

UCH-FC
Biotecnología
B 898
C.1

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS

DIRECTOR DE MEMORIA:

DRA. LEE MEISEL

LABORATORIO DE GENETICA MOLECULAR VEGETAL

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA

FACULTAD DE CIENCIAS

**ESTUDIO DE LA INTERACCION ENTRE
CLOROPLASTOS Y ACTINA**

MEMORIA PARA OPTAR AL TITULO DE

INGENIERO EN BIOTECNOLOGIA MOLECULAR



CONSUELO BRUNO URBINA

SANTIAGO DE CHILE, MARZO 2003

ESCUELA DE PREGRADO- FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE



INFORME DE APROBACIÓN TESIS DE PREGRADO

Se informa a la Escuela de Pregrado, de la Facultad de Ciencias, que la Tesis de Pregrado presentada por la candidata :

CONSUELO BRUNO URBINA

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluación de la Tesis, como requisito para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular, en el Examen de Defensa de Tesis, rendido el día 30 de Enero de 2003.

DRA. LEE ANN MEISEL
Directora de Tesis

Firma manuscrita en azul de Lee Ann Meisel, sobre una línea horizontal.

LA COMISION

DR. JUAN FERNÁNDEZ HIDALGO
Presidente de la Comisión

Firma manuscrita en azul de Juan Fernández Hidalgo, sobre una línea horizontal.

DR. MAURICIO GONZÁLEZ CANALES

Firma manuscrita en azul de Mauricio González Canales, sobre una línea horizontal.

DR. ARIEL ORELLANA LÓPEZ

Firma manuscrita en azul de Ariel Orellana López, sobre una línea horizontal.

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradece en particular modo a

Mi familia que me ha apoyado y soportado en este largo camino.

Lce Meisel, mi director de tesis, por recibirme en el laboratorio, por su apoyo y sus críticas a mi trabajo y mi desarrollo personal y por mostrarme cómo se hace ciencia.

Rodrigo Alvarez por su colaboración en desarrollar parte de los ensayos de inmunolocalización, su constante ayuda y por las discusiones sobre mi trabajo.

Andrea, Daniela, Anita y todos los integrantes, actuales y pasados, del laboratorio de Genética Molecular Vegetal por hacer del laboratorio un ambiente particularmente grato para trabajar.

Dr. Ariel Orellana y Dr. Herman Silva por ayudar a este trabajo con algunos reactivos y sus críticas constructivas.

Dr. Naohiro Kato y Dr. Eric Lam por su buena disposición, su ayuda y por donar al laboratorio las cepas de *E. coli* que expresan los genes de las proteínas fluorescentes ECFP, EGFP, EYFP y DsRed2, utilizadas en este trabajo.

Dr. Juan Fernández, por donarnos polvo cetónico para la preparación de actina purificada y Dr. Ricardo Maccioni por el anticuerpo anti-actina de pollo.

Fondecyt proyecto # 1000812, CBB ICM P99-031-F, Beca Presidente de la República y Beca MINEDUC, por financiar mi proyecto de memoria y mis estudios.

INDICE GENERAL

<i>AGRADECIMIENTOS</i>	<i>ii</i>
<i>INDICE GENERAL</i>	<i>iii</i>
<i>INDICE DE FIGURAS Y TABLAS</i>	<i>vi</i>
<i>ABREVIATURAS</i>	<i>viii</i>
<i>RESUMEN</i>	<i>x</i>
<i>SUMMARY</i>	<i>xii</i>

1 INTRODUCCION _____	1
1.1 Los plastidios. _____	1
1.2 Movimiento de cloroplastos en respuesta a la luz. _____	2
1.3 Mecanismos de movimiento de los cloroplastos en plantas. _____	3
1.4 Mecanismos de movimiento de organelos sobre actina. _____	5
1.5 Interacción de cloroplastos con actina. _____	7
1.6 HIPOTESIS _____	8
1.7 OBJETIVO GENERAL _____	8
1.8 OBJETIVOS ESPECIFICOS _____	8
2 MATERIALES Y METODOS _____	9
2.1 Materiales. _____	9
2.2 Tejido vegetal y condiciones de crecimiento. _____	10

2.3	Microscopía de fluorescencia y recuento de las muestras en el microscopio.	11
2.4	Optimización de los parámetros para la detección simultánea de múltiples fluoróforos.	12
2.5	Aislamiento de cloroplastos de hojas de coliflor.	13
2.6	Preparación de actina desde polvo cetónico de músculo.	14
2.7	Ensayo de polimerización de actina.	15
2.8	Polimerización de actina en presencia de cloroplastos aislados.	16
2.9	Inmunolocalización en cloroplastos aislados.	16
2.10	Inhibición de la interacción entre cloroplastos y actina.	17
3	RESULTADOS	18
3.1	Optimización de los parámetros para la detección simultánea, en un microscopio de epifluorescencia, de fluoroforos de distintas características espectrales.	18
3.1.1	Optimización de los parámetros para la captura de imágenes de fluorescencia asociada a cloroplastos aislados de hojas de coliflor.	21
3.1.2	Optimización de los parámetros para la captura de imágenes de fluorescencia que permitan la visualización simultánea de múltiples variantes de proteínas fluorescentes.	25

3.2	Caracterización de la interacción “in vitro” entre actina y cloroplastos.	29
3.2.1	Purificación de actina y su polimerización “in vitro”.	29
3.2.2	Polimerización de actina en presencia de cloroplastos aislados.	31
3.3	Análisis por inmunolocalización de la asociación de actina, proteínas relacionadas a actina y miosinas con cloroplastos aislados.	35
3.3.1	Inmunolocalización en cloroplastos aislados.	35
3.3.1.1	Análisis de poblaciones de cloroplastos.	39
3.4	Participación de proteínas relacionadas con actina y miosinas en la interacción entre cloroplastos y actina “in vitro”.	43
3.4.1	Inhibición de la interacción de cloroplastos con actina.	43
4	<i>DISCUSION</i>	50
5	<i>CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES</i>	58
5.1	Conclusiones	58
5.2	Recomendaciones	59
6	<i>BIBLIOGRAFIA</i>	61
7	<i>APENDICE</i>	68

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1: Regiones del cubreobjeto consideradas para el recuento de muestras en el microscopio.....	12
Figura 2: Excitación y emisión de los filtros de fluorescencia y fluoróforos utilizados.....	19
Figura 3: Visualización por microscopía de cloroplastos aislados y optimización de los parámetros para capturar imágenes de la fluorescencia asociada a ellos.....	22
Figura 4: Análisis de la fluorescencia de proteínas fluorescentes.....	26
Figura 5: Optimización de los parámetros para captura de imágenes de proteínas fluorescentes en microscopio de epifluorescencia.....	28
Figura 6: Electroforesis y ensayos de actividad de actina de pollo purificada..	30
Figura 7: Interacción <i>in vitro</i> entre cloroplastos y actina.....	33
Figura 8: Proteínas relacionadas a actina y miosina se asocian a cloroplastos aislados desde hojas de coliflor.....	38
Figura 9: Análisis poblacional de cloroplastos aislados según la presencia de proteínas relacionadas a actina y miosina.....	42

Figura 10: Proteínas relacionadas a actina participan en la interacción <i>in vitro</i> entre cloroplastos y actina.....	44
Figura 11: Efecto de anticuerpos sobre la interacción entre cloroplastos y actina.....	46
Tabla 1: Porcentaje de cloroplastos que interaccionan con actina en ensayos de inhibición de la interacción entre cloroplastos y actina utilizando los anticuerpos anti-actina C11 y anti-miosina MY32.....	47

Contenidos disco compacto anexo:

Presentación memoria.

Figuras memoria.

ABREVIATURAS

- APM = ami-profosmetil
- ATP = adenosina trifosfato
- BSA = albumina de suero bovino
- CAB = proteína de unión a clorofila A/B
- ECFP = Proteína fluorescente cyan
- cols. = colaboradores
- cv. = cultivar
- dB = decibel
- DNasa I = deoxiribonucleasa I
- DTT = ditioneitol
- FITC = isotiocianato de fluoresceína
- EGFP = Proteína fluorescente verde
- HB = tampón de homogeneización
- HFR = respuesta a alta intensidad
- IPTG = isopropil β -D-tiogalactosido
- LB = medio Luria Bertani
- LFR = respuesta a baja intensidad
- PAGE = electroforesis en gel de poliacrilamida
- RB = tampón de resuspensión

DsRed2 = Proteína fluorescente roja

RM = medio de resuspensión

rpm = revoluciones por minuto

SDS = dodecil sulfato de sodio

EYFP = Proteína fluorescente amarilla

RESUMEN

Los cloroplastos son organelos que se encuentran presentes exclusivamente en plantas y algas, tienen genoma, participan en numerosas vías metabólicas y son los organelos responsables de la fotosíntesis. Estos organelos son capaces de responder a cambios del medio ambiente, como la intensidad luminosa o la estimulación mecánica, frente a las cuales se mueven para optimizar las reacciones metabólicas que llevan a cabo.

Su movimiento ha sido asociado a filamentos de actina, sin embargo, aún se desconocen los mecanismos moleculares involucrados en este proceso. Hasta el momento se han descrito dos sistemas esenciales por los cuales organelos o patógenos intracelulares se mueven vía actina: las miosinas y el complejo Arp2/3. En este trabajo analizamos la interacción *in vitro* entre cloroplastos y filamentos de actina y la participación de proteínas relacionadas a actina y miosina en esta interacción.

En ensayos *in vitro* determinamos que existe una estrecha asociación entre cloroplastos aislados de hojas de coliflor y filamentos de actina, los que polimerizan alrededor de los cloroplastos formando estructuras tipo jaulas, este fenómeno ha sido observado en el 70% de los cloroplastos.

Mediante inmunocitoquímica encontramos que proteínas relacionadas a actina y miosina copurifican con cloroplastos aislados. Las proteínas relacionadas a actina asociadas a los cloroplastos participan en la interacción con filamentos de actina, produciéndose una inhibición del 33% en la interacción entre actina y cloroplastos tratados con un anticuerpo policlonal contra actina de pollo. Esta inhibición incompleta sugiere que exista más de un mecanismo que permita esta interacción.

SUMMARY

Chloroplasts are organelles which are only present plants and algae. They have their own genome, participate in multiples metabolic pathways and are responsible for photosynthesis. Chloroplasts can move in the cell in response to environmental changes such as light intensity or mechanical induction, optimizing the yield of the metabolic reaction that they carry out.

Chloroplast movement have been associated with actin filaments. However, the molecular mechanisms involved in this process are poorly understood. To date, two systems have been described for the actin-based organelle or intracellular pathogens movement: the Arp2/3 complex and the motor protein, myosin. In this study, we analyzed *in vitro* chloroplast-actin interaction and the role of myosin and actin-like proteins in this interaction.

In vitro assays show that actin filaments interact specifically with isolated chloroplasts, forming a cage around them. This phenomena occurs in 70% of the chloroplasts. Immunolocalization analyses, demonstrate that actin-like proteins and myosin copurify with isolated chloroplasts.

The actin-like proteins associated with chloroplasts are responsible for the interaction between actin filaments and chloroplasts. Treatment of the chloroplasts with an antibody against chicken actin inhibits actin interaction by 33%. This incomplete inhibition indicates that there may exist another system involved in the chloroplast-actin interaction.

1 INTRODUCCION

1.1 Los plastidios.

Los plastidios son una familia de organelos con genoma propio y rodeados por una doble membrana, que se encuentran presentes en plantas y algas. A partir de un progenitor común, el proplastidio, se origina toda la familia, la que incluye los leucoplastos, plastidios incoloros, entre los cuales los más conocidos son los amiloplastos, que se caracterizan por su capacidad de almacenar almidón; los cromoplastos, organelos que acumulan pigmentos, como los carotenoides, y los cloroplastos, que almacenan clorofila y son los responsables de la fotosíntesis (Stachelin y Newcomb, 2000).

Los cloroplastos han sido históricamente los plastidios más estudiados, debido a que participan en numerosas vías metabólicas además de la fotosíntesis, como por ejemplo en la síntesis de aminoácidos, ácidos grasos, asimilación de nitrógeno y fotorespiración, vías metabólicas en las que cooperan con peroxisomas y mitocondrias, intercambiando productos y substratos de las diferentes reacciones metabólicas (Pollard y Ohlrogge, 1999; Neuhaus y Emes, 2000; Stachelin y Newcomb, 2000). Los cloroplastos se moverían en la célula no sólo para repartirse en la división celular sino que también podrían movilizarse para interaccionar con otros organelos, haciendo más eficiente el intercambio de moléculas y llevar a cabo sus funciones metabólicas. Para

optimizar estos procesos, los cloroplastos, son capaces de responder a las continuas variaciones de las señales ambientales como la luz o la estimulación mecánica.

1.2 Movimiento de cloroplastos en respuesta a la luz.

La relocalización y distribución de cloroplastos en respuesta a las condiciones de luz han sido estudiadas en diferentes organismos, en las algas verdes *Vaucheria sessilis* (Blatt y Briggs, 1980) y *Ulva lactuca* L. (Britz y Briggs, 1983), en el helecho *Adiantum capillus-veneris* (Kagawa y Wada, 1996), en el musgo *Physcomitrella patens* (Kadota y cols., 2000) y en la planta acuática *Lemna trisulca* (Zurzycki y cols., 1983; Tlalka y Gabrys, 1993; Tlalka y Fricker, 1999). En todos ellos los cloroplastos se distribuyen en las paredes anticlinales, paralelas a la fuente de luz, cuando la célula está expuesta a una fuente luminosa de alta intensidad, quedando en una disposición en la cual los organelos se hacen sombra los unos a los otros, protegiéndose del daño que les podría causar tal intensidad luminosa. En cambio, cuando la célula se encuentra iluminada con luz de baja intensidad, los cloroplastos se disponen de manera azarosa en la célula, concentrándose en las paredes periclinales, perpendiculares a la fuente de luz, como un mecanismo para optimizar la captación de luz. Los cloroplastos responden específicamente a cambios en la intensidad luminosa de luz azul y roja. En helechos y musgos (*Adiantum capillus-veneris* y *Physcomitrella patens*, respectivamente), cuando se utiliza un microrayo de luz azul o roja de baja intensidad, se produce la acumulación de los cloroplastos en la zona irradiada (LFR = *low fluence response*), por el contrario, los cloroplastos se alejan de la zona iluminada (HFR = *high fluence response*) al irradiar la célula con un microrayo de luz azul o roja de alta intensidad. Sin embargo, la

intensidad luminosa que gatilla la respuesta LFR varía según la especie, siendo para helechos 10W/m^2 y para musgos $85,5\text{ W/m}^2$ (Yatsunami y cols., 1985; Kagawa y Wada, 1996; Kagawa y Wada, 1999; Kadota y cols., 2000).

La localización diferencial de cloroplastos según las condiciones de luz durante el crecimiento también ha sido descrita en la planta modelo *Arabidopsis thaliana* (Trojan y Gabrys, 1996), así como las respuestas de acumulación y alejamiento de los cloroplastos en respuesta a luz azul de alta y baja intensidad, siendo similares a las descritas para helechos (Kagawa y Wada, 2000). La luz roja, en cambio, no afecta la distribución de los cloroplastos de hojas de *Arabidopsis thaliana*, indicando que receptores de luz azul y no de luz roja están participando en regular el movimiento de estos organelos. Estudios en mutantes de *Arabidopsis thaliana* que carecen de respuesta fototrópica a la luz azul han llevado a la identificación de NPH1, un fotoreceptor de luz azul que participa en la respuesta fototrópica, ulteriores investigaciones en las mutantes *cav* (*chloroplast avoidance movement*) permitieron la identificación de NPL1, otro fotoreceptor de luz azul, homólogo a NPH1, que regula el movimiento de cloroplastos en la respuesta LFR, ambos fotoreceptores serían funcionalmente redundantes en la acumulación de cloroplastos en la respuesta LFR (Jarillo y cols., 2001; Kagawa y cols., 2001; Sakai y cols., 2001).

1.3 Mecanismos de movimiento de los cloroplastos en plantas.

La descripción de los fotoreceptores NPH1 y NPL1 ha proporcionado información sobre la vía de transmisión de señales que regula el movimiento de cloroplastos en respuesta a señales ambientales, por otro lado el uso de drogas

desestabilizadoras del citoesqueleto ha sido la herramienta más utilizada para entender el mecanismo que permite este movimiento. En plantas acuáticas y algas verdes el movimiento de cloroplastos es bloqueado por drogas que desestabilizan los filamentos de actina, como las citochalasinas B y D (Witztum y Parthasarathy, 1985; Menzel y Schliwa, 1986b; Liebe y Menzel, 1995; Sato y cols., 2000). Drogas que alteran los microtubulos, como colchicina, vinblastina o los herbicidas cremart y APM (*ami-profosmetil*), afectan la dirección del movimiento de los cloroplastos en el musgo *Physcomitrella patens* y la planta acuática *Vallisneria gigantea* (Menzel y Schliwa, 1986b; Sato y cols., 2000). El citoesqueleto de actina juega un papel fundamental en la disposición y posicionamiento de los cloroplastos, sin embargo, los microtúbulos también participan, sugiriendo una estrecha interacción entre estos elementos del citoesqueleto, postulando que los cloroplastos podrían encontrarse anclados a filamentos de actina, los que se moverían a través del citoesqueleto, para lo cual sería fundamental la presencia de microtubulos.

Con el uso de la inmunocitoquímica se ha encontrado colocación de cloroplastos con filamentos de actina. Utilizando anticuerpos contra actina en tejido fijado de *Bryopsis plumosa* y *Arabidopsis thaliana*, alga verde y planta superior respectivamente, se ha mostrado colocación entre cloroplastos y filamentos de actina. Estos se encuentran rodeando a los organelos formando estructuras similares a canastos (Menzel y Schliwa, 1986a; Kandasamy y Meagher 1999). Una asociación de este tipo no se ha encontrado para los microtúbulos.

Resultados preliminares obtenidos en nuestro laboratorio indican que en ensayos *in vitro*, cloroplastos aislados de hojas de coliflor interaccionan con filamentos de actina de pollo.

En conjunto, estos antecedentes indican que el citoesqueleto de actina estaría jugando un papel fundamental en el posicionamiento intracelular de los cloroplastos y en el movimiento en respuesta a los estímulos ambientales. Sin embargo, aún es desconocido el mecanismo por el cual estaría mediado el movimiento de estos organelos vía filamentos de actina.

1.4 Mecanismos de movimiento de organelos sobre actina.

Las primeras evidencias de movimiento de organelos dependiente del citoesqueleto de actina provienen del estudio de la corriente citoplasmática, movimiento rotacional que se observa en células vegetales, en el cual el citoplasma se mueve alrededor de la gran vacuola central (Yamaguchi y Nagai, 1981).

Williamson en 1993 postuló tres posibles mecanismos por el cual se moverían los organelos sobre actina en células vegetales: la presencia de proteínas motoras en la superficie de los organelos permitiría su movimiento sobre una red de filamentos fija; otro sistema de filamentos se movería sobre los filamentos fijos tirando organelos anclados a ellos; y por último, filamentos que se encuentren anclados a la membrana actuarían generando tensión sobre los organelos, produciendo así su movimiento.

Kachar en 1985 mostró que en el alga *Chara* el movimiento de organelos es dependiente de ATP y polarizado hacia el extremo de crecimiento rápido (barbed end) de los filamentos de actina, indicando que el motor para la corriente citoplasmática

podría ser una proteína de la familia de las miosinas. Las miosinas son proteínas motoras que se asocian a los filamentos de actina y transportan vesículas u organelos, además permiten el desplazamiento de filamentos de actina para producir la contracción muscular.

En plantas se han encontrado miosinas de tipo I y II (La Claire II, 1991), miembros de dos de las quince familias descritas en animales, (Baskin, 2000; Volkmann y Hancock, 2000). En ensayos de inmunolocalización se ha mostrado colocación de miosinas con amiloplastos y núcleos, en las monocotiledoneas *Alopecurus pratensis*, *Hyacinthus orientalis* y *Heleborus foetidus*, (Heslop-Harrison y Heslop-Harrison, 1989). En el alga verde *Ernodesmis verticillata* y en la planta acuática *Vallisneria gigantea*, se ha encontrado que las miosinas colocan con cloroplastos (La Claire II, 1991; Liebe y Menzel, 1995).

Sin embargo, las miosinas no representan el único mecanismo de movimiento sobre actina. El complejo Arp2/3 ha sido descrito como otro mecanismo, por el cual, las bacterias *Listeria monocytogenes*, *Shigella flexneri* y el virus *Vaccinia*, reclutan filamentos de actina en su superficie y se movilizan en la célula huésped (Higgs y Pollard, 2001, May, 2001). El complejo Arp2/3 está formado por siete subunidades proteicas, dos proteínas relacionadas a actina: Arp2 y Arp3 y cinco proteínas asociadas que llevan el nombre ARPC1 hasta ARPC5. Este complejo es capaz de interactuar con actina sellando el extremo de crecimiento lento (pointed end) de los filamentos, inhibiendo la unión y disociación de monómeros de actina desde este extremo, en esta posición es capaz de nuclear filamentos que crecen únicamente por el extremo de crecimiento rápido (barbed end), además se une lateralmente a filamentos de actina,

donde produce la nucleación de nuevos filamentos, generando las ramificaciones en un ángulo de 70° que se observan en animales (Mullins y cols., 1998; Higgs y Pollard, 2001; May, 2001). Además se ha descrito que el movimiento de las mitocondrias de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* sobre filamentos de actina es mediado por el complejo Arp2/3, y que dos subunidades del complejo, Arp2 y ARPC5, copurifican con mitocondrias aisladas (Boldogh y cols., 2001). En nuestro laboratorio se han identificado en el genoma de *Arabidopsis thaliana* los genes para seis de las siete subunidades del complejo Arp2/3, indicando que este complejo estaría presente en plantas y podría considerarse una alternativa para el movimiento de organelos sobre filamentos de actina.

1.5 Interacción de cloroplastos con actina.

Resulta importante estudiar la relación de los plastidios con el citoesqueleto para avanzar hacia el entendimiento del mecanismo que utilizan para moverse y la relación entre el movimiento y su participación en las diferentes vías metabólicas. Con este propósito en mente se ha estudiado la relación entre los cloroplastos y filamentos de actina, utilizando vídeo microscopía de fluorescencia, inmunofluorescencia y la acción de anticuerpos y algunas drogas.

1.6 HIPOTESIS

Los cloroplastos se mueven en respuesta a señales ambientales y este movimiento se asocia con el citoesqueleto de actina. Parece, entonces, muy probable que proteínas relacionadas con el citoesqueleto de actina puedan encontrarse asociadas con los cloroplastos, y sean elementos importantes de la interacción entre éstos y los filamentos de actina.

1.7 OBJETIVO GENERAL

Analizar la participación de proteínas relacionadas con el citoesqueleto de actina en la interacción entre cloroplastos y actina.

1.8 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Optimización de los parámetros para la detección simultánea, en un microscopio de epifluorescencia, de fluoróforos de distintas características espectrales.
- Caracterizar la interacción *in vitro* entre cloroplastos aislados y actina.
- Analizar por inmunolocalización la asociación de actina, proteínas relacionadas a actina y miosina con cloroplastos aislados.
- Determinar la participación de proteínas relacionadas a actina y miosina en la interacción entre cloroplastos y actina *in vitro*.

2 MATERIALES Y METODOS

2.1 Materiales.

Material biológico: El tejido vegetal fue obtenido de plantas de coliflor, *Brassica oleracea* cv. Bola de nieve. Para la purificación de actina se utilizó polvo cetónico preparado previamente desde pechuga de pollo.

Reactivos químicos: Los reactivos utilizados en este trabajo son todos de grado biología molecular y son productos comercializados por empresas como Sigma, GIBCO-BRL y Merck. Además se utilizaron algunas sondas fluorescentes para la marcación de actina:

- Faloidina Alexa Fluor 488 (Molecular Probes), que se une específicamente a F-actina.
- “DNasa I-Alexa Fluor 488” (Molecular Probes), que se une a monómeros de G-actina.

Los anticuerpos utilizados para inmunocitoquímica, sus especificaciones y su proveniencia, se indican a continuación:

Anticuerpos primarios:

- Anti-actina de pollo (donado por el Dr. Ricardo Maccioni): anticuerpo policlonal desarrollado en conejo contra actina de pollo.

- Anti-actina C11 (Santa Cruz): anticuerpo policlonal desarrollado en cabra contra un péptido cuya secuencia corresponde a los once aminoácidos del extremo carboxilo terminal de la proteína actina.
- Anti-miosina MY32 (Sigma): anticuerpo monoclonal que reconoce un epítipo de la cadena pesada de la miosina tipo II de músculo de conejo.
- Anti-CAB (Santa Cruz): anticuerpo policlonal desarrollado en cabra contra la proteína CAB, proteína de unión a clorofila A/B (“Chlorophyll A/B binding protein”), también conocida como “light harvesting complex B”.

Anticuerpos secundarios:

- Anti-conejo IgG-FITC (Santa Cruz).
- Anti-cabra IgG-Alexa Fluor 488 (Molecular Probes).
- Anti-ratón IgG-FITC (Santa Cruz).

2.2 Tejido vegetal y condiciones de crecimiento.

Para la extracción de cloroplastos se utilizaron plantas de coliflor (*Brassica oleracea*). Las semillas fueron embebidas en agua por 12h a 4°C, luego fueron sembradas en una mezcla de tierra de hojas de litro y vermiculita en proporción 3:2. Las plantas se hicieron crecer en una cámara de crecimiento a 22°C bajo luz blanca de 4560 lux con un ciclo de luz de 16 horas, fueron regadas regularmente cada dos días y recibieron fertilizante (N: 18%, P: 19%, K: 19%) una vez a la semana en el agua de riego.

2.3 Microscopía de fluorescencia y recuento de las muestras en el microscopio.

Las muestras fueron analizadas en un microscopio de epifluorescencia Olympus IX70, acoplado a una lámpara de mercurio (Hg) de 100W y a una cámara de vídeo digital Sony DXC-390 3CCD. Las imágenes fueron capturadas a través de un computador conectado a la cámara digital, utilizando el programa *Scion Image for Windows* versión β 4.0.2 de *Scion Corporation*, y fueron luego procesadas con el programa *Adobe Photoshop 6.0*. El microscopio estaba equipado con los siguientes filtros de fluorescencia:

- Filtro cyan UM31044v2 (Chroma), excitación D436/20x, emisión D480/40m.
- Filtro verde U-N3001 FITC (Chroma), excitación D480/30X, emisión D535/40m.
- Filtro amarillo UN31040 (Chroma), excitación D510/20x, emisión D560/40m.
- Filtro rojo U-MNG (Olympus), BP530-550, emisión BA590.

Para la determinación del porcentaje de cloroplastos que interaccionan con actina y de los cloroplastos positivos en los ensayos de inmunolocalización, se contaron los cloroplastos que presentaron señal positiva en cada muestra, contando un total de 200-250 cloroplastos por muestra. Para que los cloroplastos contados fueran una muestra representativa del total de cloroplastos presentes en el portaobjeto, se contaron nueve regiones del cubreobjeto, ocho regiones periféricas y una central (Figura 1). En aquellos casos en que el recuento de cloroplastos en estas regiones no alcanzó los 200 organelos, se contaron más cloroplastos en forma arbitraria hasta obtener un total de 200-250 cloroplastos.

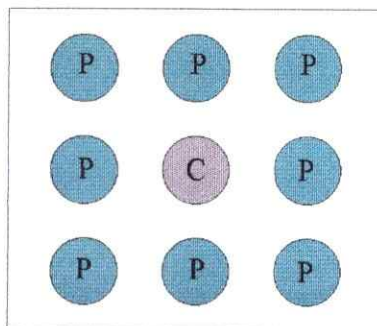


Figura 1: Regiones del cubreobjeto consideradas para el recuento de muestras en el microscopio. Para la cuantificación de los cloroplastos positivos en los ensayos de interacción con actina e inmunolocalización en cloroplastos aislados, se contaron 200-250 cloroplastos por muestra, considerando para ello, nueve regiones del cubreobjeto, ocho regiones periféricas (azul) y una región central (morado), dentro del total de cloroplastos contados se cuantificó cuantos de ellos resultaron positivos a los diferentes ensayos.

1.1 Optimización de los parámetros para la detección simultánea de múltiples fluoróforos.

Se utilizaron cepas de *E. coli* BL 21/DE3 (Novagen, WI, USA) con el vector pET23a (Novagen), en el cual ha sido clonado el gen de la proteína fluorescente verde (EGFP) o alternativamente el gen de la proteína fluorescente cian (ECFP), amarilla (EYFP) o roja (DsRed2), (cepas donadas gentilmente por Naohiro Kato y Eric Lam, Rutgers University, NJ, USA). Se hicieron crecer a 37°C toda la noche, en medio LB estéril (Peptona 1% p/v, NaCl 1% p/v, Extracto de levadura 0,5% p/v) suplementado con ampicilina a una concentración final de 200µg/ml, con agitación y asegurando una buena aireación de los cultivos. La expresión de las proteínas fluorescentes en estas cepas se encuentra regulada por el promotor de la β -galactosidasa, el cultivo fue por lo tanto incubado por 3h a 37°C con IPTG 500µM, para inducir la expresión de estas proteínas.

Luego se centrifugó 1ml del cultivo a 14.000rpm (15.000g) en una microcentrifuga, se descartó el sobrenadante y las bacterias fueron resuspendidas en 1ml de agua destilada. Las muestras para microscopía se montaron entre dos cubreobjetos de 24x50mm N°1 mezclándose con agarosa al 1% tibia.

Para obtener una mejor visualización de cada fluoroforo y poder distinguir su señal de la de otro fluoroforo se trabajó con algunos parámetros de la cámara de vídeo:

- Ganancia = se refiere a la amplificación de la señal recibida, la cámara es capaz de amplificar la señal en valores entre 0 y 24dB.
- Larga exposición y número de cuadros = para capturar las imágenes se trabajó utilizando el obturador en "larga exposición", condición en la cual la cámara de vídeo demora 1/30seg para tomar un cuadro o fotograma. Para cada imagen se capturaron varios cuadros, número que se indica en cada foto, los que fueron luego integrados (imaging integration) siguiendo el macro "*continuous integration on trigger*" del programa *Scion*, este macro integra los cuadros capturados de modo que la imagen resultante favorece la señal sobre el ruido.

2.5 Aislamiento de cloroplastos de hojas de coliflor.

Los cloroplastos fueron aislados desde hojas de coliflor de acuerdo a Pain y Blobel (1987) y Ma y cols. (1996) con algunas modificaciones. Las hojas fueron homogeneizadas en tampón de homogeneización (HB, *homogenization buffer*), el que contiene BSA 0,1mg/ml; EDTA-NaOH 10mM pH 8,0; NaHCO₃ 10mM; Sorbitol 0,45M; Tricina-KOH 20mM pH 8,4. Las muestras fueron filtradas por dos mallas de poro de 175µm y 63µm de diámetro, respectivamente y centrifugadas a 1.000g por

90seg. El sedimento fue resuspendido suavemente con un pincel en 500µl de un tampón de resuspensión (RB, *resuspension buffer*) que contiene EDTA-NaOH pH 8,0 2,5mM; MgCl₂ 5mM; Sorbitol 0,3M; Tricina-KOH pH 7,6 20mM. Las muestras fueron cargadas sobre un gradiente de Percoll 20%-40%-80% en RB y centrifugadas a 2.000g por 10min. Los cloroplastos intactos fueron recuperados de las interfases, 20%-40% y 40%-80%, y lavados tres veces con tampón de resuspensión. Finalmente fueron resuspendidos en un tampón (RM, *resuspension media*) que contiene KCl 100mM; MgCl₂ 5mM; Sorbitol 300mM; Hepes-KOH 20mM pH 7,4 y DTT 1mM, a una dilución de aproximadamente 10¹⁰ cloroplastos/ml.

2.6 Preparación de actina desde polvo cetónico de músculo.

La preparación de actina se llevó a cabo según el protocolo original descrito por Pardee y Spudich (1982) y recopilado por Spector y cols. en 1998, con algunas modificaciones. El protocolo consiste en extraer la actina desde polvo cetónico obtenido previamente de músculo esquelético de pollo, en este trabajo se utilizó polvo cetónico (donado por el Dr. Juan Fernández). Para 2g de polvo cetónico se usaron 40ml de tampón de despolimerización de actina, el que contiene Tris-HCl 2mM pH 8,0; ATP 0,2mM; DTT 0,5mM; CaCl₂ 0,2mM. La extracción se lleva a cabo a 0°C por 30min. Luego de una segunda extracción por 10min en 5ml de tampón de despolimerización, el extracto recogido mediante filtración por Miracloth se centrifugó a 16.000rpm en rotor SS-34 (30.590g_{max}) por 20min a 4°C. El sobrenadante se llevó a concentraciones de KCl 50mM; MgCl₂ 2mM y ATP 1mM y se dejó polimerizar por 2h a 4°C. Para liberar la tropomiosina fue necesario llevar la solución a una concentración de KCl de 0,7M e

incubar por 30min a 4°C. Se recuperaron los filamentos de actina por ultracentrifugación a 33.000rpm en rotor T-647.5 (120.700g_{max}) por 3h a 4°C. El sedimento de F-actina se resuspendió en 2ml de tampón de despolimerización, se homogeneizó y se dializó por 1,5 días en tampón de despolimerización con por lo menos tres cambios de tampón. Para clarificar la solución se sometió a ultracentrifugación a 33.000rpm en rotor T-647.5 (120.700g_{max}) por 3h a 4°C. La concentración de actina se calculó por el ensayo de Bradford (Bradford, 1976), su pureza se verificó en gel de poliacrilamida desnaturante al 10% (SDS-PAGE, Laemmli, 1970) teñido con azul de Coomassie (Bollag y Edelstein, 1993), la actividad de la proteína se verificó por ensayos de polimerización, como se describe más abajo.

2.7 Ensayo de polimerización de actina.

El ensayo de polimerización de actina consiste en incubar por 2h a 4°C 0,2µg de actina en tampón de polimerización (Andersland y cols., 1992) y analizar las muestras por microscopía de fluorescencia. El tampón de polimerización utilizado en nuestro caso es el tampón RM (descrito en *aislamiento de cloroplastos de hojas de coliflor*, sección 2.5) adicionado con ATP 1,2mM y faloidina Alexa Fluor 488 0,75U/ml. La faloidina se utilizó como agente estabilizante de los filamentos de actina (Small y cols. 1999). Para tener un medio más denso se adicionó metilcelulosa 0,85% p/v, permitiéndonos una mejor visualización de los filamentos de actina y reduciendo el movimiento Browniano.

2.8 Polimerización de actina en presencia de cloroplastos aislados.

El ensayo de polimerización de actina en presencia de cloroplastos ha sido ideado en el laboratorio y consiste en incubar en tubo eppendorf toda la noche a 4°C, $5 \cdot 10^5$ cloroplastos aislados con 0,2µg de actina en un tampón que permita su polimerización. En nuestro caso se utilizó el tampón RM (descrito previamente en *aislamiento de cloroplastos de hojas de coliflor*, sección 2.5) suplementado con ATP 1,2mM y 0,75U/ml de faloidina Alexa Fluor 488. Para tener un medio más denso se adicionó metilcelulosa 0,85% p/v.

2.9 Inmunolocalización en cloroplastos aislados.

Una alícuota de cloroplastos aislados, entre 10^6 - 10^7 cloroplastos, fueron incubados por 30min en tampón RM (descrito previamente en *aislamiento de cloroplastos de hojas de coliflor*, sección 2.5) suplementado con BSA 3%. Luego fueron incubados toda la noche con cada uno de los anticuerpos primarios (descritos en *Materiales* sección 2.1) diluidos en RM-BSA 3%. Se trabajó a tres diluciones del primer anticuerpo: 1:10, 1:20 y 1:100. Los cloroplastos fueron lavados tres veces con RM e incubados por dos horas a 37°C con el segundo anticuerpo conjugado a fluoróforo, correspondiente en cada ensayo, diluido 1:100 en RM-BSA 3%. Los cloroplastos fueron luego lavados y resuspendidos finalmente en 30µl de RM, de los cuales se cargaron entre 8 y 10µl en el portaobjeto. Las muestras fueron analizadas por microscopía de fluorescencia.

2.10 Inhibición de la interacción entre cloroplastos y actina.

Cloroplastos ($5 \cdot 10^5$ aproximadamente) tratados previamente con un anticuerpo primario (como descrito en *Immunolocalización en cloroplastos aislados*, sección 2.9) fueron lavados tres veces con tampón RM (descrito previamente en *aislamiento de cloroplastos de hojas de coliflor*, sección 2.5) e incubados toda la noche a 4°C con 0,2µg de actina como descrito en *polimerización de actina en presencia de cloroplastos aislados* (sección 2.8). Los cloroplastos se observaron luego por microscopía de epifluorescencia.

3 RESULTADOS

3.1 Optimización de los parámetros para la detección simultánea, en un microscopio de epifluorescencia, de fluoróforos de distintas características espectrales.

En todos los trabajos que involucran el uso de un microscopio de fluorescencia es fundamental elegir correctamente los fluoróforos a utilizar, de manera que los filtros disponibles nos permitan su visualización y diferenciación. Como vemos en la figura 2, cada filtro tiene un rango de longitud de onda en la que permite el paso de luz para la excitación de una molécula, a la vez tiene otro rango de longitud de onda en el que permite el paso de la fluorescencia producida por la molécula excitada. A su vez las moléculas fluorescentes, sean éstas proteínas, fluoróforos o pigmentos como la clorofila, se excitan en un rango de longitud de onda específico y producen fluorescencia de una determinada longitud de onda. Un fluoróforo puede utilizarse cuando se tiene un filtro que permita su excitación y a la vez permita el paso de su fluorescencia.

Para la utilización de manera correcta de un microscopio de epifluorescencia, es necesario hacer un estudio para determinar el comportamiento de los filtros con diferentes moléculas fluorescentes y definir si los filtros de los que se dispone nos permitirán detectar y distinguir la fluorescencia de los diferentes fluoróforos que se pretende utilizar.

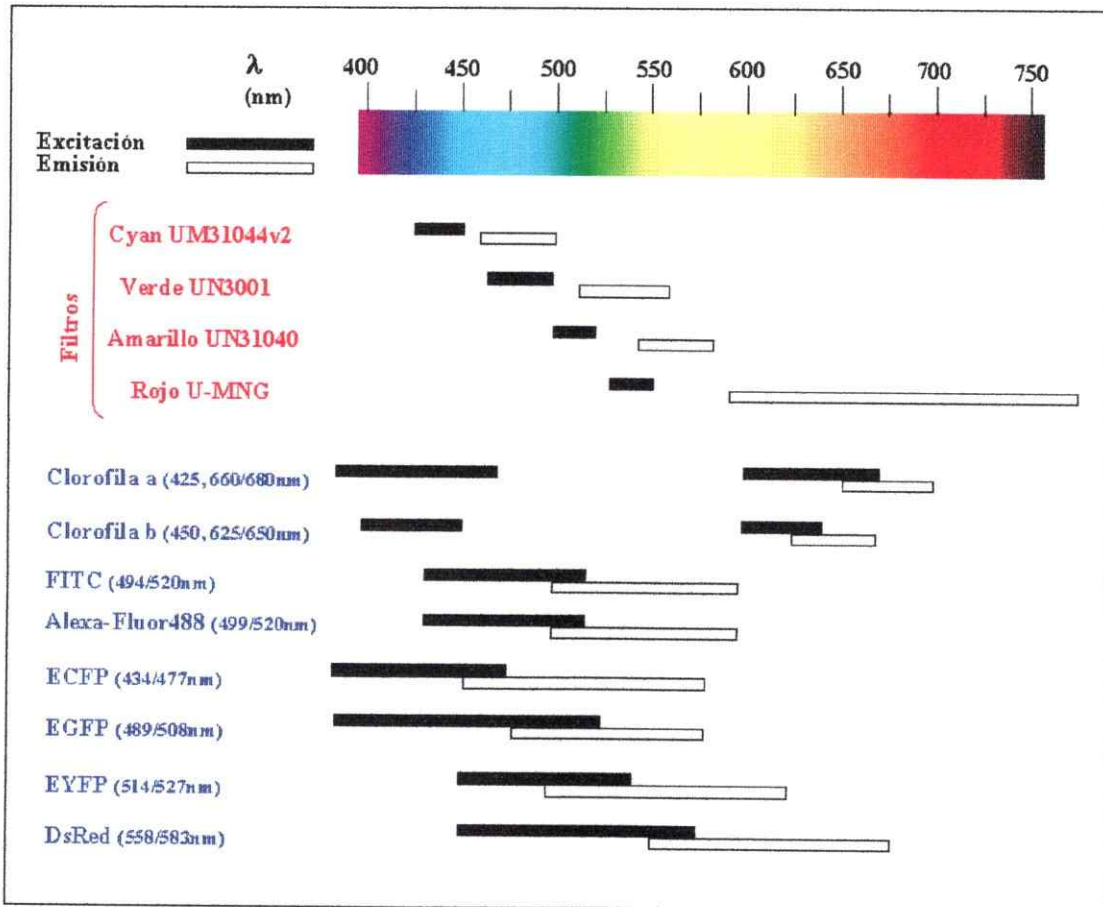


Figura 2: Excitación y emisión de los filtros de fluorescencia y fluoróforos utilizados. Los filtros de fluorescencia utilizados cubren un amplio rango del espectro luminoso visible, permitiéndonos una excitación (barras en negro) desde los 425 a los 550nm, para la emisión (barras en blanco) podemos captar la fluorescencia producida en el rango de 410 a 750nm. Para los estudios realizados en este trabajo se utilizaron fluoróforos cuyo rango de excitación (barras en negro) y emisión (barras en blanco) es compatible con los filtros disponibles. En paréntesis se indican los picos de excitación/emisión para cada fluoróforo.

En esta memoria se trabajará básicamente con dos fluorescencias, la autofluorescencia roja de la clorofila y la fluorescencia verde de variadas moléculas fluorescentes, ya sean sondas de unión a actina, como faloidina Alexa Fluor 488 o "DNasa I-Alexa Fluor 488", que se unen a filamentos de actina o a los monómeros de actina, respectivamente (Small y cols., 1999; Hitchcock, 1980), o anticuerpos secundarios acoplados a FITC o Alexa Fluor 488. En el laboratorio además se están desarrollando constructos para marcar plastidios y mitocondrias con proteínas fluorescentes de diferentes colores y poder así, en un futuro no muy lejano, visualizar "*in vivo*" múltiples elementos celulares simultáneamente y estudiar la relación espacial entre estos organelos y su movimiento en respuesta a diferentes procesos como pueden ser la infección por patógenos, la respuesta gravitrópica o la estimulación luminosa.

Es por lo tanto, importante estudiar el comportamiento de los filtros del microscopio con la autofluorescencia roja de los cloroplastos. La optimización de los parámetros para captura de imágenes en el microscopio de epifluorescencia se realizó con dos tipos de moléculas fluorescentes, la clorofila y las proteínas fluorescentes, en este caso se analizaron cuatro variantes de proteínas: ECFP, EGFP, EYFP y DsRed2, cuya emisión ocurre en las longitudes de onda del cyan, verde, amarillo y rojo respectivamente. Se trabajó con la clorofila para ajustar los parámetros de manera que el nivel de autofluorescencia basal no interfiera con la señal de los anticuerpos.

3.1.1 *Optimización de los parámetros para la captura de imágenes de fluorescencia asociada a cloroplastos aislados de hojas de coliflor.*

En los estudios de bioquímica de plantas, la coliflor representa el modelo de trabajo más utilizado, principalmente debido a la gran cantidad de tejido que proporciona para la purificación de proteínas (Fukata y cols., 1991; GrootWassink y cols., 1994). La coliflor pertenece a la familia de las *Brassicaceas*, como *Arabidopsis thaliana*, planta modelo para la genética vegetal, de la cual existen numerosas mutantes y actualmente se tiene la secuencia completa de su genoma. Esta relación ha permitido un importante trabajo de complementación entre la información obtenida por la purificación de proteínas de la coliflor y de la información de la secuencia o de plantas mutantes de *A. thaliana* (Ulmasov y Guilfoyle, 1992; Granger y cols., 1996; de La Torre y cols., 2002). El laboratorio tiene gran interés en la purificación de proteínas asociadas a cloroplastos que participen en la interacción con actina, la coliflor es el sistema óptimo para ello, permitiéndonos utilizar la información disponible para *Arabidopsis*, por ello en esta memoria se trabajó con esta planta modelo.

Los cloroplastos obtenidos desde hojas de coliflor se analizaron por microscopía para verificar su integridad, estos organelos son fácilmente identificables en microscopía de transmisión por su color verde (Figura 3A). Además con el filtro rojo (exc.530-550/em.590nm), se puede visualizar la intensa autofluorescencia roja de la clorofila (Figura 3B). En las imágenes 3A y 3B los cloroplastos aparecen intactos, la fluorescencia de la clorofila coincide con la imagen de los cloroplastos en transmisión, por lo que es una herramienta válida para la identificación de los cloroplastos y será utilizada en los análisis de microscopía de epifluorescencia a realizar.

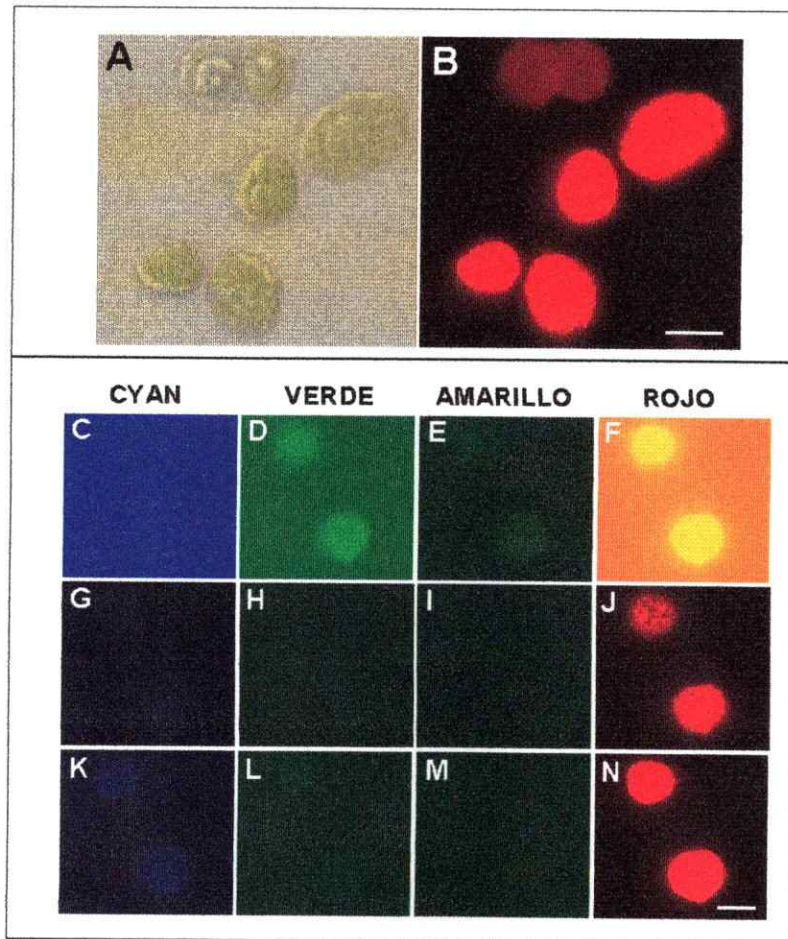


Figura 3: Visualización por microscopía de cloroplastos aislados y optimización de los parámetros para capturar imágenes de la fluorescencia asociada a ellos. Los cloroplastos aislados fueron observados al microscopio utilizando **A)** microscopía Nomarsky DIC, **B)** microscopía de epifluorescencia con el filtro para rojo (U-MNG). Los cloroplastos aparecen intactos y la autofluorescencia roja colocaliza con los cloroplastos. Optimizamos los parámetros de la cámara de video para la captura de imágenes de fluorescencia asociada a los cloroplastos capturando imágenes de los cloroplastos con diferentes parámetros: **C-F)** larga exposición 20 cuadros; ganancia 20, **G-J)** larga exposición 10 cuadros; ganancia 0, **K-N)** larga exposición 10 cuadros; ganancia 10. En cada caso se tomaron imágenes con los siguientes filtros: **C,G,K)** Cyan: exc: D436/20x; em: D480/40m; **D,H,L)** Verde: exc: D480/30x; em: D535/40m; **E,I,M)** Amarillo: exc: D510/20x; em: D560/40m; **F,J,N)** Rojo: exc: BP 530-550; em: BA 590. Barra de tamaño: 5µm.

Es importante señalar que es posible ajustar los parámetros para la captura de imágenes en la cámara de vídeo, de manera que la señal de un fluoróforo se encuentre disminuida o aumentada respecto a lo que se puede observar directamente en el microscopio, de esta forma se utiliza la cámara de vídeo para eliminar la fluorescencia no deseada y como amplificador de la señal deseada.

Debido a que los estudios a realizar involucran el uso de fluoróforos, se analizó el comportamiento de la autofluorescencia de la clorofila en los diferentes filtros disponibles en el microscopio de epifluorescencia del laboratorio. En la Figura 3C-F se observan imágenes de fluorescencia de cloroplastos en los diferentes filtros, captadas con alta ganancia, es decir que la señal se encuentra amplificada. Podemos visualizar claramente la fluorescencia basal verde de los cloroplastos (Figura 3D), así como la fluorescencia con el filtro cian (exc.436/em.480nm) (Figura 3C), se aprecia también que la fluorescencia amarilla es de menor intensidad (Figura 3E), sin embargo, la fluorescencia roja de la clorofila es de tan alta intensidad que la cámara de vídeo se satura y los colores se modifican, apareciendo amarilla (Figura 3F), este fenómeno nos indica que en realidad la fluorescencia verde y la cian son de intensidad mucho menor. Optimizamos los parámetros de la cámara de vídeo para la captura de imágenes de la fluorescencia roja de la clorofila (Figura 3J), obteniendo imágenes muy claras con el filtro rojo (exc.530-550/em.590nm), la fluorescencia verde (Figura 3H), así como la cian y amarilla (Figura 3G y 3I, respectivamente), son imperceptibles en las imágenes capturadas con estos parámetros. Para poder realizar los experimentos planificados con los fluoróforos verdes es necesario obtener imágenes en las cuales la autofluorescencia verde de los cloroplastos se encuentre minimizada. En las figuras 3K-N se muestran

imágenes capturadas con nuevos parámetros y podemos apreciar que la fluorescencia verde (Figura 3L), así como la fluorescencia cyan (Figura 3K), es de baja intensidad, se encuentra minimizada respecto a la figura 3D, sin embargo, es distinguible y nos permite identificar los cloroplastos en la muestra. Se definieron los parámetros para la captura utilizados en la Figura 3L como los parámetros óptimos para tomar imágenes de fluorescencia verde, en cuanto nos permitirá relacionar la fluorescencia de los fluoróforos FITC o Alexa Fluor 488, con la posición de los cloroplastos, sin que la autofluorescencia verde de éstos interfiera con la señal de los fluoróforos. A continuación se indican los parámetros definidos como óptimos para la captura de imágenes de fluorescencia de cloroplastos, estos parámetros se utilizaron para tomar todas las imágenes de los ensayos de inmunolocalización que se presentan en este trabajo:

- Imágenes de autofluorescencia roja de cloroplastos, con el filtro U-MNG exc.530-550/em.590nm (Fig. 3J): larga exposición; 10 cuadros y ganancia 0dB.
- Imágenes de fluoroforos verdes FITC o Alexa Fluor 488, con el filtro U-N3001 exc.480/em.535nm (Fig. 3L): larga exposición; 10 cuadros y ganancia 10dB.

3.1.2 *Optimización de los parámetros para la captura de imágenes de fluorescencia que permitan la visualización simultánea de múltiples variantes de proteínas fluorescentes.*

La optimización de la visualización de las cuatro variantes de proteínas fluorescentes está enfocada hacia la obtención de parámetros que permitan visualizar múltiples fluoróforos simultáneamente en un microscopio, sin que las señales interfieran entre sí, para poder así distinguir las señales de cada uno.

Para analizar la fluorescencia de las diferentes variantes de proteínas fluorescentes, derivadas de la proteína fluorescente verde, se utilizaron cepas de *E. coli* DH5 α , transformadas con un vector para la expresión del gen para ECFP, proteína fluorescente cian, o alternativamente los genes para EGFP, EYFP o DsRed2, proteínas fluorescentes verde, amarilla y roja respectivamente. En la Figura 4 se muestra la fluorescencia emitida por cada cepa al excitarse con los varios filtros disponibles en el laboratorio. La fluorescencia de cada proteína analizada se puede detectar claramente en el correspondiente, por ejemplo, con el filtro verde (exc.480/em.535nm) se puede identificar claramente la fluorescencia de EGFP. Las cuatro proteínas analizadas, presentan fluorescencia de alta intensidad, bien definida en puntos que colocalizan con las bacterias en microscopía de transmisión (datos no mostrados).

Sin embargo, es posible ver que la fluorescencia de EGFP e EYFP se puede detectar utilizando otros filtros, es decir, presentan filtración de su fluorescencia a otros canales, mientras la fluorescencia de ECFP y DsRed2 es específica para los filtros cian (exc.436/em.480nm) y rojo (exc.530-550/em.590nm) respectivamente. La fluorescencia de EGFP es la menos específica, ya que su señal se puede detectar en todos los canales

analizados, siendo de mayor intensidad con el filtro verde (exc.480/em.535nm) y reduciéndose en los otros.

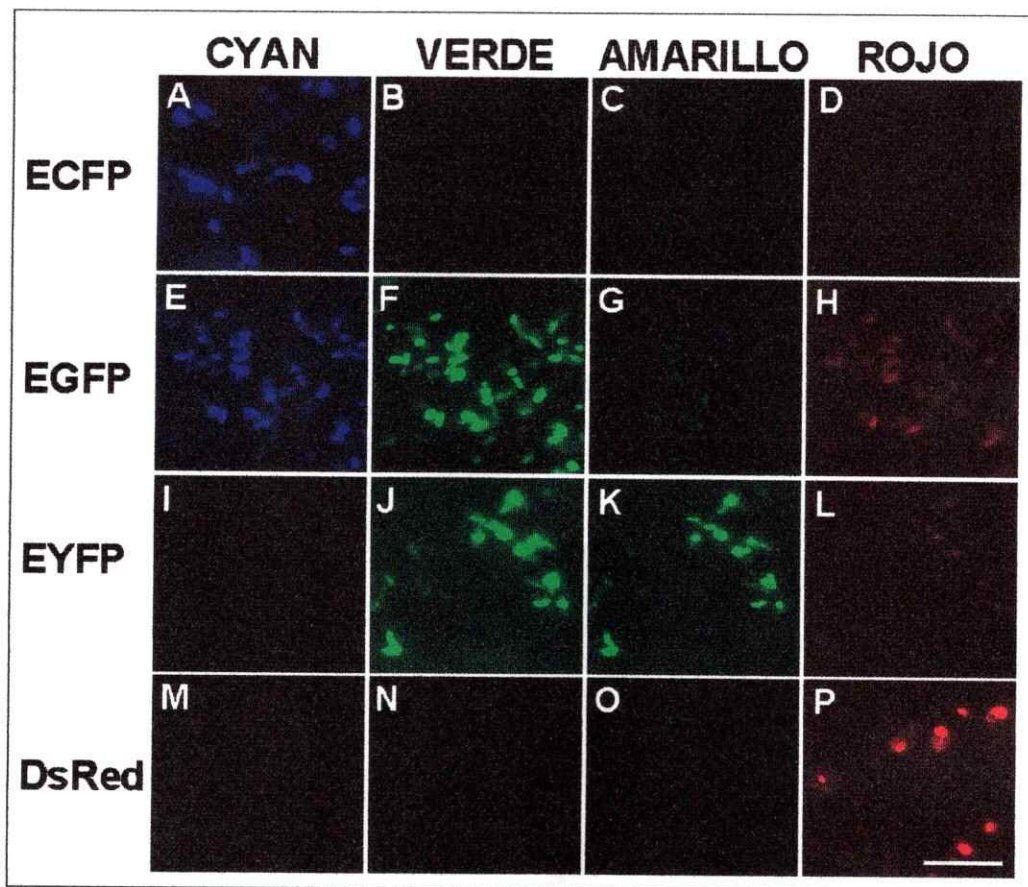


Figura 4: Análisis de la fluorescencia de proteínas fluorescentes. Se analizó el comportamiento de la fluorescencia de cuatro variedades de proteínas fluorescentes, cyan (ECFP), verde (EGFP), amarilla (EYFP) y roja (DsRed2) en los filtros del microscopio de epifluorescencia del laboratorio, para lo cual se analizaron por microscopía de epifluorescencia bacterias *E. coli* DH5 α que expresan **A-D**) la proteína ECFP, **E-H**) la proteína EGFP, **I-L**) la proteína EYFP, **M-P**) la proteína DsRed2, y se tomaron imágenes con los siguientes filtros: Cyan: exc. D436/20x; em. D480/40m; Verde: exc. D480/30x; em. D535/40m; Amarillo: exc. D510/20x; em. D560/40m; Rojo: exc. BP 530-550; em. BA 590. Los parámetros de la cámara de vídeo utilizados para la captura de imágenes fueron específicos para cada proteína: ECFP: larga exposición, 20 cuadros; ganancia 14; EGFP: larga exposición, 40 cuadros; ganancia 20; EYFP: larga exposición, 40 cuadros; ganancia 20; DsRed2: larga exposición, 40 cuadros; ganancia 10. Barra 10 μ m.

La fluorescencia de EYFP se filtra al canal verde (exc.480/em.535nm), siendo las señales captadas en los dos canales de igual intensidad. Este fenómeno de filtración puede interferir en ensayos en los que se pretenda hacer marcación de múltiples elementos en una célula utilizando las diferentes variantes de proteína fluorescente, ya que se pueden confundir las señales de una proteínas con la filtración de otra en ese canal.

Como ya se ha explicado para el caso de la autofluorescencia de los cloroplastos, es posible disminuir la filtración de la fluorescencia de un canal hacia el vecino ajustando los parámetros de la cámara de vídeo para la captura de imágenes. En la Figura 5 se muestran los resultados obtenidos con esta estrategia para el caso de las proteínas fluorescentes verde y amarilla (EGFP y EYFP, respectivamente). Se redujo considerablemente la fluorescencia en los canales vecinos para el caso de EGFP, optimizamos los parámetros para la captura de imágenes de EGFP de manera que la filtración no debería interferir en ensayos de marcación múltiple (Figura 5A-D). Para EYFP (Figura 5E-H) la filtración al canal verde (exc.480/em.535nm) es de tan alta intensidad que no es posible reducirla sin disminuir significativamente la fluorescencia en el canal amarillo (exc.510/em.560nm), por lo tanto no es óptimo hacer marcación múltiple utilizando EYFP y EGFP, puesto que la fluorescencia en el canal verde será una combinación de la fluorescencia de EGFP y de la filtración de EYFP al canal verde.

Es por lo tanto posible utilizar las diferentes variantes de proteínas fluorescentes para marcar simultáneamente varios elementos en una célula, sin embargo, es necesario ser cauteloso en la elección de las combinaciones a utilizar, por ejemplo, ECFP-EYFP-DsRed2 se pueden combinar sin problemas, en cuanto la fluorescencia de cada proteína

no interfiere con las otras. La combinación ECFP-EGFP-DsRed2 también se puede utilizar pero es necesario ajustar los parámetros de la cámara de vídeo al capturar las imágenes como una manera para asegurarse que la fluorescencia que se está observando, por ejemplo, en el canal cyan (exc.436/em.480nm), corresponde a la señal real de ECFP y no a la filtración de la fluorescencia de EGFP. La combinación EGFP-EYFP no es aconsejable, ya que la filtración de EYFP al canal verde (exc.480/em.535nm) es demasiado intensa.

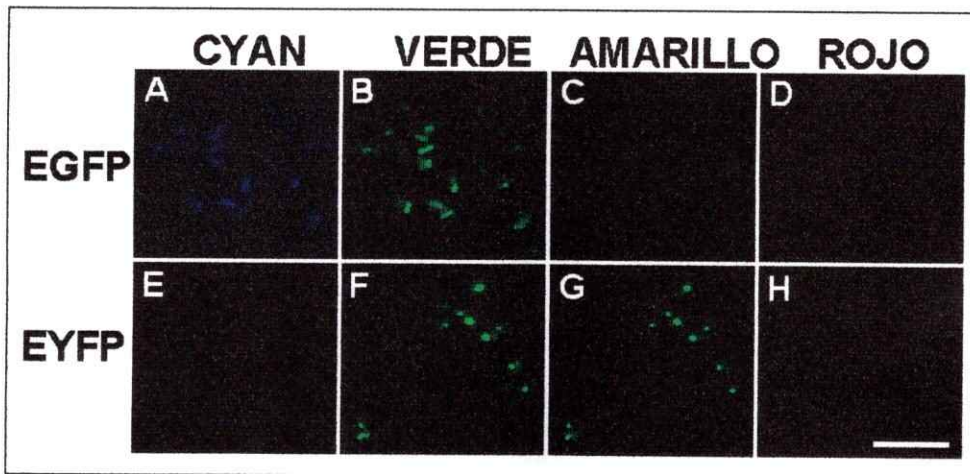


Figura 5: Optimización de los parámetros para captura de imágenes de proteínas fluorescentes en microscopio de epifluorescencia. Para optimizar los parámetros de la cámara de vídeo para tomar imágenes de fluorescencia de EGFP y EYFP, bacterias *E. coli* que expresan las proteínas fluorescentes **A-D)** verde (EGFP) y **E-H)** amarilla (EYFP), se analizaron por microscopía de epifluorescencia utilizando los filtros: Cyan: exc. D436/20x; em. D480/40m; Verde: exc. D480/30x; em. D535/40m; Amarillo: exc. D510/20x; em. D560/40m; Rojo: exc. BP 530-550; em. BA 590, y se modificaron los parámetros de la cámara de vídeo para la captura imágenes de manera de minimizar la filtración de la fluorescencia a los canales vecinos. Los parámetros utilizados para la captura de imágenes fueron: **A-D)** EGFP, larga exposición, 40 cuadros; ganancia 10, **E-H)** EYFP, larga exposición, 20 cuadros; ganancia 14. Barra 10 μ m.

3.2 Caracterización de la interacción “in vitro” entre actina y cloroplastos.

Numerosos antecedentes ya mencionados, asocian el movimiento de cloroplastos con el citoesqueleto de actina, y correlacionan espacialmente estos elementos en células fijadas. Para analizar si existe interacción entre cloroplastos y actina, se diseñó un ensayo *in vitro*, en el cual se hizo polimerizar actina purificada en presencia de cloroplastos. Resultados preliminares indican que cloroplastos aislados son capaces de unir filamentos de actina, sin embargo, es necesario caracterizar esta asociación y estudiar su especificidad.

3.2.1 Purificación de actina y su polimerización “in vitro”.

Como resultado de la purificación se obtuvo un volumen total de 2ml a una concentración de 2,77mg/ml, con un total de 5,54mg de proteína purificada. Para analizar la pureza de la proteína se cargaron 200ng en un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalantes (SDS-PAGE). La proteína se encuentra pura, sin contaminantes, como pudimos observar por la tinción del gel con azul de Coomassie (Figura 6A) y el tamaño de 43kDa corresponde al esperado (Bray y Thomas, 1975). La proteína presenta actividad, en cuanto es capaz de polimerizar en un tampón que contiene ATP y faloidina Alexa Fluor 488, la faloidina ha sido descrita como un agente estabilizador de los filamentos de actina (Small y cols., 1999), al encontrarse acoplada al fluoróforo Alexa Fluor 488 nos permite la visualización de los filamentos de actina en el microscopio de fluorescencia. Luego de dos horas de polimerización a 4°C, encontramos filamentos de actina gruesos y largos, que adquieren diferentes patrones, ya

sea filamentos largos y rectos o bien filamentos curvos que presentan ramificaciones más finas (Figura 6B-C).

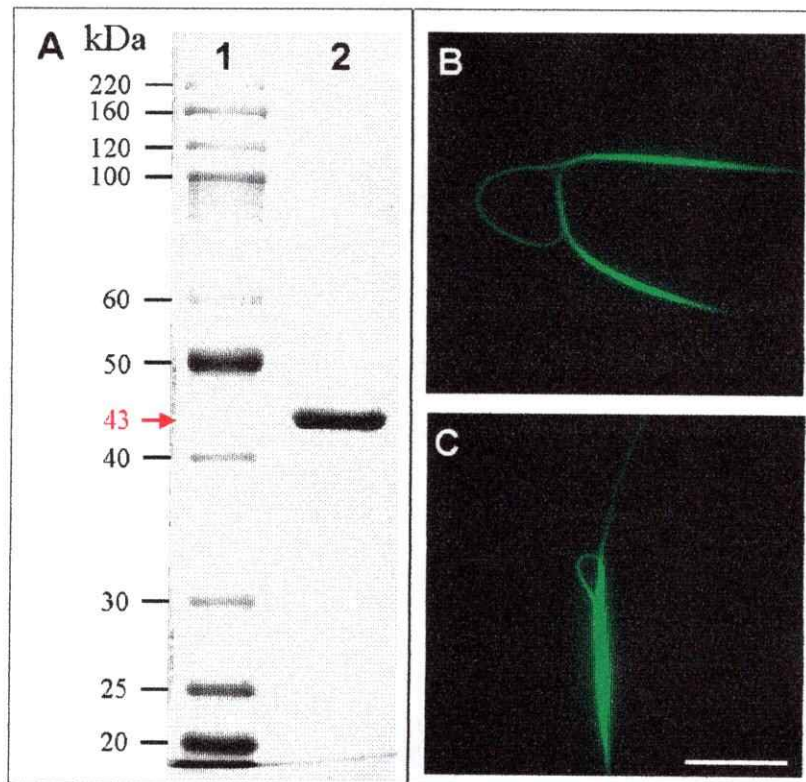


Figura 6: Electroforesis y ensayos de actividad de actina de pollo purificada. A) La pureza de la proteína y su tamaño se verificaron en gel de poliacrilamida SDS-PAGE al 10% teñido con azul de Coomassie. **Carril 1:** marcador de tamaño molecular. **Carril 2:** 200ng de actina purificada, el tamaño de 43kDa corresponde con el tamaño descrito. **B y C)** La actividad de la proteína se examinó por ensayos de polimerización y posterior visualización de los filamentos por microscopía de epifluorescencia: 0,2 μ g de actina purificada se incubaron por 2h a 4°C en tampón de polimerización (ver materiales y métodos para detalles) en presencia de faloidina Alexa Fluor 488 (verde), la que une y estabiliza los filamentos de actina. Barra 10 μ m.

3.2.2 Polimerización de actina en presencia de cloroplastos aislados.

Para determinar si los cloroplastos pueden interactuar físicamente con actina, cloroplastos aislados se incubaron con actina en un tampón que contiene ATP y faloidina acoplada al fluoróforo Alexa Fluor 488. Cuando incubamos cloroplastos aislados desde hojas de coliflor con actina (Figura 7A-C), observamos que los filamentos de actina polimerizan con características similares a las observadas en ausencia de los organelos. Se encuentran filamentos largos y gruesos, así como filamentos más cortos y delgados, la mayoría de los filamentos se encuentran asociados a los cloroplastos. Imágenes de fluorescencia con el filtro verde(exc.480/em.535nm) (Figura 7A) muestran que los filamentos de actina se entrecruzan y forman diferentes estructuras. La sobreposición de las imágenes de fluorescencia verde y la autofluorescencia roja de los cloroplastos (Figura 7C), indica que la fluorescencia de la actina colocaliza con la fluorescencia de los cloroplastos (Figura 7B). Los filamentos de actina rodean a los cloroplastos formando a su alrededor jaulas o cables que parecen anclarse a los cloroplastos. El $70,5\% \pm 2,9$ de los cloroplastos se asocian con actina, en el restante 29,5% no se detectan filamentos de actina asociados a ellos. Resultados obtenidos en el laboratorio, pero aún no publicados, indican que en ensayos de polimerización de actina en presencia de cloroplastos, los primeros filamentos se concentran alrededor de los cloroplastos, sugiriendo que podrían existir sitios de nucleación de polimerización de actina en los cloroplastos. Se utilizó nuestro diseño experimental para reproducir la interacción entre actina y la bacteria *E. coli*, interacción que ha sido bien descrita y ocurre durante la infección de las células epiteliales intestinales por la bacteria *E. coli* enteropatógena, la cual se sirve del citoesqueleto

celular para formar un pedestal que le permitirá moverse en su superficie (Goosney y cols., 1999), no hay que confundir esta forma de interacción con el cometa de actina que se produce durante la interacción de otros patógenos con el citoesqueleto de actina de la célula huésped. El ensayo se realizó con bacterias *E. coli* que expresan el gen de la proteína fluorescente roja, logrando reproducir esta interacción en nuestro ensayo *in vitro* (Figura 7D-F), las bacterias se disponen en forma lineal, y son rodeadas por los filamentos de actina, la interacción se produce principalmente en un costado de la bacteria formando una estructura similar al pedestal de actina.

Con el fin de analizar si la asociación de cloroplastos con actina es producto de una unión inespecífica o por el contrario es una interacción mediada por elementos específicos, se incubaron microesferas fluorescentes de 4µm de diámetro (Multispeck kit M7901, Molecular Probes) con actina en el tampón de polimerización. Estos ensayos mostraron que en distintos planos focales de la muestra, no parece haber interacción alguna entre las microesferas fluorescentes y los filamentos de actina (Figura 7G-H). Por lo tanto, la asociación de los filamentos de actina con los cloroplastos no es producto de un encuentro azaroso entre ellos, sugiriendo que los cloroplastos interaccionarían con actina de modo específico.

Cuando se incubaron los cloroplastos aislados en el tampón de polimerización en presencia de faloidina Alexa Fluor 488, pero en ausencia de actina, no se observaron filamentos asociados a los cloroplastos (Figura 7J-K), sugiriendo que los cloroplastos aislados no presentan restos del citoesqueleto de actina de la planta asociados a ellos.

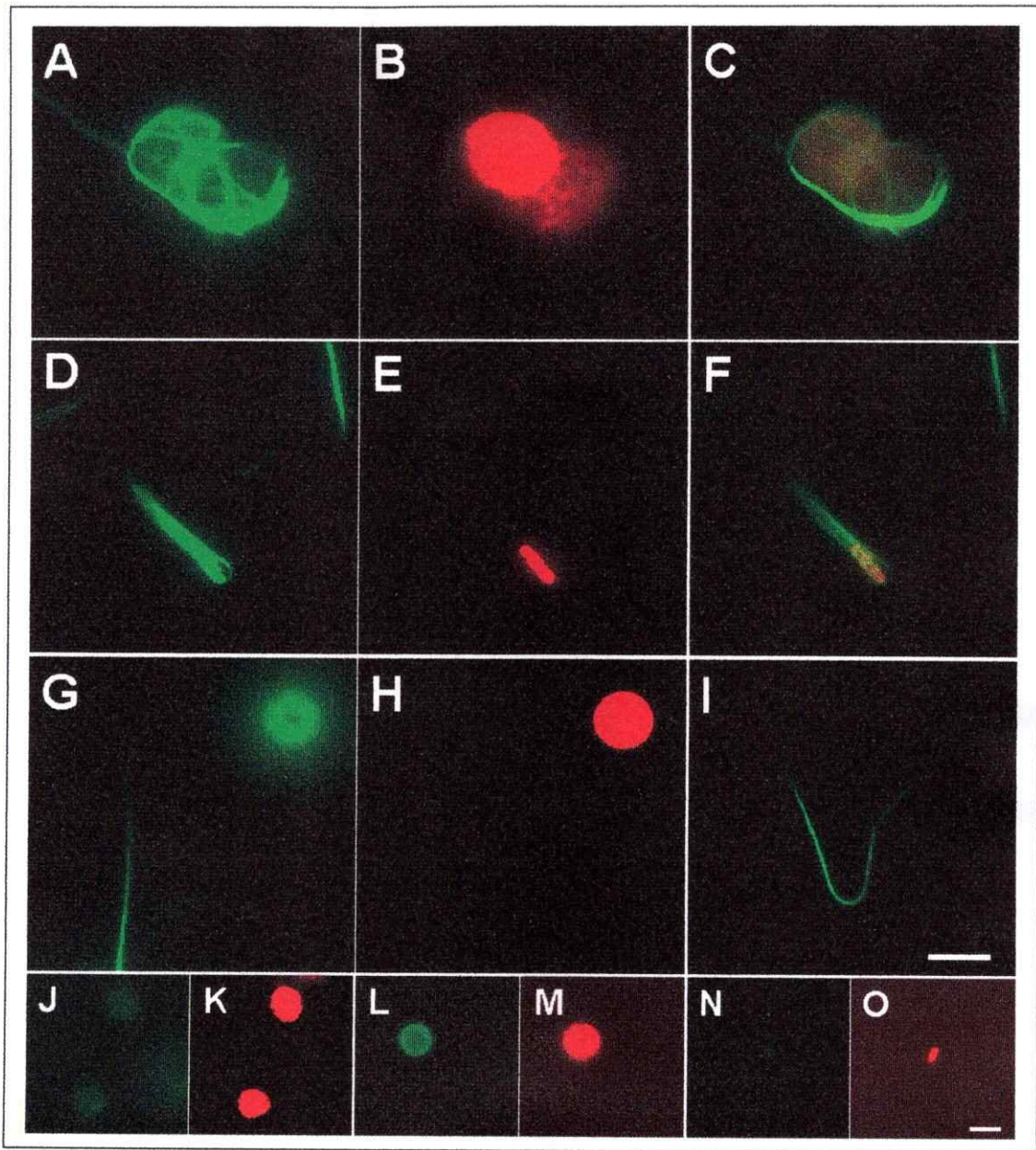


Figura 7: Interacción *in vitro* entre cloroplastos y actina. La actina purificada desde polvo cetónico fue polimerizada *in vitro* en presencia de ATP y faloidina acoplada a Alexa Fluor 488 permitiéndonos la visualización por microscopía de epifluorescencia de los filamentos de actina (en verde). A-C) Filamentos de actina polimerizados en presencia de cloroplastos aislados. A) Filamentos de actina

Para descartar la presencia de G-actina de la planta asociada a los cloroplastos aislados, se incubaron los cloroplastos por 30 min en tampón RM en presencia de "DNasa I" conjugada al fluoroforo Alexa Fluor 488 (Molecular Probes), molécula que se une a G-actina (Hitchcock, 1980). No se detectó actina globular asociada a los organelos, producto de problemas técnicos al momento de realizar el ensayo, no se dispone de material visual para mostrar en este trabajo. Tampoco las microesferas fluorescentes (Figura 7L-M) ni las bacterias (Figura 7N-O), cuando se incubaron en el tampón de polimerización en ausencia de actina, mostraron tener filamentos de actina o estructuras semejantes asociadas a ellas.

3.3 *Análisis por inmunolocalización de la asociación de actina, proteínas relacionadas a actina y miosinas con cloroplastos aislados.*

3.3.1 *Inmunolocalización en cloroplastos aislados.*

Existen numerosas proteínas que se asocian con el citoesqueleto de actina, ya sea porque se unen a actina o unen entre sí filamentos de actina, como por ejemplo la profilina y la filamina. Además, existe una familia de proteínas denominadas "Arp", proteínas relacionadas a actina (*Actin related proteins*) que se caracterizan por tener entre 20 y 60% de identidad aminoacídica con actinas convencionales. Las Arp más estudiadas son Arp2 y Arp3, que forman parte del complejo Arp2/3 y participan en la polimerización de actina, otras Arp participan en la estructura de la cromatina y otras tienen función aún desconocida (Goodson y Hawse, 2002). En el genoma de *Arabidopsis thaliana* existen 8 genes con homología a Arp de animales, incluyendo Arp2 y Arp3, sin embargo, hasta el momento, sólo se han realizado estudios de su expresión y aún se desconocen sus funciones (Klahre y Chua, 1999; McKinney y cols., 2002). Ha sido descrito que Arp2 se encuentra asociada a la membrana de mitocondrias de levaduras, apoyando que su movimiento sea regulado por el complejo Arp2/3 (Boldogh y cols., 2001), por lo que resulta interesante estudiar la presencia de proteínas relacionadas a actina (Arp's) en los cloroplastos aislados, las que pueden ser, junto con la actina y la miosina, los mejores candidatos para participar en la asociación entre cloroplastos y filamentos de actina descrita.

Resultados obtenidos en el laboratorio, aún no publicados, indican que anticuerpos policlonales contra actina y un anticuerpo monoclonal contra miosina de

tipo II, reconocen más de una banda en Western blot realizados con extractos de proteínas totales de cloroplastos, sugiriendo que actina o Arp y miosina podrían encontrarse asociadas a los cloroplastos. Para determinar si las proteínas reconocidas en los Western blot están asociadas a los cloroplastos o se encuentran como contaminantes en el extracto de cloroplastos, y por ende en los extractos proteícos, se diseñaron ensayos de inmunolocalización en cloroplastos aislados.

La presencia de actina o Arp asociadas a los cloroplastos, se estudió utilizando anticuerpos contra actina. Se utilizaron dos anticuerpos, ambos policlonales, de manera que nos permitieran reconocer proteínas similares a actina, como las Arp. Uno es un anticuerpo policlonal contra actina de pollo, el otro es un anticuerpo dirigido contra un péptido cuya secuencia corresponde a los once aminoácidos del carboxilo terminal de la actina, denominado anti-actina CII.

El anticuerpo policlonal contra actina de pollo mostró señal positiva en cloroplastos aislados (Figura 8A-C), encontrándose una fluorescencia verde intensa, superior a la fluorescencia basal de los cloroplastos. La fluorescencia es producto del reconocimiento específico del anticuerpo primario, en cuanto cloroplastos incubados únicamente con el anticuerpo secundario (Figura 8A recuadro pequeño) muestran fluorescencia de niveles muy bajos, correspondiente a la autofluorescencia de los cloroplastos. Los cloroplastos aparecen intactos, como se puede visualizar por la nítida autofluorescencia roja, de contornos bien definidos (Figura 8B). La señal verde del anticuerpo colocaliza con la fluorescencia roja de los cloroplastos y se encuentra en forma homogénea sobre la superficie del cloroplasto (Figura 8C). En algunos cloroplastos es posible distinguir un patrón punteado, ocasionalmente se encuentran

puntos más fluorescentes en el borde de los organelos, formando una corona a su alrededor.

El anticuerpo anti-actina C11 también reconoce a antígenos en los cloroplastos aislados, la señal obtenida con este anticuerpo es muy intensa y se identifican claramente puntos fluorescentes que colocalizan con la autofluorescencia roja de los cloroplastos, pero también se encuentran cloroplastos que presentan una señal muy fuerte homogéneamente distribuida en la superficie (Figura 8D-F). La fluorescencia es de niveles muy superiores a los observados cuando se incubaron los cloroplastos únicamente con el segundo anticuerpo (Figura 8D recuadro pequeño).

La presencia de miosinas asociadas a los cloroplastos aislados se analizó utilizando un anticuerpo monoclonal contra miosina de tipo II, la fluorescencia del anticuerpo colocaliza con la autofluorescencia de los cloroplastos y el patrón de fluorescencia es homogéneo (Figura 8G-I), presentando una señal de menor intensidad que los anticuerpos anti-actina, sin embargo, aún siendo bajos los niveles de fluorescencia, éstos son mayores que los del control del segundo anticuerpo (Figura 8G recuadro pequeño). No se identificaron puntos fluorescentes en la superficie de los organelos.

Como control para verificar la integridad de los cloroplastos, se trataron los cloroplastos con un anticuerpo anti-CAB, anticuerpo policlonal contra la proteína "Chlorophyll A/B binding protein", que se encuentra presente en todos los cloroplastos y se localiza en la membrana del tilacoide. Su ubicación nos permitirá determinar si los cloroplastos se encuentran rotos o permeables al anticuerpo. Los ensayos de inmunolocalización con el anticuerpo anti-CAB muestran señal positiva, la fluorescencia

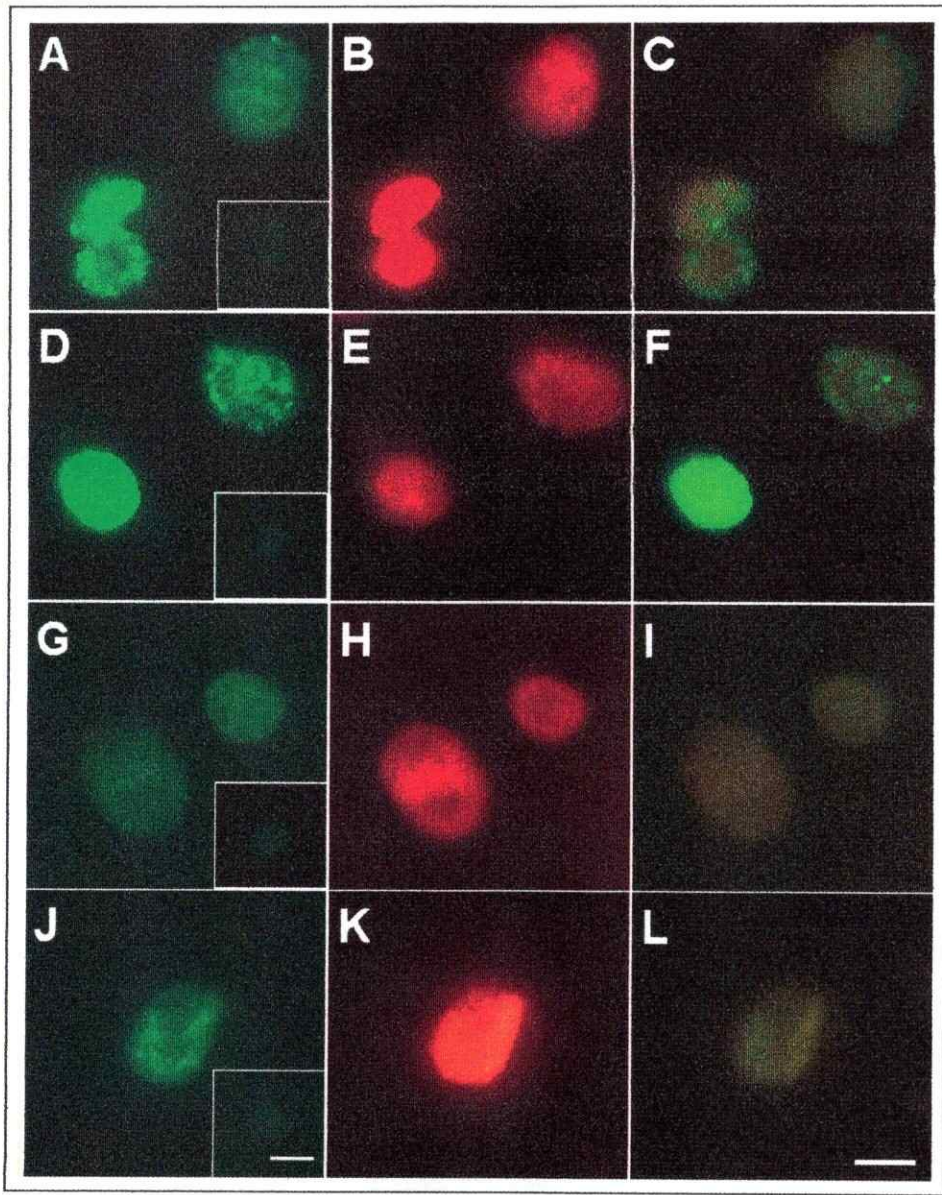


Figura 8: Proteínas relacionadas a actina y miosina se asocian a cloroplastos aislados desde hojas de coliflor. Cloroplastos aislados fueron incubados con anticuerpos anti-actina y anti-miosina para determinar la presencia de proteínas relacionadas a actina y miosina asociadas a los cloroplastos, se utilizaron los anticuerpos: **A-C)** anti-actina de pollo, **D-F)** anti-actina C11 y **G-I)** anti-miosina MY32, **J-L)** como control se utilizó el anticuerpo anti-CAB que reconoce una proteína de la membrana del tilacoide. Los cloroplastos se visualizaron en el microscopio de epifluorescencia utilizando anticuerpos secundarios acoplados a FITC o Alexa Fluor 488 (en verde), la señal de los anticuerpos se comparó con la autofluorescencia de los cloroplastos (en rojo), para comprobar su colocalización se hizo la sobreposición de las imágenes verdes y rojas correspondientes (**C,F,I,L**). En los recuadros pequeños se muestran imágenes de cloroplastos incubados únicamente con el anticuerpo secundario correspondiente. Barra de tamaño: 5 μ m.

verde nuevamente correlaciona con la autofluorescencia de los cloroplastos y el nivel de fluorescencia es similar al observado con el anticuerpo anti-miosina (Figura 8J-L), sugiriendo que los cloroplastos son permeables al anticuerpo. Es importante mencionar que los cloroplastos no fueron permeabilizados con detergente y, por lo tanto, se permeabilizaron durante el proceso de aislamiento.

3.3.1.1 Análisis de poblaciones de cloroplastos.

Los ensayos de inmunolocalización muestran señal positiva con todos los anticuerpos ensayados, sin embargo, no todos los cloroplastos reaccionan positivamente a los anticuerpos. La presencia de actina, o Arp, y miosinas asociadas a los cloroplastos aislados nos hizo pensar que efectivamente estas proteínas participen en la interacción con actina, interacción observada sólo en una población de cloroplastos (aproximadamente un 70%). Se cuantificaron los ensayos de inmunolocalización, es decir se contaron cuántos cloroplastos son reconocidos por cada anticuerpo, para verificar si existe correlación entre la población de cloroplastos que interacciona con actina y la presencia de actina y miosina en los cloroplastos.

Para realizar ensayos cuantitativos de la presencia de proteínas reconocidas por los anticuerpos en nuestros cloroplastos es necesario trabajar a una concentración de saturación de los anticuerpos, se realizó, por lo tanto, una curva de saturación para cada anticuerpo, anti-actina de pollo, anti-actina C11 y anti-miosina MY32, utilizando $1 \cdot 10^7$ cloroplastos en cada ensayo. Se analizaron las diluciones 1:10, 1:20, y 1:100 para cada anticuerpo. Como control se utilizó el anticuerpo anti-CAB, por lo que también desarrollamos una curva de saturación para este anticuerpo analizando las diluciones antes descritas.

Los resultados (Figura 9) indican que el número de cloroplastos que resultan positivos con cada anticuerpo es variable. El anticuerpo anti-actina de pollo muestra variabilidad entre las diluciones 1:10 y 1:20, sin embargo, para la dilución 1:100 el gran error estándar determina que la variación no sea significativa respecto a las diluciones menores. El anticuerpo anti-actina C11, presenta una fuerte disminución de la señal al diluir el anticuerpo hasta 1:20, el número de cloroplastos reconocidos por el anticuerpo se mantiene constante a mayor dilución. Sin embargo, hay que considerar la gran variación de los resultados obtenidos, lo que se refleja en el error estándar. El anticuerpo anti-miosina MY32 muestra una señal que se reduce levemente al aumentar la dilución, sin embargo, al analizar el error estándar de cada barra, las variaciones son despreciables. El anticuerpo anti-CAB presenta una señal constante a las tres diluciones analizadas, siendo no significativas las variaciones observadas.

Estos resultados indican que aparentemente estos anticuerpos están reconociendo poblaciones diferentes en cuanto los porcentajes de cloroplastos positivos obtenidos para cada anticuerpo son diferentes entre sí, además el anticuerpo anti-actina C11 es el más susceptible a los cambios en su concentración, siendo la dilución 1:10 la que muestra mayor señal en los cloroplastos aislados. Para confirmar la sensibilidad de los anticuerpos anti-actina de pollo y anti-actina C11, a la dilución, realizamos un dot-blot utilizando cantidades variables de actina de pollo purificada y tres diluciones del anticuerpo (datos no mostrados). Los resultados reafirman los obtenidos en las curvas de saturación, sugiriendo que para el anticuerpo anti-actina C11 es conveniente trabajar a la mayor concentración posible debido a que su sensibilidad se ve fuertemente afectada por la dilución a usar. Para los demás anticuerpos probados las variaciones dependientes

de la concentración no son significativas, por lo que se puede considerar la dilución 1:20 como concentración de saturación.

Para realizar un análisis cuantitativo de los resultados obtenidos con los diferentes anticuerpos, comparamos los resultados obtenidos con las diluciones 1:10 para el anticuerpo anti-miosina y 1:20 para los demás anticuerpos (barras señaladas con estrella en Figura 9). El anticuerpo policlonal contra actina de pollo a dilución 1:20 es capaz de reconocer el $69,6\% \pm 2,8$ de los cloroplastos, este valor corresponde al promedio de quince experimentos independientes, el error estándar es pequeño, por lo que consideramos que los resultados son consistentes. El porcentaje de cloroplastos reconocidos por el anticuerpo anti-actina C11 a dilución 1:10 es de $61,3\% \pm 12,7$, promedio de un total de seis experimentos independientes. Los resultados muestran gran variabilidad, la que se ve reflejada en el error estándar obtenido para estos resultados. Cabe destacar que los valores oscilan entre extremos de 97% y 23,7%. El anticuerpo monoclonal contra miosina, en dilución 1:20, reconoce el $36,3\% \pm 3,7$ de los cloroplastos valor obtenido del promedio de diez experimentos independientes. El porcentaje de cloroplastos reconocido por este anticuerpo se mantuvo relativamente constante en los diez experimentos que se realizaron, obteniendo un error estándar bajo. El anticuerpo anti-CAB reconoce el $49,8\% \pm 9,2$ de los cloroplastos, cuando utilizado en dilución 1:20, promedio de cinco experimentos independientes. Este resultado nos indica que sólo una porción de los cloroplastos aislados, aproximadamente la mitad de ellos, se encuentra permeable al anticuerpo, en cuanto todos los cloroplastos contienen la proteína CAB en sus membranas tilacoidales.

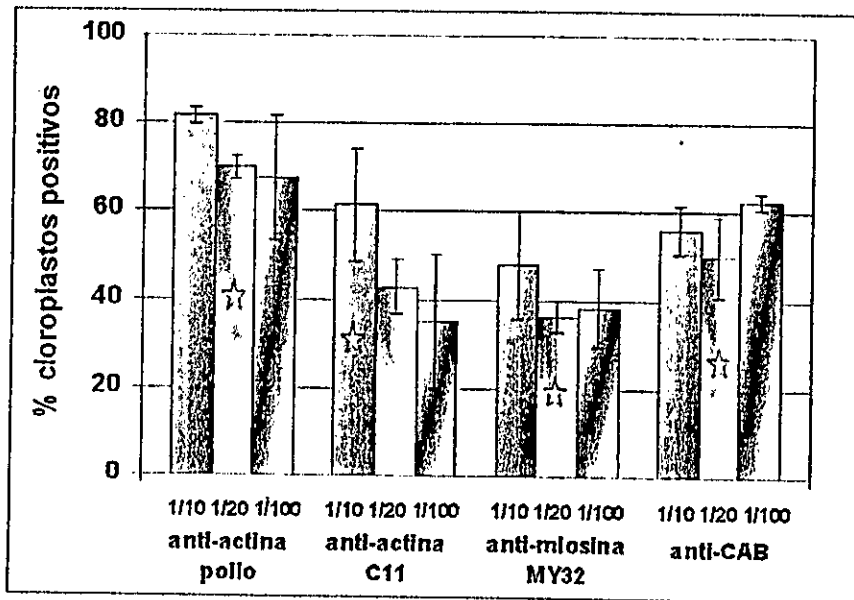


Figura 9: Análisis poblacional de cloroplastos aislados según la presencia de actina o proteínas relacionadas a actina y miosina. La dilución de los anticuerpos en la cual se obtiene la máxima señal asociada a cloroplastos aislados (saturación) se determinó cuantificando en el microscopio los cloroplastos positivos luego de ser incubados toda la noche a 4°C con los anticuerpos anti-actina de pollo, anti-actina C11, anti-miosina o anti-CAB a tres diluciones: 1:10, 1:20, 1:100, y luego con el anticuerpo secundario correspondiente acoplado a fluoróforo en dilución 1:100. La concentración que se indica con estrella se consideró para la comparación y análisis de los resultados. El porcentaje de cloroplastos positivos se calculó contando la porción de cloroplastos que reaccionó positivamente con los anticuerpos de un total de 250 cloroplastos por ensayo. Se muestra el promedio de mínimo tres ensayos y su error estándar.

Los resultados aquí presentados, muestran que tanto la miosina como la actina o Arp, no se encuentran presentes en todos los cloroplastos, y que existen variaciones en las proteínas que se asocian a las diferentes poblaciones de cloroplastos. Es importante destacar que los anticuerpos anti-actina muestran señal en un 60-70% de los cloroplastos, valor cercano al 70% de cloroplastos que se asocian con actina en los ensayos de polimerización *in vitro*, existe por lo tanto una correlación entre estos datos, y sugieren la participación de estas proteínas en la interacción de cloroplastos con actina.

3.4 Participación de proteínas relacionadas con actina y miosinas en la interacción entre cloroplastos y actina "in vitro".

3.4.1 *Inhibición de la interacción de cloroplastos con actina.*

Los resultados obtenidos en el análisis de poblaciones de cloroplastos en base a la presencia de proteínas relacionadas a actina y/o miosinas, sugieren que las proteínas relacionadas a actina (Arp) podrían participar en la interacción entre cloroplastos y actina, sin embargo, es necesario obtener resultados más consistentes para probar su participación. Para ello se diseñó un ensayo en el cual los cloroplastos fueron incubados con el primer anticuerpo y luego incubados con actina en tampón de polimerización, esperando que la interacción se vea bloqueada si es mediada por la proteína que es reconocida por el anticuerpo. Para cada ensayo se tomó una alícuota de los cloroplastos incubados con el anticuerpo primario y se incubó paralelamente con el anticuerpo secundario, como un control, para asegurar que el anticuerpo primario esté unido a los cloroplastos en las muestras incubadas con actina.

Los cloroplastos fueron tratados separadamente con los anticuerpos anti-actina de pollo, anti-actina C11 y anti-miosina MY32, además se usó como control anti-CAB. Las concentraciones de anticuerpo utilizadas fueron 1:20 para todos los anticuerpos.

En las muestras tratadas con los anticuerpos se observa una reducción en la cantidad de cloroplastos asociados con filamentos de actina. Cloroplastos no asociados con filamentos de actina se encuentran ocasionalmente en diferentes planos focales (Figura 10B-C). En los cloroplastos que mantienen la capacidad de unirse a F-actina

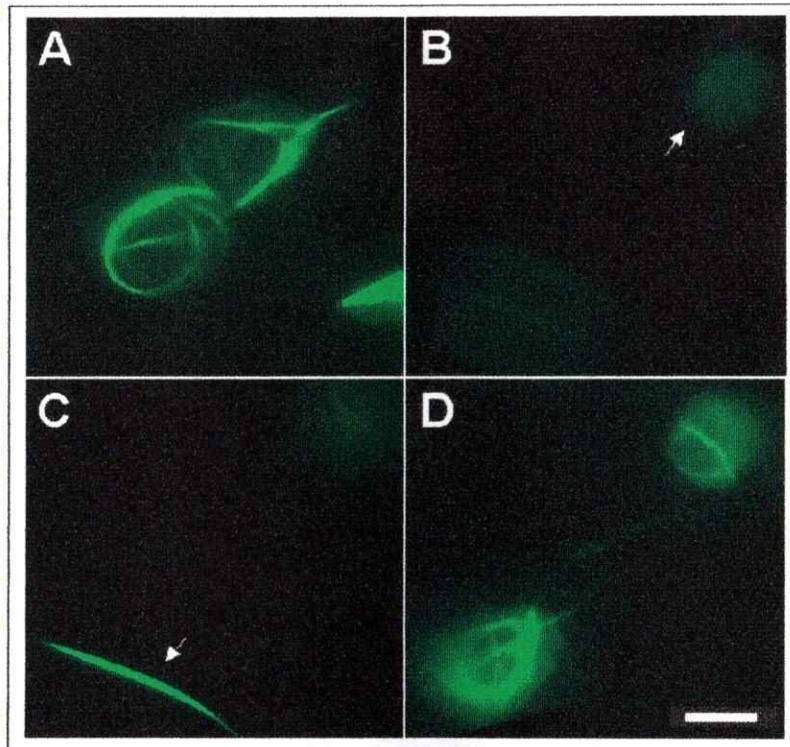


Figura 10: Proteínas relacionadas a actina participan en la interacción *in vitro* entre cloroplastos y actina. **A)** Interacción que se produce *in vitro* entre filamentos de actina y cloroplastos tras incubarlos con actina en tampón de polimerización en presencia de ATP y faloidina acoplada a Alexa Fluor 488. **B-C)** Inhibición de la interacción entre cloroplastos y actina al utilizar cloroplastos incubados previamente con el anticuerpo anti-actina de pollo (dilución 1:20) y luego con actina en tampón de polimerización y faloidina Alexa Fluor 488, filamentos de actina y cloroplastos se encuentran en planos focales diferentes: **B)** cloroplastos enfocados, indicado por la flecha, **C)** filamentos de actina enfocados, indicados por la flecha. **D)** La preincubación de cloroplastos con un anticuerpo anti-CAB, que reconoce la proteína CAB localizada en la membrana del tilacoide, no afecta la interacción entre cloroplastos y actina. Barra de tamaño: 5µm.

encontramos filamentos similares a los observados en cloroplastos sin tratar (Figura 10A). Como se esperaba, cloroplastos tratados con el anticuerpo anti-CAB mantienen la capacidad de unirse a F-actina (Figura 10D), esto porque, al encontrarse CAB en la membrana del tilacoide, no interferiría en la interacción con actina.

Para analizar los resultados obtenidos es necesario cuantificar los cloroplastos capaces de interaccionar con actina luego de ser incubados con los anticuerpos, los resultados se muestran en forma resumida en la Figura 11A. El anticuerpo anti-actina de pollo a dilución 1:20 es capaz de reducir a $47,3\% \pm 4,9$ los cloroplastos que se asocian con actina, este número corresponde al promedio de once ensayos independientes. En los ensayos con el anticuerpo anti-actina C11 se observa que el $63\% \pm 10,6$ de los cloroplastos son capaces de unirse a actina. Estos ensayos fueron repetidos nueve veces, determinamos que existe gran variabilidad en estos resultados, lo que se ve reflejado en el elevado valor del error estándar. El anticuerpo anti-miosina MY32 tampoco muestra una reducción del porcentaje de cloroplastos capaces de asociarse con actina, siendo el promedio de cinco ensayos: $71,7\% \pm 17,8$, nuevamente estos valores se asocian a un error estándar alto.

En la Tabla 1 se muestran los valores obtenidos para cada ensayo independiente utilizando el anticuerpo anti-actina C11 y el anticuerpo anti-miosina MY32, ambos en dilución 1:20, como se puede observar el elevado error estándar es producto de la variabilidad de los resultados, habiéndose obtenido valores extremos (indicados con el símbolo (*)) muy elevados y muy pequeños.

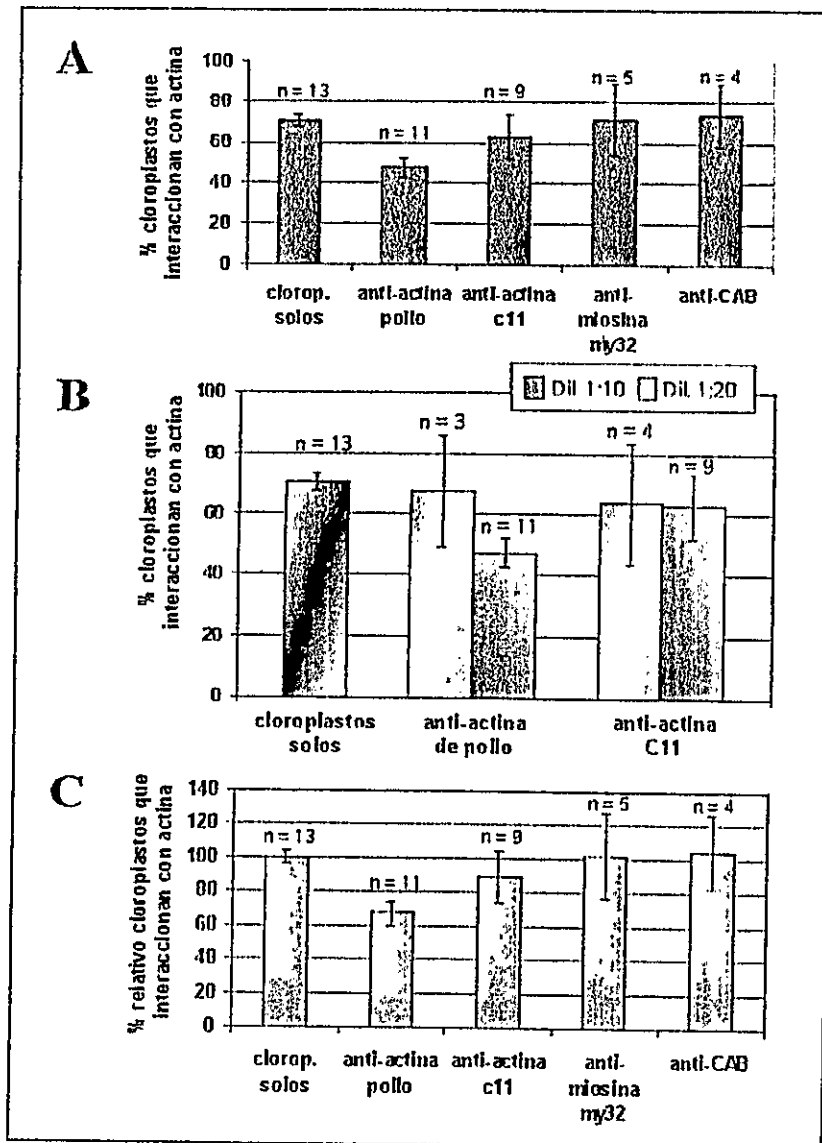


Figura 11: Efecto de anticuerpos sobre la interacción entre cloroplastos y actina. Cloroplastos aislados se incubaron toda la noche a 4°C con actina en un tampón que contiene ATP y faloidina Alexa Fluor 488, para cuantificar su capacidad de interaccionar con actina se contaron en el microscopio los cloroplastos que interaccionan con actina de un total de 250 cloroplastos por ensayo, se indica el promedio de n ensayos independientes y su error estándar. **A)** Efecto de anticuerpos sobre la interacción entre cloroplastos y actina, se utilizaron cloroplastos preincubados con anticuerpos primarios: anti-actina de pollo, anti-actina C11, anti-miosina MY32, como control negativo se usó anti-CAB, que reconoce una proteína de la membrana tilacoidal, todos los anticuerpos se utilizaron a dilución 1:20, como referencia se muestra el valor para cloroplastos sin tratar con anticuerpos. **B)** Efecto de la dilución de anticuerpos anti-actina de pollo y anti-actina C11 sobre la inhibición de la interacción entre cloroplastos y actina, comparación de los valores obtenidos con la dilución 1:20 y con la dilución 1:10, se compara con los cloroplastos sin tratar con anticuerpos. **C)** Efecto inhibitorio de los anticuerpos sobre la interacción de cloroplastos con actina expresado como porcentaje relativo de cloroplastos que interaccionan con actina, es decir cuantos cloroplastos interaccionan con actina cuando no sufren tratamiento alguno.

Para verificar si la reducción en la capacidad de los cloroplastos para unirse a F-actina, no es una inhibición inespecífica, se trataron los cloroplastos con el anticuerpo anti-CAB y luego se sometieron al ensayo de polimerización de actina, obteniendo un $73,5\% \pm 15,4$ de los cloroplastos que mantienen la capacidad de asociarse con los filamentos de actina, valor obtenido del promedio de cuatro ensayos independientes (Figura 11A).

Tabla 1: Porcentaje de cloroplastos que interactúan con actina en ensayos de inhibición de la interacción entre cloroplastos y actina utilizando los anticuerpos anti-actina C11 y anti-miosina MY32. Cloroplastos aislados previamente incubados con el anticuerpo anti-actina C11 (dil. 1:20) o anti-miosina MY32 (dil. 1:20) fueron incubados con actina por toda la noche en tampón de polimerización en presencia de faloidina Alexa Fluor 488, y se observaron por microscopía. Se contaron aproximadamente 250 cloroplastos por ensayo y se determinó el porcentaje que interactúa con actina, cada valor corresponde a un ensayo independiente. Se indica el promedio para los ensayos realizados con cada anticuerpo y el error estándar. Los valores extremos se indican con (*).

Anticuerpos utilizados	Anti-actina C11 (1:20)	Anti-miosina MY32 (1:20)
Porcentaje de cloroplastos que interactúan con actina	72,5	2,7 (*)
	31,7	97,1
	69,8	99,1 (*)
	8,9 (*)	73,8
	88,4	85,7
	65,8	-
	32,9	-
	97,9	-
	98,8 (*)	-
Promedio	63	71,7
Error estándar	10,6	17,8

Los resultados de la curva de saturación y de sensibilidad del anticuerpo anti-actina C11 indicaron que la concentración de este anticuerpo afecta su sensibilidad. Considerando este hecho y pensando que la dilución del anticuerpo podría afectar notoriamente este ensayo, decidimos realizar el ensayo de inhibición de la interacción de cloroplastos con actina, utilizando el anticuerpo anti-actina C11 a dilución 1:10, como control también se realizó la inhibición con el anticuerpo anti-actina de pollo en dilución 1:10.

En los ensayos con el anticuerpo anti-actina C11 obtuvimos un $63,7\% \pm 19,9$ de los cloroplastos capaces de unirse a actina. Con el anticuerpo anti-actina de pollo, los cloroplastos con esta capacidad fueron $67,5\% \pm 18,6$ (Figura 11B). Estos ensayos se repitieron cuatro y tres veces respectivamente, en ambos casos los errores estándar asociados son elevados, en parte debido al bajo número de ensayos. Para facilitar la comparación con los resultados obtenidos a la dilución 1:20 se incluyeron los valores obtenidos previamente en la Figura 11B, podemos ver claramente que el anticuerpo anti-actina C11 no produce inhibición significativa en la interacción con actina a ninguna de las diluciones estudiadas. La inhibición de la interacción observada con el anticuerpo anti-actina de pollo a dilución 1:20 no es tan clara a menor dilución, sin embargo, como ya se mencionó, el error estándar asociado a la dilución 1:10 es muy alto y hace no significativa la variación, respecto a la dilución 1:20.

Considerando que solo el 70,5% de los cloroplastos interaccionan con actina en condiciones normales, podemos suponer este valor como el 100% de los cloroplastos con capacidad de unirse a actina, entonces obtenemos el “% relativo de interacción” para cada tratamiento (Figura 11C), y podemos visualizar la inhibición que produce cada

anticuerpo en la asociación de actina con cloroplastos como la disminución de este porcentaje respecto al 100%. Para este efecto utilizamos los valores obtenidos para cada anticuerpo a la dilución 1:20, puesto que el número de ensayos realizados es superior respecto a la dilución 1:10 y no se observaron diferencias significativas al variar la dilución del anticuerpo anti-actina C11.

El único anticuerpo que produce una inhibición real de la interacción entre cloroplastos y actina es el anticuerpo anti-actina de pollo, que produce una inhibición del 33%. El tratamiento con los otros anticuerpos no producen inhibición de la interacción entre cloroplastos y actina en las condiciones analizadas, hay que considerar sin embargo, el elevado error estándar asociado a estos resultados.

4 DISCUSION

Analizando el comportamiento de varias moléculas fluorescentes en el microscopio de epifluorescencia, hemos observado la importancia que tiene la elección de los fluoróforos a utilizar y el análisis del comportamiento de la molécula fluorescente de acuerdo a los filtros disponibles, ya que la fluorescencia de algunas de ellas puede visualizarse con más de un filtro, ésto debido a que su longitud de onda de excitación y la de emisión coinciden con las longitudes de excitación y de paso de más de un filtro. Un ejemplo claro de esto es la fluorescencia de EGFP, proteína de amplio rango de excitación (Clontech), que puede ser excitada por varios filtros, los que a su vez permiten el paso de su fluorescencia. Este fenómeno es frecuente cuando se tienen filtros que dejan pasar longitudes de onda cercanas entre sí y el rango de longitudes de onda de excitación y emisión del fluoróforo es más amplio que el rango de longitud de onda de excitación y paso de un filtro, por lo que la fluorescencia es detectada en el filtro siguiente. Sin embargo, en algunos casos es posible ajustar los parámetros de la cámara para capturar imágenes que permitan distinguir la señal de un fluoróforo de la señal del otro.

En el caso de la autofluorescencia de los cloroplastos y de EGFP, fuimos capaces de reducir las señales fluorescentes en los canales que no eran de nuestro interés, de manera que no interfiriera su señal con la señal que se buscaba, en el caso de los cloroplastos redujimos la autofluorescencia verde para que no interfiriera con la señal verde de las sondas o de los anticuerpos secundarios a utilizar. En el caso de las

proteínas fluorescentes determinamos que las combinaciones óptimas para realizar marcación simultánea de múltiples elementos en una célula son ECFP-EYFP-DsRed2 ó ECFP-EGFP-DsRed2 considerando siempre que existe filtración de EGFP al canal cyan.

En la caracterización de la interacción entre cloroplastos y actina observamos que los filamentos de actina forman finas estructuras alrededor de los cloroplastos aislados, indicando que estos organelos son capaces de establecer una estrecha asociación estructural con los filamentos. La ausencia de interacción entre las microesferas fluorescentes y los filamentos de actina indican que la asociación observada con los cloroplastos es específica y no es producto de un encuentro azaroso entre los filamentos y los organelos. Resulta interesante destacar que la actina en las condiciones ensayadas es capaz de polimerizar en filamentos largos, los que se observan aún en presencia de cloroplastos, sin embargo, gran cantidad de filamentos se encuentran íntimamente asociados a los organelos, lo que nos ha llevado a referirnos al fenómeno como interacción entre cloroplastos y actina, sugiriendo que los cloroplastos puedan tener en su superficie sitios de nucleación de la polimerización de actina.

Nunca antes había sido descrita una interacción entre los filamentos de actina y cloroplastos aislados, en ensayos *in vitro*, sin embargo, ha sido mostrada una cercanía entre filamentos de actina y cloroplastos en tejido fijado del alga verde *Bryopsis* (Menzel y Schliwa, 1986a) y en hojas de *Arabidopsis thaliana* criofijadas (Kandasamy y Meagher, 1999). Las estructuras encontradas en nuestro trabajo, tanto las jaulas de filamentos de actina rodeando los cloroplastos, como los filamentos que comienzan en los cloroplastos, aparecen descritos en los trabajos de Menzel y Schliwa (1986a) y

Kandasamy y Mcagher (1999), indicando una forma de interacción entre actina y cloroplastos, que es conservada en diferentes especies.

Estos resultados apoyan fuertemente la hipótesis, postulada en numerosas publicaciones, de que los cloroplastos puedan moverse vía actina, trabajos en los cuales a través del uso de drogas desestabilizadoras del citoesqueleto de actina se ha asociado el movimiento de los cloroplastos con el citoesqueleto de actina (Menzel y Schliwa, 1986b; Liebe y Menzel, 1995; Sato y cols., 1999).

La interacción con actina ocurre solamente en una porción de los cloroplastos analizados, alcanzando un 70% los cloroplastos capaces de asociarse con actina. Varias son las posibles explicaciones para tal resultado, posiblemente existan diferentes poblaciones de cloroplastos, cada una con un nivel diferente de desarrollo y que solamente una cierta población tiene la capacidad de interaccionar con actina. Es posible que nosotros estemos identificando una población que no se asocia con actina ya que se moviliza por otro mecanismo como los cloroplastos del musgo *Physcomitrella patens* que se ha descrito son capaces de moverse por diferentes mecanismos, ya sea actina o microtúbulos (Sato y cols., 2000). Otra explicación es que el sistema proteico por el cual se unen los cloroplastos a la actina pueda encontrarse inactivo, de modo que solamente los cloroplastos que necesiten moverse estén capacitados para interaccionar con actina, el restante grupo tendría estas proteínas en una conformación inactiva que no les permite la interacción.

Los resultados de la inmunofluorescencia indican que tanto actina, o alguna Arp, como miosina se encuentran asociadas a los cloroplastos. Los anticuerpos anti-actina podrían estar reconociendo proteínas relacionadas a actina como actina de la propia

planta. Es posible que estén reconociendo residuos de filamentos de actina o actina de la propia célula asociada a los cloroplastos. Sin embargo, no se detectó señal fluorescente en los cloroplastos cuando éstos fueron tratados con faloidina Alexa Fluor 488, asimismo tampoco se encontró señal en cloroplastos incubados con DNasa I Alexa Fluor 488, fluoróforo que se une a G-actina, (Hitchcock, 1980), lo que nos indicaría que al parecer no habrían filamentos de actina o actina monomérica asociada a los cloroplastos. Es importante mencionar que los anticuerpos anti-actina en western-blot con extractos de proteínas totales de cloroplastos reconocen tres bandas, entre las cuales una proteína de aproximadamente 41kDa que podría corresponder a actina de plantas (Ren y cols., 1997), sin embargo, esta proteína podría encontrarse en el interior de los cloroplastos, como las proteínas descritas en arveja (McCurdy y Williamson, 1987) y por ello no la detectamos en la superficie de los cloroplastos.

Si consideramos que los anticuerpos anti-actina podrían estar reconociendo proteínas relacionadas a actina (Arp), podemos relacionar nuestros resultados con otros modelos, como mitocondrias de levaduras, los patógenos intracelulares *Listeria monocytogenes* y *Shigella flexneri* y el virus *Vaccinia*, en los que se ha asociado su movimiento con la interacción entre actina y el complejo Arp2/3 (Mullins, 2000; Boldogh y cols., 2001; Higgs y Pollard, 2001; Skoble y cols., 2001; Welch y Mullins, 2002), el que es capaz de activar y dirigir la polimerización de los filamentos de actina (Higgs y Pollard, 2001; Mullins y cols., 2000; May, 2001; Welch y Mullins, 2002). Considerando la teoría endosimbionte, que postula un origen común de cloroplastos y mitocondrias como organismos procariontes de vida libre, es posible que los cloroplastos hayan conservado un sistema similar al complejo Arp2/3 que le permitiría

la interacción con actina. De hecho, en el laboratorio, se ha identificado en el genoma de *Arabidopsis thaliana*, genes homólogos en secuencia a seis de las siete subunidades del complejo Arp2/3, información que ha sido confirmada por Vantard y Blanchoin (2002).

La presencia de miosinas asociadas con los cloroplastos sugiere que los cloroplastos podrían movilizarse en la célula a través de un sistema motor como la miosina. Ya anteriormente había sido descrita una miosina que colocaliza con los cloroplastos de células intactas del alga verde *Ernodesmis verticillata* (La Claire II, 1991), Liebe y Menzel en 1995 también detectaron señal positiva con anticuerpos monoclonales contra miosina de ratón en cloroplastos de *Vallisneria gigantea*, en cortes de tejido de mesofilo, sin embargo, postulan la posibilidad de que se encuentre asociada a membranas de retículo endoplásmico que se encontraría en la superficie de los cloroplastos. En nuestro caso estamos purificando los cloroplastos a través de un gradiente de Percoll y sucesivos lavados, método que ha sido descrito que reduce la contaminación con mitocondrias y otros organelos (Mills y Joy, 1980; McCurdy y Williamson, 1987), sin embargo, no hemos analizado la presencia de contaminantes en nuestra fracción enriquecida en cloroplastos.

El porcentaje de cloroplastos que responde a los anticuerpos indica que no todos los cloroplastos contienen estas proteínas y que existen diferentes poblaciones, una mayor que se asocia con las proteínas relacionadas a actina y una menor que se asocia con miosina. Sin embargo, no somos capaces de discriminar si estas poblaciones se sobreponen o son excluyentes entre sí. Cabe destacar que el anticuerpo anti-actina de pollo reconoce una mayor proporción de cloroplastos que el anticuerpo anti-actina C11,

por lo que estos anticuerpos reconocen diferentes antígenos en los cloroplastos, lo que se puede explicar si consideramos que el anticuerpo anti-actina C11 ha sido desarrollado contra un péptido y por lo tanto tiene una población de posibles antígenos más restringida que el anticuerpo anti-actina de pollo. También es posible que estos anticuerpos reconozcan diferentes epítopes de la misma proteína y que en el caso del anticuerpo anti-actinaC11, el epítipo no se encuentre expuesto al anticuerpo en todos los cloroplastos. Resultados obtenidos en el laboratorio, aún no publicados, indican que en western-blot utilizando el anticuerpo anti-actina de pollo, se reconocen más de una banda en extractos proteicos de cloroplastos aislados, indicando que efectivamente este anticuerpo reconoce más de un antígeno en los cloroplastos, y que, posiblemente, el anticuerpo anti-actinaC11 reconozca sólo uno de ellos.

Los resultados positivos en la inmunofluorescencia utilizando el anticuerpo anti-CAB sugieren que los cloroplastos se encuentran permeabilizados, ya que la proteína CAB se encuentra en forma trimerica asociada al Fotosistema II, en la membrana del tilacoide (Malkin y Niyogi, 2000). Por lo tanto, se trata de una proteína que se encuentra en todos los cloroplastos que contienen clorofila, sin embargo, no debería ser accesible a nuestro anticuerpo debido a su localización. A partir de estos resultados, inferimos que en el procedimiento de aislamiento de los cloroplastos éstos se permeabilizaron sin alcanzar la ruptura de las membranas tilacoidales, ya que por microscopía de luz y fluorescencia no se observa clorofila fuera de los límites de los cloroplastos. El hecho que el 49,8% de los cloroplastos resulte positivo al tratamiento con este anticuerpo, puede ser efecto de que esta permeabilización no fue homogénea, es decir, algunos

cloroplastos pueden no haberse permeabilizado y por ende, no fueron reconocidos por el anticuerpo. Este fenómeno explicaría a la vez la variabilidad de estos resultados.

No podemos, por lo tanto, discriminar si los anticuerpos anti-actina y anti-miosina están reconociendo antígenos de superficie o antígenos que se encuentran en el interior de los cloroplastos, por lo que desconocemos la localización de los antígenos. Por otro lado, no podemos determinar si existen realmente diferentes poblaciones de cloroplastos y que solamente una porción de ellos presenta estas proteínas, o si por el contrario, todos los cloroplastos se asocian a estas proteínas y tenemos una población limitada de cloroplastos que son permeables a los anticuerpos.

Aunque pareciera existir correlación entre el porcentaje de cloroplastos capaces de unirse a actina (70%) y los cloroplastos que presentan proteínas relacionadas a actina (69,6% y 61,3% con anti-actina de pollo y anti-actina C11 respectivamente), esto no constituye evidencia suficiente para determinar la participación de proteínas relacionadas a actina en la interacción entre cloroplastos y actina. Con el ensayo de inhibición de la interacción entre cloroplastos y actina, por el tratamiento con anticuerpos, determinamos que únicamente el anticuerpo anti-actina de pollo a dilución 1:20 arrojó resultados suficientemente constantes como para definir que la(s) proteína(s) reconocida(s) por este anticuerpo participa(n) en la interacción entre cloroplastos y actina. Sin embargo, la inhibición no fue completa, alcanzando niveles del 33%, esto podría significar que existe más de un mecanismo por el cual ocurre esta interacción o que una porción de los cloroplastos no fue reconocida por el anticuerpo dejando el antígeno libre para la interacción, es decir, no se produjo un bloqueo de todos los sitios de unión a actina presentes en los cloroplastos. Los resultados obtenidos con este

anticuerpo a dilución 1:10 nos parecen sorprendentes, sin embargo, debido al gran número de ensayos realizados a la dilución 1:20 creemos que la inhibición observada es real y postulamos que a la dilución 1:10 también debería producirse, pero no se aprecia en nuestros resultados debido al bajo número de ensayos (sólo tres), además analizando el error estándar obtenido a la dilución 1:10, que corresponde a un tercio del valor promedio obtenido ($63,7\% \pm 19,9$) vemos que el límite inferior alcanza los valores de nucleación obtenidos a dilución 1:20 ($47,3\% \pm 4,9$), por lo que creemos que los resultados a dilución 1:10 no son concluyentes.

Los resultados obtenidos tratando los cloroplastos con los anticuerpos anti-actina C11 y anti-miosina, indican que las proteínas reconocidas por estos anticuerpos no participan en la interacción con actina, sin embargo, estos resultados son consistentemente variables, teniendo mucha fluctuación entre un ensayo y el siguiente, lo que sugiere que existe un mecanismo de regulación de la participación de estas proteínas en la interacción con actina. El anticuerpo anti-CAB, aunque reconoce antígenos en los cloroplastos, no inhibe la interacción de actina con los cloroplastos, lo que corresponde con lo esperado ya que la proteína CAB se encuentra en la membrana del tilacoide y es muy poco probable que participe en este tipo de interacciones.

Se concluye, por lo tanto, que las proteínas relacionadas a actina, que encontramos asociadas a cloroplastos aislados de hojas de coliflor, participan en una interacción muy estrecha que se produce entre cloroplastos y filamentos de actina en ensayos *in vitro*. Esta interacción y la participación de proteínas relacionadas a actina podrían indicarnos el mecanismo que permite el movimiento de cloroplastos sobre actina.

5 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

Demostramos que existe interacción *in vitro* entre cloroplastos aislados de hojas de coliflor y filamentos de actina.

La interacción descrita es variable, los filamentos de actina adquieren variadas formas alrededor de los cloroplastos y en algunos casos ésto no ocurre.

Miosina y actina, al igual que proteínas relacionadas a actina (Arp), co-purifican con los cloroplastos aislados de hojas de coliflor y se encuentran asociadas a ellos.

Las proteínas reconocidas por el anticuerpo anti-actina de pollo, posiblemente correspondan a proteínas relacionadas a actina (Arp), que se encuentran asociadas a los cloroplastos. ARPs podrían mediar la interacción con filamentos de actina, por cuanto el tratamiento de cloroplastos con dicho anticuerpo inhibe en un 33% la capacidad de los cloroplastos de unirse a los filamentos de actina, probablemente bloqueando los sitios de unión de actina a los cloroplastos.

5.2 Recomendaciones

Sería interesante definir la presencia de proteínas relacionadas a actina en la superficie de los cloroplastos utilizando anticuerpos dirigidos contra proteínas como Arp2 y Arp3, que podrían mediar la interacción de cloroplastos con actina.

Estudiar, mediante microscopía confocal la localización de las proteínas reconocidas por los anticuerpos anti-actina y anti-miosina utilizados en este trabajo, para definir si se encuentran asociadas a la membrana del organelo o son proteínas internas.

Sería muy interesante lograr esclarecer si la asociación descrita entre cloroplastos y actina es producto de la presencia de sitios de nucleación de polimerización de actina en la superficie de los cloroplastos o más bien corresponde a sitios de interacción cloroplasto - F-actina, una vez que ya se produjo la polimerización del filamento. La identificación de proteínas descritas en la nucleación de la polimerización de actina, como por ejemplo proteínas del complejo Arp2/3, asociadas a los cloroplastos, o estudios de la cinética de polimerización de actina en presencia de cloroplastos, podrían apoyar la hipótesis de que los cloroplastos sean capaces de producir la nucleación de la polimerización de los filamentos de actina en su superficie.

También se podría analizar si los cloroplastos asociados a "proteínas relacionadas a actina" también se asocian a la miosina o si son poblaciones excluyentes. Inmunolocalizaciones dobles ayudarían a este análisis, sin embargo, es importante recordar que la fluorescencia roja de la clorofila es muy intensa y dificulta el uso de anticuerpos secundarios acoplados a fluoróforos como la rodamina.

El análisis de la asociación de filamentos de actina, de proteínas relacionadas a actina y de miosina a los cloroplastos durante diferentes estadios de desarrollo o condiciones de crecimiento permitiría entender si la interacción entre estos componentes es blanco de algún proceso de regulación.

La purificación de las proteínas asociadas a cloroplastos, que son reconocidas por los anticuerpos utilizados en este trabajo, permitiría su identificación y esclarecer si efectivamente son posibles candidatos para mediar el movimiento de estos organelos a lo largo de cables de actina.

6 BIBLIOGRAFIA

- Andersland J., Jagendorf A. y Parthasarathy M. (1992) The isolation of actin from pea roots by DNaseI affinity chromatography. *Plant Physiol.* 100: 1716-1723.
- Baskin T. (2000) The cytoskeleton. *En* Buchanan B., Gruissem W., Jones R. (eds.), Biochemistry & Molecular Biology of Plants. pp. 202-258. Courier Companies, Inc., USA.
- Blatt M. y Briggs W. (1980) Blue-light-induced cortical fiber reticulation concomitant with chloroplast aggregation in the alga *Vaucheria sessilis*. *Planta* 147: 355-362.
- Boldogh I., Yang H., Nowakowski W., Karmon S., Hays L., Yates J. y Pon L. (2001) Arp2/3 complex and actin dynamics are required for actin-based mitochondrial motility in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98 (6): 3162-3167.
- Bollag D. y Edelstein S. (1993) Gel electrophoresis under denaturing condition. *En* Protein Methods. pp. 114-116. Wiley-Inc, New York, USA.
- Bradford M. (1976) A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 148-254.
- Bray D. y Thomas C. (1975) The actin content of fibroblasts. *Biochem. J.* 147: 221-228.
- Britz S. y Briggs W. (1983) Rhythmic chloroplast migration in the green alga *Ulva*: dissection of movement mechanism by differential inhibitor effects. *Eur. J. Cell Biol.* 31: 1-8.

- De La Torre F., Sampredo J., Zarra J. y Revilla G. (2002) AIFXG1, an Arabidopsis gene encoding alpha L-fucosidase active against fucosylated xyloglucan oligosaccharides. *Plant Physiol.* 128: 247-255.
- Fukata H., Mochida A., Maruyama N. y Fukasawa H. (1991) Chloroplast DNA topoisomerase I from cauliflower. *J. Biochem.* 109: 127-131.
- Goodson H. y Hawse W. (2002) Molecular evolution of the actin family. *J. Cell Sci.* 115: 2619-2622.
- Goosney D., de Grado M. y Finlay B. (1999) Putting *E. coli* on a pedestal: a unique system to study signal transduction and the actin cytoskeleton. *Trends Cell Biol.* 9: 11-14.
- Granger C., Callos J. y Medford J. (1996) Isolation of an Arabidopsis homologue of the maize homeobox Knotted-1 gene. *Plant Mol. Biol.* 31(2): 373-378.
- GrootWassink J., Reed D. y Kolenovsky A. (1994) Immunopurification and immunocharacterization of the glucosinolate biosynthetic enzyme thioldoximate S-glucosyltransferase. *Plant Physiol.* 105: 425-433.
- Heslop-Harrison J. y Heslop-Harrison Y. (1989) Myosin associated with the surface of organelles, vegetative nuclei and generative cells in angiosperm pollen grains and tubes. *J. Cell Sci.* 94: 319-325.
- Higgs H. y Pollard T. (2001) Regulation of actin filament network formation through ARP2/3 complex: activation by a diverse array of proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 70: 649-676.
- Hitchcock S. (1980) Actin deoxyribonuclease I interaction. Depolymerization and nucleotide exchange. *J. Biol. Chem.* 255(12): 5668-5673.
- Jarillo J., Gabrys H., Capel J., Alonso J., Ecker J. y Cashmore A. (2001) Phototropin-related NPL1 controls chloroplast relocation induced by blue light. *Nature* 410: 952-954.

- Kachar B. (1985) Direct visualization of organelle movement along actin filaments dissociated from Characcean algae. *Science* 227: 1355-1357.
- Kadota A., Sato Y. y Wada M. (2000) Intracellular chloroplast photorelocation in the moss *Physcomitrella patens* is mediated by phytochrome as well as by a blue-light receptor. *Planta* 210: 932-937.
- Kagawa T. y Wada M. (1996) Phytochrome and blue-light-absorbing pigment-mediated directional movement of chloroplasts in dark-adapted prothallial cells of fern *Adiantum* as analyzed by microbeam irradiation. *Planta* 198: 488-493.
- Kagawa T. y Wada M. (1999) Chloroplast-avoidance response induced by high-fluence blue light in prothallial cells of the fern *Adiantum capillus-veneris* as analyzed by microbeam irradiation. *Plant Physiol.* 119: 917-923.
- Kagawa T. y Wada M. (2000) Blue light-induced chloroplast relocation in *Arabidopsis thaliana* as analyzed by microbeam irradiation. *Plant Cell Physiol.* 41(1): 84-93.
- Kagawa T., Sakai T., Suetsugu N., Oikawa K., Ishiguro S., Kato T., Tabata S., Okada K. y Wada M. (2001) *Arabidopsis* NPL1: a phototropin homolog controlling the chloroplast high-light avoidance response. *Science* 291: 2138-2141.
- Kandasamy M. y Meagher R. (1999) Actin-organelle interaction: association with chloroplast in *Arabidopsis* leaf mesophyll cells. *Cell Motil. Cytoskel.* 44: 110-118.
- Klahre U. y Chua N.H. (1999) The *Arabidopsis* ACTIN RELATED PROTEIN 2 (AtARP2) promoter directs expression in xylem precursor cells and pollen. *Plant Mol. Biol.* 41: 65-73.
- La Claire II J.W. (1991) Immunolocalization of myosin in intact and wounded cells of the green alga *Ernodesmis verticillata* (Kützing) Borgesen. *Planta* 184: 209-217.

- Laemmli UK. (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Liebe S. y Menzel D. (1995) Actomyosin-based motility of endoplasmic reticulum and chloroplasts in *Vallisneria* mesophyll cells. *Biol. Cell* 85: 207-222.
- Ma Y., Kouranov A., LaSala S. y Schnell D. (1996) Two components of the chloroplasts protein import apparatus, IAP86 and IAP75, interact with the transit sequence during the recognition and translocation of precursor proteins at the outer envelope. *J. Cell Biol.* 134(2): 315-327.
- Malkin R. y Niyogi K. (2000) Photosynthesis. *En* Buchanan B., Gruissem W., Jones R. (eds.), Biochemistry & Molecular Biology of Plants. pp. 569-628. Courier Companies, Inc., USA.
- May R.C. (2001) The Arp2/3 complex: a central regulator of the actin cytoskeleton. *Cell. Mol. Life Sci.* 58:1607-1626.
- McCurdy D. y Williamson R. (1987) An actin related protein inside pea chloroplasts. *J. Cell Sci.* 87: 449-456.
- McKinney E., Kandasamy M. y Mcagher R. (2002) *Arabidopsis* contains ancient classes of differentially expressed actin-related protein genes. *Plant Physiol.* 128: 997-1007.
- Menzel D. y Schliwa M. (1986a) Motility in the siphonous green alga *Bryopsis*. I. Spatial organization of the cytoskeleton and organelle movements. *Eur. J. Cell Biol.* 40: 275-285.
- Menzel D. y Schliwa M. (1986b) Motility in the siphonous green alga *Bryopsis*. II. Chloroplast movement requires organized arrays of both microtubules and actin filaments. *Eur. J. Cell Biol.* 40: 286-295.
- Mills W.R. y Joy K.W. (1980) A rapid method for isolation of purified, physiologically active chloroplasts, used to study the intracellular distribution of amino acids in pea leaves. *Planta* 148: 75-83.

- Mullins R. (2000) How WASP-family proteins and the Arp2/3 complex convert intracellular signals into cytoskeletal structures. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12: 91-96.
- Mullins R., Heuser J. y Pollard T. (1998) The interaction of Arp2/3 complex with actin: nucleation, high affinity pointed end capping, and formation of branching networks of filaments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 6181-6186.
- Neuhaus H. y Emes M. (2000) Nonphotosynthetic metabolism in plastids. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 51: 111-140.
- Pain D. y Blobel G. (1987) Protein import into chloroplasts requires a chloroplast ATPase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 3288-3292.
- Pardee, J. y Spudich, J. (1982) Purification of muscle actin. *Method Cell Biol.* 24: 271-89.
- Pollard M. y Ohlrogge J. (1999) Testing models of fatty acid transfer and lipid synthesis in spinach leaf using *in vivo* oxygen-18 labeling. *Plant Physiol.* 121: 1217-1226.
- Ren H., Gibbon B., Ashworth S., Sherman D., Yuan M. y Staiger C. (1997) Actin purified from maize pollen functions in living plant cells. *Plant Cell* 9(8): 1445-1457.
- Sakai T., Kagawa T., Kasahara M., Swartz T., Christie J., Briggs W., Wada M. y Okada K. (2001) *Arabidopsis* nph1 and npl1: Blue light receptors that mediate both phototropism chloroplast relocation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 6969-6974.
- Sato Y., Kadota A. y Wada M. (1999) Mechanically induced avoidance response of chloroplasts in fern protonemal cells. *Plant Physiol.* 121: 37-44.
- Sato Y., Wada M. y Kadota A. (2000) Choice of tracks, microtubules and/or actin filaments for chloroplast photo-movement is differentially controlled by phytochrome and a blue light receptor. *J. Cell Sci.* 114: 269-279.

- Skoble J., Auerbuch V., Goley E., Welch M. y Portnoy D. (2001) Pivotal role of VASP in Arp2/3 complex-mediated actin nucleation, actin branch-formation, and *Listeria monocytogenes* motility. *J. Cell Biol.* 155(1): 89-100.
- Small J., Rottner K., Hahne P. y Anderson K. (1999) Visualizing the actin cytoskeleton. *Microsc. Res. Tech.* 47: 3-17.
- Spector D., Goldman R. y Leinwand L. (1998) Preparation of actin. *En: Cells a laboratory manual*. Vol. 1: Culture and biochemical analysis of cells. pp. 57.1-57.15. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY.
- Staelin L. y Newcomb E. (2000) Membrane structures and membranous organelles. *En Buchanan B., Gruissem W., Jones R. (eds.), Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. pp. 2-50. Courier Companies, Inc. USA.
- Tlalka M. y Fricker M. (1999) The role of calcium in blue-light dependent chloroplast movement in *Lemna trisulca* L. *Plant J.* 20(4): 461-473.
- Tlalka M. y Gabrys H. (1993) Influence of calcium on blue-light induced chloroplast movement in *Lemna trisulca* L. *Planta* 189: 491-498.
- Trojan A. y Gabrys H. (1996) Chloroplast distribution in *Arabidopsis thaliana* (L.) depends on light conditions during growth. *Plant Physiol.* 111: 419-425.
- Ulmasov T. y Guilfoyle T. (1992) Sequence of the fifth largest subunit of RNA polymerase II from plants. *J. Biol. Chem.* 267(32): 23165-23169.
- Vantard M. y Blanchoin L. (2002) Actin polymerization process in plant cells. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5: 502-506.
- Volkman N. y Hanein D. (2000) Actomyosin: law and order in motility. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12: 26-34.
- Welch M. y Mullins R. (2002) Cellular control of actin nucleation. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 18: 247-288.
- Williamson R. (1993) Organelle movements. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 44: 181-202.

- Witztum A. y Parthasarathy M. (1985) Role of actin in chloroplast clustering and banding in leaves of *Egeria*, *Elodea* and *Hydrilla*. *Eur. J. Cell Biol.* 39: 21-26.
- Yamaguchi Y. y Nagai R. (1981) Motile apparatus in *Vallisneria* leaf cells. I. Organization of microfilaments. *J. Cell Sci.* 48: 193-205.
- Yatsunami H., Kadota A. y Wada M. (1985) Blue and red-light actin in photoorientation of chloroplasts in *Adiantum protonemata*. *Planta* 165: 43-50.
- Zurzycki J., Walczak T., Gabrys H. y Kajfosz J. (1983) Chloroplast translocations in *Lemna trisulca* L. induced by continuous irradiation and by light pulses. *Planta* 157: 502-510.

7 APENDICE

AVANCES DE LA BIOTECNOLOGIA VEGETAL Y SU RELACION CON LA INVESTIGACION BASICA

En los últimos años la biotecnología vegetal se ha enfocado en producir plantas transgénicas resistentes a insectos y herbicidas, por ejemplo expresando en plantas la toxina de *Bacillus turingiensis* o proporcionando resistencia a glifosato. Los beneficios para la agricultura se observan en la disminución de costos, mayor producción de semillas, menor contaminación con hongos y menor uso de pesticidas. El exitoso desarrollo de esta tecnología para transferir características altamente específicas a las plantas, está siendo ahora aplicada a la producción de plantas de cultivo con valor nutritivo mejorado o al uso de las plantas como biofábricas para producción de vacunas u otros compuestos de interés para el hombre (Ma y cols., 1995; Poirier, 1999; Giddings y cols., 2000; Slattery y cols., 2000; Ye y cols., 2000). La ingeniería de las vías metabólicas que controlan el suministro de vitaminas, antioxidantes y otros productos naturales que ayudan a mantener una buena salud, promete revolucionar su disponibilidad en los alimentos. El número de genes y vías metabólicas que podrían manipularse por ingeniería metabólica está en continuo incremento y producirá el aumento de la diversidad de químicos útiles producibles en plantas.

Sin embargo, en su avance la industria biotecnológica se ha encontrado con muchos opositores, se ha planteado la posibilidad de que los alimentos transgénicos sean dañinos para la salud, en cuanto las nuevas características conferidas podrían producir

alergias en los consumidores; la posible transferencia de los transgenes al ambiente podría causar problemas ecológicos, por ejemplo se podrían originar “supermalezas” resistentes a herbicidas, o bacterias resistentes a antibióticos.

La investigación en el área de la biotecnología vegetal está estudiando sistemas que sean más seguros, en los que, por ejemplo, ya no se utilizan genes de resistencia a antibióticos como genes reporteros, además ha desarrollado estrategias para evitar una posible difusión de los transgenes al ambiente, por ejemplo a través del polen, dirigiendo la incorporación del transgen a otros compartimentos celulares con genoma, como por ejemplo los plastidios (Daniell, 1999; Sidorov, 1999; Bogorad, 2000; Heifetz y Tuttle, 2001; VanBel y cols., 2001). En la mayoría de las plantas de interés comercial se produce herencia maternal de los plastidios, por lo tanto no se transmiten por el polen, por ello han sido un blanco atractivo para la transformación de plantas. Además, esta tecnología permite obtener plantas transgénicas que contienen mayor número de copias del transgen, por lo menos una en cada plastidio, optimizando de este modo el uso de plantas como biofábricas aumentando de manera considerable los niveles de producción.

El avance de la biotecnología en el área vegetal ha llevado a desarrollar nuevas tecnologías, de gran proyección y que pueden ser muy útiles, sin embargo, es necesario ser cautelosos, ya que no conocemos a fondo todos los procesos celulares que participan o regulan estos blancos de la biotecnología. Es muy importante tener en cuenta que todo avance en la biotecnología se encuentra estrechamente ligado a un descubrimiento científico, por lo tanto es necesario que la investigación básica siga avanzando para que se produzca un correcto balance entre el conocimiento y la biotecnología.

BIBLIOGRAFIA

- Bogorad L. (2000) Engineering chloroplasts: an alternative site for foreign genes, proteins, reactions and products. *Trends Biotechnol.* 18: 257-263.
- Daniell H. (1999) New tools for chloroplast genetic engineering. *Nature* 17: 855-856.
- Giddings G., Allison G., Brooks D. y Carter A. (2000) Transgenic plants as factories for biopharmaceuticals. *Nature Biotechnol.* 18: 1151-1155.
- Heifetz P. y Tuttle A. (2001) Protein expression in plastids. *Curr. Opin. Plant Biol.* 4: 157-161.
- Ma J., Hiatt A., Hein M., Vine N., Wang F., Stabila P., van Dolleweerd C., Mostov K. y Lehner T. (1995) Generation and assembly of secretory antibodies in plants. *Science* 268: 716-719.
- Poirier Y. (1999) Green chemistry yields a better plastic. *Nature Biotechnol.* 17: 960-961.
- Sidorov V., Kasten D., Pang S., Hajdukiewicz P., Staub J. y Nehra N. (1999) Stable chloroplast transformation in potato: use of green fluorescent protein as a plastid marker. *Plant J.* 19(2), 209-216.
- Slattery C., Kavakli I. y Okita T. (2000) Engineering starch for increased quantity and quality. *Trends Plant Sci.* 5(7): 291-298.
- VanBel A., Hibberd J., Prüfer D. y Knoblauch M. (2001) Novel approach in plastid transformation. *Curr. Opin. Biotech.* 12:144-149.
- Ye X., Al-Babili S., Klöti A., Zhang J., Lucca P., Beyer P. y Potrykus I. (2000) Engineering the provitamin A (β -carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm. *Science* 287: 303-305.