provocadas por la contaminación del aire en espacios cerrados. En la construcción de viviendas se utilizan materiales que liberan formaldehído, de forma que el contenido de formaldehído en el aire de muchas viviendas suele ser superior al del aire exterior. A modo de ejemplo, se ha estimado que el número de individuos expuestos ocupacionalmente al formaldehído en los Estados Unidos excede los 1,5 millones. Las plantas tienen la capacidad de reducir las concentraciones de formaldehído y de muchos otros contaminantes xenobióticos, como el dióxido de nitrógeno (NO₂) o el monóxido de carbono (CO), presentes en espacios cerrados (Wolverton y col., 1984; Wolverton y col., 1989; Henseler y col., 1992; Giese y col., 1994), ya que pueden captarlos a través de sus estomas o de su cutícula e incorporarlos a su metabolismo celular.

4. Inmunolocalización de la FALDH en células de tabaco BY2.

Como se mencionó en el primer capítulo, una de las causas de la toxicidad del formaldehído es debido a que reacciona con las proteínas, produciendo entrecruzamientos de las cadenas polipeptídicas o de éstas con los grupos amino del DNA (Feldman y col., 1973). Esta reacción es mucho más rápida con los nucleótidos libres o con el DNA desnaturalizado que con el DNA nativo (Stollar y col., 1962; Hayat, 1981). En la primera parte de esta tesis, demostramos que la FALDH tiene un papel esencial en la detoxificación del formaldehído. En este capítulo, mediante estudios de localización celular, proponemos que una de las funciones de la FALDH puede ser la de proteger las estructuras nucleares de los efectos tóxicos del formaldehído.

Los experimentos de inmunolocalización de la FALDH en células de tabaco BY2 mostraron que esta proteína presenta, además de una localización nuclear, una distribución similar a la de los microtúbulos durante las diferentes etapas del ciclo celular.

La distribución de los microtúbulos en las células es dinámica. Muchas células en división muestran cinco diferentes disposiciones sucesivas: la cortical, la banda preprofásica, el huso mitótico, el fragmoplasto y la disposición radial (Hasezawa y col., 1997) (Figura 53).

La disposición cortical se encuentra en el citoplasma de células en crecimiento. Los microtubulos se ubican muy cerca de la membrana plasmática, disponiéndose en forma helicoidal, con orientación predominante en angulos de 90° respecto a la dirección de la elongación celular. Se cree que su función es dirigir la disposición de las microfibrillas de celulosa en las paredes celulares.

En la división celular, los microtúbulos forman el huso mitótico y se encargan del desplazamiento de los cromosomas, por un proceso de polimerización y despolimerización de las unidades de tubulina que los componen.

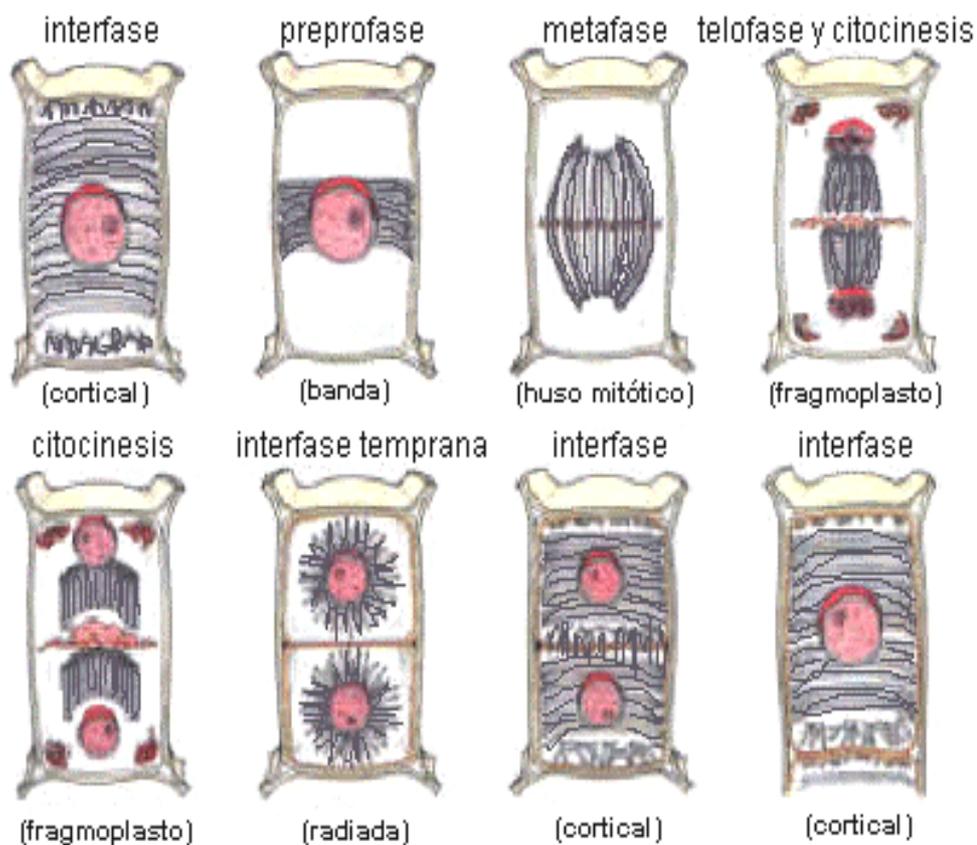


Figura 53. Organización de los microtúbulos durante el ciclo celular en plantas.

En cuanto a su función, los microtúbulos en plantas están involucrados en aspectos dinámicos importantes como:

1. Morfogénesis. La forma de algunas prolongaciones o protuberancias celulares se correlaciona con la orientación y la distribución de los microtúbulos.
2. Movilidad intracelular. Con los otros elementos del citoesqueleto, participan en la ubicación y movimiento de orgánulos citoplasmáticos, como los dictiosomas, y también en el movimiento de los cromosomas durante la mitosis y la meiosis.
3. Transporte intracelular. Actúan como soporte o carril sobre el cual las proteínas motoras transportan vesículas y moléculas grandes.

Una pregunta que cabe plantearse es ¿Qué función tiene esta proteína en el núcleo celular? ¿Qué relación o qué tipo de interacción puede existir entre la FALDH y los microtúbulos?

4.1 Posible función de la FALDH en el núcleo.

En relación con la localización subcelular de la FALDH, siempre se ha asumido que se trata de una localización citoplasmática. Los experimentos de inmunolocalización que se presentan en esta tesis demuestran, por primera vez en plantas, que la localización de la FALDH en las células BY2 no es solo citoplasmática, si no que, además, la FALDH presenta una localización nuclear durante la interfase (G1-S-G2). Por otra parte, nuestros resultados demuestran que, al menos en células BY2, el principal lugar de la localización de la FALDH durante la mitosis es en los microtúbulos.

Hasta ahora existen pocos resultados que respalden la localización de la FALDH dentro del núcleo. En el año 1994, los experimentos de Iborra y col., demostraron que la FALDH se induce en los linfocitos de rata y que se acumula en el citoplasma hasta que la célula entra en la fase S. En la fase S se transporta al núcleo y se asocia, en parte, a los sitios de replicación del DNA. Su función podría ser la de proteger al DNA en fase de replicación de los daños provocados por el formaldehído.

Por otra parte, se ha hipotetizado que La FALDH nuclear podría jugar un papel en la replicación del DNA, implicada en la replicación del DNA, que sería independiente de su función como formaldehído deshidrogenasa. Iborra y col., demostraron que el bloqueo con anticuerpos de los sitios de interacción de la FALDH con proteínas del aparato replicacional, inhibía parcialmente la replicación este proceso (Iborra, 1994). Algo semejante ocurre con otras enzimas, como la gliceraldehído-3-deshidrogenasa, un enzima glicolítico, que dentro del núcleo funciona como uracilo glicosilasa, en la reparación del DNA.

La FALDH es un enzima ancestral, que probablemente ha estado en el núcleo siempre. El núcleo ha evolucionado conjuntamente con esta proteína (que como muchas proteínas del aparato replicacional, esta muy conservada), de modo que esta cuando se ha encontrado en las inmediaciones del DNA que está replicando, para evitar la formación de entrecruzamientos, ha podido servir como un elemento más de tal sistema y ha desarrollado interacciones con otras proteínas del aparato replicacional.

En plantas, no existe ningún trabajo que aborde la localización subcelular de la FALDH. Nuestros resultados de inmunolocalización corroboran los datos obtenidos por

Iborra, demostrando que la FALDH se localiza en el núcleo durante la fase de síntesis de DNA (fase S) y la fase G2 (Figura 48).

Otro resultado potencialmente interesante, no descrito hasta la fecha, es la localización de la FALDH en los microtubulos. Durante la interfase, la FALDH muestra una localización idéntica que la de la tubulina. En el citoplasma, formando los microtubulos corticales y los microtubulos que salen de la envoltura nuclear. En la mitosis, formando el huso mitótico y el fragmoplasto (Figura 48).

Todavía es necesario mucha experimentación para profundizar en la distribución celular de la FALDH en plantas. El hecho de demostrar, por primera vez, que la FALDH se localiza en los microtúbulos, abre una nueva función de este enzima, y sólo el estudio de su localización y distribución en otras especies de plantas, acabará por esclarecer el papel de la FALDH en los microtúbulos.

CONCLUSIONES.

- 1- Se ha aislado y purificado el enzima FALDH de *A. thaliana*. a partir de la línea celular T87. El enzima presenta un punto isoeléctrico de 5,3-5,6, y el peso molecular de la cadena polipeptídica es de 44,6 kDa. Presenta un valor de $K_m = 7 \mu\text{M}$ para el S-hidroximetilglutathion, y es prácticamente inactiva con etanol.
- 2- Se ha construido un mutante de *S. cerevisiae* por delección del gen *SFA1*. La sobreexpresión del gen FALDH de *Arabidopsis* en este mutante nos ha permitido la purificación y la caracterización completa del enzima recombinante.
- 3- La caracterización cinética de la FALDH recombinante de *Arabidopsis* ha demostrado que:
 - Su mejor sustrato es el S-hidroximetilglutathion, con un valor de $K_m = 7 \mu\text{M}$, y una eficiencia catalítica (k_{cat}/K_m) de $193.00 \text{ mM}^{-1}\text{min}^{-1}$.
 - Es específica para el NAD^+ como coenzima.
 - A pH 10, cataliza de forma eficiente la oxidación de alcoholes específicos de plantas, como farnesol y geraniol. Sin embargo, a pH fisiológico (7,5) solamente con el farnesol presenta una actividad significativa ($k_{cat}/K_m = 780 \text{ mM}^{-1}\text{min}^{-1}$).
 - Otros alcoholes de cadena larga, como el octanol y el 12-hidroxidodecanoico, no son buenos sustratos para el enzima.
- 4- La FALDH de *Arabidopsis*, como la de otros organismos eucariotas superiores, presenta valores de K_m y k_{cat} para el S-hidroximetilglutathion significativamente inferiores a los de los microorganismos. Ello sugiere una estrecha correlación entre los valores catalíticos de la FALDH y la necesidad de una eliminación eficiente del formaldehído en el organismo correspondiente, manteniéndose una relación óptima de k_{cat}/K_m , que parece tender a un valor aproximado de $200.000 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$.
- 5- Se ha demostrado que la expresión en un vector multicopia del gen FALDH de *A. thaliana* en levadura confiere a ésta la capacidad de resistir altas concentraciones de formaldehído (2 mM). La levadura salvaje es claramente más sensible al formaldehído

que la levadura con el gen FALDH sobreexpresado. Estos resultados indican que la FALDH tiene un papel importante en el metabolismo del formaldehído en la célula, y que, si bien no es imprescindible para la vida celular, su presencia es claramente ventajosa para la levadura cuando está expuesta a concentraciones altas de formaldehído.

6- A partir de la proteína purificada, se ha obtenido un anticuerpo específico contra la FALDH de *A. thaliana*.

7- Se ha puesto a punto el método de obtención de plantas transgénicas de *Arabidopsis*, por transformación con *Agrobacterium tumefaciens*.

8- Se han obtenido varias líneas transgénicas independientes que sobreexpresan la FALDH de *Arabidopsis* bajo el promotor constitutivo 35S. En homocigosis, se obtienen incrementos de la cantidad y actividad del enzima que varía entre 1,5 y 17 veces.

9- Se ha estudiado la capacidad de las diferentes líneas transgénicas de eliminar formaldehído exógeno a concentraciones muy elevadas (2 mM y 5 mM), demostrándose un incremento entre el 20% y el 30% con respecto a plantas de *Arabidopsis* no transformadas. Estos resultados confirman una vez más el papel esencial del enzima en el metabolismo del formaldehído *in vivo*.

10- La sobreexpresión del gen, sin embargo, no impide que la exposición a formaldehído (5 mM) durante 24 h tenga un efecto fototóxico, que produce la destrucción de los cloroplastos.

11- La inmunolocalización de la FALDH en células de tabaco BY2, muestra que se encuentra tanto en el citoplasma como en el núcleo. Su distribución es similar a la de la γ -tubulina durante las diferentes etapas del ciclo celular.

-
- **Atsushi, S., Manami Ueda and Hiromichi Morikawa.** (2002). *Arabidopsis* glutathione formaldehyde in an S-nitrosoglutathione reductase. *FEBS Letters*, **515**, 20-24
 - **Bagchi, D., Bagchi, M., Hassoun, E. and Stohs, S. J.** (1993). Carbon-tetrachloride induced urinary excretion of formaldehyde, malondialdehyde, acetaldehyde and acetone in rats. *Pharmacology*, **47**, 209- 216.
 - **Barber, R.D., Rott, M.A and Donohue, T.J.** (1996). Characterization of glutathione-dependent formaldehyde from *Rhodobacter sphaeroides*. *J. Bact.* **178**, 1386-1393.
 - **Becker, D.M. and Lundblad, V.** (1994) Introduction of DNA into Yeast Cells. In *Current Protocols in Molecular Biology 2*. (Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J. A. and Struhl, K., eds), pp. 13.7.1-13.7.2, John Wiley and Sons, Inc.
 - **Beissweger, T. B., Holmquist, B. and Vallee, B. L.** (1985). Chi-ADH is the sole alcohol dehydrogenase isozyme of mammalian brains: implications and interferences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **82**, 8369-8373.
 - **Benkovic, S.J.** (1980). On the Mechanism of folate and Biopterin-Requiring enzymes. *Ann. Rev. Biochem.* **49**, 227-251.
 - **Berben, G., Dumont, J., Gilliquet, V. Bolle, P.A. and Hilger, F.** (1991) The YDp Plasmids: a Uniform Set of Vectors Bearing Versatile gene Disruption Cassettes for *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. **7**, 475-477.
 - **Bevan, M.** (1984). Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation. *Nucl. Acids Res.* **12**, 8711-8721.
 - **Bicsak, T., Kann, L., Reiter, A. and Chase, T.** (1982). Tomato alcohol dehydrogenase: purification and substrate specificity. *Arch. Biochem. Biophys.* **216**, 605-615.
 - **Bizili, SP., Rugh CL., Summers AO. and Meagher RB.** (1999). Phytoremediation of methylmercury pollution. MerB expression in *Arabidopsis thaliana* confers resistance to organomercurials. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 6808-6813.
 - **Blair, A.H and Vallee, B.** (1966). Some Catalytic properties of human liver alcohol dehydrogenase. *Biochemistry* **.5**, 2026-2034.
 - **Blakley, R.L** (1960). Spectrophotometric Studies on the Combination of Formaldehyde with tetrahydropeteroylglutamic Acid and Other Hydropteridines. *Biochem. J.* **74**, 71-82
 - **Blaylock MJ, and Huang JW.** (2000). Phytoextration of metals. In. Raskin I, Ensley BD (eds) phytoremediation of toxic metals: using plants to clean-up the environment. *Wiley, New York*. 53-70.
 - **Blázquez, M.** (1988), Tesina de Licenciatura (UAB): Técnicas de Separació dels Ribonucleases de plasma humà: Actvitat Ribonucleasa Latent Activable per rHMB.
 - **Blum, H., Beier, H. and Gross, H.J.** (1987). Improved Silver Staining of Plant Proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electroforesis.* **8**. 93-99

- **Boleda, M. D.** (1990). Estudios funcionales e immunoquímicos de l'alcohol deshidrogenasa de rata. Tesis doctoral. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad Autónoma de Barcelona.
- **Boleda, M. D., Julia, P., Moreno, A. and Parés, X.** (1989). Role of extrahepatic alcohol dehydrogenase in rat ethanol metabolism. *Arch. Biochem Biophys.* **274**, 74-81.
- **Boleda, M. D., saubi, N., Farrés, J. and Parés, X.** (1993). Physiological substrates for rat alcohol dehydrogenase classes. Aldehydes of lipid peroxidation, ω -hydroxyfatty acids, and retinoids. *Arch. Biochem Biophys.* **307**, 85-90
- **Bradford, M.M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- **Burnell, J. C. and Bosron, W.F.** (1989). Genetic polymorphism of human liver alcohol dehydrogenase and kinetic properties of the isoenzymes. En Human Metabolism of Alcohol (Crow K.E. and Batt R.D., eds). Vol. **II**, pp. 65-75, CRC Press Inc., Boca Raton, Florida.
- **Burnell, J.C., Carr, L. G., Dwulet, F.E., Edenberg, H.J., Li, T. -K. and Bosron, W.F.** (1987). The human β_3 alcohol dehydrogenase subunit differs from β_1 by a Cys for Arg-369 substitution which decreases NAD(H) binding. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **146**, 1227-1233.
- **Canestro, C., Hjelmqvist, L., Albalat, R., García-Fernández, J., González-Duarte, R., and Jörnvall, H.** (2000). Amphioxus alcohol dehydrogenase is class 3 form of single type and of structural conservation but with unique developmental expression. *Eur J Biochem.* **276**, 6511-6518.
- **Chatterjee, S., Noack, H., Possel, H. and Wolf, G.** (2000) Induction of nitric oxide synthesis lowers intracellular glutathione in microglia of primary glial cultures. *Glia.* **29**, 98-101.
- **Chen, C. S. and Yoshida, A.** (1991). Enzymatic properties of the protein encoded by newly cloned human alcohol dehydrogenase ADH6 gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **181**, 743-747
- **Cinti, D.L., keyes, S.R., Lemeli, M.A., Denk, H. and Schenkman.** (1976). Biochemical Properties of Rat Liver Mitochondrial Aldehyde Dehydrogenase with Respect to Oxidation of Formaldehyde. *J. Biol. Chem.* **251**, 1571-1577.
- **Clancy, M., Levartovsky, D., Leszczynska-Piziak, J., Yegudin, J., and Abramson, S.B.** (1994). Nitric oxide reacts with intracellular glutathione and activates the hexose monophosphate shunt in human neutrophils: Evidence for S-nitrosoglutathione as bioactive intermediary. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**, 3680-3684.
- **Combettes, B., Reichhel, J. P., Chabouté, M. E., Philipps, G., Shen, W. H. and Chaubet-Gigot, N.** (1999). Study of phase-specific gene expression in synchronized tobacco cells. *Meth. Cell Sci.* **21**, 109-121
- **Conaway, C.C., Whysner, J., Verna, L.K and Williams, G.M.** (1996). Formaldehyde Mechanistic Data and Risk Assessment: Endogenous Protection From DNA adduct Formation. *Pharmacol. Ther.* **71**, 29-55.

- **Consalvi, V., Mardh, G and valle, B. L.** (1986). Human alcohol dehydrogenases and serotonin metabolism. *Biochem. Biophys. Res. Común.* **139**, 1009- 1016.
- **Cooper, J.R and Kini, M.M.** (1962). Biochemical aspects of methanol poisoning. *Biochem Pharmacol.* **11**, 405-416.
- **Crosas, B., Allali-Hassani, A., Martínez, S. E., Martras, S., Persson, B., Jörnvall, H., Parés, X. and Farrés, J.** (2000). Molecular basis for differential substrate specificity in class IV alcohol dehydrogenase: A conserved function in retinoid metabolism but not in ethanol metabolism. *J. Biol.Chem.* **275**, 25180-25187.
- **Cunningham SD, Ow DW** (1996). Promises and prospects of phytoremediation. *Plant Physiol.* **110**, 715-719.
- **Dafeldecker, W. P., Meadow, P.E., Parés , X, and Vallee, B.L.** (1981). Simian liver alcohol dehydrogenase: isolation and characterization of isoenzymes from *Macaca mulatta*. *Biochemistry.* **20**, 6729-6734.
- **Danielsson, O. and Jörnvall. H.** (1992). “Enzymogenesis” Classical liver alcohol dehydrogenase origin from the glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase line. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89**, 9241-9251.
- **Danielsson, O., Shafquat, J., Estonius, M. and Jörnvall, H.** (1994a). Alcohol dehydrogenase class III contrasted to class I. Characterization of the cyclostome enzyme, the existence of multiple forms as for the human enzyme, and distant cross-species hybridisation. *Eur. J. Biochem.* **225**, 1081-1088
- **Danielsson, O., Atrian, S., Luque, T., Hjelmqvist, L., Gonzalez-Duarte, R. and Jörnvall, H.** (1994b). Fundamental molecular differences between alcohol dehydrogenase classes. *Proc Nat Acad Sci USA.* **91**, 4980-4984.
- **Danielsson, O., Shafqat, J., Estanius, M. and Jörnvall, H.** (1996). Izozyme Multiplicity in Class III Alcohol Dehydrogenase. Effects on Activity and Quaternary Structure of Residue Exchanges at “Non-Funcional” Sites in a Native Protein. *Biochemistry.* **35**, 14561-14568.
- **Decarvalho, F., Frendo, p., Van Montagu, M. and Cornelissen, M.** (1995). Post-transcriptional cosuppression of β -1-3-glucanase genes does not affect accumulation of transgen nuclear RNAm. *Plant Cell.* **7**. 347-358.
- **Delfour, L., Foglio, M. H. and Duester, G.** (1999). Impaired retinol utilization in *adh4* alcohol dehydrogenase mutant mice. *Dev. Genet.* **25**, 1-10.
- **Delledonne, M., Xia, Y., Dixon RA. and Lamb, C.** (1998). Nitric oxide functions as a signal in plants disease resistance. *Nature.* **6. 394** (6693), 585-588.
- **Denis, C.L., Young, E.T.** (1983). Isolation and characterization of the positive regulatory gene ADH1 from *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **3**. 360-370.
- **Dicker, E., and Cederbaum, A.I** (1986). Inhibition of CO₂ production from aminopyrine or methanol by cyanamide or crotonaldehyde and the role of mitochondrial aldehyde dehydrogenase in formaldehyde oxidation. *Biochem, Biophys. Acta.* **883**, 91-97.

- **Dingle, P., Tapsell, P., and Hu, S.** (2000). Reducing formaldehyde exposure in office environments using plants. *Bull Environ Contam Toxicol.* **64** (2), 302-308.
- **Dolferus, R., Osterman, J.C., Peacock, W.J. and Dennis, E.S.** (1997). Cloning of *Arabidopsis* and rice formaldehyde dehydrogenase genes. Implications for the origin of plant ADH enzymes. *Genetics.* **146.** 1131-1141.
- **Duester, G., Farrés, J., Felder, M. R., Holmes, R. S., Höög, J. –O., Parés, X., Plapp, B. V., Yin, S. –J. and Jörnvall, H.** (1999). Recommended nomenclature for the vertebrate alcohol dehydrogenase gene family. *Biochem. Pharmacol.* **58,** 389-395.
- **Durner, J., Wendehenne, D. and Klessig, F. D.** (1998). Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP-ribose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95** (17), 10328-10333.
- **Ebbs SD, Brady DJ, and Kochian LV.** (1998). Role of uranium speciation in the uptake and translocation of uranium by plants. *J Exp Bot.* **49,** 1183-1190
- **Edenberg, H. J. and Bosron, W. F.** (1997). Alcohol deshydrogenases En: Comprehensive Toxicology, vol. 3: Biotransformation, ed. F. P. Guengerich, Pergamon, N. Y. **8,** 119- 131.
- **Edenberg, H.J** (2000). Regulation of the mammalian alcohol dehydrogenase genes. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* **64,** 295-341.
- **Eklund, H., Samama, J.P and Jones, T. A.** (1984). Crystallographic investigations of nicotinamide adenine dinucleotide binding to horse liver alcohol dehydrogenase. *Biochemistry.* **23,** 5982-5996.
- **Eklund, H. and Brändén, C.-I.** (1987). Alcohol dehydrogenase. In: Biological Macromolecules and Assemblies (Jurnak, F.A and McPerherson, A., eds), pp 73-142, John Wiley and Sons, Inc., London.
- **Engeland, K., Höög, J.-O., Holmquist, B., Estonius, M., Jörnvall, H. and Vallee, B.L.** (1993). Mutation of Arg-115 of human class III alcohol dehydrogenase: A binding site required formaldehyde dehydrogenase activity and fatty acid activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90,** 2491-2494.
- **Espunya, M.C., Bruno Combettes., Joseph Dot., Nicole Chaubet-Gigot and Carmen Martínez.** (1999). Cell-cicle modulation of CK2 activity in tobacco BY-2 cells. *Plant Journal.* **19**(6), 655-666.
- **Estonius, M., Danielsson, O., Karlsson, C., Person, H., Jörnvall, H and Höög, J. –O.,** (1993). Distribution of alcohol and sorbitol dehydrogenases. Assesment of mRNA species in mammalian tissues. *Eur. J. Biochem.* **215.** 479-503
- **Estonius, M., Höög, J.-O., Danielsson, O. and Jörnvall, H.** (1994). Residues Apecific for Class III Alcohol Dehydrogenase. Site-Directed Mutagenesis of the Human Enzyme. *Biochemistry.* **33,** 15080-15085.
- **Farey, R.C. and Sundquist, A.R.** (1991). Evolution of glutathione metabolism. In: Advances in enzymology **64** (A. Meister, Ed.) *Jonh Wiley and Sons, Inc., New York.* 1-53.

- **Farrés, J.** (1985). Alcohol deshidrogenasa i aldehid deshidrogenasa de placenta humana. Tesis doctoral, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad Autónoma de Barcelona.
- **Farrés, J. , Julia, P. and Parés X.** (1988). Aldehyde oxidation in human placenta. Purification and properties of 1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase. *Biochem J.* 256: 461-467.
- **Feldman, M.Y.** (1973). Reactions of nucleic acids and nucleoproteins with formaldehyde. *Prog. Nucleic. Acid. Res. Mol. Bio.* 13, 1-49
- **Fernández. M.R., Jörnvall, H., Moreno, A., Kaiser, R. and Parés, X.** (1993). Cephalopod alcohol dehydrogenase: purification and enzymatic characterization. *FEBS Lett.* 328, 235-238.
- **Fernández, M.R., Biosca, J.A., Norin, A., Jörnvall, H. and Parés, X.** (1995). Class III alcohol dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae*: Structural and enzymatic features differ toward the human/mammalian forms in manner consistent with functional needs in formaldehyde detoxification. *FEBS Lett.* 370, 23-26.
- **Fernández, M. R., Biosca, J. A., Martínez, M. C., Achkor, H., Farrés, J. and Parés, X.** (1997). Formaldehyde dehydrogenase from yeast and plant. Implications for the general functional and structural significance of class III alcohol dehydrogenase. *In Advances in Experimental Medicine and Biology.* 414, 373-381. Ed. H. Weiner, Plenum Press, New York.
- **Fernández, M.R., Biosca, J.A., Torres, D., Crosas, B. and Parés, X.** (1999). A double residue substitution in the coenzyme binding site accounts for the different kinetic properties between yeast and human formaldehyde dehydrogenases. *J. Biol. Chem.* 274, 37869-37875.
- **Ferre, J. L.** (1983), Anàlisi dels isoenzims de l'alcohol deshidrogenasa i aldehid deshidrogenasa hepàtiques de la població de Barcelona. Tesis de licenciatura. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular.
- **Fliegman, J. and Sandermann, H.Jr.** (1997). Maize glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase cDNA: a novel plant gene detoxification. *Plant. Mol. Biol.* 34, 843-854.
- **Foyer, C.H., López-Delgado,H., Dat, J.F. and Scott, I.M.** (1997). *Physiol. Plant.* 100, 241-254.
- **Frezza, M., Di Padova, C., Pozzato, G., Terpin, M., Baraona, E. and Lieber, C.S.** (1990). High blood alcohol levels in women. The role of decreased gastric alcohol dehydrogenase activity and first pass metabolism. *N. Eng. J. Med.* 322, 95-99.
- **Fries, RW, Bohlken DP, Plapp BV.** (1979). 3-Substituted pyrazole derivatives as inhibitors and inactivators of liver alcohol dehydrogenase. *J Med Chem.* 22, 256-359.
- **Fujiwara.K., Okamura-Ikeda, K. and Motokawa** (1984). Mechanism of the glycine cleavage reaction. *The Journal of Biological Chemistry.* 259, 10664-10668.
- **Gerbeau, P., Amodeo, G., Henzler, T., Santoni, V., Ripoche, P. And Maurel, C.** (2002). The water permeability of *Arabidopsis* plasma membrane is regulated by divalent cations and pH. *The plant J.* 30,71-81.

- **Giese, M., Bauer-Doranth, U., Langebartels, C. And Sandermann, H. Jr** (1994). Detoxification of formaldehyde by spider plant (*chlorophytum comosum* L.) and by soybean (*Glycine max* L.) cell-suspension cultures. *Plant Physiol.* **104**, 1301-1309.
- **Gillette, J.R.** (1966). Biochemistry of drug oxidation and reduction by enzymes in hepatic endoplasmic reticulum. *Adv Pharmacol.* **4**, 219-261
- **Giri, PR, Linnoila M, O'Neill JB. and Goldman, D.** (1989). Distribution and possible metabolic role of class III alcohol dehydrogenase in the human brain. *Brain Res.* **27**, 481, 131-41.
- **Goffner D, Van Doorselaere J, Yahiaoui N, Sama J, Grima-Pettenati J, and Boudet AM.** (1998) A novel aromatic alcohol dehydrogenase in higher plants: Molecular cloning and expression. *Plant Mol Biol.* **36**, 755-765.
- **Gow, AJ, Buerk DG. And Ischiropoulos H.** (1997). A novel reaction mechanism for the formation of S-nitrosothiol *in vivo*. *J Biol Chem.* Jan 31, **272** (5), 2841-5.
- Grafström, R.C., Hsu I-C and Harris C.C,** (1993). Mutagenicity of formaldehyde in chinese hamster lung fibroblasts-synergy with ionizing radiation and N-nitroso-N-methylurea. *Chem Biol Interact.* **86**, 41-49.
- **Grey, M., Schmidt, M. and Brendel** (1996). Overexpression of *ADH1* confers hyper-resistance to formaldehyde in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Gen.* **29**, 437-440
- **Grossmann, L.** (1967). The reaction of formaldehyde with denatured DNA. *Meth Enzymol.* **12**, 131.
- **Gutheil, W.G., Holmquist, B. and Valle, B.** (1992). Purification, characterization, and partial sequence of the glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase. From *Escherichia coli*: A Class III Alcohol Dehydrogenase. *Biochemistry.* **31**, 475-481.
- **Hasezawa, S. And Nagata, T.** (1992). Okadaic acid as probe to analyse cell cycle progression in plant cells. *Bot. Acta.* **105**, 63-69.
- **Hayat, M.A.** (1981). Fixation of electron microscopy. *New York, Acad Press.*
- **Heck, H. d'A., and Casanova-Schmitz, M.** (1984). Biochemical Toxicology of formaldehyde. In review of *Biochemical Toxicology* Vol. 6 (Hodgson, E., Bend, J. R., Philpot, R.M., eds), 155-189. Elsevier: Amsterdam.
- **Hedberg, J.J., Griffiths, J.W., Nilsson, S.J.F. and Höög, J. –O.** (2001). Reduction of S-nitrosoglutathione by human alcohol dehydrogenase 3. (Tesis doctoral).
- **Hoffman, C.S., and Wintson, F.** (1987). A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene.* **57**, 267-272.
- **Hoffman, C.S.** (1997). Preparation of Yeast DNA, RNA, and Proteins. Preparation of Yeast DNA. In. *Current Protocol in Molecular Biology* **2** (Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J. G., Smith, J. A and Struhl, K., eds), pp. 13.11.1-13.11.4, John Wiley and Sons, Inc.

- **Holmquist, B. and vallee, B.L.** (1991). Human liver class III alcohol dehydrogenase and glutathione dependent formaldehyde dehydrogenase are the same enzyme. *Biochem. Biophys. Res. Común.* **178**, 1371-1377.
- **Hööy, J. O. y Brandt, M.** (1995). Mammalian class VI alcohol dehydrogenase. Novel types of the rodent enzymes. *ADV. Exp. Med. Biol.* **372**, 355-364.
- **Huang JW, Blaylock MJ, Kapulnik Y, Ensley BD.** (1998). Phytoremediation of uranium-contaminated soils: role of organic acids in triggering uranium hyperaccumulation in plants. *Environ Sci Technol.* **32**, 2004-2008.
- **Huang, X., Von Rad U. and Durner, J.** (2002). Nitric oxide induces transcriptional activation of nitric oxide-tolerant alternative oxidase in *Arabidopsis* suspension cells. *Planta.* **215** (6), 914-923.
- **Hur, M.W. and Edenberg, H. J.** (1992). Cloning and characterization of the *ADH5* gene encoding Human Alcohol Dehydrogenase 5, formaldehyde dehydrogenase. *Gene.* **121**, 305-311.
- **Hur, M.W. and Edenberg, H. J.** (1995). Cell-specific Function of cis-Acting Elements in the Regulation of Human Alcohol dehydrogenase 5 Gene Expression and Effect of the 5'-Nontranslate Region. *J. Biol. Chem.* **270**, 9002-9009.
- **Hurley, T.D., Borson, W.F., Hamilton, J.A. and Amzel.** (1991). Structure of human $\beta_1\beta_1$ alcohol dehydrogenase: Catalytic effects of non-active-site substitutions. *Biochemistry.* **88**, 8149-8153.
- **Hurley. T.D., Borson, W.F., Stone, C.L. and Amzel.** (1994). Structures of three human β alcohol dehydrogenase variants. Correlations with their Funcional Differences *J. Mol. Biol.* **239**, 415-429.
- **IARC.** (1995). Formaldehyde. In Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Wood Dust and Formaldehyde. **62**, 217-362. IARC, Lyon
- **IARC.** (1986). Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Tobacco Smoking. *International Agency for Reserch on Cancer*
- **Iborra, F. J., Renau-Piqueras, J., Portoles, M., Boleda, M.D., Guerri, C. and Parés, X.** (1992). Immunocytochemical and Biochemical demostration of formaldehyde dehydrogenase (classIII alcohol dehydrogenase) in the Nucleus. *J. Histochem. Cytochem.* **40**, 1865-1878.
- **Iborra. J.R., (1994).** Caracterización de la Formaldehído Deshidrogenasa, una Nueva Proteína Nuclear. Tesis Doctoral.
- **Ikegami, S., Taguchi, T and Ohashi, M.** (1978). Aphidicolin prevents mitotic cell division by interfering with the activity of DNA polimerasa α . *Nature.* **275**, 458-460
- **Jensen, D.E and Belka, G.K.** (1997). Enzymic denitrosation of 1,3-dimethyl-2-cyano-1-nitrosoguanidine in rat liver cytosol and the fate of the immediate product S-nitrosoglutatione. *Biochem Pharmacol,* **53**, 1279-1295
- **Jensen, D. E., Belka, G. K. and Du bois, G. C.** (1998). S-Nitrosoglutatione is a substrate for rat alcohol dehydrogenase classIII isoenzyme. *Biochem J.* **331**, 659-668.

- **Jörnvall, H., Danielsson, O., Eklund H., Hjelmqvist L, Höög JO, Parés X, Shafqat.** (1993). Enzyme and isozyme developments within the medium-chain alcohol dehydrogenase family. *Adv Exp Med Biol.* **328**, 533-544.
- **Jörnvall, H. and Höög, J.-O.** (1995). Nomenclature of alcohol dehydrogenases. *Alcohol Alcohol.* **30**, 153-161.
- **Jörnvall, H. Höög, J. O., Persson, B. And Parés, X.** (2000). Pharmacogenetics of the alcohol dehydrogenase system. *Pharmacology.* **61**, 184-191
- **Julia, P., Boleda, MD., Farrés, J. and Parés, X.** (1987). Mammalian alcohol dehydrogenase: characteristics of class III isoenzymes. *Alcohol Alcohol.* **1**,169-73.
- **Julia, P., Farres, J. and Parés, X.** (1986). Ocular alcohol dehydrogenase in the rat: Regional distribution and kinetics of the ADH-1 isoenzyme with retinol and retinal. *Exp. Eye. Res.* **42**, 305-314.
- **Kaiser, R., Holmquist, B., Hempel, J., Valle, B.L. and Jörnvall, H.** (1988). Class III human liver alcohol dehydrogenase: A novel structural type equidistantly related to the class I and class II enzymes. *Biochemistry.* **88**, 1132-1140.
- **Kaiser, R., Holmquist, B., Vallee, B. L. and Jörnvall, H.** (1991). Human class III alcohol dehydrogenase/glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase. *J. Prot. Chem.* **10**, 69-73.
- **Kaiser, R., Fernández, M.R., Parés, X. and Jörnvall, H.** (1993). Origin of the human alcohol dehydrogenase system: Implications from the structure and properties of the octopus protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**, 11222-11226.
- **Kato, K., Matsumoto, T., Koiwai, A., Mizusaki, S., Nishida, K., Noguchi, M. and Tamki, E.** (1972). In "Fermentation Technology Today" (G.Terui, ed), 689-695. Soc. Ferment. Technol., Osaka, Japan.
- **Kato, S., Burke, P.J., Fenick, D.J., Taatjes, D.J Bierbaum, V.M and Koch T.H.** (2000). Mass spectrometric measurement of formaldehyde generated in breast cancer cells upon treatment with anthracycline antitumor drugs. *Chem Res Toxicol.* **13**, 509-516.
- **Kedishvili, N. Y., Stone, C.L., Thomasson, H.R., Carr, L.G., Edenberg,H.J., Borson, W.F. and Li, T.-K.** (1994). Isolation and analysis of a cDNA for human stomach δ alcohol dehydrogenase. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* **18**, 16A.
- **Keller, D.A.,Heck, H.D, Randall, H.W. and Morgan, K.T.** (1990). Histochemical Localization of Formaldehyde Dehydrogenase in the Rat. *Toxicol App pharmacol.* **106**, 311.
- **Keung, W.M., Kunze, L and Holmquist, B.** (1995). Rabbit liver class III alcohol dehydrogenase: a cathodic isoform with formaldehyde dehydrogenase activity. *Alcohol Clin Exp Res.* **19**, 860-866.
- **Keung,W.M.** (1996). Isolation and characterization of three alcohol dehydrogenase isozymes from Syrian golden hamsters. *Alcohol Clin Exp Res.* **20**, 213-220.
- **Klessig, D. F. And Malamy, J.** (1994). The salicylic acid signal in plants. *Plant Mol Biol.* **26** (5), 1439-1458.

- **Klessig, D. F., Jörg Durner., Robert Noad., Duroy, A.N., David Wendehenne., Dhirendra Kumar., Domimnique Pontier., Eric Lam and Herman Silva.** (2000). Nitric oxide and salicylic acid signaling in plant defense. *Proc. Nat. Acad. Sci. Usa.* **97**, Issue 16, 8849-8855.
- **Koivusalo, M., Baumann, M. and Uotila, L.** (1989). Evidence for the identity of glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase and class III alcohol dehydrogenase. *FEBS Lett.* **257**, 73-83
- **Koivusalo, M. and Uotila, L.** (1991). Glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase (EC 1.2.1.1): evidence for the identity with class III alcohol dehydrogenase. *Adv Exp Med Biol.* **284**, 305-13.
- **Kukielka, E. and Cederbaun, A.I.** (1995). Increased oxidation of ethylene glycol to formaldehyde by microsomes after ethanol treatment: role of oxygen radicals and cytochrome P450. *Toxicology Letters.* **78**, 9-15.
- **Kvalnes-Krick, K. and Jorns, M.S.** (1987). Interaction of Tetrahydrofolate and Other Folate Derivatives with bacterial Sarcosine Oxidase. *Biochemistry.* **26**, 7391-7395.
- **Laemmler, U.K.** (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage. *Nature.* **227**, 680-685.
- **Le, L., Ayer, S., Olace, A.R. and Benyajati, C.** (1990). Análisis of formaldehyde-induced *Adh* mutations in *Drosophila* by RNA structural mapping and direct sequencing of PCR-amplified genomic DNA. *Biochem. Genet.* **28**, 367-387.
- **Leatherbarrow, R.J** (1987). Enzfitter. Anon-linear regression data analysis program for IBM-PC. Elsevier Biosoft, Cambridge, U. K.
- **Liber, H.L., Benforado, K., Crosby, R.M., Simpson, D. and Skopek, T.R.** (1989). Formaldehyde-induced and spontaneous alterations in human hprt DNA sequence and RNAm expression. *Mutant. Res.* **226**, 31-37
- **Lindinger, W., Taucher, J., Jordan, A. and Vogel, W.** (1997). Endogenous Production of Methanol after the Consumption of fruit. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* **21**, 939-943.
- **Liu, L., Hausladen, A., Zeng, M., Que, L., Heitman, J. and Stamler, J.S.** (2001). A metabolic enzyme for S-nitrosothiol conserved from bacteria to humans. *Nature.* **410**, 490-494.
- **Luque, T., Atrian, S., Danielsson, O., Jörnvall, H. and Gonzales –Duarte, R.** (1994). Structure of drosophila melanogaster glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase/octanol dehydrogenase gene (class III alcohol dehydrogenase) Evolutionary pathway of the alcohol dehydrogenase genes. *Eur. J. Biochem.* **225**, 985-993.
- **Magaña-Schwencke, N., Elkert, B. and Moustachi.** (1978). Biochemical analysis of damage induced in yeast by formaldehyde. Induction of single-strand in DNA and their repair. *Mutación Res.* **50**, 181-193.
- **Mardh, G., Luehr, C.A and vallee, B.L.** (1985). Human class I alcohol dehydrogenases catalyse the oxidation of glycols in the metabolism of norepinephrine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **82**, 4979-4982.

- **Mardh, G. and Vallee, B. L.** (1986). Human class I alcohol dehydrogenases catalyse the interconversion of alcohol and aldehyde in the metabolism of dopamine. *Biochemistry*. **25**, 7279-7282.
- **Marschall, H.U., Oppermann, U.C., Svensson, S., Nordling, E., Persson, B., Hoog, J.O and Jörnvall, H.** (2000). Human liver class I alcohol dehydrogenase gammagamma isozyme: the sole cytosolic 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase of isobile acids. *Hepatology*. **31**, 990-996.
- **Martínez, M.C., Achkor, H., Persson, B., Fernández, M.R., Shafqat, J., Farrés, J., Jörnvall, H. and Parés, X.** (1996). *Arabidopsis* formaldehyde dehydrogenase: molecular properties of plant class III alcohol dehydrogenase provide further insight into the origins, structure and function of plant P and liver class I alcohol dehydrogenases. *Eur. J. Biochem.*, 849-857.
- **Meagher RB.** (2000). Pytoremediation of toxic elemental and organic pollutants. *Curr Opin Plant Biol*, **3**, 153-162.
- **Meister, A.** (1988). Glutathione Metabolism and Its Selective Modification. *J. Biol. Chem.* **263**, 17205-17208.
- **Messing, J.** (1983) New M13 vectors for cloning. *Methods Enzymol* .**101**, 20-78
- **Meyerowitz, E.M.** (1989). *Arabidopsis*, a useful weed. *Cell*. **56**, 263-269.
- **Miglior, L., Ventura, L., Barale, R., Lopriendo, N., Castellino, S. and Pulci, R.** (1989). Micronuclei and nuclear anomalies induced in the gastrointestinal epithelium of rats treated with formaldehyde. *Mutagénesis*. **4**, 327-334.
- **Molotkov, A., Fan, X., Deltour, L., Foglio, M.H, Martras, S., Farrés J., Parés, X. and Duester G.** (2002). Stimulation of retinoic acid production and growth by ubiquitously expressed alcohol dehydrogenase Adh3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **99**, 5337-5342.
- **Moreno, A.** (1994). Alcohol deshidrogenasa clase IV. Tesis doctoral, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Universidad Autónoma de Barcelona.
- **Mori, O., Haseba, T., Kameyama, K., Shimitzu, H., Kudoh, M., Ohaki, O. Yamazaki, M. and Asano, G.** (2000). Hitological distribution of classIII alcohol dehydrogenase in human brain. *Brain Res*. **852** (1): 186-90.
- **Moser, J., Bagchi, D., Akubue, P.I and Stohs, S.J.** (1993). Excretion of malondialdehyde, formaldehyde, acetaldehyde and acetone in the urine of rats following acute and chronic administration of etanol. *Alcohol and alcoholism*. **28**, 287-295.
- **Moulis, J. –M., Homquist, B. and Vallee, B.L.** (1991). Hydrophobic anion activation of human liver γ alcohol dehydrogenase. *Biochemistry*. **30**, 5743-5749.
- **Murdanoto, A.P., Sakai, Y., Konishi, T., Yasuda, F., Tani, Y and Kato, N.** (1997). Purification and properties of methyl formate syntase, a mitochondrial alcohol dehydrogenase, participating in formaldehyde oxidation in methylotrophic yeast. *Appl. Environ. Microbiol*. **63**, 1715- 1720.

- Nagata, T., Nemoto, Y. and Hasezawa, S. (1992). Tobacco BY-2 cell line as the “HeLa” cell in the cell biology of higher plants. *Int. Rev. Cytol.* **132**, 1-30.
- Nagata, T. and Kumagai, F. (1999). Plant cell biology through the window of highly synchronized tobacco BY2 cell line. *Meth. Cell Sci.* **21**, 123-127
- Nieboer E, Richardson DHS. (1980) The replacement of the nondescript term “heavy metals” by a biologically and chemically significant classification of metal ions. *Environ Pollut Ser B.* **1**, 3-26.
- Norin, A., Van Ophem, P.W., Piersma, S.R., Persson, B., Duine, J.A. and Jörnvall, H. (1997). Mycothiol-dependent formaldehyde dehydrogenase, a prokaryotic medium-chain dehydrogenase/reductase, phylogenetically links different eucaryotic alcohol dehydrogenase-Primaty structure. Conformational modelling and functional correlations. *Eur. J. Biochem.* **248**, 282-289.
- Nriagu JO, pacyna JM (1988). Quantitative assessment of worldwide contamination of air water and soils by trace metals. *Nature.* **333**, 134-139.
- Parés, X., and vallee, B.L. (1981). New human liver alcohol dehydrogenase forms with unique kinetic characteristics. *Biochem. Biophys. Res. Común.* **98**, 122-130.
- Parés, X., Farres, J. and Vallee, B.L. (1984). Organ specific alcohol metabolism: placental chi-ADH. *Biochem Biophys Res Commun.* **119**, 1047-1055
- Parés, X., Juliá, P and Farrés, J. (1985). Properties of rat retina alcohol dehydrogenase. *Alcohol.* **2**, 43-46.
- Peitruszko. R., Crawford, K. and Lester, D. (1973). Comparison of substrate specificity of alcohol dehydrogenase from human liver, horse liver, and yeast towards saturated and 2-enoic alcohols and aldehydes. *Arch. Biochem. Biophys.* **159**, 50-60.
- Peralba, J. M., Crosas, B., Martínez, S. E., Juliá, P., Farrés, J. and Parés, X. (1999). Amphibian alcohol dehydrogenase. Purification and characterization of classes I and III from *Rana perezi*. *Adv. Exp. Med. Biol.* **463**, 343-350.
- Pietrzak, M., Shillito, R. D., Hohn, T. and Potykus, I. (1986). Expression in plants of two bacterial antibiotic resistance genes after protoplast transformation with a new plant expression vector. *Nucl Acids Res.* **14**, 5857-5868.
- Popescu, G. and Napoli, J.L. (2000). Analysis of rat cytosolic 9-Cis-retinol dehydrogenase activity and enzymatic characterization of rat ADHIII. *Biochem. Biophys. Acta.* **1476**, 43-52.
- Pourmotabbed, T., Shih, M.J., Creighton DJ., A.I. (1989). Bovine liver formaldehyde dehydrogenase. Kinetic and Molecular properties. *J Biol Chem.* **264**, 17384-17388.
- Ramawamy, S., El-Ahmad, M., Danielsson, O., Jörnvall, H. and Eklund. (1996). Crystal structure of cod liver class I alcohol dehydrogenase: Substrate pocket and structurally variable segments. *Protein Science.* **5**, 663
- Ras, J., Van Ophem, P.W., Reijnders, W.N.M., Van Spanning, R.J.M., Duine, J.A., Stouthamer, A.H. and Harms, N. (1994). Isolation, sequencing, and mutagenesis of the gene

encoding NAD- and glutathione dependent formaldehyde (GD-FALDH) from *Paracoccus denitrificans*, in which GD-FALDH is essential for methyltrophic growth. *J. Bact.* **177**, 247-251.

- **Rashba-step, J., Step, E., Turro, N.J. and Cederbaum,** (1994). Oxidation of glycerol to formaldehyde by Microsomes: Are Glycerol Radicals produced in the reaction Pathway? *Biochemistry.* **33**, 9504-9510.

- **Raskin I.** (1996). Plant genetic engineering may help environmental clean-up. *Proc Natl Acad Sci USA.* **93**, 3164-3166.

- **Redel, G.P.** (1975). *Arabidopsis* as a genetic tool. *Ann. Rev. Genet.* **9**, 111-129.

- **Sakai, Y., Murdanoto, A.P., Sembiring, L., Tani, Y. and Kato, N.** (1995). A novel formaldehyde oxidation pathway in methylotrophic yeast: Methylformate as a possible intermediate. *FEMS Microbiol. Lett.* **127**, 229-234

- **Salt DE, Smith RD, Raskin I.** (1998). Phytoremediation. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* **49**, 643-668

- **Sambrook, J., Fritsh, E.F. and Maniatis, T.** (1989). Molecular cloning. A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

- **Shafqat, J., El-Ahmad, M., Danielsson, O., Martínez, M.C., Persson, B., Parés, X. and Jörnvall, H.** (1996). Pea formaldehyde-active class III alcohol dehydrogenase: Common derivation of the plant and animal forms but not of the corresponding ethanol-active forms (classes I and P). *Proc. Natl. Acad. SCI. USA.* **93**, 5595-5599.

- **Shaham, J., Bomstein, Y., Meltzer, A., Kaufman, Z., Palma, E. and Ribak, J.** (1996). DNA-protein crosslinks, a biomarker of exposure to formaldehyde-*in vitro* and *in vivo* studies. *Carcinogenesis.* **17**, 121-125.

- **Shara, M.A., Dickson, P.H., Baghi, D., and Stohss, S.J.** (1992). Excretion of formaldehyde, malondialdehyde, acetaldehyde and acetone in the urine of rats in response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin, paraquat, endrin and carbon tetrachloride. *J. Chromato.* **576**, 221-233.

- **Smith, M.,Hopkinson DA, Harris H.** (1971). Developmental changes and polymorphism in human alcohol dehydrogenase. *Ann Hum Genet.* **34**, 251-271.

- **Smith, M.** (1986), Genetics of human alcohol and aldehyde dehydrogenases. *Adv. Hum. Genet.* **15**, 249-290.

- **Somssich, IE., Wernert, P., Kiedrowski, S. and Hahlbrock, K.** (1996) *Arabidopsis thaliana* defense-related protein ELI3 is an aromatic alcohol: NADP⁺ oxidoreductase. *Proc Nat Acad Sci USA.* **93**, 14199-14203.

- **Staler, M. L.** (1973). Effect of reversible inhibition of deoxyribonucleic acid synthesis of the yeast cell cycle. *J. Bacteriol.* **113**, 263-270

- **Stayner, L., Steenland K., Greife, A., Hornung, R., Hayes, R. B., Nowlin, S., Morawetz, J., Ringenburg, V., Elliot, L., and Halperin, W.** (1993). Exposure-response analysis of cancer mortality in cohort of workers exposed to ethylene oxide. *American Journal of Epidemiology.* **138** (10), 787-798.

- **Strimatter, P. and Ball, E.G.** (1955). Formaldehyde dehydrogenase, a glutathione dependent enzyme system. *J. Biol. Chem.* **213**, 445-461.
- **Suruda, A., Schutle, P., Boeniger, M., Hayes, R.B., Livingston, G.K., Steenland, K., Stewart, P., Herrick, R., Douthit, D. and Fingerhut.** (1993). Cytogenetic effects of formaldehyde exposure in students of mortuary science. *Cancer Epidemiol. Biomarker Preven.* **2**, 453-460.
- **Stollar, D. and Grossman, L.** (1962). *J Mol Biol Chem.* **249**, 7653.
- **Tamaki, N. and Hama, T.** (1980). Aldehyde Dehydrogenase from Baker's Yeast. *Methods in Enzymology.* **89**, 469-473.
- **Theodore Chase, JR.** (1999). Alcohol dehydrogenase: Identification and names for Gene Families. *Plant Molecular Biology Reporter.* **17**, 333-350.
- **Tolf, B.-R., Dahlbom, R., Theorell, H. and Akeson, A.** (1982). Synthetic inhibitors of alcohol dehydrogenase. Pyrazoles containing an unsaturated hydrocarbon residue in the 4-position. *Acta Chem Scand B.* **36**, 101-107.
- **Uotila, L. and Koivusalo, M.** (1974). Formaldehyde dehydrogenase from human liver. Purification, properties and evidence for the formation of glutathione thiol esters by the enzyme. *J. Biol. Chem.* **249**, 7653-7663.
- **Uotila, L. and Koivusalo, M.** (1979). Purification of formaldehyde dehydrogenase and formate dehydrogenase from pea seeds by affinity chromatography and S-formylglutathione as the intermediate of formaldehyde metabolism. *Arch Biochem Biophys.* **196**, 33-45.
- **Uotila, L., Koivusalo, M.** (1987). Multiple forms of formaldehyde dehydrogenase from human red blood cells. *Hum. Hered.* **37**, 102-106.
- **Uotila, L. and Koivusalo, M.** (1989). Glutathione-dependent oxidoreductases: Coenzymes and Cofactors. Vol. III In. Glutathione. Chemical, Biochemical and Medical Aspects. Part .A. (Dolphin, D., Poulson, R. and Avramovic, O., eds.), 517-551, John Wiley and Sons, Inc., New York.
- **Vallee, B.L. and Bazzone, T.J.** (1983). Isoenzymes of human liver alcohol dehydrogenase.. Current topics in Biological and Medical Research 8 (Rattazzi, M.C., Scandalios, J.G. and Witt, G.S., eds.) pp.219-244, Alan R. Liss, New York.
- **Von Wertburg, P.P., Bethune, J.L and Vallee, B.L.** (1964). Human liver alcohol dehydrogenase. Kinetic and physicochemical properties. *Biochemistry.* **3**, 1775-1782.
- **Wagner, F.W., Parés, X., Holmquist, B. and Vallee, B. L.** (1984). Physical and Enzymatic Properties of class III Isoenzyme of Human Liver Alcohol Dehydrogenase. γ -ADH. *Biochemistry.* **23**, 2193-2199.
- **Wassenger, M., Heimes, S., Reidel, L. and Sanger, H.L.** (1994). RNA-directed de novo methylation of genomic sequences in plants. *Cell.* **76**, 567-576.

- **Waydhas, C., Weigl, k and Seis, H.** (1978). The disposition of Formaldehyde and Formate Arissing from Drug N-Demethylations Dependent on Cytochrome P-450 in Hepatocytes and Perfused Rat Liver. *Eur. J. Biochem.* **89**, 143-150.
- **Wehner, E.P., Rao, E. and Brendel, M.** (1993). Molecular structure and genetic regulation of *SFA*, a gene responsible for resistance to formaldehyde in *Saccharomyces cerevisiae*, and characterization of its protein product. *Mol.Gen.Genet.* **237**, 351-358.
- **Wendehenne, D., Pugin, A., Klessing, D. F. and Durner, J.** (2001). Nitric oxide: comparative synthesis and signaling in animal and plant cells. *Trends Plant cells.* **6** (4), 177-183.
- **Winters, D.K, and Cederbaun, AI.** (1990). Oxidación of glycerol to formaldehyde by rat liver microsomes. Effects of cytochrome P-450 inducing agents. *Biochem Pharmacol.* **39**, 697-705.
- **Wippermann, U., Fliegmann, J., Bauw, G., Landgebartels, C., Maier, K. and Sandermann, H. Jr.** (1999). Maize glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase: protein sequence and catalytic properties. *Planta.* 208, 12-18.
- **Yang, Z.-N., Davis, G.J., Hurley, T.D., Stone, C.L., Li, T.-K. and Bosron, W.F.** (1994). Catalytic efficiency of human alcohol dehydrogenase for retinol oxidation and retinal reduction. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 18, 587-591.
- **Yang , Z.-N.,Bosron, W.F. and Hurley, T.D.** (1997). Structure of human $\chi\chi$ Alcohol dehydrogenase: A Glutathione-dependent Formaldehyde Dehydrogenase. *J. Mol. Biol.* 265, 330-343.
- **Yasunami, M., Chen, C.S. and Yoshida, A.** (1991). A human alcohol dehydrogenase gene (*ADH6*) encoding an additional class of isozyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **88**, 7610-7614.
- **Yin, S.- J., Vagelopoulos, N., Wang, S.-L. and Jörnvall. H.** (1991). Structural feature of stomach aldehyde dehydrogenase distinguish aldehyde dehydrogenase as a “variable “ enzyme. “Variable” and “constant” enzymes within the alcohol and aldehyde dehydrogenase families. *FEBS Lett.* 283, 85-88.
- **Yu, P.H., Lai, C.T. and Zuo, D.M.** (1997). Formation of Formaldehyde from Adrenaline In vivo; a Potential Risk Factor for Stress-Related Angiopathy. *Neurochemical Research.* **22**, 615-620.
- **Zheng, Y.W., Bey, M., Liu, H and Felder, M.R.** (1993). Molecular basis of the alcohol dehydrogenase-negative deer mouse. Evidence for deletion of the gene for class I enzyme and identification of possible new enzyme class. *J Biol Chem.* **268**, 24933-24939.