

03088

2  
24

**INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA  
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

**Estudio de la expresión de uricasa II  
en *Phaseolus vulgaris* L.**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTOR EN BIOTECNOLOGÍA**

**PRESENTA**

*Maria de las Nieves Capote Mainez*

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

1997



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Biología Molecular de Plantas del Instituto de Biotecnología de la U.N.A.M, bajo la dirección del Dr. Federico Sánchez Rodríguez.**

**Cuernavaca, Mor 1997**

# ÍNDICE

• <b>RESUMEN</b> .....	1
• <b>INTRODUCCIÓN</b> .....	2
- <b>LA FIJACIÓN DE NITRÓGENO</b> .....	3
- <b>LA SIMBIOSIS <i>RHIZOBIUM</i>-LEGUMINOSA</b> .....	5
a. Reconocimiento.....	8
b. Preinfección.....	11
c. Infección.....	11
d. Organogénesis del nódulo.....	18
e. Funcionamiento del nódulo.....	21
e1. Regulación de la expresión de nodulinas.....	21
e2. Regulación de los niveles de oxígeno en el nódulo.....	21
e3. Flujo de carbono hacia el bacteroide.....	22
e4. Asimilación del nitrógeno fijado.....	23
e5. Los ureidos.....	23
I. Papel de los ureidos en la simbiosis <i>Rhizobium</i> -leguminosa.....	23
II. Papel de los ureidos durante el desarrollo.....	25
III. Biosíntesis de ureidos.....	25
IV. Catabolismo de ureidos.....	26
V. Significado biológico de los ureidos.....	26
- <b>URICASA II</b> .....	29
a. Uricasa II en los organismos eucariotas.....	29
b. Uricasa II como enzima catabólica en plantas.....	30
c. Características y propiedades de la enzima.....	31
d. Distribución de uricasa II en la planta.....	31
e. Expresión de uricasa II en el nódulo.....	31
f. Antecedentes de uricasa II en el laboratorio.....	33
f1. Purificación de uricasa II de nódulos de <i>P. vulgaris</i> .....	33
f2. Clonación del cDNA de uricasa II de nódulos de <i>P.</i> <i>vulgaris</i> .....	33
f3. Expresión de uricasa II durante el desarrollo del nódulo.....	33
f4. Expresión de uricasa II en nódulos inducidos por bacterias mutantes.....	35
- <b>LA GERMINACIÓN Y EL ESTABLECIMIENTO DE LA PLÁNTULA</b> .....	36

•	<b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	41
•	<b>OBJETIVOS</b> .....	42
•	<b>Artículo:</b> "Characterization of the common bean uricase II and its expression in organs other than nodules".....	43
•	<b>RESULTADOS ANEXOS Y DISCUSIÓN</b> .....	77
	<b>Primera parte</b>	
	1. Localización del ARNm de uricasa II en cotiledones e hipocotilos de plántulas de frijol	
	2. Inmunodetección de uricasa II en raíces, cotiledones e hipocotilos de plántulas de frijol	
	<b>Segunda parte</b>	
	1. Aislamiento de la clona genómica de uricasa II	
	2. Secuenciación del promotor de uricasa II	
	3. Construcción de herramientas moleculares para hacer estudios de regulación en <i>cis</i>	
	3.1. Construcción del gen quimérico (Puricasa:GUS:NOS) dentro de vectores de transformación de plantas.	
	3.1.1. Localización del sitio de inicio de la transcripción	
	3.1.2. Amplificación mediante PCR del promotor de uricasa II	
	3.1.3. Clonación del promotor de uricasa en los vectores de transformación: pBI121 y pBI426	
	3.2. Construcción de un sistema de delecciones 5' del promotor de uricasa II	
	3.2.1. Delecciones mediante digestión ExoIII/SalI	
	3.2.2. Delecciones mediante PCR	
	4. Estudios de regulación en <i>cis</i>	
	4.1 Estudios de expresión estable	
	4.2 Estudios de expresión transitoria	
•	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	110
•	<b>CONCLUSIONES</b> .....	117
•	<b>PERSPECTIVAS</b> .....	119
•	<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	121

# "Study of the uricase II expression in *Phaseolus vulgaris* L."

PHD THESIS PRESENTED BY

Nieves Capote Mañez

## ABSTRACT

The work presented in this PhD thesis is placed in the nitrogen metabolism of the legume plant *Phaseolus vulgaris* L (bean). It is centered in the regulation of the uricase II gene expression during the first stages of bean development, i.e., during germination and seedling establishment. Uricase II is a well studied enzyme because of its participation in the ureide biosynthesis that takes place during the symbiosis established between legume plants and soil bacteria of the genus *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*. However, along this work, I have found that this enzyme is also present in plant organs other than nodules, and that could play an essential role in the metabolism and development of the non-symbiotic plant.

There exists a single copy of the uricase II gene in the *P. vulgaris* genome. This gene is not only expressed in symbiotic nodules, but in cotyledons, roots and hypocotyls of bean seedlings. The expression of uricase II gene has been also detected in roots, stems and leaves of adult bean plants, and in *Leucaena leucocephala* (an amide-transporter legume) seedlings. In extracts from bean cotyledons, roots and hypocotyls the anti-uricase antibody not only detects a 35-kD protein, corresponding to the uricase II subunit, but a novel polypeptide of 50-kD, that has urate oxidase activity and is not present in nodules. The uricase II transcript and protein are located in the cotyledon cells that are in an active metabolic stage, and in the vascular tissue of roots and hypocotyls seedlings. The putative role of uricase II in those plant organs during the bean seedling establishment is discussed.

The uricase II gene promoter contains putative regulatory motifs, homologous to those present in other plant gene promoters, which might control the organ-, tissue-, cell-, and organello-specific expression of

uricase II, and its expression during the symbiosis and seedling development. Molecular tools were constructed to perform *cis* regulatory expression studies using transgenic plants and a transient expression system.

Vo Bo advisor



Federico Sánchez Rodríguez

## RESUMEN

El trabajo que presento en esta tesis está enmarcado en la biología molecular del metabolismo nitrogenado de la leguminosa *Phaseolus vulgaris* (frijol) y se centra en el estudio de la regulación de la enzima uricasa II durante las etapas tempranas del desarrollo de la planta, es decir, desde la germinación hasta el establecimiento de la plántula. Uricasa II es una enzima muy estudiada en el nódulo, debido a su participación en la biosíntesis de ureidos durante la simbiosis que establecen leguminosas tropicales con bacterias de los géneros *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*. Sin embargo, en el presente trabajo he encontrado que uricasa II también está presente en otros órganos distintos al nódulo y que puede jugar un papel importante en el metabolismo y el desarrollo de la planta no simbiótica.

En otras plantas leguminosas se ha reportado que uricasa II está codificada por una familia de genes. Sin embargo, en este trabajo he demostrado que existe una sola copia del gen de uricasa II en el genoma de *P. vulgaris*. Este gen no sólo se expresa en el nódulo simbiótico, sino también en cotiledones, raíces e hipocotilos de la plántula de frijol en desarrollo. Su expresión ha sido también detectada en raíces, tallos y hojas de la planta adulta, y en leguminosas transportadoras de amidas, como *Leucaena leucocephala*. En extractos de cotiledones, raíces e hipocotilos de plántulas de frijol, el anticuerpo anti-uricasa detecta dos polipéptidos: una proteína de 35-kD, que corresponde a la subunidad de uricasa II, y una nueva proteína de 50-kD, con actividad urato oxidasa, que no está presente en nódulos. En los cotiledones, el transcrito y la proteína de uricasa II se localizan en las células que se encuentran en un estado metabólico activo. Por otro lado, el mensajero y la proteína de uricasa II se localizan en el tejido vascular de las raíces e hipocotilos de la planta en desarrollo. Se discute el posible papel de uricasa II en estos órganos durante el establecimiento de la plántula de frijol.

El promotor del gen de uricasa II contiene posibles cajas de regulación que podrían estar controlando la expresión órgano-, tejido-, célula- y organelo-específica de uricasa II, y su expresión durante la simbiosis y el establecimiento de la plántula. Algunas de estas cajas son homólogas a las presentes en otros promotores de plantas y de otras nodulinas. Se presenta la construcción de herramientas moleculares para, en un futuro, llevar a cabo el estudio de las regiones en *cis* importantes para regular la expresión de uricasa II, tanto en plantas transgénicas como en un sistema de expresión transitoria.



## INTRODUCCIÓN

Antes de adentrarnos en el proceso de simbiosis que se establece entre plantas leguminosas y bacterias del suelo, quisiera destacar que la planta es un organismo complejo multifuncional en el que se integran diversos fenómenos que van a dar lugar a su desarrollo. A grandes rasgos, el desarrollo de una planta está determinado por su morfogénesis y su diferenciación. Estos fenómenos siguen una serie de patrones establecidos comunes en todas las plantas. Por otro lado, cada planta en particular contiene en su genoma la información necesaria para llevar a cabo su desarrollo y utiliza una serie de vías metabólicas y procesos de crecimiento y reproducción característicos de su especie. Del mismo modo, para el desarrollo y funcionamiento de cada uno de sus órganos, la planta es capaz de inducir o reprimir la expresión de una batería de genes que van a determinar sus características morfológicas y funcionales. Por razones históricas y metodológicas, los conocimientos sobre fisiología, anatomía, citología, morfología y biología molecular de plantas, nos han sido entregados como fenómenos aislados o independientes, perdiéndose así parte de la integridad de la planta como organismo. Los estudios que yo he realizado sobre la enzima uricasa II en mi tesis de Doctorado se centran en las primeras etapas del desarrollo del frijol y, sin embargo, para comprender mejor el papel de uricasa II en esa etapa del desarrollo, es necesario presentar la información que se tiene sobre esta enzima en los distintos órganos de la planta. Por ello, he centrado la primera parte de mi introducción en la etapa simbiótica del frijol, donde uricasa II ha sido más estudiada debido a que alcanza su máxima expresión en el nódulo simbiótico. Con ello podremos comprender mejor el papel que esta enzima desarrolla en el metabolismo global de la planta, especialmente durante las primeras etapas de desarrollo.

## LA FIJACIÓN DE NITRÓGENO

El nitrógeno es frecuentemente el nutriente del suelo que limita el crecimiento de las plantas. La asimilación de nitrógeno inorgánico en esqueletos de carbono tiene un marcado efecto en la productividad de las plantas, biomasa y rendimiento de las cosechas. La deficiencia de nitrógeno en las plantas causa una disminución de los componentes de la maquinaria fotosintética, como clorofila y ribulosa difosfato carboxilasa (Rubisco) con la consecuente reducción de la capacidad fotosintética. Aunque el  $N_2$  constituye el 78% de la composición de la atmósfera, la mayoría de los organismos vivos no pueden utilizar directamente el  $N_2$  como sustrato para la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos. Sólo algunos microorganismos en vida libre o en asociación simbiótica con plantas superiores son capaces de reducir el nitrógeno atmosférico a amonio, mediante un proceso denominado fijación de nitrógeno, llevado a cabo por la enzima nitrogenasa (Postgate, 1981). La reacción general de la fijación de  $N_2$  a  $NH_4^+$  es la siguiente:



La nitrogenasa es una enzima compleja formada por dos componentes: una Ferroproteína y una Molibdoferroproteína, que no tienen actividad catalítica por sí solas. La Fe proteína es el menor de los componentes y está formada por dos subunidades idénticas de 30,000 a 72,000 Da, dependiendo del organismo. Contiene un grupo de 4Fe-4S que participan en las reacciones redox involucradas en la conversión de  $N_2$  a  $NH_4^+$ . La Fe proteína se inactiva irreversiblemente con el  $O_2$ . La MoFe proteína está compuesta por cuatro subunidades con un peso molecular total de 180,000 a 235,000 Da, dependiendo del organismo. Contiene dos grupos de Mo-Fe-S y un número variado de grupos de Fe-S. La MoFe proteína también se inactiva con el  $O_2$ .

En la reacción general que cataliza la nitrogenasa, la ferredoxina, una proteína no hémica que contiene hierro, dona electrones y reduce a la Fe proteína, que a su vez reduce a la MoFe proteína. En este paso es necesaria la hidrólisis de ATP. Finalmente, la MoFe proteína reduce el  $N_2$  a  $NH_4^+$  (Fig. 1). Esta reacción está acoplada a la evolución de  $H_2$  a partir de la reducción de dos protones. Se produce, por tanto, una competencia entre estas dos reacciones acopladas por los electrones, limitándose la eficiencia de la fijación de  $N_2$ . Sin embargo, muchos microorganismos,

como la bacteria *Rhizobium*, tienen una enzima, la hidrogenasa, capaz de romper el  $H_2$  y reciclar los electrones que se utilizan en la reducción del  $N_2$ .

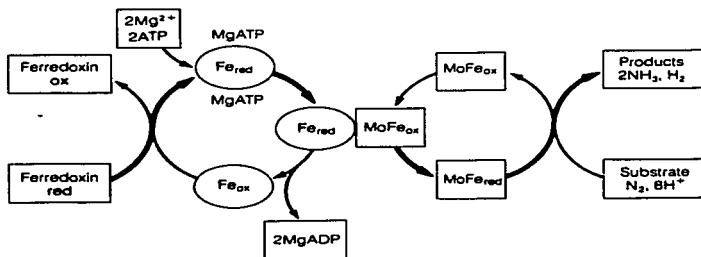


Fig 1: Reacción general de la fijación de nitrógeno catalizada por la enzima nitrogenasa.

Los organismos fijadores de  $N_2$  más eficientes establecen una simbiosis con plantas superiores, en la cual la planta aporta a la bacteria una fuente de carbono y un microambiente favorable y la bacteria proporciona a la planta una fuente nitrogenada asimilable.

En la naturaleza existen diversos microorganismos fijadores de nitrógeno capaces de asociarse con plantas inferiores y superiores: las cianobacterias se asocian con casi todos los grupos de plantas formando simbiosis fijadoras de nitrógeno. En general, la cianobacteria coloniza estructuras ya existentes en las plantas y en algunos casos las modifica. En estas estructuras, la cianobacteria diferencia algunas de sus células vegetativas a heterocistos, células con pared celular gruesa especializadas en la fijación de nitrógeno. De esta forma la maquinaria de reducción de  $N_2$  está relegada a un tipo celular que posee una protección física frente al  $O_2$ , inactivador de la actividad nitrogenasa. La cianobacteria es capaz de fijar carbono y nitrógeno, pero en simbiosis la fijación de carbono proviene en su mayor parte de la planta a través de la fotosíntesis, y la bacteria deriva toda su energía a la fijación de nitrógeno para ambos simbiosis. La cianobacteria *Nostoc* es capaz de

asociarse con hongos para formar líquenes. Estas asociaciones pueden tener o no a un alga como tercer componente, encargado de la fijación del carbono. *Nostoc* puede formar simbiosis también con plantas Briofitas, como *Anthoceros* o *Blasia*, donde la cianobacteria coloniza cavidades mucilaginosas. La cianobacteria *Anabaena* coloniza y fija N<sub>2</sub> atmosférico en cavidades especializadas de las hojas del helecho acuático *Azolla*. Esta asociación ha sido ampliamente utilizada como fertilizador de arrozales. Las plantas de la familia Cicadaceae son colonizadas por cianobacterias de los géneros *Nostoc*, *Anabaena* y *Calotrix* que invaden las raíces coraloideas. *Nostoc* también es capaz de asociarse con plantas angiospermas: la cianobacteria invade las glándulas secretoras localizadas justo detrás del ápice del tallo llegando a formar unas estructuras parecidas a nódulos. En esta asociación la localización de la bacteria es intracelular al igual que en la asociación de bacterias del suelo de los géneros *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* con plantas leguminosas. Otro microorganismo fijador de nitrógeno es la bacteria *Frankia*, capaz de formar nódulos en géneros como *Alnus* y *Casuarina*. Estos nódulos contienen lóbulos que se semejan a raíces laterales modificadas, con un parénquima vascular central.

## LA SIMBIOSIS RHIZOBIUM-LEGUMINOSA

Las leguminosas establecen una simbiosis con bacterias del suelo, como resultado de la cual se forma en la raíz de la planta un nuevo órgano llamado nódulo, donde la bacteria, diferenciada a bacteroide, lleva a cabo la fijación de nitrógeno (Franssen et al., 1992).

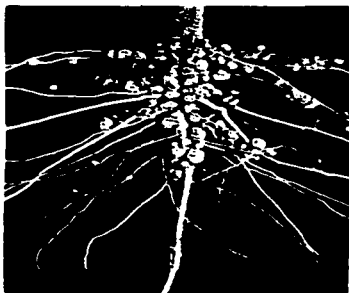
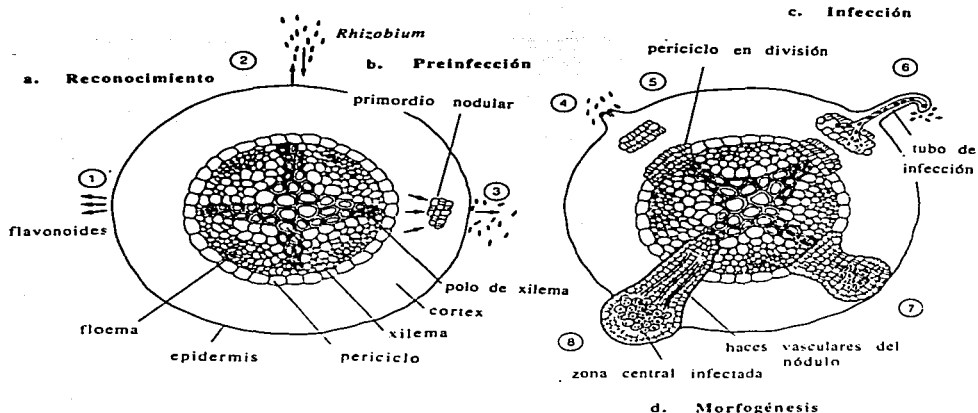
Las leguminosas que establecen una simbiosis con bacterias del suelo fijadoras de nitrógeno adquieren una ventaja selectiva, puesto que pueden crecer mejor en suelos limitados de nitrógeno y pueden translocar más nitrógeno a sus semillas y tejidos. El alto contenido en proteína de las leguminosas las hacen de importante interés agronómico. Como dato interesante sobre el contenido nitrogenado de las leguminosas podemos citar que la relación C:N en granos de leguminosas tiene un valor de 10 comparado con valores superiores a 30 en cereales. De ahí la importancia de estudiar la simbiosis y el intento de manipularla, no sólo para eficientar la que ocurre naturalmente, sino para ampliar el rango de plantas de interés agronómico que puedan ser infectadas por bacterias fijadoras de nitrógeno.

Durante la interacción simbiótica se produce un intercambio de señales moleculares entre la bacteria y la planta, que regulan la expresión de genes esenciales para la infección, el desarrollo y funcionamiento del nódulo. Se expresan genes de ambos simbioses: los genes *nod* de la bacteria, y los genes de nodulinas de la planta (Sánchez et al., 1991; Verma et al., 1992).

Las nodulinas se definieron como proteínas codificadas por genes de la planta que se expresaban específicamente durante la simbiosis (van Kammen, 1984). Actualmente se ha comprobado que muchas de las proteínas que se creían específicas de nódulo, se expresan también en otros órganos de la planta y participan en otros eventos distintos a la simbiosis. En general, se consideran nodulinas a las proteínas de la planta que tienen una expresión inducida o aumentada durante la simbiosis. Según su patrón temporal de expresión, las nodulinas se clasifican en tempranas y tardías (Nap and Bisseling, 1990). Las nodulinas tempranas se expresan durante la preinfección, infección y desarrollo del nódulo. Están involucradas en los procesos de infección, en aspectos estructurales y en la transducción de señales durante la morfogénesis del nódulo. Según la nomenclatura se designan como ENOD (Early NODulins). Algunas nodulinas tempranas estudiadas no necesitan de la presencia de la bacteria para su inducción, y se expresan en la raíz o el primordio nodular con la simple adición del factor de nodulación, ej: ENOD5, ENOD12 y ENOD40 (Horvath et al., 1993). Las nodulinas tardías se expresan justo antes de que comience la fijación de nitrógeno y, en general, necesitan de la presencia de la bacteria para su inducción. Participan en el funcionamiento del nódulo: transporte de O<sub>2</sub> (ej: leghemoglobina), metabolismo de carbono (ejs: PEP carboxilasa y sacarosa sintasa) y asimilación de nitrógeno (ej: subunidad  $\gamma$  de GS, uricasa II).

Para que el establecimiento de la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa tenga lugar deben ocurrir una serie de eventos que en general se agrupan en varias etapas (Fig. 2):

- a. Reconocimiento de los dos simbioses.
- b. Preinfección.
- c. Infección de la planta por la bacteria.
- d. Organogénesis del nódulo.
- e. Establecimiento de la simbiosis y funcionamiento del nódulo.



e. Establecimiento de la simbiosis

Fig 2: Etapas del establecimiento de la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa. Se representan las distintas etapas de desarrollo de un nódulo determinado del tipo de los que forma el frijol. (1) la raíz excreta flavonoides; (2) los flavonoides atraen quimiotácticamente a las bacterias y estimulan su división; (3) las células del cortex de la raíz se dividen y originan el primordio nodular; (4) las bacterias se unen al pelo radicular emergente; (5) se induce la división de las células del periciclo de la raíz; (6) se forma el tubo de infección y penetra en el cortex de la raíz (7) Las bacterias se liberan al citoplasma de las células del primordio nodular; (8) los haces vasculares inervan al nódulo en cuyo interior las bacterias se diferencian a bacteroides o formas fijadoras de  $N_2$ ; (9) Aspecto de una raíz de frijol con nódulos maduros fijadores de nitrógeno.

### a. Reconocimiento

La interacción *Rhizobium*-leguminosa es específica, de tal manera que una especie de *Rhizobium* no es capaz de nodular cualquier leguminosa. Existen barreras de especificidad a distintos niveles durante la interacción:

Los exudados radiculares de las leguminosas contienen compuestos flavonoides (flavonas, isoflavonas y flavononas) capaces de atraer quimiotácticamente a las bacterias del suelo (Peters and Verma, 1990). Las bacterias, en respuesta a los flavonoides, se dirigen hacia las raíces, se dividen y colonizan la rizosfera. Una planta leguminosa puede secretar a la rizosfera más de un tipo de flavonoides, como luteonina, eriodictiol, genisteína, naringenina, etc. (Hungria et al., 1992). A este nivel existe la primera barrera de especificidad ya que el rhizobio es atraído sólo por cierta clase de flavonoides excretados por una leguminosa compatible (Goethals et al., 1992). Estos flavonoides se unen a la proteína NodD sintetizada constitutivamente por la bacteria. NodD unida a flavonoides es capaz de activar la expresión de los genes de nodulación bacterianos, genes *nod*, uniéndose a una secuencia específica del promotor denominada caja *nod* (Fisher and Long, 1992). Los genes *nod* codifican para enzimas involucradas en la síntesis de factores de nodulación o factores Nod (Fig. 3).

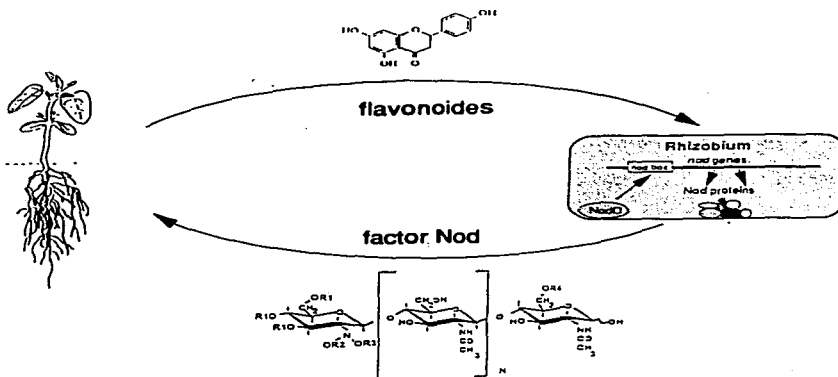


Fig 3: Diagrama esquemático del intercambio de señales en la interacción *Rhizobium*-leguminosa

En general, la estructura de los factores Nod consiste en un oligosacárido de 3 a 5 unidades de *N*-Acetilglucosamina unidas con enlaces  $\beta$ -1,4, y con un ácido graso en el extremo no reductor (Fig 4). Los factores pueden tener distintas substitutiones en sus extremos reducido y no reducido que determinan no sólo la especificidad de hospedero sino la propia actividad biológica de la molécula.

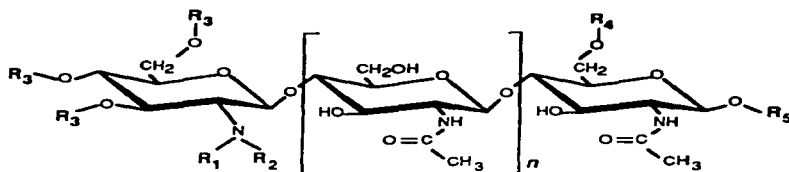


Fig 4: Estructura general del factor de nodulación.  $n = 1, 2$  ó  $3$ ;  $R_1 = H$ , carbamoilo o acetilo;  $R_2 = H$  o metilo;  $R_3 =$  ácido graso;  $R_4 = H$ , acetilo, sulfito o azúcar.

La longitud del esqueleto del factor Nod juega también un papel importante en el reconocimiento de la planta. La síntesis del esqueleto del factor de nodulación es catalizada por los productos de tres genes *nodA*, *nodB* y *nodC*. *NodC* tiene homología con una quitinsintasa y se ha especulado que es la enzima responsable de la síntesis del oligómero de quitina, incorporando moléculas de NAcGlc a oligómeros con un tamaño máximo de cinco (Geremia et al., 1994). La enzima *NodB* es la encargada de *N*-acetilar el extremo no reducido de la molécula (John et al., 1993). Finalmente, *NodA* transfiere el ácido graso desde una proteína acilada hasta el factor de nodulación (Röhrig et al., 1994). Este esqueleto básico es modificado por la acción de otras proteínas Nod (*hsn*: host specific nodulation) que determinan la especificidad de hospedero de la bacteria. Esta regulación es tan fina que hace que la diferencia entre el rango de hospedero de dos bacterias radique en una mínima modificación de sus factores de nodulación. Por ejemplo, la diferencia entre los lipooligosacáridos que sintetizan *R. leguminosarum* biovar *viceae* y *trifoli* radica en la presencia o ausencia de un doble enlace en su ácido graso que determina distinta hidrofobicidad de la molécula. Esta diferencia está mediada por el dominio central de la proteína *NodE* (44 aminoácidos) (Bloemberg et al., 1995).



Los genes *nodABC* se han denominado genes *nod* comunes, porque se creía podían ser intercambiables entre distintas especies de *Rhizobium*. Sin embargo, Ritsema et al., (1996) demostraron que cuando se reemplaza el gen *nodA* de *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* por el de la cepa *Bradyrhizobium* sp. ANU289 la proteína NodA de *Bradyrhizobium* sp. ANU289 transfiere un ácido graso distinto al oligosacárido aceptor de *R. leguminosarum* biovar *viciae*. Esto hace que el factor de nodulación sintetizado sea diferente al producido por la cepa silvestre y que se establezca un fenotipo Nod-(Nodulación-) en *Vicia*. De este modo, se puede considerar que la proteína NodA es también un determinante de la especificidad del hospedero. A la misma conclusión llegaron Debelle et al., (1996), demostrando que el gen *nodA* de *R. tropici* incorpora al factor de nodulación de *R. meliloti*, un ácido graso C18:1 (ácido cis-vaccénico), en vez de la cadena insaturada de C16 que incorpora la proteína NodA de *R. meliloti*. Esto conduce a un retraso en la infección y en la nodulación de la planta, reafirmando la contribución del gen *nodA* al rango de hospedero. El gen *nodC*, encargado de la oligomerización del factor, también es considerado un determinante del rango de hospedero, ya que distintos alelos *nodC* determinan diferentes tamaños del oligómero de N-acetil glucosamina, haciendo que se produzcan variados fenotipos en la planta hospedera dependiendo de la longitud del factor de nodulación que se excrete (Debelle et al., 1995).

Un determinado rhizobio es capaz de sintetizar varios tipos de factores de nodulación. *Rhizobium etli*, microsimbionte que nodula específicamente frijol, produce varios tipos de factores. Son pentasacáridos cuyo extremo no reductor está metilado y acetilado. Poseen como ácido graso cis vaccénico (C18:1) o esteárico (C18:0) y llevan un grupo carbamoil en el C4. Su extremo reductor está sustituido en la posición C6 con O-acetil fucosa. Parece ser que los rhizobios que sintetizan un mayor número de factores Nod diferentes tienen un rango de infección de leguminosas más amplio (Price et al., 1992). Sin embargo, en algunos casos la separación de dos especies de plantas en dos grupos de nodulación distintos viene determinada por los flavonoides secretados por sus raíces. *R. etli* es capaz de nodular algunas especies de *Lotus* sólo cuando la bacteria lleva un gen *nodD* FITA, es decir, un activador de la transcripción independiente de flavonoides. Del mismo modo, *R. loti* que no es capaz de nodular frijol, puede hacerlo cuando porta el gen *nodD* FITA. Esto indica que la barrera de especificidad entre *R. etli* y *R. loti* viene determinada por el tipo de

flavonoide que secreta la planta y que es reconocido por el regulador de la transcripción NodD (Cárdenas et al., 1995).

#### **b. Preinfección**

Cuando el rhizobio coloniza la raíz de la leguminosa induce la expresión de algunos genes de la planta, la deformación y curvatura de los pelos radiculares y la actividad meristemática de las células del cortex de la raíz para dar lugar al primordio nodular. Estos cambios morfológicos son precedidos de una despolarización de la membrana (Ehrhardt et al., 1992), un cambio en los flujos de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{H}^{+}$ , rearrreglos en los microfilamentos de actina (Allen et al., 1994) y un incremento del flujo citoplásmico (Heidstra et al., 1994). El factor Nod por sí solo es capaz de inducir estos efectos en la planta (Spaink et al., 1991; Truchet et al., 1991; Relic et al., 1993). Durante esta etapa temprana, la planta expresa en la epidermis genes de nodulinas tempranas. Parece ser que se necesita un contacto directo entre el factor Nod y la epidermis de la planta para inducir la expresión de estos genes (Journet et al., 1994). Por ello, se ha postulado la existencia de un receptor en la epidermis que debería reconocer específicamente a la molécula bacteriana. El ácido graso del factor de nodulación podría servir para anclarlo a la membrana y facilitar la unión al supuesto receptor o para traslocarlo al interior de la célula.

#### **c. Infección**

Después de que la bacteria se une al pelo radicular de la planta, la punta del pelo se curva y la bacteria queda atrapada dentro. Se produce una hidrólisis local de la pared celular de la planta (Van Spronsen et al., 1994), se invagina la membrana plasmática y se produce depósito de nueva pared celular. Así se forma una estructura denominada hilo o tubo de infección a través del cual la bacteria se introduce en la planta (Fig. 5 y 6a). Para que se forme el tubo de infección es necesaria la presencia de la bacteria, pues la aplicación del factor de nodulación sólo produce tubos de infección abortados (Van Brussel et al., 1992). La bacteria en el tubo de infección está rodeada de una matriz formada por compuestos de origen vegetal y bacteriano. A la vez que se está formando el tubo de infección se produce la división de las células del cortex de la raíz, formándose así el primordio nodular. El factor de nodulación es necesario y suficiente para desencadenar la división de las células corticales (Spaink et al., 1991; Truchet et al., 1991; Relic et al., 1993). La bacteria en el interior del tubo de infección se dirige hacia este primordio y se libera en el citoplasma de la célula vegetal. Esta

liberación es similar a una endocitosis (Basset et al., 1977) pues la bacteria queda rodeada de una membrana de origen vegetal llamada membrana peribacteroidal (MPB) (Fig 5 y 6b).

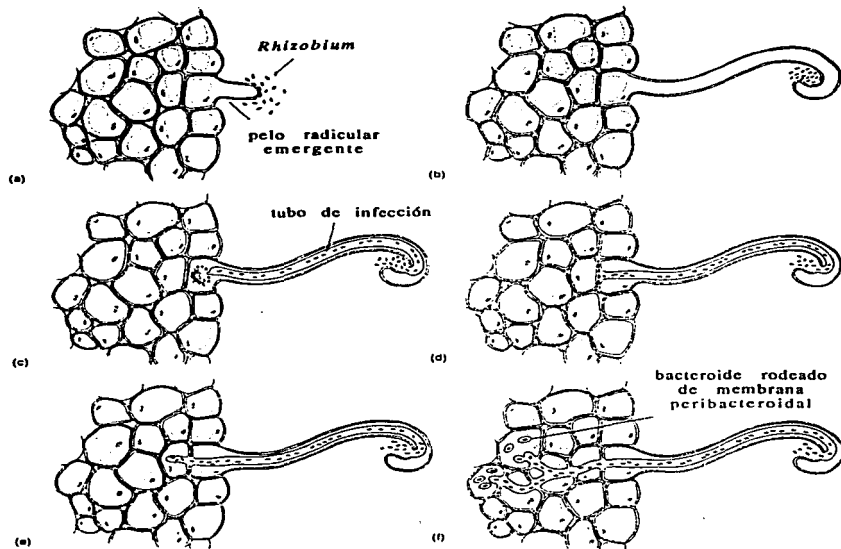


Fig 5: Esquema del proceso de infección. (a) Unión de las bacterias a la punta del pelo radicular emergente de la raíz. (b) Curvatura del pelo radicular y proliferación de las bacterias en ese espacio. (c) Hidrólisis parcial de la pared celular del tubo de infección por donde viajan las bacterias. (d y e) El tubo de infección entra en contacto con las células del cortex de la raíz y las atraviesa a través de un puente citoplásmico. (f) Ramificación del tubo de infección y liberación de las bacterias al citoplasma de las células del primordio nodular, donde se diferencian a bacteroides.

A través de la MPB se produce el intercambio de señales y nutrientes entre la planta y la bacteria. De este modo se libera el  $\text{NH}_4^+$ , producto de la fijación de  $\text{N}_2$  (O'Gara and Shanmugam, 1976), o el grupo hemo de la leghemoglobina, de origen bacteriano (Nadler and Avissar, 1977) y se incorpora el fotosintato proporcionado por la planta (De Bruijn et al., 1989; Werner, 1992). A su vez, la MPB previene del disparo de una respuesta de defensa de la planta contra un posible patógeno intracelular (Nap and Bisseling 1990; Verma 1992; Werner 1992). La MPB contiene algunas nodulinas: la nodulina 24 se localiza en la superficie de la MPB, orientada hacia el espacio peribacteroidal (Cheon et al., 1994); la nodulina 25 se propone que participa en la formación de la matriz peribacteroidal y en el intercambio de metabolitos entre los dos simbiontes (Küster et al., 1994); la nodulina 26 (Miao et al., 1992) es una proteína intrínseca de membrana que forma un poro por donde entran los ácidos dicarboxílicos al bacteroide, además de otros iones y pequeños metabolitos (Weaver et al., 1994).

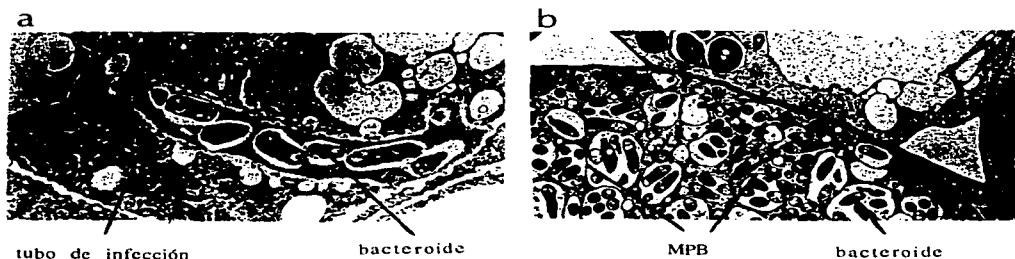


Fig 6: Micrográficas electrónicas de (a) un tubo de infección en crecimiento con bacterias en su interior; (b) bacteroides rodeados de la membrana periacterodal en las células infectadas de un nódulo determinado

Durante la formación del primordio del nódulo se inducen genes que participan en división celular, tales como ciclinas y el gen *cdc2* (Yang et al., 1994), y genes de nodulinas como *Mtr1p1* (Cook et al., 1995), *ENOD2* (van de Wiel et al., 1990) *ENOD12* (Scheres et al., 1990a), *ENOD5*, *ENOD3*, *ENOD14* (Scheres et al., 1990b), *ENOD40* (Kouchi and Hata, 1993; Yang et al., 1993; Asad et al., 1994; Matvienko et al., 1994) y *MtPRP4* (Wilson et al., 1994)(Tabla I).

Mtripl es una peroxidasa que se expresa durante las primeras etapas de la infección (3 horas postinoculación) o pocas horas después de la adición del factor de nodulación. Su expresión declina a las 48 h después de la infección. La expresión de Mtrip se localiza en una zona de la raíz cercana a la punta donde aún no han emergido los pelos radiculares (Cook et al., 1995). Esta peroxidasa podría actuar facilitando la infección mediante la modificación de la pared celular del pelo radicular. También podría contribuir a la reparación de la pared celular en el sitio de infección o, alternativamente, su inducción podría ser una respuesta similar a la desencadenada en la interacción planta-patógeno, para restringir la infección por *Rhizobium* (Cook et al., 1995).

ENOD2 es una proteína rica en hidroxiprolina localizada en el parénquima nodular (Van de Wiel et al., 1990). Su expresión se induce de 7 a 10 días después de la infección o la inoculación con el factor de nodulación (Lauridsen et al., 1993). Su probable función es la de formar una barrera de difusión al oxígeno formando parte de la pared celular modificada del parénquima (Govers et al., 1990).

ENOD12 es una proteína rica en prolina que forma parte de la pared celular del tubo de infección (Scheres et al., 1990b). Se expresa muy tempranamente, 2-3 horas después de la adición del factor Nod, en las células de la epidermis de la raíz, antes y durante la emergencia de los pelos radiculares (Journet et al., 1994). Su expresión se induce en las células por las que pasa el tubo de infección y en aquellas que aún no lo tienen. En los nódulos maduros, ENOD12 se expresa en las células de origen meristemático de la parte distal de la zona de infección.

ENOD5 es un arabinogalactano rico en prolina que también parece formar parte del tubo de infección (Scheres et al., 1990a). Su expresión se induce en la epidermis de la raíz pocas horas después de la infección o de aplicar a la planta el factor de nodulación (Houarth et al., 1993) y en las células infectadas del primordio nodular (Vijn et al., 1995).

ENOD3 y ENOD14 tienen clusters de cisteína que sugieren que son proteínas que unen metales. Se inducen en zonas contiguas y solapadas del nódulo pero sólo en las células infectadas (Scheres et al., 1990a).

Tabla I. Características de las principales nodulinas tempranas estudiadas

<b>Nodulinas tempranas (ENOD)</b>	<b>Cinética de expresión</b>	<b>Localización</b>	<b>Características</b>	<b>Función propuesta</b>	<b>Referencia</b>
Mitrip1	primeras etapas de la infección o pocas horas después de la adición del factor Nod. Su expresión declina 48h postinfección	zona cercana a la punta de la raíz		peroxidasa	(Cook et al., 1995)
ENOD2	etapas tempranas de nodulación (7 a 10 d postinfección) y nódulo maduro	parénquima nodular (pared celular)	proteína rica en OH-prolina	barraera de difusión al O <sub>2</sub>	(van de Wiel et al., 1990) (Govers et al., 1990) (Lauridsen et al., 1993)
ENOD12	2-3 h después de la infección o la adición del factor Nod  nódulo en desarrollo  nódulo maduro	epidermis de la raíz en zona de emergencia de pelos radiculares  células por las que pasa o pasará el tubo de infección  células de origen meristemático	proteína rica en OH-prolina	forma parte de la pared celular del tubo de infección	(Scheres et al., 1990a) (Jourmet et al., 1994)
ENOD5	pocas horas después de la infección o la adición del factor Nod y nódulo en desarrollo	epidermis de la raíz y células infectadas del primordio nodular	arabinogalactano rico en prolina	forma parte de la pared celular del tubo de infección	(Vijn et al., 1995). (Scheres et al., 1990b) (Houarth et al., 1993)

<b>Nodulinas tempranas (ENOD)</b>	<b>Cinética de expresión</b>	<b>Localización</b>	<b>Características</b>	<b>Función propuesta</b>	<b>Referencia</b>
ENOD3 ENOD14	nódulo en desarrollo	zonas contiguas y sobrelapadas del nódulo pero sólo en las células infectadas	tienen grupos de cisteína	proteínas que unen metales	(Scheres et al., 1990a).
ENOD40	primeras etapas de la infección nódulo en desarrollo nódulo maduro	periciclo de la raíz primordio nodular periciclo del parénquima vascular y células no infectadas	ARNm con una estructura altamente estable pero no traducible	comunicación entre estela y cortex de la raíz control del crecimiento y diferenciación de la planta	(Kouchi and Hata, 1993) (Yang et al., 1993) (Matvienko et al., 1994) (Asad et al., 1994) (Crespi et al., 1994)
MiPRP4	nódulo en desarrollo y nódulo maduro	meristemo nodular	proteína rica en OH-prolina	modificación de la pared celular de las células del nódulo	(Wilson et al., 1994)

ENOD40 se expresa en nódulos inducidos por *Rhizobium* o por el factor de nodulación, y en nódulos espontáneos de alfalfa. Durante las primeras etapas de la nodulación se expresa en el periciclo de la raíz y en el primordio nodular. En los nódulos maduros ENOD40 se localiza en el periciclo del parénquima vascular del nódulo y en las células no infectadas (Kouchi and Hata, 1993; Yang et al., 1993; Asad et al., 1994; Matvienko et al., 1994). También aparece en estadíos tempranos del desarrollo de raíces laterales, en las células del periciclo que van a dar lugar al primordio de la raíz lateral (Papadopoulou et al., 1996). El gen *enod40* codifica para un ARNm con una estructura altamente estable pero no traducible (Crespi et al., 1994). Se ha propuesto que juega un papel en la comunicación (ej, respecto al balance hormonal) entre la estela de la raíz y el cortex, a partir del cual se va a originar el nódulo (Yang et al., 1993). También se ha sugerido que ENOD40 está involucrada en el control del crecimiento de la planta y la diferenciación, participando en procesos organogénicos en los que esté involucrado un cambio en el estatus hormonal de la planta (Crespi et al., 1994).

MtPRP4 es una proteína de pared celular rica en prolina, encargada como muchas otras de remodelar la matriz extracelular de la planta. Se expresa tempranamente durante el desarrollo del meristemo nodular y en las células meristemáticas del nódulo indeterminado maduro (Wilson et al., 1994).

En respuesta a la infección por *Rhizobium* también se inducen proteínas involucradas en la transducción de señales, como el factor de transcripción NMH7 de alfalfa (Heard and Dunn, 1995).

En plantas de clima tropical como frijol, soya y *Vigna* las células corticales que son susceptibles al factor Nod y que originan el primordio del nódulo son células del cortex externo. Sin embargo, en leguminosas de clima templado como alfalfa, chícharo y trébol, el nódulo se forma a partir de las células que se dividen en el cortex interno. El mecanismo por el cual el factor de nodulación induce división celular es desconocido aún, pero las evidencias indican que el factor Nod causa un cambio en el balance de fitohormonas auxina/citoquinina. La aplicación de citoquininas (Cooper and Long, 1994) y de inhibidores del transporte polar de auxinas (Hirsch et al., 1989) inducen la formación de estructuras similares a nódulos donde se expresan nodulinas tempranas: por ejemplo, en *Sesbania rostrata*, *Enod 2* se expresa en nódulos inducidos por citoquininas (Dehio and Bruijn, 1992)



El factor de nodulación actúa a concentraciones muy bajas, similares a las fitohormonas. El hecho de que dispere respuestas en tres tejidos diferentes de la raíz (epidermis, corteza y periciclo), sugiere que podría existir un receptor en la epidermis cuya unión al factor de nodulación desencadenara la generación de un segundo mensajero que dispararía la respuesta en los tejidos adyacentes (Myllona et al., 1995).

En adición a los factores Nod, otros compuestos bacterianos podrían estar involucrados en las respuestas inducidas en la planta. Análisis genéticos han demostrado la existencia de glicoconjugados bacterianos que son esenciales para el desarrollo normal y funcionamiento del nódulo: polisacáridos extracelulares capsulares, lipopolisacáridos de la membrana externa y glucanos cíclicos presentes en el espacio periplásmico (Brewin et al., 1994). Como otro ejemplo podemos citar a la proteína NodO. El gen *nodO* de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae* codifica para una proteína que se secreta y no participa en la biosíntesis del factor. Está involucrada en la formación de canales para iones novalentes. NodO podría amplificar la acción de los factores Nod en la membrana plasmática de la planta (Sutton et al., 1994).

Algunos resultados indican que la presencia de la bacteria es necesaria para la inducción de ciertas nodulinas, aunque la fijación de nitrógeno determine los niveles finales de expresión. Por ejemplo: en nódulos inefectivos de frijol (Nod+ Fix-) se induce la expresión de la enzima uricasa II. A los 12 días después de la inoculación se alcanzan niveles de expresión similares a los del nódulo silvestre. Sin embargo, a los 21 días, los niveles decaen, sugiriendo que la acumulación de uricasa II depende de condiciones derivadas de una activa fijación de nitrógeno (Padilla et al., 1991). En chícharo (*Pisum sativum*), nódulos mutantes con bacteroides en su interior pero no fijadores de nitrógeno, expresan nodulinas como ENOD2 y dos leghemoglobinas distintas; sin embargo, los niveles de expresión son inferiores a los alcanzados en nódulos silvestres (Suganuma et al., 1995).

#### **d. Organogénesis del nódulo**

Una vez que la bacteria se libera del tubo de infección se diferencia a bacteroide en la célula infectada y el primordio nodular se diferencia a nódulo fijador de nitrógeno. Existen dos tipos de nódulos en leguminosas: nódulos indeterminados y determinados. Los nódulos indeterminados son típicos de leguminosas de clima templado que

transportan preferentemente amidas. Son nódulos cilíndricos con un meristemo de actividad persistente. Existe un gradiente de desarrollo que comienza en este meristemo y pasa por una zona de prefijación, donde tiene lugar la infección, una interzona, donde se induce la fijación de nitrógeno, una zona de fijación y una zona de senescencia donde los bacteroides son degradados por la planta. El nódulo está rodeado de un parénquima vascular atravesado por haces vasculares que no se cierran en el extremo y de un cortex externo (Vasse et al., 1990) (Fig. 7). Los nódulos determinados son típicos de leguminosas de clima tropical y subtropical, como el frijol y la soya, que transportan como forma nitrogenada preferentemente ureidos. Son nódulos esféricos con un meristemo de actividad limitada. Un cortex externo rodea a un parénquima vascular atravesado por haces vasculares que irrigan al nódulo. La zona central está compuesta por células infectadas por la bacteria y células no infectadas (Hirsch et al., 1992) (Fig. 8). Las células infectadas son de mayor tamaño y en ellas se lleva a cabo la fijación del  $N_2$ . Las células no infectadas son de menor tamaño y parecen estar involucradas en el transporte del nitrógeno fijado. Estas células contienen una gran cantidad de peroxisomas y un retículo endoplásmico muy desarrollado que se continúa a través de plasmodesmos, de tal forma que todas las células no infectadas están interconectadas y constituyen una red más o menos continua que conecta la zona central del nódulo con los haces vasculares (Newcomb et al., 1985; Selker, 1988). A través de esta red se transportan los ureidos.

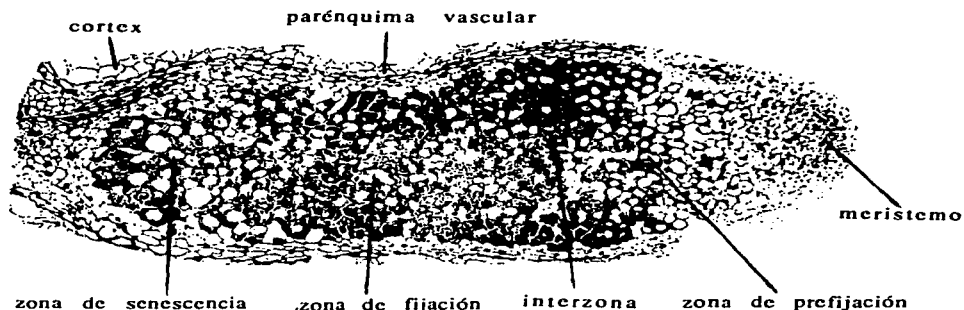


Fig 7: Micrografía de un corte longitudinal de un nódulo indeterminado.

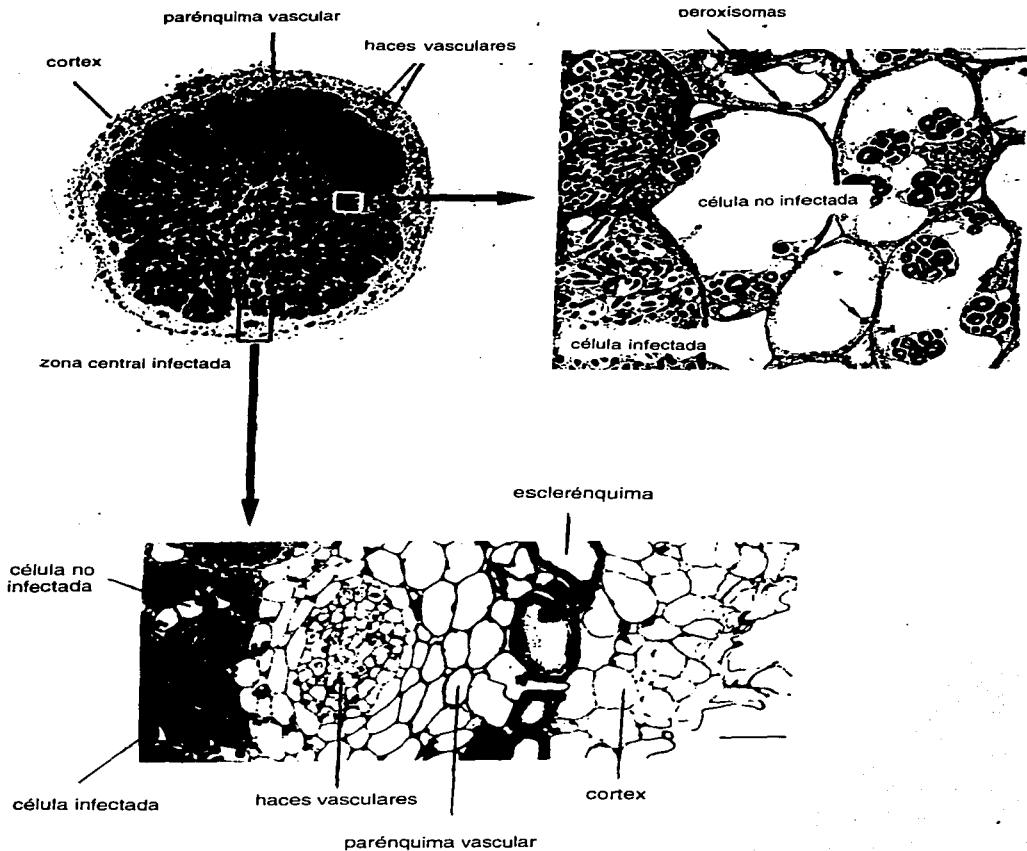


Fig 8: Micrografías de un nódulo determinado donde se muestran los distintos tipos celulares que lo componen.

### **e. Funcionamiento del nódulo.**

La planta deriva hacia el nódulo fotosintatos en forma de sacarosa (Hawker, 1985) que el bacteroide utiliza como fuente de carbono y energía para su mantenimiento y para la fijación de nitrógeno. En el interior de las células infectadas del nódulo, la bacteria se diferencia a bacteroide: cambia su morfología celular e induce la expresión de genes para la fijación de nitrógeno, genes *fix* y *nif*. El bacteroide reduce el  $N_2$  atmosférico a  $NH_4^+$  gracias a la acción de la enzima nitrogenasa. La planta, por su parte, también induce la expresión de genes que van a permitir el funcionamiento óptimo del nódulo y por tanto una eficiente asimilación del nitrógeno fijado. Durante esta etapa se expresan las denominadas nodulinas tardías.

#### **e1. Regulación de la expresión de nodulinas**

La expresión de los genes de la planta puede estar regulada por factores de desarrollo y medioambientales. Estos factores, entre los que se encuentran señales de la planta y la bacteria, controlan directa o indirectamente la expresión temporal y espacial (célula-, tejido- y órgano-específica) de los genes de nodulinas. El factor de nodulación por sí solo es capaz de inducir la expresión de muchos genes de la planta, entre los que se encuentran los genes de nodulinas tempranas. La expresión de las nodulinas tardías necesita en muchos casos de la presencia de la bacteria. Se ha sugerido que el factor BBFI (Bacterial Binding Factor I) aislado del rizobio *Azorhizobium caulinodans* es una proteína reguladora de unión a ADN que podría controlar la expresión de genes de nodulinas tardías en la planta *Sesbania rostrata* (Welters et al., 1993). Aparentemente las señales de expresión para distintas nodulinas están conservadas entre las distintas leguminosas, independientemente del tipo de nódulo, determinado o indeterminado, que produzcan (Lauridsen et al., 1993). Prueba de ello es que muchos promotores de nodulinas han dirigido la expresión correcta de sus genes reporteros en plantas transgénicas heterólogas, tanto temporal como órgano-específica. Por otro lado existen factores que actúan en *trans* que regulan diferencialmente la expresión de las nodulinas tempranas y tardías.

#### **e2. Regulación de los niveles de oxígeno en el nódulo.**

*Rhizobium* es una bacteria aerobia que necesita oxígeno para llevar a cabo su metabolismo. La fijación de nitrógeno es un proceso que requiere de gran cantidad de energía y la bacteria la obtiene a través de procesos oxidativos. Sin embargo, el proceso de fijación de nitrógeno es

altamente sensible al  $O_2$ , debido a que el cofactor MoFe de la nitrogenasa se desnaturaliza irreversiblemente por  $O_2$  (Shaw and Brill, 1977). Existen varias estrategias para solventar este problema:

Justo antes de la fijación de nitrógeno se induce en el nódulo la expresión de la leghemoglobina (Lbs). Es la proteína más abundante del nódulo, constituyendo un 25% de la proteína total soluble. El péptido globina es codificado por un gen de la planta y la bacteria sintetiza el grupo prostético hemo. La leghemoglobina está involucrada en el transporte de  $O_2$  y por tanto es capaz de facilitar la difusión de este gas a los bacteroides a la vez de controlar la concentración interna del  $O_2$  en los distintos compartimentos del nódulo (Wittenberg et al., 1990). Las Lbs son productos de una familia multigénica. Las distintas isoformas parecen estar asociadas con distintas afinidades por  $O_2$  y su expresión se induce en distintos estadios durante el desarrollo y funcionamiento del nódulo (Appleby, 1984).

Por otro lado, el parénquima del nódulo está constituido por células que poseen muy poco espacio intercelular. De este modo constituye una barrera natural a la difusión de oxígeno (Witty et al., 1986). ENOD2 es una nodulina temprana rica en hidroxiprolina que se ha localizado en el parénquima vascular del nódulo (Van de Wiel et al., 1990). Se ha propuesto que ENOD2 es una proteína de pared celular que podría contribuir a la formación de una barrera de difusión de  $O_2$  en el cortex interno del nódulo.

### **e3. Flujo de carbono hacia el bacteroide**

Durante la simbiosis la planta suministra al bacteroide la fuente de carbono necesaria para mantener la respiración de la bacteria, con la consiguiente obtención de ATP y poder reductor para la fijación de  $N_2$ , y proveer esqueletos de carbono para la asimilación y transporte de compuestos nitrogenados. Se han identificado algunas enzimas del metabolismo de la planta que aumentan sus niveles de expresión durante la simbiosis, como la fosfoenol piruvato carboxilasa (PEP carboxilasa) que transforma fosfoenol piruvato en málico, el compuesto que se ha propuesto atraviesa la MPB hacia el bacteroide. Otras enzimas cuya síntesis también aumenta son la sacarosa sintasa y la nodulina GmN56 de soya que codifica para una enzima homóloga a isopropil malato sintasa y homocitrato sintasa (Kouchi and Hata, 1995).

#### **e4. Asimilación del nitrógeno fijado**

El amonio, producto de la fijación del  $N_2$ , se excreta al citoplasma de las células no infectadas y se incorpora a glutamina gracias a la acción de las enzimas glutamina sintetasa (GS) y glutamato sintasa (GOGAT). Cada una de estas enzimas está presente en la planta como múltiples isoformas codificadas por familias de genes (Schubert, 1986; Lam et al., 1995; Marsolier et al., 1995). En plantas de frijol, se induce un aumento de la expresión de la subunidad  $\gamma$  de la GS en el nódulo (Lara et al., 1983). Aunque en un principio se pensó que este péptido era nódulo específico, se han detectado niveles de ARNm en tallos, peciolo y cotiledones verdes (Bennett et al., 1989a; Bennett et al., 1989b). En los nódulos indeterminados, típicos de leguminosas templadas, glutamina y asparagina son las formas nitrogenadas que se exportan al resto de la planta. Por el contrario, en los nódulos determinados, la glutamina se incorpora a la síntesis de purinas *de novo* junto con otros compuestos procedentes del metabolismo celular. La oxidación de estas purinas se lleva a cabo en su mayoría en las células no infectadas del nódulo, dando lugar a los ureidos, alantoína y ácido alantoico, compuestos nitrogenados que se transportan al resto de la planta (Fig 9).

#### **e5. Ureidos**

Los ureidos son compuestos orgánicos nitrogenados que contienen uno o más grupos ureido ( $NH_2-CO-NH-$ ). Están presentes en una gran cantidad de organismos superiores e inferiores. En plantas superiores juegan un papel esencial en el metabolismo, transporte y almacenamiento de nitrógeno. Alantoína, ácido alantoico y citrulina son los ureidos más comunes en plantas.

##### **I. Papel de los ureidos durante la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa**

Durante la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa la bacteria es capaz de fijar el nitrógeno atmosférico a un compuesto nitrogenado asimilable por la planta: el amonio. En leguminosas de origen tropical, como frijol, soya o cowpea el amonio se deriva a la formación de ureidos como compuestos de transporte y almacén de nitrógeno. Diversas evidencias indican que la producción de ureidos está íntimamente relacionada con la fijación de nitrógeno. Por un lado, las plantas noduladas tienen mayor concentración de ureidos que las no noduladas. Por otro, la eliminación de los nódulos de una planta o la adición de nitrato al medio resultan en una disminución de los niveles de alantoína y ácido alantoico en la planta (Schubert and Boland, 1990). En leguminosas noduladas de clima

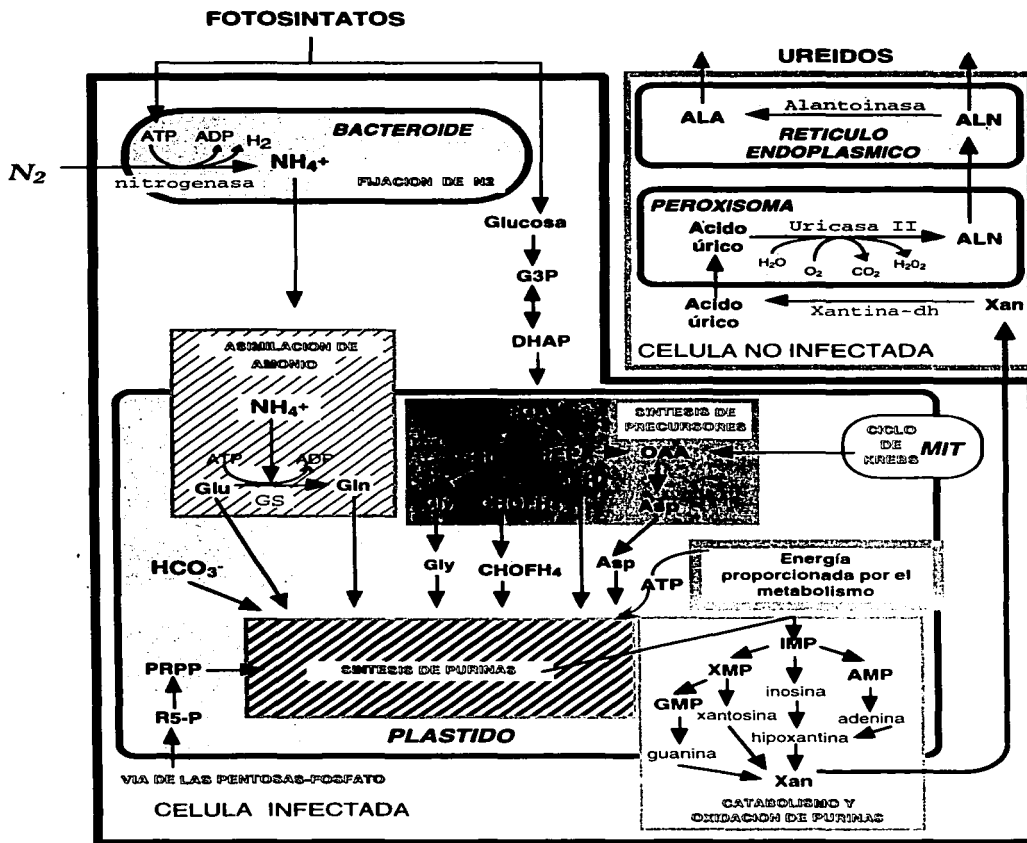


Fig 9: Vías de asimilación de amonio, biosíntesis y catabolismo de purinas en nódulos exportadores de ureidos. Abreviaturas por orden alfabético: ALA, ácido alantoico; ALN, alantoina; AMP, adenosina monofosfato; Asp, ácido aspártico; CHOFG<sub>4</sub>, metenil tetrahidrofolato; DHAP, dihidroxiacetona fosfato; Gln, glutamina; Glu, ácido glutámico; Gly, glicina; GMP, guanosina monofosfato; GS, glutamina sintetasa; G3P, gliceraldehído 3-fosfato; IMP, MIT, mitocondria; inosina monofosfato; NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, amonio; OAA, ácido oxalacético; PEP, fosfoenolpirúvico; PGA, fosfogliceraldehído; PRPP, fosforribosil pirofosfato; R5-P, ribosa 5-fosfato; Ser, Serina; Xan, xantina; XMP, xantossina monofosfato.

tropical, los ureidos constituyen del 50 al 99% del nitrógeno orgánico de la savia. Sin embargo, plantas no noduladas y plantas noduladas suplementadas con nitrato transportan preferentemente amidas, aunque también contienen una proporción variable de ureidos en el xilema. En plantas de *Phaseolus vulgaris* no noduladas o alimentadas con amonio, se han encontrado niveles significativos de ureidos en la savia en comparación con otras leguminosas tropicales (del 13 al 40% del nitrógeno orgánico). Los ureidos se exportan del nódulo hacia el resto de la planta donde se acumulan o se catabolizan.

## II. Papel de los ureidos durante el desarrollo

Los ureidos también están involucrados en la translocación de nitrógeno durante la ontogenia y la germinación de la semilla (Polayes and Schubert, 1984) y durante el establecimiento de la plántula (este trabajo). Durante el desarrollo y llenado de la semilla el nitrógeno de los ureidos es utilizado para la síntesis de proteínas de reserva en la semilla. Los ureidos no entran a la semilla como tal, sino que se degradan en la cubierta y el producto de su catabolismo alimenta al embrión.

Durante la germinación y más intensamente durante el establecimiento de la plántula el proceso es inverso: se sintetizan ureidos como formas para transportar nitrógeno, que luego se utilizan en la síntesis de proteínas de la plántula en crecimiento. Los ureidos en estos procesos constituyen un bajo porcentaje del total del nitrógeno transportado por la planta. El resto del nitrógeno se transporta en forma de amidas: glutamina y asparagina.

## III. Biosíntesis de ureidos

La biosíntesis de ureidos implica la asimilación de amonio ( $\text{NH}_4^+$ ), la síntesis de purinas y su oxidación (Reynolds et al., 1982). En los nódulos la producción de ureidos proviene de la síntesis *de novo* de purinas, sin embargo en los cotiledones pueden formarse a partir de purinas *de novo* o sintetizarse a partir de la degradación de ácidos nucleicos o el reciclado de otras purinas. Esto es lógico al pensar que durante la germinación se produce una hidrólisis masiva de ARN (y posiblemente también de ADN) que elevan los niveles de purinas.

Para la síntesis de purinas y ureidos en el nódulo se requiere un constante aporte de precursores (Fig. 9): el fosforribosil pirofosfato (PRPP) constituye el sitio de anclaje de los constituyentes del anillo de



purinas; la glutamina aporta dos grupos amida; el aspártico dona el grupo amino; la glicina se incorpora íntegra en las posiciones C<sub>4</sub>, C<sub>5</sub> y N<sub>7</sub>; el meteniltetrahidrofolato y el formiltetrahidrofolato aportan grupos metilo y el CO<sub>2</sub> se incorpora en la posición C<sub>6</sub> para dar lugar al anillo de purinas. Este carbono es luego eliminado por la acción de la uricasa II.

La planta es la que provee esqueletos de carbono, tanto para mantener el metabolismo de la bacteria como para la formación de compuestos nitrogenados en las células vegetales. Se considera que el malato es la principal fuente de carbono vegetal que recibe el bacteroide en el nódulo (Suganuma et al., 1987).

La síntesis de ureidos en los nódulos de leguminosas está compartimentalizada. A partir de las purinas sintetizadas *de novo* en los plástidos de las células infectadas, se produce IMP, XMP y xantina que a su vez son convertidos en ácido úrico gracias a la acción de la xantina deshidrogenasa. Esta enzima se ha localizado tanto en células infectadas como no infectadas. La enzima uricasa II transforma el ácido úrico en alantoína. Este paso se lleva a cabo en los peroxisomas de las células no infectadas del nódulo. En el retículo endoplásmico de estas células, la alantoinasa transforma la alantoína a ácido alantoico. Alantoína y ácido alantoico son los compuestos nitrogenados que se transportan al resto de la planta a través de los haces vasculares que irrigan al nódulo.

#### IV. Catabolismo de ureidos

El principal órgano donde se catabolizan los ureidos es la hoja. La alantoína y el ácido alantoico se oxidan hasta producir 4 moléculas de amonio, 2 moléculas de dióxido de carbono y una molécula de glioxilato a partir de la cual se producen glicina y serina (Fig. 10). El nitrógeno liberado es reasimilado y utilizado para síntesis de aminoácidos, ácidos nucleicos, proteínas u otros compuestos nitrogenados. El resto de los ureidos que se acumulan se metabolizan más tarde en el desarrollo y proveen de fuente de nitrógeno adicional para el llenado de la semilla.

#### V. Significado biológico de los ureidos

El hecho de que los nódulos determinados producidos por plantas tropicales sinteticen ureidos como compuestos nitrogenados de transporte y almacén y los nódulos indeterminados, típicos de plantas templadas, sinteticen amidas, no debe ser algo casual.

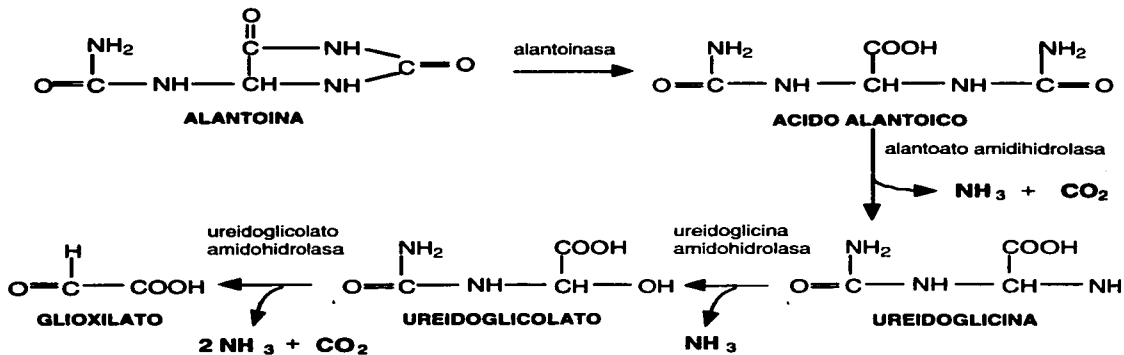


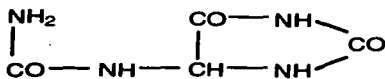
Fig 10: Esquema general del catabolismo de ureidos

El clima tropical al que se han adaptado plantas como el frijol, la soya y *Vigna* se caracteriza por altas temperaturas y abundancia de agua. Los ureidos son relativamente menos solubles en agua que las amidas. Sin embargo, los nódulos determinados tienen una estructura que permite un flujo de agua mayor a través de los haces vasculares. Además, la abundancia de agua y las altas temperaturas solventan el problema de la insolubilidad. Sin embargo, la baja solubilidad de alantofina y ácido alantoico podría ser una ventaja para secuestrar nitrógeno en tejidos y órganos de almacén.

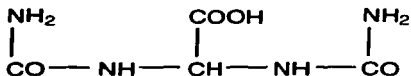
Por otro lado, las altas temperaturas causan un aumento en la tasa de fotorrespiración de las plantas, con la consiguiente pérdida de carbono. Se ha postulado que una de las razones de la planta para usar este ciclo que se pensaba futil es la de obtener una alta disponibilidad de  $\text{NH}_3$ , y así poder moverlo a procesos de biosíntesis o almacén. El catabolismo de los ureidos en la hoja aumenta los niveles de  $\text{CO}_2$ . En estas condiciones la fotorrespiración se reduce, porque aumentaría la relación  $\text{CO}_2/\text{O}_2$ , favoreciéndose la fijación de  $\text{CO}_2$  por la Rubisco. Por ello, el transporte de ureidos podría ser considerado como un mecanismo para reducir la fotorrespiración, con el consiguiente ahorro de energía y la efficientización de la fotosíntesis.

Por último, los ureidos son posiblemente las formas más eficientes para el transporte de nitrógeno desde el punto de vista de ahorro de carbono, ya que según la estructura de su molécula, la relación C/N=1, es decir, para transportar un átomo de nitrógeno se necesita un átomo de carbono (Fig. 11). Las amidas, asparagina y glutamina, tienen una relación C/N=2 ó 2.5, por lo que el gasto de C para el transporte de nitrógeno es mayor (Atkins, 1982).

### UREIDOS

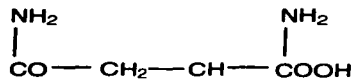


ALANTOINA (C/N=1)

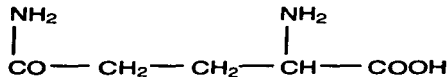


ACIDO ALANTOICO (C/N=1)

### AMIDAS



ASPARAGINA (C/N=2)



GLUTAMINA (C/N=2.5)

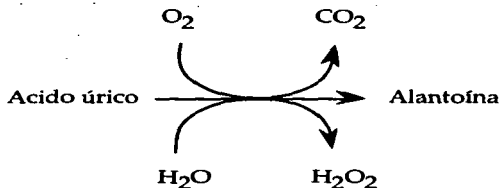
Fig 11: Esquema de los ureidos y las amidas más comunes presentes en plantas. Se indican la relación Carbono/Nitrógeno de cada una de las moléculas

Se ha postulado que las plantas transportan ureidos en condiciones de limitación de carbono: por ejemplo, durante la fijación de nitrógeno donde la bacteria necesita mucho aporte de fotosintato, o durante la germinación y el establecimiento de la plántula antes de que la planta desarrolle sus primeras hojas fotosintéticas (Mothes, 1961; Polayes and Schubert, 1984). La formación de ureidos en plantas no noduladas parece ser parte de una respuesta fisiológica a la limitación de aporte de carbono. El transporte de ureidos se postula por tanto como una estrategia para el ahorro de carbono.

## URICASA II

### a. Uricasa II en los organismos eucariotas.

Uricasa II, o urato oxidasa, es una enzima conservada a lo largo de la evolución eucariota. Cataliza la conversión de ácido úrico en alantofina y  $\text{CO}_2$ , con la liberación de  $\text{H}_2\text{O}_2$ .



La proteína uricasa II ha sido caracterizada en una gran diversidad de organismos: *Aspergillus nidulans* (Oestreich and Scazzocchio, 1993), *Aspergillus flavus* (Legoux et al., 1992), humano (Wu et al., 1992), rata (Reddy et al., 1988), ratón (Wu et al., 1989), mono (Wu et al., 1989), conejo (Motojima and Goto, 1989), cerdo (Wu et al., 1989), *Drosophila melanogaster* (Wallrath et al., 1990), *Drosophila pseudoobscura* (Friedman et al., 1992), *Glycine max* (Nguyen et al., 1985) y *Vigna aconitifolia* (Lee et al., 1993). En todos ellos uricasa II conserva los motivos característicos de esta enzima: el sitio de unión a  $\text{Cu}^{+2}$ , la señal de importe a peroxisomas, y dos motivos conservados de función desconocida.

La función que desempeña uricasa en las distintas especies en las que se ha estudiada, es variada. Algunos organismos, como el hongo ascomiceto *Aspergillus nidulans*, usan el ácido úrico y otras purinas como única fuente de nitrógeno (Scazzocchio et al., 1982). El alga verde *Chlamydomonas reinhardtii* (Devi Prasad, 1983) y otras algas como *Chlorella* (Birdsey and Lynch, 1962) y *Xanthophyceae* (Miller and Fogg, 1958), usan purinas y derivados de purinas como fuente nitrogenada para su crecimiento. La uricasa en estos organismos está involucrada en vías metabólicas de asimilación. La mosca del vinagre, *Drosophila melanogaster*, expresa un gen de urato oxidasa específicamente durante un determinado estado de desarrollo, en el que el exceso de purinas, usado comúnmente para la síntesis de nucleótidos y pterinas, se convierte en ácido úrico y se excreta por los túbulos de Malpigio

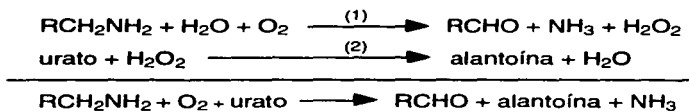
(Wallrath et al., 1990). En mamíferos, esta enzima se localiza preferentemente en el hígado y, como en *Drosophila*, tiene un papel detoxificador en el metabolismo. El gen de urato oxidasa de humanos presenta dos mutaciones sinsentido, que hacen inactiva a la enzima en el hombre (Wu et al., 1989). Este es también el caso de otros homínidos, como el chimpancé y el orangután, en los que mutaciones deletéreas en el gen de uricasa hacen a la urato oxidasa no funcional (Wu et al., 1992). Como ya hemos visto, en las plantas leguminosas de origen tropical como *Phaseolus vulgaris* (frijol), *Glycine max* (soya) y *Vigna*, uricasa II participa en la biosíntesis de ureidos durante la simbiosis que estas plantas establecen con bacterias del suelo de los generos *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* (Sánchez et al., 1991; Verma et al., 1992b).

### b. Uricasa II como enzima catabólica en plantas

Uricasa II es una enzima que participa en el metabolismo nitrogenado de leguminosas, concretamente en la vía de síntesis de ureidos. Cataliza la descarboxilación oxidativa del ácido úrico para convertirlo en el ureido alantoína.

Es una proteína tetramérica formada por cuatro subunidades iguales que se sintetizan en polisomas libres y se exportan al peroxisoma, donde se ensamblan y forman la proteína activa. La señal de importe al peroxisoma está constituida por el tripéptido SKL (Ser-Lys-Leu) localizado en el extremo carboxilo de la proteína.

En plantas existe otra actividad degradadora de úrico denominada uricasa I: es una actividad producida por la acción combinada de una diamino oxidasa (1) y una peroxidasa (2) (Tajima et al., 1983)



La actividad uricasa I fue detectada en radículas de plántulas de soya no infectadas (Tajima and Yamamoto, 1975), aunque también está presente en raíces inoculadas. Su pH óptimo de actividad es 8.0 a diferencia de la uricasa II de nódulo, cuyo pH óptimo es 9.5. Anticuerpos monoclonales creados contra la uricasa de nódulos no cruzan con la urato oxidasa detectada en radículas (Bergmann et al., 1983). Esta actividad necesita de la presencia de un cofactor, cadaverina, cuya

concentración regula la actividad degradadora de úrico (Tajima et al., 1983; Tajima et al., 1985). La cadaverina se produce en condiciones aeróbicas y su formación se inhibe por adición de nitrato exógeno. La adición de cadaverina no afecta la actividad de uricasa de nódulos (Tajima et al., 1983).

#### **c. Características y propiedades de la enzima**

Uricasa II ha sido aislada de nódulos de cowpea (Rainbird and Atkins, 1981) soya (Legocki and Verma, 1979; Lucas et al., 1983; Bergmann et al., 1983) y frijol (Sánchez et al., 1987), presentando su monómero tamaños de 50-, 33- y 35-KDa respectivamente. En nódulos de soya, la enzima tiene un  $pI=9.0$  y un pH óptimo de actividad de 9.5 (Lucas et al., 1983; Bergmann et al., 1983). Es una metaloproteína que posee  $Cu_2^+$  como grupo prostético. El análisis de aminoácidos indica que no contiene residuos de cisteína (Cys) pero sí una gran proporción (aproximadamente el 22%) de residuos de glicina (Gly)(Bergmann et al., 1983).

#### **d. Distribución de uricasa II en la planta**

Uricasa II se localiza preferentemente en los peroxisomas de las células no infectadas del nódulo simbiótico de leguminosas tropicales como frijol, soya y *Vigna* (Hanks et al., 1981; Nguyen et al., 1985; Vandenbosch and Newcomb, 1986; Kouchi et al., 1989). Experimentos de hibridación *in situ* confirman que el ARNm de uricasa II se localiza en las células no infectadas del nódulo de frijol (Taté et al., 1994; Papadopoulou et al., 1995). Mediante inmunolocalización, uricasa II también se ha detectado en el parénquima vascular de nódulos efectivos de soya (Vaughan and Stegink, 1987).

En órganos distintos al nódulo, se ha detectado transcrito y actividad de uricasa en cotiledones e hipocotilos de plántulas de soya durante el desarrollo de la semilla y la germinación temprana (Tajima et al., 1991). En cotiledones en desarrollo el transcrito de uricasa II alcanza su máximo nivel durante el periodo de llenado de la semilla, 29 días después de la floración (Takane et al, 1997). El cDNA de uricasa II de cotiledones de soya es idéntico a nivel de su secuencia nucleotídica que el caracterizado de nódulos de soya (Takane et al, 1997). En los cotiledones de plántulas de soya la uricasa II ha sido inmunolocalizada a nivel subcelular exclusivamente en los peroxisomas (Damsz et al 1994).

#### **e. Expresión de uricasa II en el nódulo**

La expresión de uricasa II en el nódulo simbiótico se incrementa

unas 100 veces, 2 ó 3 días antes de que inicie la fijación de nitrógeno (entre los días 11 y 13 después de la inoculación) (Bergmann et al., 1983; Sánchez et al, 1987; Papadopoulou et al., 1995) lo que sugiere que la inducción de su expresión no está relacionada con la efectividad del nódulo (Sánchez et al, 1987). Sin embargo, la fijación de nitrógeno sí es necesaria para alcanzar la máxima expresión de uricasa y para el mantenimiento de la misma, como lo prueban experimentos en los que la actividad uricasa se reduce al 50% en nódulos inefectivos (Nod+, Fix-) en comparación con nódulos silvestres (Nod+, Fix+) (Larsen and Jochimsen, 1986) (Fig 12).

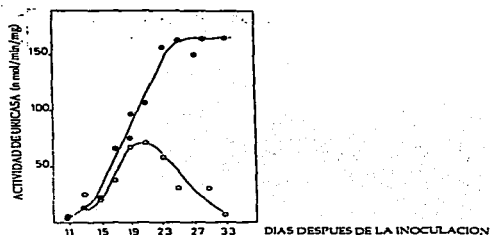


Fig 12: Actividad específica de uricasa II en extractos de nódulos colectados a distintos tiempos después de la infección. La infección se llevó a cabo con *Bradyrhizobium japonicum* 110: nod+, fix+ (●); *Bradyrhizobium japonicum* A3: nod+, fix- (○). Tomado de Larsen y Jochimsen, 1986

Uricasa II es una enzima esencial en la biosíntesis de ureidos. Esta vía de asimilación y transporte de nitrógeno se ha demostrado que es esencial para plantas transportadoras de ureidos: Lee et al. (1994) transformaron plantas de *Vigna aconitifolia* con ARN antimensajero de uricasa II. Además de observar un retraso en la biogénesis de los peroxisomas, las plantas presentaban síntomas de deficiencia de nitrógeno, como clorosis. Estos resultados indican por un lado, que la biogénesis de los peroxisomas podría estar acoplada a la síntesis de uricasa y, por otro lado, que cuando se reduce la síntesis de ureidos el transporte de amidas y otros compuestos nitrogenados no son suficientes para suplir los requerimientos nitrogenados de la planta.

#### **f. Antecedentes de uricasa II en el laboratorio**

Nuestro interés en el laboratorio ha estado enfocado hacia el estudio de la interacción simbiótica entre plantas leguminosas y bacterias del suelo. El proyecto de nodulinas ha tenido un enfoque metabólico y molecular

#### **f1. Purificación de la uricasa II de nódulos de *Phaseolus vulgaris* (Sánchez et al., 1987)**

La enzima uricasa II fue purificada a homogeneidad por métodos cromatográficos. Los datos de purificación indicaron que uricasa II constituye aproximadamente un 2% de la proteína total soluble del nódulo maduro. A partir de la enzima purificada de nódulo se obtuvieron anticuerpos policlonales anti-uricasa II que se usaron para estudiar la expresión de la enzima a lo largo del desarrollo del nódulo y para purificar ARNm de uricasa II mediante inmunoselección de polisomas.

#### **f2. Clonación del cDNA de uricasa II de nódulos de *Phaseolus vulgaris* (Sánchez et al., 1987)**

A partir de ARN poli(A) de nódulos de frijol de 18 días se construyó una genoteca de cDNA en el vector pUC19. De este banco específico de nódulo se aisló una clona de uricasa II de 900 pb usando como sonda un cDNA construido a partir del ARN polisomal inmunoseleccionado con el anticuerpo anti-uricasa. Las clonas se confirmaron mediante hibridación frente a la clona de uricasa nódulo-específica de soya.

#### **f3. Expresión de uricasa II durante el desarrollo del nódulo (ARNm, proteína y actividad)(Sánchez et al., 1987)**

Mediante análisis por northern y usando como sonda la clona de cDNA aislada, se detectó un transcrito de aproximadamente 1.3 Kb en nódulos de frijol. En otros tejidos analizados, raíces y hojas de plantas no infectadas, no se detectó el transcrito, llegándose a la conclusión de que uricasa II era una enzima nódulo específica. Durante el desarrollo del nódulo la expresión de uricasa II experimenta un aumento de unas 100 a 150 veces entre los días 11 y 13 después de la inoculación del frijol con *Rhizobium tropici* CIAT 899, es decir, 2 ó 3 días antes de que inicie la fijación de nitrógeno. Los niveles del transcrito alcanzan un máximo entre los días 13 y 20, en nuestras condiciones experimentales, y luego decaen ligeramente hacia el día 28 después de la infección, cuando el nódulo comienza a senescer (Fig. 13 A).



El antígeno de uricasa II se detecta mediante análisis por western en nódulos de 11 días después de la infección. No se detectó antígeno de uricasa II en extractos procedentes de hipocotilos, raíces y hojas de frijol (Fig. 13 B).

La actividad de uricasa se induce 100 veces durante el desarrollo del nódulo. En resumen, después del comienzo de la fijación de nitrógeno se detectan altos niveles de antígeno, de transcrito y de actividad de uricasa (Fig. 13 C).

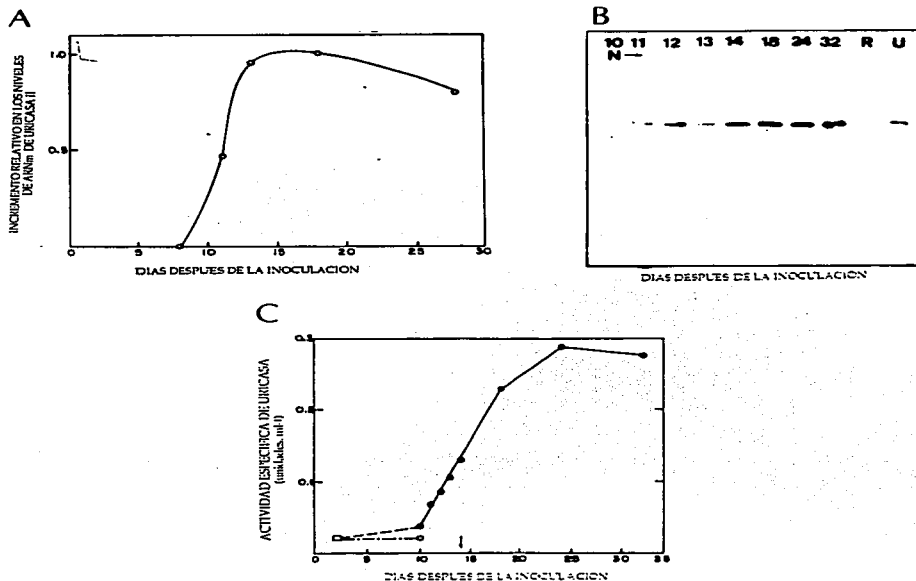


Fig 13: Cinética de expresión del ARNm (A), de la proteína (B) y de la actividad uricasa II (C) a lo largo del desarrollo del nódulo. R, raíz de frijol no inoculada; U, uricasa II purificada.

#### **f4. Expresión de uricasa II en nódulos inducidos por bacterias mutantes (Padilla et al., 1994)**

En el laboratorio se dispone de una serie de cepas mutantes de *Rhizobium*, capaces de formar estructuras similares a nódulos con características anatómicas y fisiológicas alteradas. Se analizó la expresión del gen de uricasa II en tres tipos de nódulos anómalos:

A. Nódulos vacíos: son nódulos no infectados, blancos y pequeños producidos por tres cepas diferentes de *R. etli* con mutaciones en los genes de lipopolisacáridos (CE109 Lps-); de producción de purinas (CE110 Pur-) y en el gen de citocromo c (CFN4202 Cit c-). Estas mutaciones bloquean la invasión bacteriana. En estos nódulos vacíos se expresan genes de nodulinas tempranas como ENOD2, pero no se detectan niveles de transcritos de nodulinas tardías como Leghemoglobina o nodulina 30. Parece ser que la inducción de las nodulinas tardías está condicionada a la liberación de la bacteria. Sin embargo, uricasa II considerada como una nodulina tardía, sí se expresa en estos nódulos, alcanzando niveles de transcrito del 10% en comparación con los nódulos normales. Esto sugiere que existe una regulación de la expresión de uricasa II previa a la liberación de la bacteria.

B. Nódulos de desarrollo lento: producidos por cepas de *Rhizobium* con capacidad infectiva limitada por poseer inserciones de Tn5 en genes de citocromos (CFN031 Cit o-) y de síntesis de purinas (CE106N Pur-), o producidos por una cepa no virulenta de *Agrobacterium tumefaciens* (AT42D) portadora del plásmido simbiótico de *Rhizobium etli*. Los nódulos producidos por estas cepas son pequeños, verdes o rosas tenues y pobremente infectados. Los niveles detectados de uricasa II son tres veces superiores a los encontrados en nódulos silvestres. Estos resultados se pueden explicar por el desarrollo anormal de estos nódulos, en los que existe una relación alterada entre el número de células infectadas y no infectadas.

C. Nódulos inefectivos: La expresión de uricasa II en estos nódulos es similar a la de la cepa silvestre. Sin embargo, cuando el nódulo no fija nitrógeno la expresión de uricasa decae. Esto indica que la fijación de nitrógeno no es el factor que dispara la inducción del gen de uricasa II pero sí es necesaria para el mantenimiento de su expresión, posiblemente porque la fijación de nitrógeno proporciona el sustrato para la biosíntesis de ureidos.

## LA GERMINACIÓN Y EL ESTABLECIMIENTO DE LA PLÁNTULA

La germinación es el periodo de desarrollo de la planta que abarca desde la captura de agua del suelo hasta la emergencia de la radícula. Las semillas contienen grandes cantidades de sustancias de reserva necesarias para soportar el crecimiento temprano de la plántula. Estas sustancias son principalmente carbohidratos (almidón, hemicelulosas y amiloides), grasas y aceites (triacilglicerol, fosfolípidos, glicolípidos y esteroides) y proteínas que se almacenan en los cuerpos proteicos o "protein bodies" (albúminas, globulinas, gluteolinas, prolaminas y zeínas). Las semillas también contienen en menor cantidad fitinas, alcaloides, lectinas, inhibidores de proteasas y oligosacáridos de rafinosa.

Cuando la semilla seca entra en contacto con el agua se produce el fenómeno de la imbibición, es decir la captura de agua gracias a la existencia de un gradiente de potencial hídrico ( $\Delta\Psi$ ), por medio del cual el agua fluye desde el suelo con alto potencial hídrico, hasta la semilla seca con potencial hídrico bajo. La toma de agua del suelo desencadena la inducción del metabolismo de la semilla y se activan la respiración, las actividades enzimáticas y la síntesis de ARN y proteínas. Cuando la semilla empieza a respirar se induce la glucólisis, el ciclo de las pentosas fosfato y el ciclo de Krebs. El sustrato de la glucólisis durante la germinación proviene de la hidrólisis de reservas, generalmente triacilglicerol, sacarosa y oligosacáridos de rafinosa y sus derivados. Sin embargo, la mayor movilización de reservas ocurre postgerminación y la glucólisis utiliza como sustratos sacarosa y oligosacáridos. A partir de estas vías la semilla obtiene ATP y poder reductor que utiliza en las rutas de biosíntesis. El metabolismo de los organelos también se activa y, por ejemplo, las mitocondrias activan la fosforilación oxidativa que es la principal fuente de ATP para la germinación. También se produce un aumento en el número de polisomas para la síntesis de proteínas. Los embriones sintetizan ARNm's y en 30 a 90 minutos se incorporan a polisomas en el retículo endoplásmico. La síntesis de proteínas también puede ocurrir sin que haya habido síntesis de mensajeros ya que en la semilla seca se conservan la mayoría de los componentes del complejo de síntesis de proteínas, incluyendo ARNm. Estos transcritos se protegen quedándose en el núcleo o bien asociándose con proteínas en el citoplasma, formando partículas de ribonucleoproteínas (RNP). Luego serán traducidos rápidamente a proteínas necesarias para la germinación. Según esto, durante las primeras horas de la imbibición se

produce un cambio en el conjunto de transcritos, ya que muchos ARNm residuales se degradan y se sintetizan ARNm nuevos.

La presión positiva que ejerce el agua que entra en la célula produce la expansión de la pared celular y el consiguiente aumento o elongación celular. Este fenómeno sumado a división celular da lugar a la emergencia de la radícula, con lo que finaliza la germinación propiamente dicha. A partir de que emerge la radícula comienza el establecimiento de la plántula. Durante este periodo se produce una gran movilización de las reservas almacenadas en la semilla que se convierten en formas fácilmente transportables a los órganos en crecimiento con altas tasas metabólicas. La liberación de las reservas disminuye a medida que la plántula crece y se hace fotosintética.

El principal carbohidrato de reserva en la semilla es el almidón. En la hidrólisis del almidón participan enzimas como la  $\alpha$ -amilasa, dextrinasas límite y  $\alpha$ -glucosidasas. Estas tres enzimas se sintetizan *de novo* en la capa de aleurona de muchas semillas en respuesta a la hormona ácido giberélico ( $GA_3$ ) liberada por el embrión.

Las proteínas de reserva almacenadas en los cuerpos proteicos se catabolizan en la semilla gracias a la acción de endo-, amino- y carboxipeptidasas con la consiguiente liberación de péptidos y aminoácidos. Estos aminoácidos van a formar parte de esqueletos de carbono para la síntesis de otras proteínas o se utilizan como fuente de carbono en la respiración oxidativa. En cotiledones de semillas de leguminosas, en el momento en el que se hidrolizan las proteínas de reserva, se produce un aumento en la actividad de las enzimas GS/GOGAT y asparagina sintetasa que intervienen en la síntesis de glutamina y asparagina. Estos aminoácidos, denominados amidas, son los principales transportadores de nitrógeno en leguminosas. Sin embargo, también se producen ureidos como formas de transporte de compuestos nitrogenados. En germímulas de soya, los ureidos constituyen el 0.7 y 6% del nitrógeno total de cotiledones y ejes embrionarios, respectivamente (Polayes and Schubert, 1984).

El catabolismo de ácidos grasos (triacilgliceroles) saturados y su conversión a carbohidratos se lleva a cabo a través de cuatro procesos: lipólisis,  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos, ciclo del glioxilato y gluconeogénesis. En estos procesos están involucrados el citosol y tres organelos yuxtapuestos en la célula: cuerpos oleicos ("oil bodies"),

mitocondrias y glioxisomas (Fig. 14).

En los cuerpos oleicos el triacilglicerol se transforma a ácidos grasos por la acción de lipasas. En los glioxisomas los ácidos grasos entran a la vía de la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos, en la que se liberan progresivamente moléculas de AcCoA (acetil coenzima A). Esta molécula se incorpora en los mismos glioxisomas al ciclo del glioxilato, que en general convierte dos moléculas de acetato en una molécula de succínico. El succínico sale del glioxisoma y se incorpora al ciclo de Krebs en la mitocondria. A través de la gluconeogénesis, los ácidos tricarbóxicos se transforman en azúcares. La sacarosa, producto de la gluconeogénesis, es utilizada como sustrato de procesos oxidativos durante el desarrollo de la plántula. Para la oxidación de ácidos grasos insaturados se necesita de la acción de enzimas como *cis*- y *trans*- isomerasas, epimerasas e hidratasas, presentes en los glioxisomas.

En la semilla se produce también una hidrólisis masiva de ácidos nucleicos durante las primeras horas de la germinación. Aumentan así los niveles de purinas que se dirigen bien al reciclaje de ácidos nucleicos o bien a la síntesis de ureidos como formas de movilización de nitrógeno. Estudios de germinación en cotiledones de plantas de soya han demostrado que durante el desarrollo temprano de la plántula el metabolismo de ureidos está inducido transitoriamente (Matsumoto et al, 1977; Fujihara and Yamaguchi, 1978; Polayes and Schubert, 1984). En estos cotiledones existe actividad de uricasa y de alantoinasa, alcanzándose un máximo 2-4 días después de la imbibición (Polayes and Schubert, 1984). Los ureidos se producen en cotiledones de plantas de soya noduladas y no noduladas (Matsumoto et al, 1977) y en presencia o ausencia de nitrato exógeno (Polayes and Schubert, 1984). Estos resultados sugieren que la formación de ureidos es independiente de la fijación de nitrógeno y de la captación de nitrato por las raíces de las plantas.

Los cotiledones están conectados a los órganos en crecimiento a través de una red de haces vasculares, de modo que los productos de la hidrólisis de las sustancias de reserva pueden ser translocados a través del floema. La entrada de compuestos al floema se lleva a cabo gracias a la presencia de células de transferencia u otras células parenquimáticas que rodean al xilema y el floema. Estas células tienen una superficie muy extensa de modo que se aumenta el área de transporte.

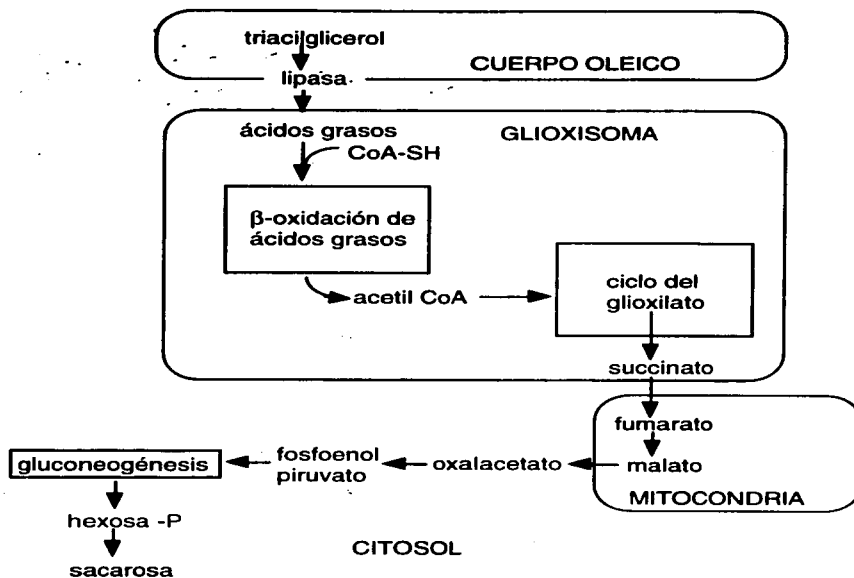


Fig 14: Catabolismo de ácidos grasos en los cotiledones de plántulas en desarrollo

En las plantas de crecimiento epigeo, como el frijol, los cotiledones emergen del suelo y se exponen a la luz. Se produce entonces una transformación de glioxisomas a peroxisomas, desapareciendo las enzimas del ciclo del glioxilato y la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos. En ambos tipos de organelos se conserva la actividad oxidasa (entre las que se incluye la urato oxidasa) con la consiguiente formación de peróxido de hidrógeno, eliminado por la acción de catalasas y peroxidasas.

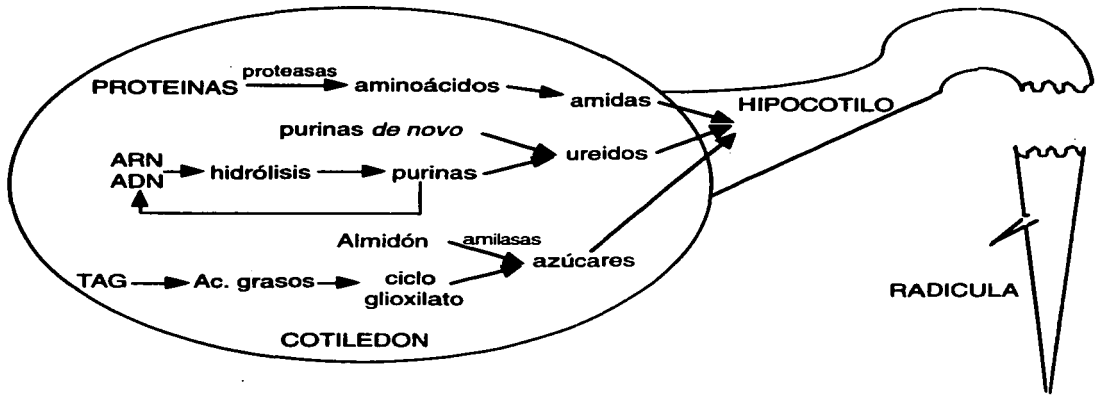


Fig 15: Metabolismo general de los cotiledones durante la germinación y el desarrollo de la plántula.

## **JUSTIFICACIÓN**

Uricasa II ha sido considerada como una nodulina. Según la definición de van Kammen (1984), las nodulinas son proteínas codificadas por la planta que se expresan exclusivamente en nódulos. Sin embargo, actualmente esta definición es más amplia, pues se ha visto que muchas de las llamadas nodulinas son proteínas que desempeñan un papel en otros órganos de la planta, pero que ven aumentada su expresión durante la simbiosis.

En trabajos preliminares con uricasa II en frijol, se catalogó a esta proteína como nodulina, debido a que sólo se detectó expresión en nódulos simbióticos, y no en raíces u hojas de la planta adulta (Sánchez et al., 1987). Sin embargo, estudios sobre el metabolismo de ureidos en otras plantas como soya, indican que estos compuestos nitrogenados se transportan a niveles considerables durante la germinación y desarrollo de la plántula.

Con estas premisas, decidimos investigar la presencia de uricasa II en órganos de frijol distintos al nódulo, concretamente en cotiledones, raíces e hipocotilos, durante los primeros estadios de desarrollo de la planta, es decir, durante la germinación y el establecimiento de la plántula, cuando el transporte de ureidos es considerable. Este trabajo dio lugar al artículo que se presenta a continuación.



## **OBJETIVOS**

### **A. OBJETIVOS GENERALES**

Estudiar la expresión del gen de uricasa II de frijol en otros órganos distintos al nódulo y en otro estado de desarrollo distinto a la simbiosis.

### **B. OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Clonar el cDNA de uricasa II de frijol para determinar su secuencia de nucleótidos y de aminoácidos, y establecer homologías con urato oxidasas de otros organismos. Esta clona será útil para ser usada como sonda en los estudios posteriores.

2. Determinar mediante Southern genómico el número de genes de uricasa II que posee el genoma de *P. vulgaris*, usando como sonda la clona de cDNA de uricasa II aislada.

3. Estudiar mediante experimentos tipo northern la cinética de expresión del transcrito de uricasa II en distintos órganos de la planta de frijol (cotiledones, raíces e hipocotilos), durante la germinación y el establecimiento de la plántula.

4. Estudiar mediante experimentos tipo western la expresión de la proteína uricasa II en los cotiledones, raíces e hipocotilos de frijol, a lo largo de la germinación y el desarrollo de la plántula.

5. Determinar mediante experimentos de hibridación *in situ* la localización del transcrito de uricasa II en los distintos órganos de la plántula de frijol.

6. Determinar mediante inmunodetección la localización de la proteína uricasa II en los distintos órganos de la plántula de frijol.

**Characterization of the common bean uricase II and its  
expression in organs other than nodules**

**Federico Sánchez\***

**Departamento de Biología Molecular de Plantas**

**Instituto de Biotecnología. UNAM**

**Avenida Universidad 2001. Apdo 510-3**

**Cuernavaca, Morelos CP 62210**

**México**

**Telephone: 525-6227666**

**Fax: 52-73-136600**

**e-mail: federico@ibt.unam.mx**

**Characterization of the common bean uricase II and its  
expression in organs other than nodules**

**Nieves Capote-Mañez, Federico Sánchez<sup>1</sup>**

**Departamento de Biología Molecular de Plantas, Instituto de Biotecnología,  
Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos CP 62210 México**

**This work was supported by grants from DGAPA-UNAM IN 3000993 and USAID  
12367**

**Corresponding author; fax: 52-73-136600. e-mail: federico@ibt.unam.mx**

**Abbreviations: AP, alkaline phosphatase; BCIP, 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-  
phosphate; DIG, digoxigenin; NBT, 4-Nitro blue tetrazolium chloride.**

## ABSTRACT

Uricase II is a purine metabolic enzyme highly induced in root nodules during the symbiosis established between legumes and bacteria of the genus *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*. Here we describe the characterization of bean nodule uricase II cDNA and show that uricase II is encoded by a single gene in the *Phaseolus vulgaris* genome. This gene is also expressed in cotyledons, roots and hypocotyls during bean seedling establishment, and an anti-uricase antibody recognizes the protein in different seedling organs. Uricase II has also been found in *Leucaena* seedlings, suggesting that it participates during seedling establishment in legumes that do not transport ureides. A 50-kD polypeptide that is detected by the anti-uricase antibody is found in cotyledons during seedling development. This higher molecular weight form is also detected in developing roots and hypocotyls, but not in nodules. *In situ* hybridization experiments in root seedlings showed uricase II transcripts in the metaxylem-parenchyma cells and phloem fibers of the vascular system.

## INTRODUCTION

Ureides are important components of the nitrogen metabolism in a wide variety of higher plants (Pate et al., 1980; Thomas and Schrader, 1981; Reynolds et al., 1982) including the Leguminosae, Boraginaceae, Platanaceae, Hippocastanaceae and Aceraceae families (Mothes, 1961). Legumes can be classified into amide or ureide transporters depending on the nitrogenous compounds that they export from the nodule to the shoot. In tropical legumes such as bean, soybean and cowpea, a change in the transported nitrogen compounds from amides (glutamine and asparagine) to ureides (allantoin and allantoic acid) occurs when they are in association with nitrogen-fixing bacteria of the genus *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* (Matsumoto et al., 1977; Fujihara and Yamaguchi, 1980).

Root nodules are highly specialized symbiotic organs wherein the differentiated bacteria or bacteroids reduce atmospheric nitrogen to ammonia (Sánchez et al., 1991; Verma et al., 1992; Mylona et al., 1995). Ammonium ions are excreted into the plant's cell cytoplasm, assimilated into glutamine and then incorporated into *de novo* purine biosynthesis (Schubert, 1986). In the infected and non-infected cells of the nodule, these purines are catabolized and consequently converted into ureides which are transported to the aerial parts of the plant (Matsumoto et al., 1977; Pate et al., 1980). Xanthine dehydrogenase, uricase-II and allantoinase, the last three enzymes in the ureide biosynthetic pathway, are predominantly located in the non-infected cells of the nodule (Atkins et al., 1980; Hanks et al., 1981; Bergmann et al., 1983; Schubert, 1986; Schubert and Boland, 1990).

Uricase II (urate oxidase; EC 1.7.3.3) catalyzes the oxidative cleavage of uric acid into allantoin and CO<sub>2</sub>, liberating H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. This enzyme has been purified from cowpea (Rainbird and Atkins, 1981), soybean (Legocki and Verma, 1979; Lucas et al., 1983; Bergmann et al., 1983) and bean (Sánchez et al., 1987) nodules. It is preferentially synthesized on free polysomes during nodule development and is localized in the peroxisomes of non-infected cells of the nodule (Hanks et al., 1981; Nguyen et al., 1985; Vandenbosch and Newcomb, 1986; Kouchi et al., 1989). In effectively nodulated bean plants, uricase II expression and activity are induced to high levels before N<sub>2</sub> fixation begins (Sánchez et al., 1987; Padilla et al.,

1991), and the enzyme constitutes approximately 2% of the total soluble protein of the nodule (Sánchez et al., 1987). In empty nodules induced by *Rhizobium* mutants, the amount of uricase II mRNA is 10% of that observed in nodules infected with wild-type bacteria, suggesting that events during nodule development (e.g., nodule induction, bacteria release, nitrogen fixation) are important for the regulation of the uricase II gene expression (Padilla et al., 1991).

Low uricase II activity has been detected in soybean callus tissue, where it is regulated by oxygen availability (Larsen and Jochimsem, 1986), and uricase activity has also been found in soybean cotyledons and hypocotyls during seed development and early germination (Tajima et al., 1991). The uricase II protein has been immunocytochemically detected in the peroxisomes of soybean cotyledon cells (Damsz et al., 1994). In this plant, uricase II is encoded by a small gene family (Tajima et al., 1993). Uricase activity (uricase-I) has also been detected in soybean seed radicles, but this activity was found to be due to a diamine oxidase/oxidase system with different characteristics than nodule uricase (Tajima et al., 1983; Tajima et al., 1985). Uricase II cDNA clones have been isolated from soybean nodule (Bergmann et al., 1983; Nguyen et al., 1985) and cotyledon (Takane et al., 1997) libraries, and from *Vigna aconitifolia* (Lee et al., 1993), *Canavalia liniata* (Kim and An, 1993), and *Phaseolus vulgaris* (Sánchez et al., 1987; Papadopoulou et al., 1995) nodule libraries.

The present work describes the isolation and characterization of the bean nodule uricase II cDNA and demonstrates that a single copy of the uricase II gene is present in the *Phaseolus vulgaris* genome. In addition to the nodule, this gene is expressed in different organs of the seedling and the adult plant. We have also investigated the patterns of uricase II mRNA and protein in cotyledons, roots and hypocotyls during germination and seedling establishment. In bean organs other than nodules, a 50-kD polypeptide immunologically related to uricase II was detected and its initial characterization is reported. Finally, we show the *in situ* localization of the uricase transcript in the seedling roots, and discuss the biochemical and developmental significance of these results.

## MATERIAL AND METHODS

### Growth of plants

Bean seeds (*Phaseolus vulgaris* cv. Negro Jamapa) were surface-sterilized in 10% (v/v) commercial sodium hypochlorite for 10 min and then rinsed several times with sterile water. Germination was carried out on moist towel paper in sterile trays at 28°C in the dark. Four d after imbibition, the seedlings were grown in an approximately 12 h light/12 h dark photoperiod. The plants were not inoculated with any *Rhizobium* bacteria. Cotyledons, roots and hypocotyls were harvested at different times after imbibition (0 h, 12 h, 1 d, 2 d, 3 d, 4 d, 7 d, and 10 d), frozen immediately in liquid nitrogen and stored at -70°C. Germination and growth conditions were the same for *Leucaena leucocephala* and *Zea mays*.

### Isolation and DNA sequencing of the uricase II cDNA clone

A *Phaseolus vulgaris* uricase-II clone (pSKuri) was isolated from a  $\lambda$ -Zap cDNA library constructed from 20-d-old bean nodules, using an incomplete uricase-II cDNA (Sánchez et al., 1987) as a probe. The nucleotide sequence of the uricase-II cDNA clone was determined by the dideoxy chain termination method (Sanger et al., 1977) using the Sequenase 2.0 kit (United States Biochemical). The nucleotide and the deduced amino acid sequence were compared to the soybean and cowpea uricase-II using the GeneWorks program, version 2.3.1.

### Genomic Southern blot

Bean DNA was extracted from *Phaseolus vulgaris* cv. Negro Jamapa etiolated hypocotyls, and digested with EcoRI, EcoRV, HindIII and XbaI, restriction enzymes. Twenty five  $\mu$ g of each restricted DNA were loaded per lane and fractionated on a 0.8% (w/v) agarose gel (Maniatis, 1982). Southern blot analysis was performed as described by Maniatis (1982), with a EcoRI-NcoI fragment from pSKuri (see Fig. 1A) labeled with  $\alpha$ -[<sup>32</sup>P]dCTP (Multiprime DNA labeling system kit, Amersham) as a probe. The hybridized filter was washed from 2X SSC, 0.1% (w/v) SDS at 55°C to 0.1X SSC, 0.1% (w/v) SDS at 65°C in three steps, and exposed to Kodak X-OMAT film for three days.

### RNA isolation and northern analysis

Plant material, previously harvested and frozen as described above, was



ground in a chilled coffee mill. Total RNA from cotyledons, uninfected roots and hypocotyls was extracted according to the procedure described by de Vries et al. (1988). Thirty  $\mu\text{g}$  of total RNA were loaded per lane in 1% (w/v) agarose gels containing 2.2 M formaldehyde as described (Campos et al., 1987). After transfer to a nylon membrane (Hybond N+, Amersham), the RNA was hybridized with the uricase II cDNA labeled with  $\alpha$ -[ $^{32}\text{P}$ ]dCTP using the multiprime DNA labeling system kit (Amersham). In order to check that equal amounts of RNA were loaded, the gels were stained with ethidium bromide and photographed. In addition, the filters were also hybridized with a 28S rRNA probe. The hybridized filters were washed from 2X SSC, 0.1% (w/v) SDS at 55°C to 0.1X SSC, 0.1% (w/v) SDS at 65°C, in three steps, and exposed to Kodak X-OMAT film. The hybridization signals were quantified using the 1-D Analysis Program from Bio-Image Products (Millipore).

#### **Protein extraction and western blot analysis**

Frozen cotyledons, uninfected roots or hypocotyls were ground in a coffee mill and incubated in 2.5 volumes of extraction buffer (30% (w/v) sucrose, 30 mM Tris-HCl (pH 7.4), 2% (w/v) polyvinylpyrrolidone) for 10 min at 4°C. The extracts were centrifuged at 12,000 g for 25 min at 4°C. The supernatant fluids were filtered through two layers of Miracloth and precipitated with 60% acetone (v/v). Total soluble proteins were determined by the method of Bradford (1976). The samples were analyzed by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis using the Laemmli discontinuous buffer system (Laemmli, 1970). For western blot analysis, proteins were electroblotted onto nitrocellulose (Immobilon-P Transfer Membrane, Millipore) as described by Maniatis (1987), blocked in 5% (w/v) commercial nonfat dry milk in TBST (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.05% (v/v) Tween 20), incubated with anti-uricase antibodies (1:1000) and detected with goat anti-rabbit antibodies coupled to horseradish peroxidase (Amersham) (1:5000) using the ECL Amersham detection kit, as indicated by the suppliers. The exposure time for the cotyledon western blot was longer than for root and hypocotyl westerns. For protein visualization, the gels were stained with Coomassie brilliant blue (Merril, 1990) or the nitrocellulose filters were stained with Ponceau S. Anti-uricase is a rabbit polyclonal antibody obtained against uricase II, which was purified to homogeneity from common bean nodules (Sánchez et al., 1987).

### **V8 protease digestion**

V8 protease digestion of the crude extracts from 4-d-old (days after imbibition) bean seedling roots was made in polyacrylamide gels as previously described (Cleveland et al., 1977). Anti-uricase (1:1000) and sheep anti-rabbit-AP (Boehringer Mannheim) (1:5000) antibodies were used to detect the resulting peptides.

### **Urate oxidase activity**

Two grams of various bean seedling organs were homogenized with 6 mL of extraction buffer (50 mM of potassium phosphate buffer containing 50 mM KCl, 5 mM Mg-acetate, 1 mM DTT, 1 mM EDTA, 4% (w/v) polyvinylpyrrolidone). The extracts were centrifuged at 12,000 g for 25 min at 4°C. The supernatants were filtered through glass fiber and centrifuged at 50K for 15 min. The resulting supernatants were precipitated with 60% acetone (v/v), resuspended in 2 mL of 85 mM glycine pH 10, and passed through a Sephadex G-25 column (0.7 X 26 cm) using 85 mM glycine pH 10 as eluent. Urate oxidase activity was measured as described previously (Bergmann et al., 1983), except that 85 mM glycine pH 10 buffer was used. Units of uricase activity are in nmol of oxidized uric acid  $\cdot$  min<sup>-1</sup>  $\cdot$  mg<sup>-1</sup> protein. Protein concentration was determined by the Bradford procedure (1976).

### ***In situ* hybridization**

Uninfected roots from 4-d-old bean seedlings and 21-d-old nodules were harvested and fixed at room temperature overnight, in 4% (w/v) paraformaldehyde, 0.25% (v/v) glutaraldehyde in 10 mM sodium phosphate buffer pH 6.8, supplemented with 1 M NaCl, with the first hour under vacuum. Fixed tissues were dehydrated and embedded in paraffin following the method described by Van de Wiel et al. (1990). Seven  $\mu$ m thick sections were cut in a manual microtome. The uricase II cDNA clone (pSKuri) linearized with HindIII was transcribed from the T7 promoter and a 441 base antisense RNA labeled with (DIG)-11-rUTP (Boehringer Mannheim) was obtained (see Fig. 1A). The same plasmid digested with NcoI was transcribed from the T3 promoter to obtain a 367 base sense RNA labeled by the same method (see Fig. 1A). To estimate the yield of the assay, the transcripts were analyzed by agarose-gel electrophoresis and ethidium bromide staining. The amount of labeled RNA generated was measured by direct detection: dilutions of the labeled transcripts and a

control DIG-dUTP labeled DNA (5  $\mu\text{g/mL}$ ) were blotted on a nylon membrane (Hybond-N+, Amersham) and detected with the anti-DIG-AP antibody (Boehringer, Mannheim) (1:15000) and the AP substrates NBT and BCIP. Sense and antisense RNAs were hybridized to the tissue sections, according to the protocol described by McKhann and Hirsch (1993). Equal amount of labeled sense and antisense probes were added to the corresponding sections. The hybridization and antibody incubation times were the same for the sense and antisense experiments. Probed slides were dried, mounted in Poly/Mount (Polysciences, Inc., Warrington, PA), examined under a Zeiss microscope and photographed with 16X, 40X and 100X objectives using 35 mm, 100 ASA Kodak film.

## RESULTS

### Isolation and characterization of a uricase II cDNA clone

From a  $\lambda$ -Zap common bean cDNA library constructed from 20-d-old nodule RNA, a uricase-II clone (pSKuri) (Fig. 1A) was isolated using an incomplete nodule uricase-II cDNA clone (Sánchez et al., 1987) as a probe. This clone contains the entire uricase II coding region. Its nucleotide and deduced amino acid sequences were obtained and compared to the nodule soybean (*Glycine max*) and cowpea (*Vigna aconitifolia*) uricase-II sequences (Fig. 1B). The uricase II coding regions share a high percentage of identity at the nucleotide (90% with soybean; 94% with cowpea) and amino acid levels (91% with soybean; 95% with cowpea). The bean uricase II cDNA encodes a protein of 308 amino acids that contains the four conserved motifs present in all urate oxidases described previously, namely the V-L-K-T-T-Q-S motif (Bairoch, 1991) and the S-P-S-V-Q-K/H/N-T-L-Y motif, each of unknown function, the H-X-H-X-F motif that joined to a third His (residue 266 in bean uricase) forms the protein copper-binding site proposed by Wu et al., (1989), and the tripeptide S-Basic-L (S-K-L for bean, soybean and cowpea uricase II), the signal for peroxisome entry localized at the carboxyl terminus of the protein (Motojima and Goto, 1989; Wallrath et al., 1990; van den Bosch, 1992; Miura et al., 1994) (Fig. 1B). The 3' non-coding region of 294 bp contains a putative polyadenylation signal sequence (AATAAA) located 67 nucleotides from the poly(A).

### Genomic Southern blot

To estimate the complexity of uricase II genes in the *P. vulgaris* genome, we analyzed total bean DNA digested with several restriction enzymes using Southern blots. The EcoRI-NcoI uricase II cDNA fragment was used as a probe (see Fig. 1A). We detected a single hybridization band in DNAs restricted with EcoRI and XbaI, and two bands in DNAs restricted with HindIII and EcoRV (Fig. 2). The later are restriction sites located at the first intron of the uricase II gene (unpublished results)(see Fig. 1A). We conclude that, unlike soybean where it has been proposed that uricase II is encoded by a small gene family (Tajima et al., 1993), in the bean genome, this gene exists as a single copy.

### **Expression of uricase II mRNA in different organs of adult bean plants**

To determine if the single bean uricase II gene was expressed in a nodule-specific manner, we analyzed the expression of this gene in organs other than nodules using northern blot analysis. We found a ~1.2 Kb transcript in roots, stems and leaves of uninfected adult bean plants (Fig. 3), of the same size as the one found in nodules (Sánchez et al., 1987), indicating that uricase II expression was not restricted to this organ. However, transcript levels in nitrogen-fixing nodules were much higher than those of the other organs examined.

### **Expression pattern of bean uricase II mRNA during seed germination and seedling establishment**

Nitrogen is actively mobilized during seedling development (Polayes and Schubert, 1984). Because uricase II is a key enzyme in nitrogen metabolism, we investigated the expression of the uricase II gene in different seedling organs during seed germination and seedling establishment.

Total RNA from cotyledons, roots and hypocotyls from germinated *P. vulgaris* seedlings was analyzed by northern blots using the nodule uricase II cDNA as a probe. During seed germination (0 h, 4 h, 8 h and 12 h after imbibition) uricase II mRNA was not detected in the cotyledons. At 1 d post-imbibition, when the radicle has emerged and seedling growth starts, uricase II mRNA was first detected, reaching a maximum 4 d post-imbibition (Fig. 4A). Uricase II transcripts were not detected in the dry embryo radicle nor in radicles 12 h after imbibition. In developing roots, the uricase II transcript is detected 1 d post-imbibition, showing a similar induction pattern as in cotyledons (Fig. 4B). Constant uricase II mRNA levels were maintained in hypocotyls from 3 to 10 d after imbibition (Fig. 4C).

### **Expression pattern of bean uricase II protein during seed germination and seedling establishment**

Uricase II protein was also detected in the cotyledons, roots and hypocotyls of developing seedlings (Fig. 5A, 5B and 5C, respectively). Western blot analysis, showed not only the 35-kD polypeptide corresponding to the uricase II subunit (Sánchez et al., 1987) but in

addition, a novel 50-kD polypeptide not found in nodules. The 35-kD polypeptide was detected in dry seeds and cotyledons at 12 h, 1 d and 2 d after imbibition, whereas the 50-kD cross-reacting polypeptide was visible in proteins isolated from cotyledons 2 to 10 d after imbibition (Fig. 5A). In roots (Fig. 5B) and hypocotyls (Fig. 5C), both polypeptides appeared in similar proportion and at the same time in development, which was approximately coincident with the detection of the uricase II transcript in those organs. Both forms were maintained at constant levels during seedling establishment. Although the same amount of protein was loaded in the three experiments, the exposure times used in the root (Fig. 5B) and hypocotyl (Fig. 5C) westerns were considerably shorter than the used for the cotyledon western (Fig. 5A). These data indicate that the amount of uricase II protein with respect to the total soluble protein is higher in roots and hypocotyls than in cotyledons.

#### **Uricase II is present in amide-transporting legumes**

We analyzed total proteins from *Leucaena leucocephala* seedlings (a legume that preferentially transports amides as nitrogenous compounds during symbiotic conditions) and from a non-leguminous plant, *Zea mays*, by SDS-PAGE, and immunochemically with an anti-uricase II antibody. We detected the uricase II subunit (the 35-kD polypeptide) and the 50-kD protein, in 4-d-old roots and hypocotyls from *L. leucocephala* seedlings, and only the 50-kD form in 4-d-old cotyledons (Fig. 6), the same pattern found in bean seedlings. In 4-d-old *Z. mays* seedlings, no cross-reacting bands were detected in any organ analyzed.

#### **Immunological and enzymatic analysis of the 50-kD polypeptide**

To determine whether the 50-kD polypeptide was a modification product of the 35-kD protein or a different but immunologically related protein, we digested the 35- and 50-kD polypeptides with V8 protease, separated the reaction products on a SDS-PAGE gel and detected the resulting peptides with an anti-uricase antibody. The 50-kD protein digestion yielded three peptides of 34-, 7.9- and 7.3-kD (Fig. 7), and all digestion products were recognized by anti-uricase polyclonal antibody, supporting the idea that the 50-kD protein could be a modified form of the 35-kD uricase. V8 proteolysis of the 35-kD protein yielded four different peptides of approximately 11-, 7.6-, 6.9- and 5.8-kD, all of which were recognized by anti-uricase antibody. In a second experiment (Fig. 8), we

measured uricase-specific activity in cotyledon extracts from dry seeds to 10 d after imbibition. We detected similar uricase specific activity levels along all stages of cotyledon development. Cotyledons from 3 to 10 d after imbibition, those that only contain the 50-kD polypeptide (see Fig. 5A), had urate oxidase activity. These extracts were precipitated with 15% (v/v) TCA and analyzed by western blot, corroborating the presence of the 50-kD and not the 35-kD protein (data not shown). We also measured the uricase-specific activity in other bean seedling organs and mature nodules. These results are shown in Table I. A cotyledon extract from maize, where no protein immunorelated to bean uricase was detected (Fig. 6), was also included.

### **Spatial localization of uricase II transcripts in the roots of developing bean seedlings**

To determine the localization of the uricase II mRNA in bean developing roots, 4 d-post-imbibition roots were collected and examined by *in situ* hybridization. We used antisense and sense (as a control) DIG-labeled mRNAs as probes (See Material and Methods). Uricase II transcripts were detected in root vascular tissue (Fig. 9). In the xylem, the signal accumulated in the cytoplasm of the parenchyma cells which surround the metaxylem vessels (Fig. 9A, 9C). These cells have a living protoplasm at maturity as shown in the micrographs (Fig. 9E). Some of the cytoplasm is so closely appressed to the cell wall such that the signal seems to be over the cell wall. In the phloem, the signal was confined to the cytoplasm of phloem fibers (Fig. 9A, 9D). Although fibers are usually dead cells late in development, the fibers we analyzed have not lost their cytoplasm at this stage of development (4 d after imbibition) (Fig. 9F). We also performed *in situ* hybridization experiments on 21-d-old nodule sections, as a positive control. We detected the uricase II mRNA not only in the uninfected cells of the central tissue, as previously reported (Taté et al., 1994; Papadopoulou et al., 1995) but also in the nodule parenchyma cells and in the vascular tissue (Fig. 9G). No signal was detected in the infected cells nor in the outer cortex of the nodule. Sense controls did not exhibit any hybridization signal (Fig. 9B, 9H).

## DISCUSSION

Uricase II has been commonly studied in tropical legume nodules because of its participation in ureide biosynthesis during the symbiosis these plants establish with bacteria of the genus *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*. In this work we have demonstrated that this enzyme is also expressed in other bean organs (roots, stems and leaves)(Fig. 3), and that its expression is probably modulated when the plant needs to mobilize reduced nitrogen, i.e. during seedling establishment. The presence of a single uricase II gene in the bean genome (Fig. 2) suggests that different regulatory mechanisms for the uricase II gene, rather than differential regulation of several genes, account for its expression in response to the different stimuli of symbiosis and development.

Bean plants associated with nitrogen-fixing bacteria mainly transport nitrogenous compounds as ureides. However, even in non-nodulated bean plants, the transport of ureides constitutes about 13 to 42% of the total organic nitrogen in the xylem sap (Thomas and Schader, 1981). The uricase detected in the seedling (Fig. 5) and adult plant organs (Fig. 3) is probably maintaining this ureide transport rate during seedling and plant development. On the other hand, plants are carbon starved during seed germination and seedling establishment, before photosynthesis starts (Schubert and Boland, 1990). In these conditions, the biosynthesis of ureides, in which uricase II participates, may be a strategy for energy conservation (Mothes, 1961). The detection of the uricase II protein in *Leucaena leucocephala* seedlings (Fig. 6), an amide-transporter legume, suggests that this legume uses a similar strategy to improve the plant carbon economy during seedling development. Although we could not detect any uricase II antigen nor urate oxidase activity in *Zea mays* seedlings, under our experimental conditions, we cannot discard the possibility that this plant contains uricase II. Alternatively, maize plants could use a strategy other than transporting ureides to improve its carbon metabolism during seedling establishment.

The expression of the uricase II gene is induced in bean cotyledons at the onset of seedling development, approximately 1 d after imbibition, coinciding with the beginning of reserves mobilization (Figs. 4A). A massive hydrolysis of DNA and RNA takes place in the seed during



germination, elevating the levels of purines, which are substrates for ureide biogenesis (Polayes and Schubert, 1984), and may also participate in uricase II induction. The presence of uricase II transcripts in developing bean roots and hypocotyls (Fig. 4B, 4C), suggests that these organs are also able to synthesize ureides.

In addition to the uricase II subunit (35-kD polypeptide), we detected a uricase-related protein of 50-kD in developing cotyledons, roots and hypocotyls of bean seedlings, that interestingly, is not found in nodules. Tajima et al. (1991) reported the detection of a less abundant band of high molecular weight by immunoblot analysis of soybean cotyledon proteins with anti-uricase antibody. They suggested that this band could be the dimeric form of the uricase protein. Damsz et al. (1994) also reported the detection of uricase II and two high molecular weight polypeptides in proteins extracted from 28-d-old soybean nodules. However, the molecular mass of the 50-kD polypeptide (Fig. 5) does not correspond to a dimer of a 35-kD monomer, and the three peptides derived from its digestion with V8 protease have different sizes than those derived from the 35-kD protein (Fig. 7). This supports the idea that the 50-kD polypeptide we detected is not a dimeric form of the enzyme. The 50-kD polypeptide may be a modified version of the 35-kD protein, which could give rise to different sized peptides after V8 proteolysis. However, these putative modifications do not seem to be due to ubiquitination of the 35-kD uricase II subunit, as a signal for protein degradation, because anti-ubiquitin antibodies do not cross-react with the 50-kD band (data not shown). It is possible that a differential splicing of the uricase II mRNA in cotyledons, roots and hypocotyls, could give rise to a higher molecular weight protein, but northern analysis consistently showed only a single ~1.2 kb uricase II transcript in all organs including nodules (Fig. 3). Alternatively, the 35- and 50-kD polypeptides may represent related but distinct proteins encoded by different genes. The 50-kD protein could share reactive epitopes with the 35-kD uricase protein but the nucleotide sequence of the corresponding genes would not have enough identity to be detected by nucleic acid hybridization experiments. This possibility was explored by using lower stringent hybridization and washing conditions in the Southern and northern experiments. No differences from the results presented were found (data not shown).

Extracts from seedling cotyledons containing only the 50-kD polypeptide had urate oxidase activity (Fig. 8), suggesting that the immunologically-related protein has uricase activity. Uricase specific activity was maintained in bean cotyledons during all the stages of bean seedling development (from dry seeds to 10 d after imbibition)(Fig. 8). Further, we could also detect a higher uricase specific activity in roots and hypocotyls from 4 d bean seedlings (Table I), where both polypeptides are present. In contrast, Tajima et al. (1991) reported the presence of uricase activity in cotyledons from soybean seedlings, but this activity decreased 5 d after imbibition. Additionally, they reported lower uricase levels in developing soybean hypocotyls, which disappeared rapidly 2 d after imbibition.

The 35-kD uricase II polypeptide is present in the dry seed and remains in the cotyledon 12 h and 1 d after imbibition (Fig. 5A), although uricase II mRNA is not present at these stages of development (see Fig. 4A). It is likely that the uricase II protein that participates in uric acid biosynthesis during the seed-filling period, but not its mRNA, is maintained in the cotyledon during desiccation and early germination. The detection of the uricase II transcript coincides with the progressive disappearance of the 35-kD protein and the accumulation of the 50-kD polypeptide, further supporting the hypothesis that the 35-kD protein translated from its mRNA is modified to the 50-kD polypeptide. We are continuing with these investigations.

Uricase II transcripts have been localized by *in situ* hybridization in the non-infected cells of the central tissue of bean nodules (Taté et al., 1994; Papadopoulou et al., 1995). However, we have also detected uricase mRNA in the vascular tissue that traverses the nodule as well as in nodule parenchyma cells (Fig. 9G), confirming the results of Vaughun and Stegink (1987) who found uricase II in cells of the vascular parenchyma of effective nodules. In this work we have extended these localization studies to developing bean roots, 4 d after imbibition. Here, the signal for uricase II transcript was primarily detected in the metaxylem-parenchyma cells that surround the large xylem vessels (Fig. 9A, 9C), and in the phloem fibers (Fig. 9A, 9D). Electron microscopy showed that the phloem fibers from young roots appear to contain a living cytoplasm, as so do the parenchyma cells in which the uricase II signal is also detected (Fig. 9E,

9F). The metaxylem-parenchyma cells are considered to be active in the transport of solutes, because they contain abundant mitochondria and endoplasmic reticulum (Chonan et al, 1981). Uricase II likely synthesizes ureides in the metaxylem-parenchyma cells and transports them to the xylem vessels through the abundant plasmodesmata that interconnect both cell types. The ureides would be distributed from the xylem vessels to the whole plant. The presence of uricase II in the phloem fibers however, is not easily explained. These cells serve mainly as support and have a very thick cell wall. Sakurai et al (1996) detected cytosolic glutamine synthetase (GS1; EC 6.3.1.2) in the phloem fibers and xylem parenchyma cells from non-green leaves of developing rice plants. They proposed that this enzyme might participate in the assimilation of  $\text{NH}_4^+$  derived from the phenylalanine ammonia-lyase (PAL; EC 4.3.1.5) reaction, the key enzyme for biosynthesis of lignin polymers in the cell wall. The  $\text{NH}_4^+$  assimilated by the GS may be incorporated, as in nodules, to the synthesis of purines and their conversion into ureides, with the subsequent participation of the uricase II enzyme. Experiments are in progress to localize uricase II mRNA in cotyledons and hypocotyls from bean seedlings.

## ACKNOWLEDGMENTS

We are greatly indebted to Dr. José M. Colmenero, Dr. Manuel Pineda and Dra. Shirley Gil for helpful discussions, and to Drs. M. Lara, M. Rocha, A. Covarrubias, and M. Soberón, for critical reading of the manuscript. We also thank A. Pichardo and S. Trujillo for photograph assistance, and L. López for technical assistance with the microscopy. This work was supported by grants from DGAPA-UNAM IN 300993 and USAID 12367.

Received: 5/14/97

Accepted:

## LITERATURE CITED

- Atkins CA, Rainbird RM, Pate JS** (1980) Evidence for a purine pathway of ureide synthesis in N-fixing nodules of cowpea [*Vigna unguiculata*(L) Walp]. *Z Pflanzen Physiol* **97**: 249-260
- Bairoch A** (1991) The SWISS-PROT protein sequence data bank. *Nucleic Acid Res (suppl.)* **19**: 2241-2246
- Bergmann H, Preddie E, Verma DPS** (1983) Nodulin-35: a subunit of specific uricase (uricase II) induced and localized in the uninfected cells of soybean nodules. *EMBO J* **2**: 2333-2339
- Bradford MM** (1976) A rapid and sensitive method for the quantization of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254
- Campos F, Padilla J, Vázquez M, Ortega JL, Enríquez C, Sánchez F** (1987) Expression of nodule-specific genes in *Phaseolus vulgaris*. *Plant Mol Biol* **9**: 521-532
- Chonan N, Kaneko M, Kawahara H, Matsuda T** (1981) Ultrastructure of the large vascular bundles in the leaves of rice plants. *Jpn J Crop Sci* **50**: 323-331
- Cleveland DW, Fisher SG, Kirschner MW, Laemmli UK** (1977) Peptide mapping by limited proteolysis in sodium dodecyl sulfate and analysis by gel electrophoresis. *J Biol Chem* **252**: 1102-1106
- Damsz B, Dannenhoffer JM, Bell JA, Webb MA** (1994) Immunocytochemical localization of uricase in soybean cotyledons. *Plant Cell Physiol* **35**: 979-982
- de Vries S, Hoge H, Bisseling T** (1988) Isolation of total polysomal RNA from plant tissues. *Plant Mol Biol Manual* **6**: 1-13
- Fujihara S, Yamaguchi M** (1980) Nitrogen fixation and allantoin formation in soybean plants. *Agric Biol Chem* **44**: 2569-2573.
- Hanks JF, Tolbert NE, Schubert KR** (1981). Localization of enzymes of ureide biosynthesis in peroxisomes and microsoms of nodules. *Plant Physiol* **68**: 65-69
- Kim HB, Ann CS** (1993) Nucleotide sequences and expression of cDNA clones encoding uricase II in *Canavalia lineata*. *Korean J Biol* **36**: 415-423
- Kouchi H, Tsukamoto M, Tajima S** (1989) Differential expression of nodule-specific (nodulin) genes in the infected, uninfected and cortical cells of soybean (*Glycine max*) root nodules. *J Plant Physiol* **135**: 608-617
- Laemmli UK** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685
- Larsen K, Jochimsem BU** (1986) Expression of nodule-specific uricase in soybean

callus tissue is regulated by oxygen. *EMBO J* **5**: 15-19

**Lee N, Stein B, Suzuki H, Verma DPS** (1993) Expression of antisense nodulin-35 RNA in *Vigna aconitifolia* transgenic root nodules retards peroxisome development and affects nitrogen availability to the plants. *Plant J* **3**: 599-606

**Legocki RP, Verma DPS** (1979) A nodule specific plant protein (Nodulin-35) from soybean. *Science* **205**: 190-192

**Lucas K, Boland MJ, Schubert KR** (1983) Uricase from soybean root nodules: purification, properties and comparison with the enzyme from cowpea. *Arch Biochem Biophys* **226**: 190-197.

**Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J** (1982) Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, NY.

**Matsumoto T, Yatazawa M, Yamamoto Y** (1977) Distribution and change in the contents of allantoin and allantoic acid in developing nodulating and non-nodulating plants. *Plant Cell Physiol* **18**: 353-359

**McKhann HI, Hirsch AM** (1993) *In situ* localization of specific mRNAs in plant tissues. In BR Glick, JE Thompson, eds, *Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology*. CRC press, Inc, pp 179-205

**Merril CR** (1990) Gel staining techniques. *Methods Enzymol* **182**: 477-488

**Miura S, Oda T, Funai T, Ito M, Okada Y, Ichiyama A** (1994) Urate oxidase is imported into peroxisomes recognizing the C-terminal SKL motif of proteins. *Eur J Biochem* **223**: 141-146

**Mothes K.** (1961) The metabolism of urea and ureides. *Can J Bot* **39**: 1785-1807

**Motojima K, Goto S** (1989) Cloning of rabbit uricase cDNA reveals a conserved carboxy-terminal tripeptide in three species. *Biochim Biophys Acta* **1008**: 116-118

**Mylena P, Pawlowski K, Bisseling T** (1995) Symbiotic nitrogen fixation. *Plant Cell* **7**: 869-885

**Nguyen T, Zelechowska M, Foster V, Bergmann H, Verma DPS** (1985) Primary structure of the soybean nodulin-35 gene encoding uricase II localized in the peroxisomes of uninfected cells of nodules. *Proc Natl Acad Sci USA* **82**: 5040-5044

**Padilla JE, Miranda J and Sánchez F** (1991) Nodulin regulation in common bean nodules induced by bacterial mutants. *Mol Plant Microbe Inter* **4**: 433-439

**Papadopoulou K, Roussis A, Kuin H, Katinakis P** (1995) Expression pattern of uricase II gene during root nodule development in *Phaseolus vulgaris*. *Experientia* **51**: 90-94.

**Pate JS, Atkins CA, White ST, Rainbird WR, Woo KC** (1980). Nitrogen nutrition and xylem transport of nitrogen in ureide-producing grain legumes. *Plant Physiol*

65: 961-965.

**Polayes DA, Schubert KR (1984)** Purine synthesis and catabolism in soybean seedlings. *Plant Physiol* **75**: 1104-1110

**Rainbird RM, Atkins CA (1981)** Purification and some properties of urate oxidase from nitrogen-fixing nodules of cowpea. *Biochimica et Biophysica Acta* **659**: 132-140

**Reynolds PHS, Boland MJ, Blevins DG, Randall DD, Schubert KR (1982)** Ureide biogenesis in leguminous plants. *TIBS* **7**: 366-368

**Sakurai N, Hayakawa T, Nakamura T, Yamaya T (1996)** Changes in the cellular localization of cytosolic glutamine synthetase protein in vascular bundles of rice leaves at various stages of development. *Planta* **200**: 306-311

**Sánchez F, Campos F, Padilla J, Bonneville JM, Enriquez C, Caput D (1987)** Purification, cDNA cloning and developmental expression of the nodule-specific uricase from *Phaseolus vulgaris* L. Negro Jamapa. *Plant Physiol* **84**: 1143-1147

**Sánchez F, Padilla JE, Pérez H, Lara M (1991)** Control of nodulin gene in root-nodule development and metabolism. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **42**: 507-528

**Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977)** DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**: 5463-5467

**Schubert KR (1986)** Products of biological nitrogen fixation in higher plants: synthesis, transport and metabolism. *Ann Rev Plant Physiol* **37**: 539-574

**Schubert KR and Boland MJ (1990)** The ureides. In *The biochemistry of plants*. Academic Press, Inc, pp 197-282.

**Tajima S, Ito H, Tanaka K, Nanakado T, Sugimoto A, Kouchi H, Okazaki K (1991)** Soybean cotyledons contain a uricase that cross-reacts with antibodies raised against the nodule uricase (Nod-35). *Plant Cell Physiol* **32**: 1307-1311

**Tajima S, Kanazawa T, Takeuchi E, Yamamoto Y (1985)** Characteristics of a urate-degrading diamine oxidase-peroxidase enzyme system in soybean radicles. *Plant Cell Physiol* **26**: 787-795

**Tajima S, Kato N, Yamamoto Y (1983)** Cadaverine is involved in urate degrading activity (uricase activity) in soybean radicles. *Plant Cell Physiol* **24**: 247-253

**Tajima S, Tanaka K, Takane K, Sugimoto A, Okazaki K, Kouchi H (1993)** Soybean nodule uricase gene (nodulin-35) is expressed in cotyledons during seed development and early germination. In R Palacios, J Mora, WE Newton, eds, *New Horizons in Nitrogen Fixation*. Kluwer, Dordrecht, The Netherlands, p373.

**Takane K, Tanaka K, Tajima S, Okazaki K, Kouchi H (1997)** Expression of a gene for uricase II (nodulin-35) in cotyledons of soybean plants. *Plant Cell Physiol* **38**: 149-154

**Taté R, Patriarca EJ, Riccio A, Defez R, Laccarino M (1994)** Development of *Phaseolus vulgaris* root nodules. *Mol Plant Microbe Inter* **7**: 582-589

**Thomas RS, Schrader RE (1981)** Ureide metabolism in higher plants. *Phytochemistry* **20**: 361-371.

**Van den Bosch KA (1992)** Biochemistry of peroxisomes. *Ann Rev Biochem* **61**: 157-197

**Van den Bosch KA, Newcomb EH (1986)** Immunogold localization of nodule-specific uricase in developing soybean root nodules. *Planta* **167**: 425-436.

**Van de Wiel C, Scheres B, Franssen H, Van Lierop MJ, Van Lammeren A, Van Kammen A, Bisseling T (1990)** The early nodulin transcript ENOD2 is located in the nodule parenchyma (inner cortex) of pea and soybean root nodules. *EMBO J* **9**: 1-7

**Vaughn KC, Stegink SJ (1987)**. Peroxisomes of soybean, *Glycine max*, root nodule vascular parenchyma cells contain a nodule-specific urate oxidase. *Physiol Plant* **71**: 251-256

**Verma DPS, Hu CA and Zhang M (1992)** Root nodule development: origin, function and regulation of nodulin genes. *Physiol Plant* **85**: 253-265.

**Wallrath LL, Burnett JB, Friedman TB (1990)** Molecular characterization of the *Drosophila melanogaster* urate oxidase gene, an ecdysone-repressible gene expressed only in the Malpighian tubules. *Mol Cell Biol* **10**: 5114-5127.

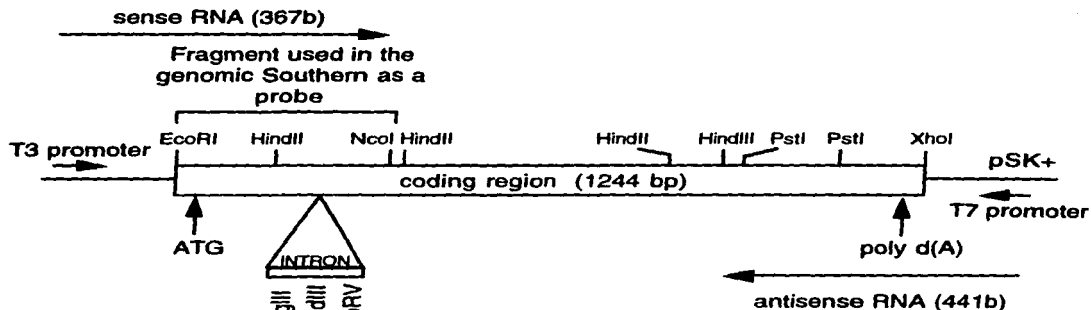
**Wu XW, Lee CC, Muzny D M, Caskey CT (1989)** Urate oxidase: structure and evolutionary implications. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 9412-9416

**Table I. Uricase specific activity from different plant organs**

<b>Plant organ</b>	<b>Uricase specific activity (U/ mg prot)<sup>a</sup></b>
<b>Bean cotyledons 4-d-old</b>	<b>3.74 ± 0.40</b>
<b>Bean roots 4-d-old</b>	<b>15.40 ± 0.84</b>
<b>Bean hypocotyls 4-d-old</b>	<b>13.33 ± 1.61</b>
<b>Bean nodules 21-d-old</b>	<b>1790 ± 380</b>
<b>Maize cotyledons 4-d-old</b>	<b>0.00</b>

<sup>a</sup> Units (U) of uricase activity are in nmol of oxidized uric acid · min<sup>-1</sup> under the conditions of the reaction.



**A****B**

soyb	MAQ	QEVVEGFKFEQRHGKERVVRVA	RVWRFHOGCFHEV	VEWRVGI	ILFSDCVNSYL	RDDNS	ETIVATDTMKNTVYAKA	75				
vign	MA	QEVVEGFKFEQRHGKERVVRVA	LVWRFHOGCFHEV	VEWRVGI	ILFSDCVNSYL	RDDNS	ETIVATDTMKNTVYAKA	74				
bean	MA	QEVVEGFKFEQRHGKERVVRVA	RVWRFHOGCFHEV	VEWRVGI	ILFSDCVNSYL	RDDNS	ETIVATDTMKNTVYAKA	74				
soyb	KECSDILS	MEVF	FAILLAKHFVSFY	CKVTGAI	VNIVEK	PWERV	IVDGGQPH	EHGFK	ILGSEKHT	TEAIVQKSGS	IQLT	150
vign	KECSDILS	MEVF	FAILLAKHFVSFY	CKVTGAI	VNIVEK	PWERV	IVDGGQPH	EHGFK	ILGSEKHT	TEAIVQKSGS	IQLT	149
bean	KECSDILS	MEVF	FAILLAKHFVSFY	CKVTGAI	VNIVEK	PWERV	IVDGGQPH	EHGFK	ILGSEKHT	TEAIVQKSGS	IQLT	149
soyb	SGIEGLS	VLKTTQSGR	NFIR	DKYTAL	PDTRER	ILATEVTAL	WRYSY	ESLY	ILPOKPLYFT	IKYLEVH	KVLADTF	225
vign	SGIEGLS	VLKTTQSGR	NFIR	DKYTAL	PDTRER	ILATEVTAL	WRYSY	ESLY	ILPOKPLYFT	IKYLEVH	KVLADTF	224
bean	SGIEGLS	VLKTTQSGR	NFIR	DKYTAL	PDTRER	ILATEVTAL	WRYSY	ESLY	ILPOKPLYFT	IKYLEVH	KVLADTF	224
soyb	FGPFR	KCGVYSPSVQNTLYLMAKATLNRF	PDIAAYV	SLKMLPNLH	ILPVNIS	SKDGGPIV	KFEDDVYL	PTDEPHGS	IQCA	300		
vign	FGPFR	NCGVYSPSVQNTLYLMAKATLNRF	PDIAAYV	SLKMLPNLH	ILPVNIS	SKDGGPIV	KFEDDVYL	PTDEPHGS	IQCA	299		
bean	FGPFR	NCGVYSPSVQNTLYLMAKATLNRF	PDIAAYV	SLKMLPNLH	ILPVNIS	SKDGGPIV	KFEDDVYL	PTDEPHGS	IQCA	299		
soyb	SLSR	WSKI	309									
vign	SLSR	WSKI	308									
bean	SLSR	WSKI	308									

Fig. 1

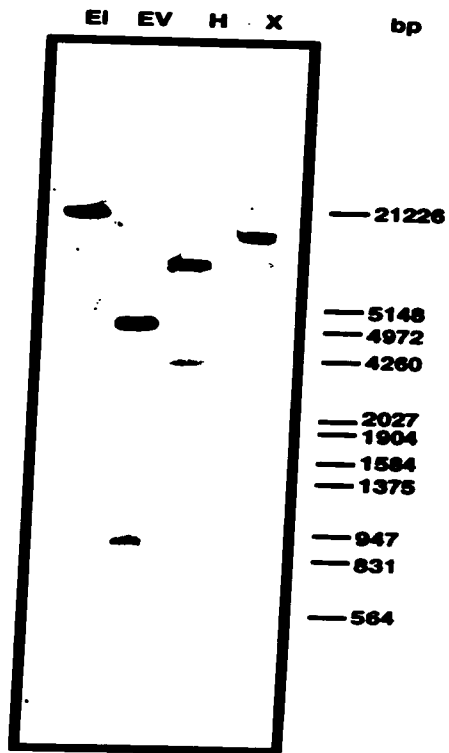


Fig. 2

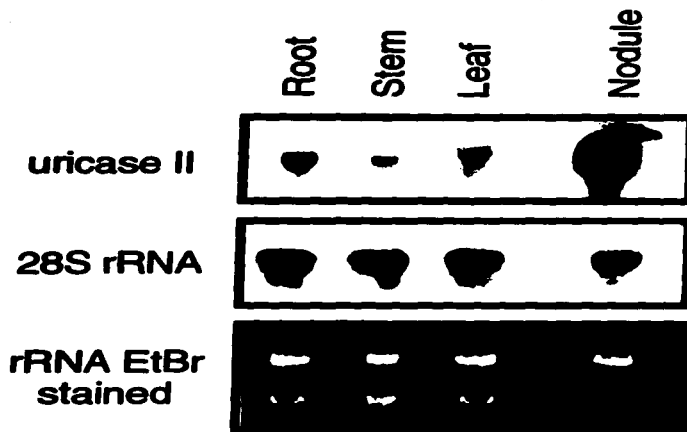
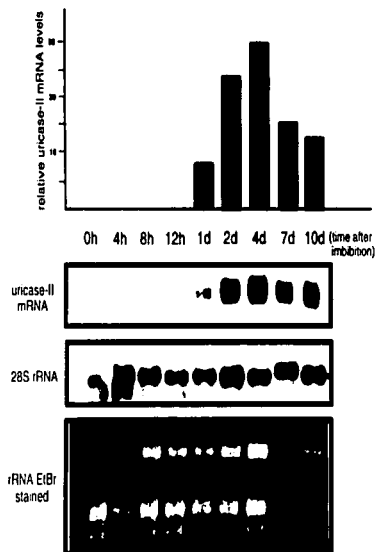
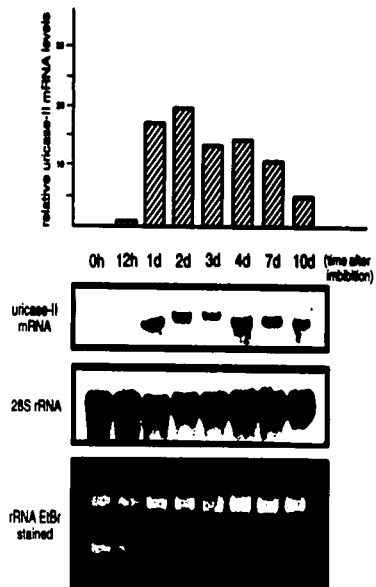


Fig. 3

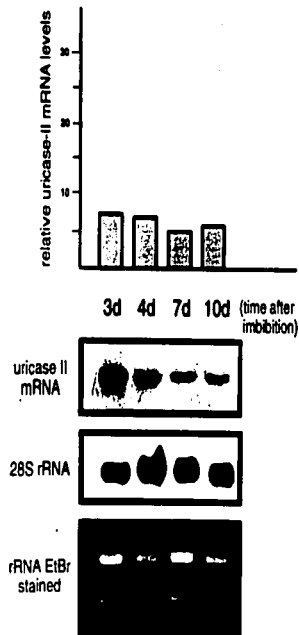
A



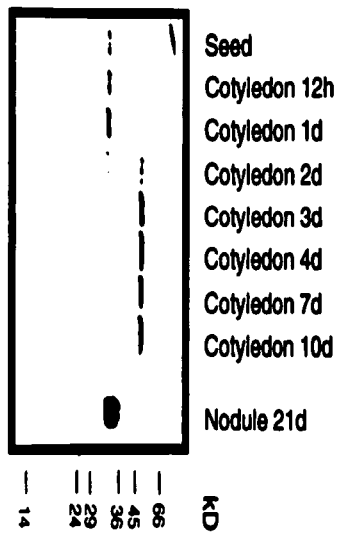
B



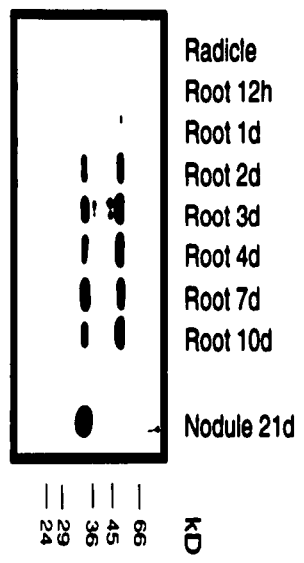
C



A



B



C

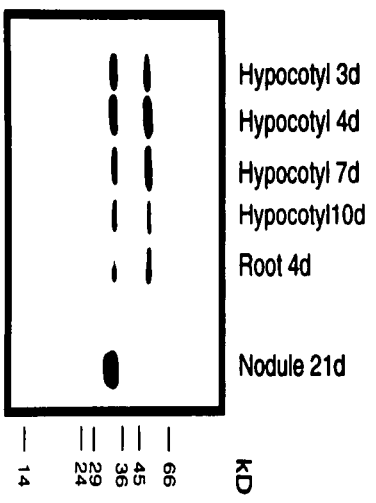


Fig. 5

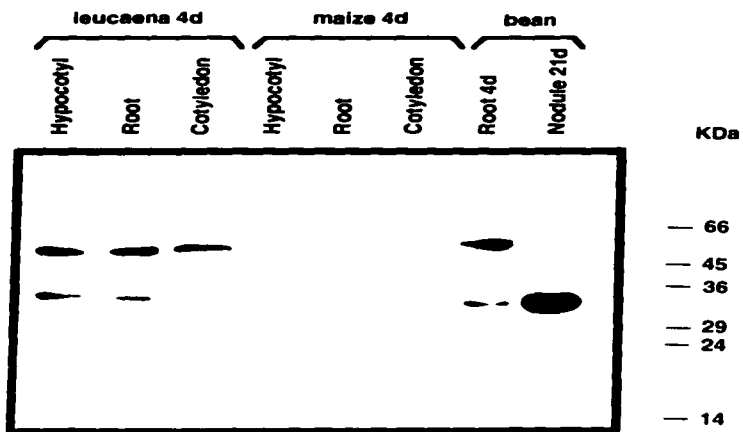


Fig. 6

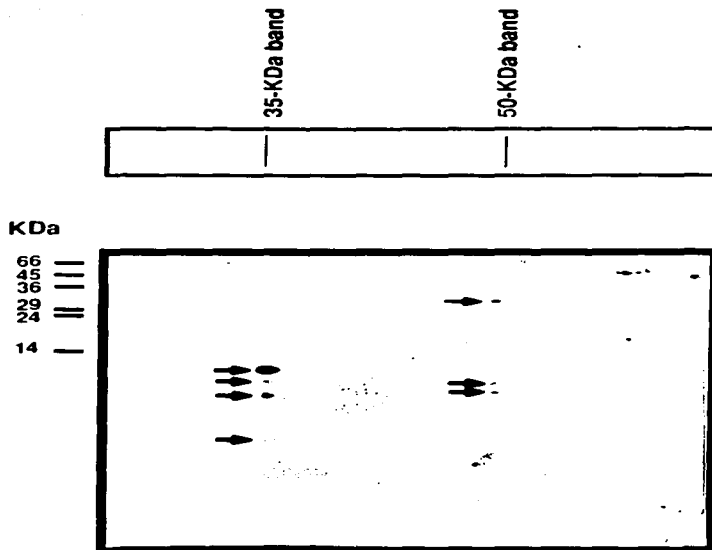


Fig. 7

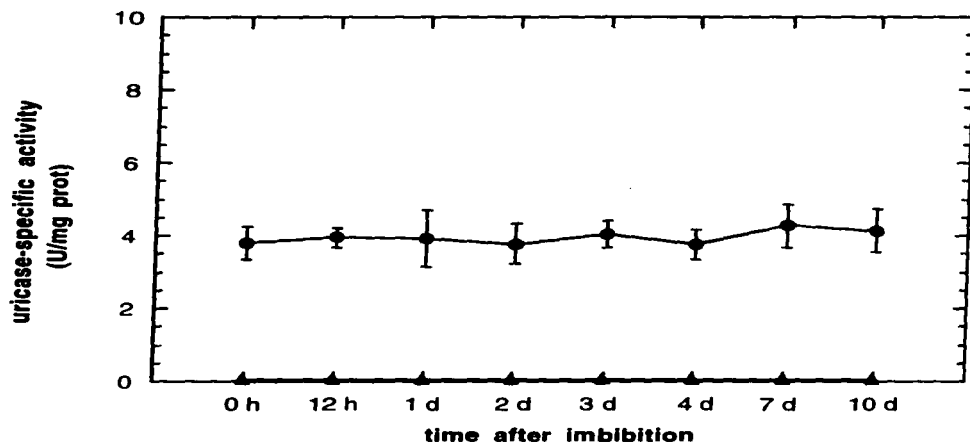


Fig. 8



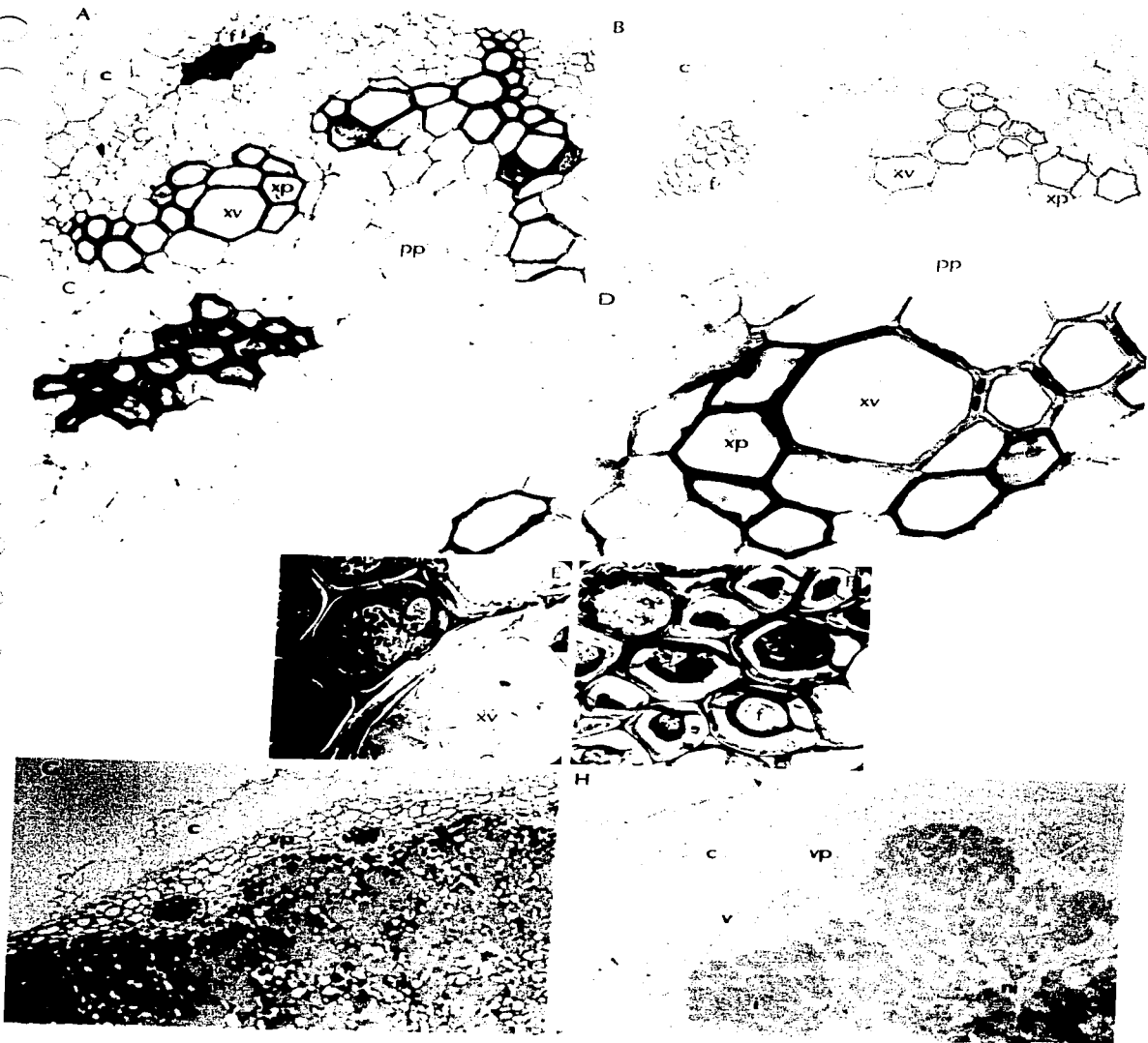


Fig.9

## FIGURE LEGENDS

**Figure 1** (A) Restriction map of the uricase II cDNA clone. T7 and T3 promoters, from which transcripts for their *in situ* hybridization experiments are initiated, are indicated. (B) Alignment of the deduced amino acid sequences from bean, soybean and cowpea uricase II. Arrowheads indicate the His and Phe amino acid residues proposed by Wu et al., (1989) as the copper-binding site of the protein. The two conserved motifs of unknown function are indicated with open boxes above the sequence. The SKL motif for protein import into peroxisomes is underlined.

**Figure 2.** Southern blot analysis of *P. vulgaris* DNA restricted with EcoRI (EI), EcoRV (EV), HindIII (H) and XbaI (X) restriction enzymes. Twenty-five µg of each restricted DNA were loaded per lane. The blot was probed with a EcoRI-NotI fragment from pSKuri clone (see Fig. 1A). Molecular mass markers are indicated.

**Figure 3.** Expression of uricase II gene in different organs of adult plants. Total RNA (25 µg) from roots, stems, leaves and 21-d-old nodules was analyzed by northern blot analysis using the uricase II cDNA as a probe. In order to verify that equal amounts of RNA were loaded, the gels were stained with ethidium bromide and the filters were also hybridized with a 28S rRNA probe.

**Figure 4** Expression of uricase II gene during bean seed germination and seedling establishment. Northern blot analysis of total RNA from (A) cotyledons; (B) roots; (C) hypocotyls. Twenty-five µg of total RNA were loaded per lane. Uricase II cDNA was used as a probe in all experiments. The gels were stained with ethidium bromide and the filters were also hybridized with a 28S rRNA probe. The experiments were performed two times with identical results. The mRNA levels were quantified using the 1-D Analysis Program from Bio-Image Products (Millipore). h, hours after imbibition; d, days after imbibition.

**Figure 5** Expression of uricase II protein during bean seed germination and seedling establishment. Immunodetection of uricase II protein in (A) cotyledons; (B) roots; (C) hypocotyls. All experiments have a protein sample from 21-d-old nodules as a control. Crude extracts of proteins (20

μg per lane, except for nodule extract, 2 μg) were analyzed by SDS-PAGE and immunoblotting with anti-uricase (1:1000) and anti-rabbit coupled to horseradish peroxidase (Amersham) (1:5000) antibodies. The exposure time in A was longer than in B and C. Molecular mass standards are indicated.

**Figure 6.** Detection of uricase II protein in hypocotyls, roots and cotyledons of *Leucaena leucocephala*. Crude extracts of proteins (20 μg per lane, except for nodule extract, 2 μg) were analyzed by SDS-PAGE and immunoblotting with anti-uricase (1:1000) and anti-rabbit horseradish-peroxidase (1:5000) antibodies. Seedling organ extracts from *Zea mays* 4 d after imbibition were also included. Molecular mass standards are indicated.

**Figure 7.** Immunoblot analysis of peptides generated from the 35- and 50-kD proteins by V8 hydrolysis. The two bands that cross-reacted with the anti-uricase antibody were digested in the gel with V8 protease, loaded in SDS-PAGE and immunodetected with anti-uricase (1:1000) and anti-rabbit-AP (Boehringer Mannheim) (1:5000) antibodies. Arrows indicate the resulting peptides. Molecular mass standards are indicated.

**Figure 8.** Uricase-specific activity in the cotyledons of developing bean seedlings. Five mM uric acid (●) or no uric acid (▲) were used in the reactions as substrate. Each value is the mean of three experiments ± SD. Each experiment included triplicate samples. Units of uricase activity are in nmol of oxidized uric acid · min<sup>-1</sup> under the conditions of the reaction.

**Figure 9.** Localization of uricase II transcripts in 4-d-post imbibition roots of *P. vulgaris* seedlings by *in situ* hybridization. Tissues were fixed, embedded in paraffin, cut into 7 μm sections and hybridized with DIG-labeled sense and antisense probes. Anti-DIG-AP (Boehringer Mannheim) (1:2500) and the substrates NBT and BCIP were used to detect hybridization. Photographs were taken with 16X, 40X and 100X objectives. Bars represent 10 μm (1 μm for electron microscopy photographs). (A, C, D) Root cross-sections hybridized with antisense uricase II RNA; (B) Root cross-sections hybridized with sense uricase II RNA; (E, F) Electron micrographs showing the metaxylem-parenchyma cells (E) and the phloem

fibers (F) of the vascular tissue from 4-d-post imbibition bean roots. Symbols: f, phloem fibers; pp, pith parenchyma; xp, metaxylem-parenchyma cells; xv, metaxylem vessels.

(G) Nodule cross-sections hybridized with antisense uricase II RNA. (H) Nodule cross-sections hybridized with sense uricase II RNA. Symbols: c, cortex; i, infected cells; ni, non-infected cells; v, vascular tissue; vp, vascular parenchyma.

## RESULTADOS ANEXOS Y DISCUSIÓN

### • Primera parte

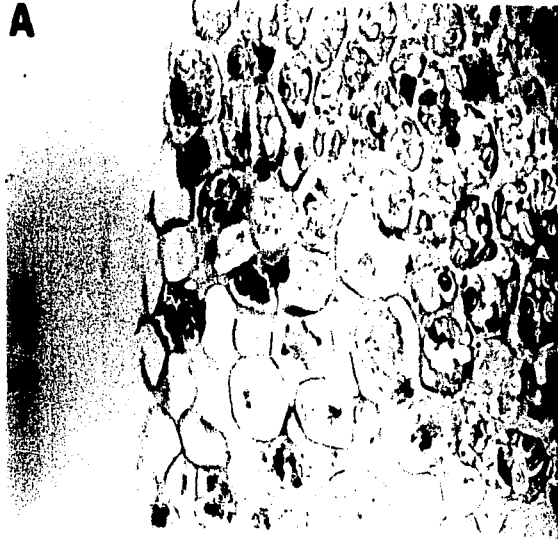
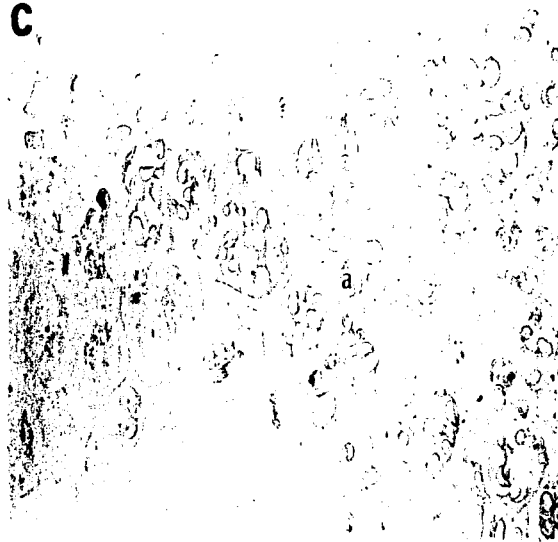
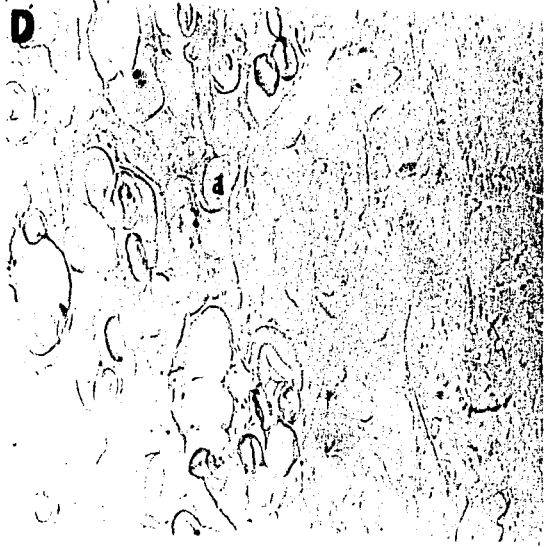
Los experimentos de hibridación *in situ* llevados a cabo en las raíces de plántulas de frijol, revelaron que uricasa II se expresa específicamente en el tejido vascular (ver artículo). Por otro lado, experimentos de northern y western blot publicados en ese mismo trabajo, revelaron que el ARNm y la proteína de uricasa II están también presentes en cotiledones e hipocotilos de la plántula en desarrollo. Por ello, decidimos investigar mediante experimentos de hibridación *in situ* la localización del transcrito de uricasa II en estos órganos. Nuestra inquietud nos llevó también a investigar la localización de la proteína de uricasa II en las raíces, cotiledones e hipocotilos de la plántula de frijol, mediante inmunolocalización.

### **Localización del ARNm de uricasa II en cotiledones e hipocotilos de plántulas de frijol.**

Para llevar a cabo los experimentos de hibridación *in situ* se emplearon cotiledones e hipocotilos de plántulas de frijol de 4 ddi (días después de la imbibición). La metodología empleada está detallada en los materiales y métodos.

En cotiledones de frijol 4 ddi, se pueden distinguir dos tipos de células que parecen estar en estados metabólicos distintos: unas células con abundantes amiloplastos y otras con los amiloplastos ya digeridos y un citoplasma más extendido. El transcrito de uricasa II se localiza preferentemente en el citoplasma de las células con amiloplastos digeridos (Figs. 1A y 1B). Los controles negativos hibridados con el ARNm sentido no mostraron ninguna señal. (Figs. 1C y 1D).

En los hipocotilos en desarrollo, el transcrito de uricasa II se localiza en las células parenquimáticas que rodean a los vasos del xilema (Figs. 2A y 2B), no presentándose señal en los controles hibridados con el ARNm sentido (Figs. 2C y 2D).

**A****C****D**

## RESULTADOS ANEXOS Y DISCUSIÓN

### • Primera parte

Los experimentos de hibridación *in situ* llevados a cabo en las raíces de plántulas de frijol, revelaron que uricasa II se expresa específicamente en el tejido vascular (ver artículo). Por otro lado, experimentos de northern y western blot publicados en ese mismo trabajo, revelaron que el ARNm y la proteína de uricasa II están también presentes en cotiledones e hipocotilos de la plántula en desarrollo. Por ello, decidimos investigar mediante experimentos de hibridación *in situ* la localización del transcrito de uricasa II en estos órganos. Nuestra inquietud nos llevó también a investigar la localización de la proteína de uricasa II en las raíces, cotiledones e hipocotilos de la plántula de frijol, mediante inmunolocalización.

### **Localización del ARNm de uricasa II en cotiledones e hipocotilos de plántulas de frijol.**

Para llevar a cabo los experimentos de hibridación *in situ* se emplearon cotiledones e hipocotilos de plántulas de frijol de 4 ddi (días después de la imbibición). La metodología empleada está detallada en los materiales y métodos.

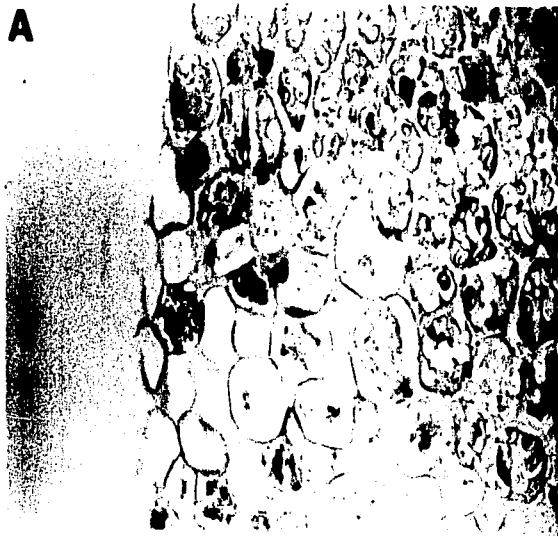
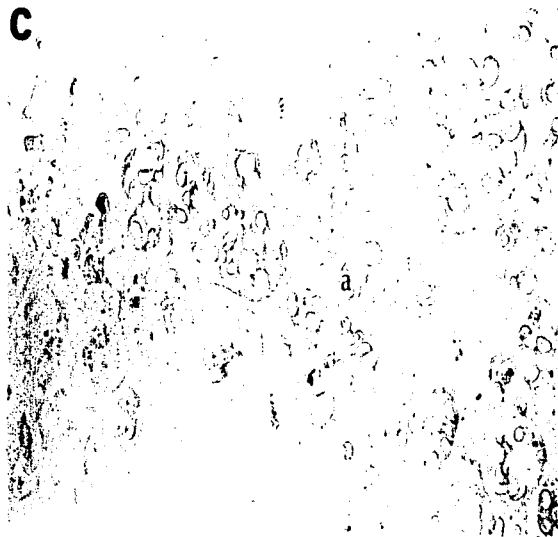
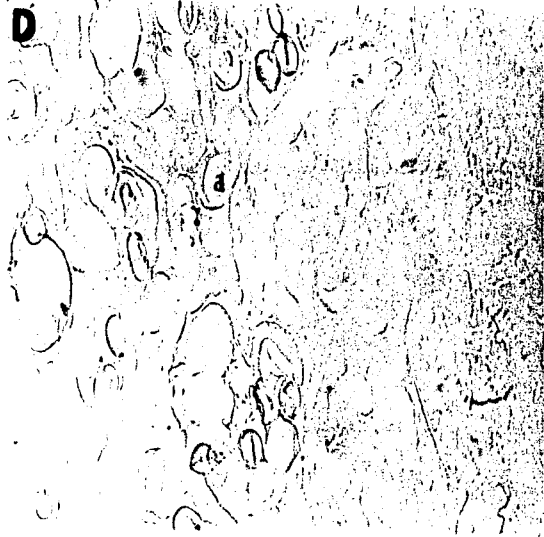
En cotiledones de frijol 4 ddi, se pueden distinguir dos tipos de células que parecen estar en estados metabólicos distintos: unas células con abundantes amiloplastos y otras con los amiloplastos ya digeridos y un citoplasma más extendido. El transcrito de uricasa II se localiza preferentemente en el citoplasma de las células con amiloplastos digeridos (Figs. 1A y 1B). Los controles negativos hibridados con el ARNm sentido no mostraron ninguna señal. (Figs. 1C y 1D).

En los hipocotilos en desarrollo, el transcrito de uricasa II se localiza en las células parenquimáticas que rodean a los vasos del xilema (Figs. 2A y 2B), no presentándose señal en los controles hibridados con el ARNm sentido (Figs. 2C y 2D).

Fig. 1. Localización del ARNm de uricasa II en cotiledones de frijol de 4 ddi mediante hibridación *in situ*. Rebanadas de cotiledón hibridadas con ARN antisentido (A, B); ARNm sentido (C, D). Las fotos fueron tomadas en un microscopio Zeiss con objetivos de 16X y 40X. Símbolos: a, amiloplastos.

**Fig 1: Localización del ARNm de uricasa II en cotiledones de frijol de 4 ddi mediante hibridación *in situ*. Rebanadas de cotiledón hibridadas con ARN antisentido (A, B); ARNm sentido (C, D). Las fotos fueron tomadas en un microscopio Zeiss con objetivos de 16X y 40X. Símbolos: a, amiloplastos.**



**A****C****D**

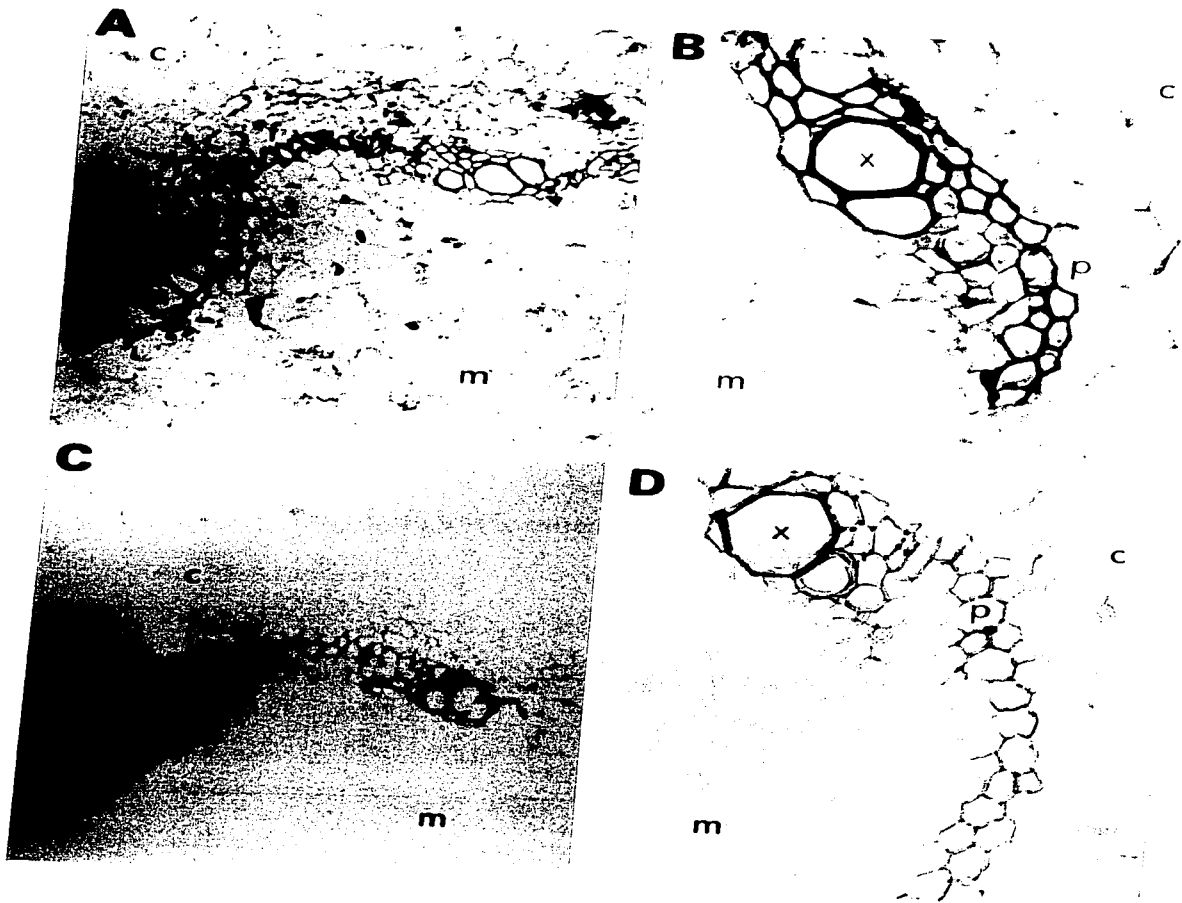


Fig 2: Localización del ARNm de uricasa II en hypocotilos de frijol de 4 ddi mediante hibridación *in situ*. Rebanadas transversales de hypocotilos hibridadas con ARN antisentido (A, B); ARNm sentido (C, D). Las fotos fueron tomadas en un microscopio Zeiss con objetivos de 16X y 40X. Símbolos: c, cortex; f, floema; m, médula; p, parénquima del xilema; x, vasos del xilema;

## **Inmunodetección de uricasa II en raíces, cotiledones e hipocotilos de plántulas de frijol**

Para conocer la localización de la proteína uricasa II en las plántulas de frijol en desarrollo, llevamos a cabo experimentos de inmunolocalización en raíces, cotiledones e hipocotilos de plántulas de 4ddi, usando el anticuerpo policlonal anti-uricasa y el anticuerpo comercial anti-conejo-AP, como se detalla en materiales y métodos.

En los cotiledones de la plántula, uricasa II se localiza en el mismo tipo celular que el transcrito, es decir, en las células del cotiledón donde ya se ha llevado a cabo el proceso de digestión metabólica de las reservas (Fig. 3A). El control negativo incubado con el suero preinmune de conejo, no presentó ninguna señal (Fig. 3B).

En la raíz de plántulas de frijol, uricasa II se localiza en los haces vasculares, presentando la misma distribución que el transcrito: uricasa II se localiza en las células parenquimáticas del xilema (Figs. 4A y 4D) y en las fibras del floema (Figs. 4A y 4B). Los cortes de raíz incubados con el suero preinmune de conejo no presentaron ninguna señal (Fig. 4C).

En el hipocotilo, el patrón de distribución de la proteína coincide también con el del transcrito, localizándose uricasa II en las células parenquimáticas del xilema (Fig. 5A). La incubación de cortes de hipocotilo con suero preinmune de conejo no originó ninguna señal (Fig. 5B).

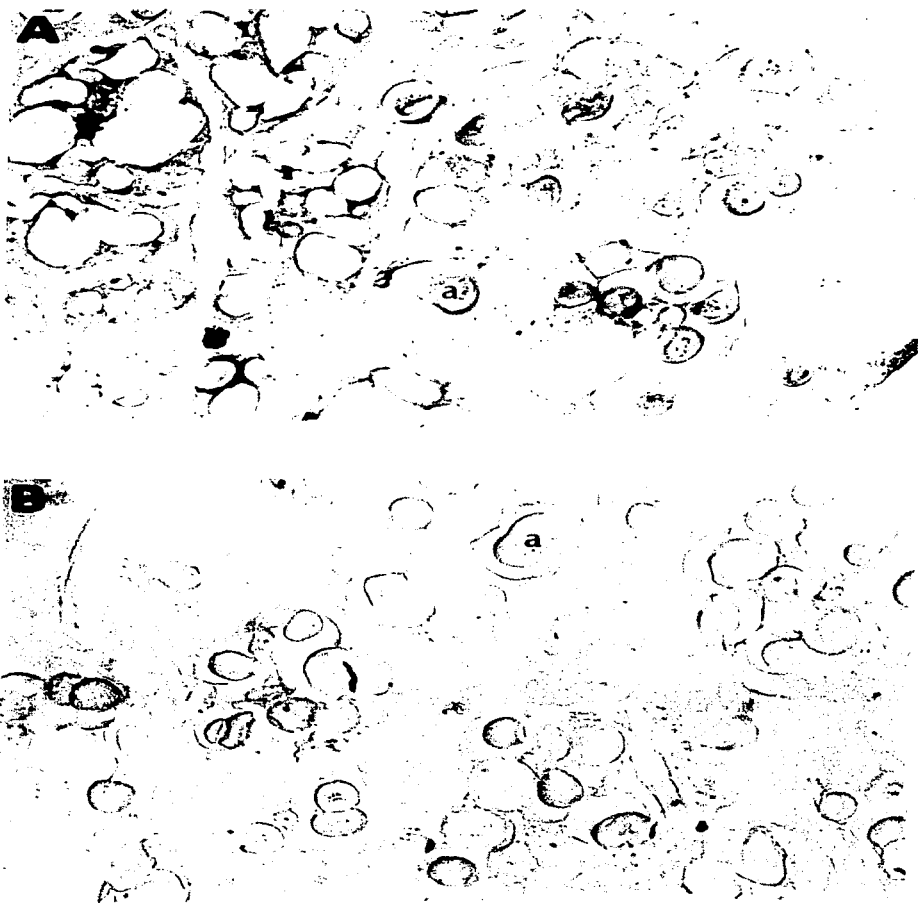
Con estos resultados podemos concluir que los cotiledones, raíces e hipocotilos de la plántula de frijol en desarrollo contienen uricasa II y que, por tanto, son capaces de sintetizar ureidos. Como hemos discutido en el artículo, durante el establecimiento de la plántula se produce una gran movilización de reservas desde el cotiledón hasta la plántula en crecimiento. En los cotiledones de la plántula de frijol, uricasa II podría estar participando en la movilización de compuestos nitrogenados en forma de ureidos. En la raíz y el hipocotilo de la plántula en desarrollo, uricasa II podría sintetizar ureidos en las células parenquimáticas del xilema. Estos ureidos serían transportados a través de plasmodesmos hacia los vasos del xilema contiguos, y de ahí serían distribuidos al resto de la planta. Por último, la presencia de uricasa II en las fibras del floema podría responder

a un proceso detoxificador del  $\text{NH}_4^+$  que se produce durante la activa síntesis de lignina que tiene lugar en este tipo celular, dentro del programa de engrosamiento de sus paredes celulares. Una explicación más interesante, sin embargo, aunque sin fundamentos bioquímicos ni moleculares aún, puede relacionar a la proteína de 50-kD con un proceso de apoptosis. Se ha reportado que la producción de  $\text{H}_2\text{O}_2$  como componente del "burst" oxidativo que tiene lugar en las células vegetales durante la infección por patógenos, funciona como disparador local de la muerte celular programada (Levine et al., 1994, 1996). La apoptosis es, por tanto, un proceso esencial para la supervivencia y el desarrollo de las plantas, y participa, por ejemplo, durante la formación de las flores, los óvulos y el tejido vascular (Greenberg, 1996). Durante la diferenciación y maduración del xilema y floema de las plantas se lleva a cabo un proceso de autólisis celular. Si las señales oxidativas indujeran la muerte celular programada en plantas, como lo hacen en animales (Hockenberry et al., 1993), el  $\text{H}_2\text{O}_2$  producido durante la reacción de uricasa II (ver introducción de la tesis) podría participar en la muerte celular programada de las fibras del floema. Nuestra hipótesis es, pues, que la proteína de 50-kD relacionada con uricasa podría tener un papel relacionado con apoptosis durante el desarrollo de la plántula. De esta forma se explicaría su presencia en cotiledones senescentes (la senescencia tiene también asociada un programa de muerte celular programada) y en las células del xilema y floema de las raíces e hipocotilos de frijol que están madurando y perdiendo sus citoplasmas.

Uricasa II es una proteína peroxisomal y sin embargo, la señal de inmunolocalización parece detectarse en el citoplasma celular. La explicación a esta aparente incongruencia es que, por un lado, el método de detección empleado no permite una mayor resolución y, por tanto, no podemos localizar la proteína a nivel subcelular. Por otro lado, somos conscientes de que el anticuerpo anti-uricasa probablemente está detectando el péptido de 35- y el de 50-kD en sus formas nativas. Quizá la proteína de 50-kD no se dirija al peroxisoma y la estemos detectando en el citoplasma de la célula. En cualquier caso, los experimentos de inmunolocalización confirman la expresión específica de uricasa II en esos tipos celulares.

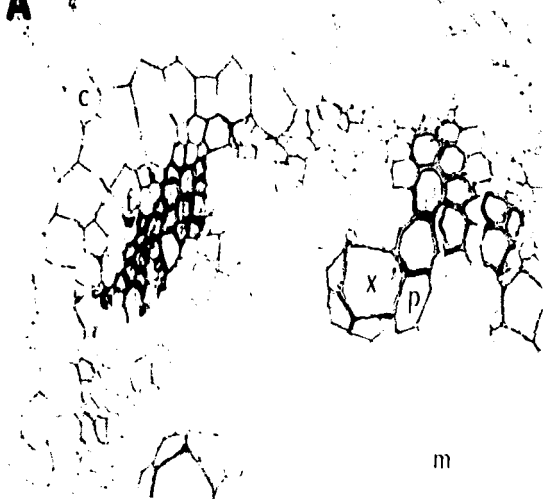
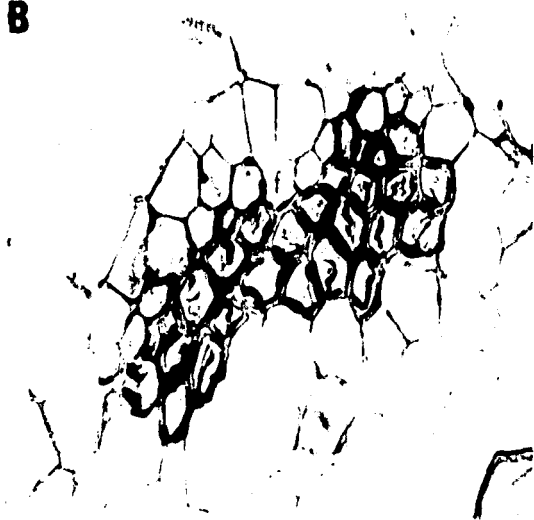
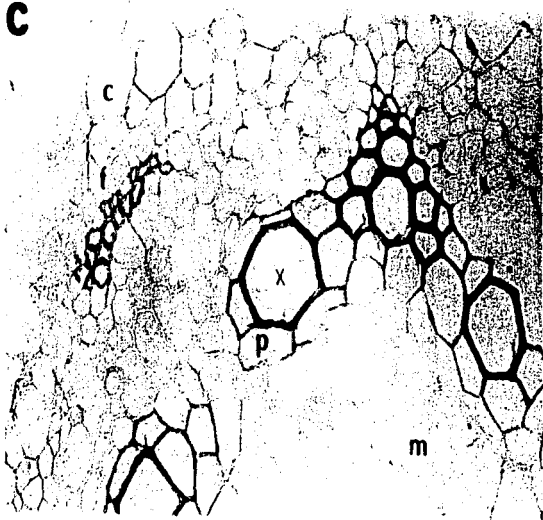
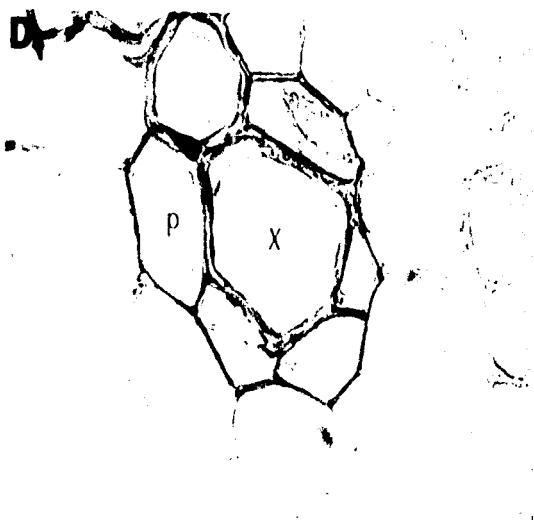
Con estos estudios se completan y se apoyan los resultados

publicados en el artículo: uricasa II como forma tetramérica de la proteína de 35-kD podría desempeñar un papel en la movilización de reservas del cotiledón hacia la raíz y la parte aérea de la plántula en desarrollo, y en el mantenimiento de los niveles de ureidos de la plántula y la planta adulta. Por otro lado, la proteína de 50-kD podría ser una forma modificada de uricasa que no se importara al peroxisoma y que pudiera desempeñar en el citoplasma de la célula una función detoxificadora de  $\text{NH}_4^+$  (en concordancia con papel detoxificador que desempeña esta enzima en *Drosophila* y en mamíferos), o una función de desarrollo relacionada con apoptosis. Consecuentemente se localiza en las células senescentes del cotiledón y en las células que van a perder su citoplasma dentro de un programa de desarrollo de los haces vasculares.



**Fig 3:** Inmunolocalización de uricasa II en cotiledones de plántulas de frijol de 4 ddi. (A) rebanadas de cotiledón incubadas con el anticuerpo anti-uricasa (1:100); (B) rebanadas de cotiledón incubadas con el suero preinmune. Las fotos fueron tomadas en un microscopio Zeiss con objetivos de 40X. Símbolos: a, amiloplastos.

Fig 4: Inmunolocalización de uricasa II en raíces de frijol de 4 ddi. (A, B, D) rebanadas transversales de raíces hibridadas con ARN antisentido; (C) ARNm sentido. Las fotos fueron tomadas en un microscopio Zeiss con objetivos de 40X y 100X. Símbolos: c, cortex; f, floema; m, médula; p, parénquima del xilema; x, vasos del xilema; .

**A****B****C****D**



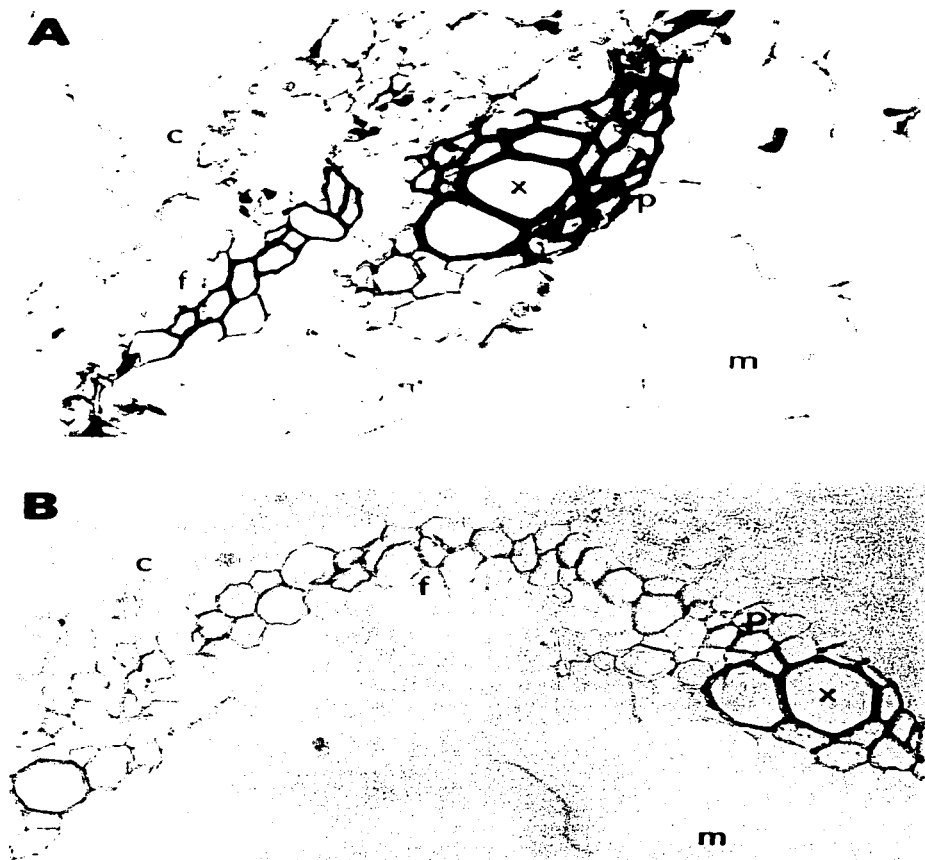


Fig 5: Inmunolocalización de uricasa II en hypocotilos de frijol de 4 ddi. (A) rebanadas transversales de hypocotilos hibridadas con ARN antisentido; (B) ARNm sentido. Las fotos fueron tomadas en un microscopio Zeiss con objetivos de 40X. Símbolos: c, cortex; f, floema; m, médula; p, parénquima del xilema; x, vasos del xilema; .

- Segunda parte

El genoma de frijol contiene una sólo copia del gen de uricasa II. Como hemos visto, la expresión de este gen está regulada a distintos niveles: desarrollo, simbiosis, órgano-, tejido-, célula- y organelo-especificidad. Este patrón de expresión tan interesante nos llevó a estudiar la regulación del gen de uricasa II a nivel molecular analizando su región 5' regulatoria. Decidimos llevar a cabo estos estudios de regulación en *cis* siguiendo dos estrategias distintas y complementarias:

A. Estudios de expresión estable, mediante la obtención de plantas transgénicas de *Lotus corniculatus*. Debido a que no se cuenta con un sistema eficiente de transformación para frijol, elegimos como modelo para hacer los estudios de expresión estable a la planta *Lotus corniculatus*, leguminosa que presenta varias ventajas: 1. Existe un método de transformación bien establecido para *Lotus corniculatus*. 2. Es una planta leguminosa que forma nódulos determinados al igual que frijol. 3. *Lotus* transporta como forma nitrogenada preferencialmente amidas. Esto nos permite eliminar problemas de competencia entre los promotores por la maquinaria de transcripción que podrían enmascarar los resultados de actividad del promotor de uricasa II que introducimos. 4. Las señales que controlan la expresión de nodulinas están conservadas en distintas leguminosas, incluso entre aquellas que tienen nódulos determinados e indeterminados.

B. Estudios de expresión transitoria, mediante la electroporación de protoplastos de células no infectadas de frijol, debido a que es en este tipo celular en donde se obtienen los máximos niveles de expresión del gen de uricasa II. Para ello, pusimos a punto un sistema de obtención de protoplastos de células de nódulo, basándonos en la diferencia de tamaño que existe entre las células infectadas y no infectadas (Ver Materiales y Métodos).

Los pasos realizados para llevar a cabo estos estudios fueron:

1. Aislamiento de la clona genómica de uricasa II.
2. Secuenciación del promotor de uricasa II.

### 3. Construcción de herramientas moleculares para hacer estudios de regulación en *cis*:

3.1. Construcción del gen quimérico (Promotor de uricasa II: GUS: nos) dentro de dos vectores de transformación de plantas: pBI121, para hacer estudios de expresión estable en plantas transgénicas de *Lotus corniculatus*; pBI426, para hacer estudios de expresión transitoria en protoplastos de células no infectadas de nódulos de frijol.

3.1.1. Localización del sitio de inicio de la transcripción (+1).

3.1.2. Amplificación por PCR del promotor de uricasa II.

3.1.3. Clonación del promotor en los vectores pBI121 y pBI426.

3.2. Construcción de un sistema de delecciones 5' de la región promotora de uricasa II y fusión de estas delecciones al gen reportero GUS dentro de los dos vectores de transformación vegetal, pBI121 y pBI426.

### 4. Estudios de regulación en *cis*.

4.1. Obtención de plantas transgénicas de *Lotus corniculatus*, mediante infección mediada por *Agrobacterium rhizogenes*.

4.2. Electroporación de protoplastos de células no infectadas de nódulos de frijol.

A continuación se detallan cada uno de estos pasos. El objetivo último de realizar los estudios de regulación en *cis* no se llevó a su término debido a que, por la complejidad de los sistemas elegidos, se encontraron muchas dificultades experimentales. A pesar de que se obtuvieron plantas transgénicas de *Lotus* los resultados no fueron concluyentes, pues no se obtuvo un número suficiente de plantas y no se analizaron todas las construcciones. Por otro lado, a pesar de que se puso a punto el método de obtención de protoplastos de células no infectadas de nódulos de frijol, no se obtuvieron resultados de transformación de los mismos, aunque se probaron muchas condiciones distintas. A pesar de ello, se detallan las estrategias de obtención de transgénicas y de protoplastos en el apartado de Materiales y métodos y se proponen métodos alternativos para la realización de estos estudios en el apartado de Perspectivas.

## 1. Aislamiento de la clona genómica de uricasa II

Para llevar a cabo los estudios de regulación en *cis* del gen de uricasa II, el primer paso a dar fue el aislamiento de la clona genómica de uricasa II. Para ello, utilizamos una genoteca de frijol en el vector  $\lambda$ -EMBL3A, y usamos como sonda el fragmento EcoRI-NotI de la región 5' del cDNA de uricasa II. De este modo, aislamos la clona genómica de uricasa II,  $\lambda$ -urig (Fig. 6). Las regiones 5' (fragmento EcoRI-NotI) y 3' (fragmento HindIII-XhoI) del cDNA de uricasa II se usaron para hacer hibridaciones independientes sobre el ADN del fago  $\lambda$ -urig digerido con varias enzimas de restricción (Figs. 7A y 7B). De este modo se obtuvo un mapa de restricción parcial de la clona genómica y se pudo determinar un fragmento de 2 Kb SalI/EcoRV correspondiente a la zona 5' del gen de uricasa II. El fragmento de 2 Kb se subclonó en un vector más manejable, el plásmido pKS+, dando lugar a la construcción pPuri.2. Se realizó un mapa de restricción parcial de la clona (Fig 6).

## 2. Secuenciación del promotor de uricasa II

Conociendo la secuencia del cDNA de uricasa II (Fig. 8)(Capote-Mañez and Sánchez, 1997), se diseñó un oligonucleótido homólogo a la región de inicio de la traducción del gen de uricasa II ATG (5' CGCCATCTTTTCGGAATA 3'), que se usó para secuenciar río arriba la región correspondiente al promotor de uricasa II. También se usaron como primers los oligonucleótidos homólogos al plásmido pKS+, universal (UNI) y reverso (REV) (ver Fig. 6). Como ADN molde se usaron las clonas pPuri.2 y las delecciones 5' del promotor (ver después). Comparando la secuencia del promotor con la de genes de nodulinas y no nodulinas de plantas encontramos algunos motivos conservados que podrían funcionar como cajas de regulación de la transcripción (Fig 9):

a. la caja **TATA**, una secuencia corta, situada cerca del inicio de la transcripción (44 pb en el caso del promotor de uricasa II) necesaria para la transcripción que es reconocida por el factor TBP (TATA-binding protein) en los promotores de genes eucariotas.

b. tres motivos **AAAGAT** (-90, -629 y -926) y cuatro motivos **CTCTT** (-16, -239, -308 y -688) pertenecientes al elemento específico de nódulo

**OSE (Organ Specific Element)** típico de promotores de nodulinas tardías como Npv30 de frijol (Campos et al., 1995), N23 y *lbc3* de soya (Jorgensen et al., 1988; Stougaard et al., 1990; de Bruijn et al., 1990). Mutaciones puntuales en los motivos CTCTT o en ambos CTCTT y AAAGA del OSE hacen al promotor del gen *lbc3* de soya inactivo. Mutaciones puntuales en AAAGA tiene sólo efectos mínimos en los niveles de expresión. Mutaciones en motivos CTCTT fuera del OSE reducen un 50% la actividad del promotor (Ramlov et al., 1993). No se han encontrado factores que interaccionen en *trans* con estos elementos *in vitro* (Jensen et al., 1988; Forde et al., 1990). Sin embargo parece ser que no es el único elemento que controla la expresión específica de nódulo, pues el elemento regulador positivo SPE (Strong Positive Element) del promotor de *lbc3* es capaz de dirigir la expresión nódulo-específica en ausencia del OSE (Stougaard et al., 1990).

En el promotor del gen *Srglb3* de *Sesbania rostrata* se ha encontrado un elemento de 78 pb denominado **NICE (Nodule Infected Cell Expression)**. Este elemento es esencial y suficiente para determinar la expresión nódulo- y célula- (infectada) específica del gen de leghemoglobina. Consta de tres motivos: (A)AAAGAT, (TTGT)CTCTT y CACCC. Los dos primeros motivos que pertenecen al OSE antes mencionado, son esenciales para la actividad de los promotores *Srglb3* y *lbc3* de soya (Szczyglowski et al., 1994). El motivo CACCC está también presente en la región promotora de globina de humanos. Como es de esperar para una proteína que se expresa exclusivamente en células no infectadas, este motivo NICE no está presente en el promotor del gen de uricasa II.

c. una región rica en A/T (**ATRE: AT Rich Element**) situada entre las posiciones -305 y -267 homóloga al consenso TATTTWAT que se encuentra en muchos genes de plantas: *lbc3* de soya (Jensen et al., 1988; de Bruijn et al., 1988; Jacobsen et al., 1990), *Srglb3* de *Sesbania rostrata* (Metz et al., 1988; de Bruijn et al., 1988), N23 de soya, *gln-γ* de frijol (Forde et al., 1990), nodulina 30 (N30) de frijol (Campos et al., 1995) y en otros genes que no son de nodulinas (Forde et al., 1994).

En otros sistemas se han aislado factores nucleares que interaccionan en *trans* con estos elementos ATRE: factores nucleares derivados de nódulos (PNF-1) y de raíces no infectadas (PRF-1), interaccionan con regiones ricas en A/T del gen *gln-γ* de frijol (Forde et al., 1990); los factores

NAT2 de nódulos maduros, NAT1 de raíces y nódulos y LAT1 de hojas jóvenes, interaccionan con regiones ricas en A/T (ATRE-BS1 y ATRE-BS2) de los promotores de *lbc3* y de N23 de soya (Jacobsen et al., 1990). NAT1 y LAT1 son proteínas homólogas a las proteínas cromosomales del grupo de alta movilidad, HMG I (High Mobility Group) de humanos, que se encuentran asociadas con cromatina transcripcionalmente activa (Jacobsen et al., 1990). En el promotor del gen *Srg1b3* de *Sesbania rostrata* se han encontrado otros elementos ATRE BS2\* que interaccionan con factores específicos de nódulos, raíces y hojas (Metz et al., 1988; de Bruijn et al., 1988), y otros situados río arriba y río abajo de este elemento que parecen ser elementos de regulación en *cis* positivos (de Bruijn et al., 1989; de Bruijn and Schell, 1992; Welters et al., 1993).

d. dos hipotéticas cajas G situadas en las posiciones -375 y -439 homóloga al consenso ACGT. Esta región es típica de promotores de genes de plantas que responden a una gran variedad de estímulos tales como la luz (Meier et al., 1995), anaerobiosis (McKendree et al., 1992), ácido cumárico (Loake et al., 1992) y hormonas como ABA (Shen and Ho, 1995), etileno (Sessa et al., 1995), auxina (Hong et al., 1995) y metil jasmonato (Mason et al., 1993). En estos ejemplos mutaciones o deleciones de la caja G reducen dramáticamente la actividad del promotor o hacen que el promotor ya no responda a un determinado estímulo. A este elemento regulatorio se unen en *trans* una gran variedad de factores agrupados con el nombre de GBFs (G-box binding factors) que incluyen proteínas con características similares a la familia de factores de transcripción bZIP (basic Leucine Zipper). Todos los GBF aislados contienen un dominio rico en prolina involucrado en la activación de la transcripción. La actividad de las GBFs es regulada por fosforilación (Harter et al., 1994). Las propiedades reguladoras de la transcripción de la caja G dependen del complejo de proteínas que se le unan en *trans* y del contexto donde se ubiquen dentro del promotor. Se ha demostrado que las secuencias de ADN aledañas a la caja G influyen sobre las propiedades de este elemento regulatorio (Williams et al., 1992).

No todos los factores proteicos que se unen a ADN están involucrados directamente en el control de la expresión. Por ejemplo, se ha especulado que el factor NAT2 es un componente de la estructura de la cromatina en su estado relajado, que podría estar relacionado con el andamiaje nuclear

(Stougaard et al., 1990; Jacobsen et al., 1990). Por otro lado, no todos los elementos que controlan la expresión en *cis* lo hacen a través de unión a proteínas, ni actúan de forma aislada: en el promotor de los genes *lbc3* y *N23* existe una interdependencia entre distintos elementos de control de modo que la interacción entre elementos negativos, positivos y órgano-específicos controlan la expresión del gen (Stougaard et al., 1990).

### **3. Construcción de herramientas moleculares para hacer estudios de regulación en *cis***

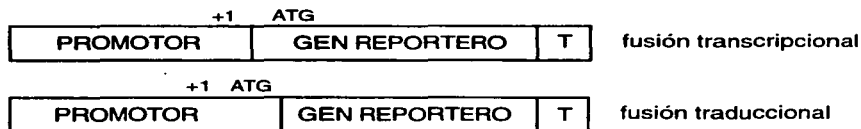
Para determinar si alguna de las cajas detectadas en el promotor de uricasa II u otras regiones no conocidas eran responsables de la regulación de la transcripción de este gen, decidimos llevar a cabo estudios de regulación en *cis*, a través de la construcción de genes quiméricos y su transformación en sistemas vegetales. Los pasos seguidos fueron los siguientes:

- 3.1. Construcción de un gen quimérico, fusionando transcripcionalmente la región 5' regulatoria del gen de uricasa II con la región codificante del gen reportero GUS ( $\beta$ -glucuronidasa) y la región terminadora del gen *nos* (nopalina sintetasa) dentro de dos vectores de transformación vegetal:
  - pBI121, para hacer estudios de expresión estable en plantas transgénicas de *Lotus corniculatus*.
  - pBI426, para hacer estudios de expresión transitoria mediante electroporación de células no infectadas de nódulos de frijol.
  
- 3.2. Construcción de un sistema de delecciones 5' de la región promotora y fusión de estas delecciones al gen reportero GUS dentro de los dos vectores de transformación vegetal, pBI121 y pBI426. Estas construcciones se obtuvieron con el fin de monitorear su expresión en los dos sistemas elegidos (plantas transgénicas de *Lotus corniculatus* y protoplastos de células no infectadas de nódulos de frijol), y de esta forma obtener información sobre el papel que las regiones deletadas podrían tener en la regulación de la expresión del gen de uricasa II.

A continuación se detallan los pasos para la construcción de las herramientas moleculares (apartados 3.1 y 3.2).

### 3.1. Construcción del gen quimérico (Promotor de uricasa II: GUS: nos) dentro de vectores de transformación de plantas.

Para hacer los estudios de regulación decidimos fusionar transcripcionalmente la región 5' regulatoria del gen de uricasa II con el gen reportero  $\beta$ -glucuronidasa (GUS). Una fusión transcripcional es aquella en la que la traducción se inicia a partir del ATG del gen reportero. La ventaja sobre una fusión traduccional, en la que la traducción se inicia a partir del ATG del gen a estudiar, es que no se necesita secuenciar la construcción para saber si quedó en fase de lectura.



Por tanto, para hacer la fusión transcripcional (Promotor de uricasa II: GUS) debíamos eliminar el ATG del gen de uricasa II pero conservar el sitio de inicio de la transcripción (+1).

#### 3.1.1. Localización del sitio de inicio de la transcripción (+1)

Para llevar a cabo una fusión transcripcional del promotor de uricasa II con del gen reportero GUS era necesario conocer la localización exacta del sitio de inicio de la transcripción (+1). Para ello, decidimos llevar a cabo un experimento de "primer extension", en el que, tomando como molde ARN total de nódulo y usando un oligonucleótido marcado radiactivamente complementario a una porción del ARN de interés, la transcriptasa reversa sintetiza una hebra de ADN de cadena simple complementaria al ARN. La cadena de ADN sintetizada queda marcada radiactivamente y es analizada en un gel de poliacrilamida para determinar la longitud de la hebra de ADN que se ha extendido a partir del primer.



El protocolo seguido fue el indicado en Materiales y Métodos. Usando como molde 50 µg de ARN total de nódulos de frijol de 21 días y utilizando como primer un oligonucleótido marcado radiactivamente, complementario al sitio de inicio de la traducción, **ATG** (5' CGCCATCTTTTCGGAATA 3'), se sintetizó una hebra de ADN y se analizó en un carril de un gel de poliacrilamida (Fig 10). Este oligonucleótido fue el mismo que se diseñó para secuenciar el promotor de uricasa II a partir de la clona pPuri.2 (ver Fig. 6). Para determinar exactamente el nucleótido que corresponde al inicio de la traducción (+1), la muestra se corrió junto a una reacción de secuenciación del promotor de uricasa II que se realizó usando como molde la clona pPuri.2 y como primer el mismo oligonucleótido usado en este experimento. Como resultado del experimento de "primer extension" se obtuvo una sola banda. Debido a que el oligonucleótido diseñado estaba muy cercano al sitio de inicio de la transcripción no pudimos leer las 9 bases situadas río abajo del +1. Sin embargo, fue suficiente para leer la secuencia del promotor de uricasa II a partir del sitio de inicio de la transcripción, con lo que pudimos determinar su localización exacta. Como es usual en los promotores de genes eucariotas, el nucleótido A es la primera base del ARNm de uricasa II. Está situado a 20 pb del ATG (Fig 9).

### 3.1.2. Amplificación mediante PCR del promotor de uricasa II

Una vez determinado el sitio de inicio de la transcripción y conocida la localización del ATG mediante la secuenciación del cDNA, diseñamos dos oligonucleótidos para amplificar el promotor de uricasa II mediante un experimento de PCR (Fig 11A): un 29-mero complementario al vector pKS, con una mutación que creaba el sitio de restricción HidIII (5' CTCCTATAGGGAAGCTTGGGTACCGGC 3') y un 28-mero complementario a la región proximal del promotor de uricasa II, con una mutación que creaba el sitio de restricción BamHI y que dejaba río abajo el sitio de inicio de la traducción (ATG), pero permitía amplificar el sitio de inicio de la transcripción (5' CGCCATCTTTTCGGATCCAACACTGTTT 3'). Este experimento de PCR nos permitió tres cosas:

- a. eliminar el ATG y conservar el +1 para hacer la fusión transcripcional.
- b. introducir dos sitios de restricción HindIII y BamHI en los oligonucleótidos diseñados de tal modo que el nuevo fragmento amplificado adquiriera estos sitios que nos iban a facilitar la clonación.

- c. obtener grandes cantidades de ADN correspondiente a la región 5' regulatoria del gen de uricasa II, que nos iban a facilitar la clonación en los vectores elegidos.

El tamaño del fragmento obtenido fue de 1476 pb, como era esperado (Fig 11B y 11C).

### 3.1.3. Clonación del promotor de uricasa en los vectores de transformación: pBI121 y pBI426

pBI121 es un vector derivado del plásmido pBIN19 diseñado para que, una vez introducido en *Agrobacterium*, la bacteria sea capaz de transferir el ADN contenido entre los bordes del ADN-T al genoma de la planta que infecta. El vector pBI121 contiene dentro de los bordes del ADN-T 800 pb del promotor del virus del mosaico de la coliflor (35S) fusionado transcripcionalmente a GUS y al terminador de *nos*, además de un gen marcador de resistencia a kanamicina (Fig 12A). Por lo tanto, nuestra estrategia a seguir para la clonación de la región 5' no codificante del gen de uricasa II en este vector fue la de reemplazar el promotor 35S por las 1476 pb correspondientes a la zona proximal del promotor de uricasa II:

- a. eliminación el promotor 35S mediante digestión HindIII-BamHI del plásmido pBI121.
- b. purificación por gel del plásmido pBI121 carente del promotor 35S.
- c. ligación del plásmido incompleto y la región amplificada del promotor de uricasa II digerida con HindIII y BamHI para obtener la construcción pBIURI (Fig 12A)
- d. transformación del plásmido obtenido a una cepa de *E.coli* mediante electroporación, para amplificar el plásmido.
- e. obtención, mediante conjugación triparental, de cepas de *Agrobacterium rhizogenes* portadoras de los plásmidos construidos, para infectar a plantas de *Lotus corniculatus*.

pBI426 es un vector derivado de pBR322 diseñado para hacer estudios de expresión transitoria en sistemas vegetales. Contiene dos fragmentos repetidos del promotor 35S fusionados transcripcionalmente al elemento potenciador de la traducción AMV, a los genes reporteros GUS y *npt* (neomicina fosfotransferasa) y al terminador de *nos* (Fig 12B). Una vez

introducido en la célula vegetal es incapaz de dividirse y por tanto de perdurar. Sin embargo la maquinaria vegetal es capaz de transcribir y traducir los genes que alberga bajo el control de promotores de plantas. Para la clonación de la región 5' regulatoria del gen de uricasa en el plásmido pBI426 se siguió la misma estrategia empleada para la clonación en pBI121, con la salvedad de que el promotor de uricasa II está clonado entre los sitios de restricción HindIII y BglII (Fig 12B).

### **3.2. Construcción de un sistema de deleciones 5' del promotor de uricasa II.**

Para obtener un sistema de deleciones 5' del promotor de uricasa II decidimos clonar esta región en el vector pKS+, obteniéndose la construcción pKPuri (Fig 13). El sistema de deleciones se obtuvo mediante dos estrategias: digestión ExoIII/SalI y PCR. Los fragmentos obtenidos fueron secuenciados para obtener la secuencia completa del promotor y para mapear exactamente las deleciones.

#### 3.2.1. Deleciones mediante digestión ExoIII/SalI.

Las deleciones se llevaron a cabo como se detalla en Materiales y Métodos y como se esquematiza en la figura 13:

- 1. Corte protectorio con KpnI. Esta enzima al cortar el ADN deja extremos 3' prominentes y, por tanto, la exonucleasa ExoIII no puede actuar. De esta forma, se protege de la digestión este extremo del plásmido
- 2. Corte permisivo con XhoI. Esta enzima al digerir el ADN deja extremos 5' prominentes por donde puede actuar la exonucleasa ExoIII.
- 3. Deleciones con exonucleasa ExoIII. Para obtener una serie de deleciones de distintos tamaños, las reacciones se incuban durante periodos de tiempo progresivos.
- 4. Extremos romos con endonucleasa SI. Una vez obtenidas las deleciones se obtienen extremos romos con la endonucleasa SI para poder ligar de nuevo el plasmido.
- 5. Ligación con ligasa T4 de *E. coli* y transformación mediante electroporación de una cepa de *E. coli* para amplificar las construcciones obtenidas.

### **3.2.2. Deleciones mediante PCR.**

Una vez conocida la secuencia proximal del promotor y los motivos conservados que se encontraban en ella, se obtuvieron mediante PCR deleciones más pequeñas que contuvieran regiones determinadas con posible papel regulador de la transcripción. Para este fin se utilizó el oligonucleótido 3'BamHI, usado previamente en la amplificación del promotor de uricasa II, y se diseñaron tres oligos 5'HindIIIa, 5'HindIIIb y 5'HindIIIc. Se amplificaron tres fragmentos de 66, 187 y 329 pb que contenían distintas cajas de regulación (Fig. 14).

De las deleciones obtenidas por los dos métodos, se seleccionaron nueve de ellas y se clonaron en los plásmidos pBI121 y pBI426, reemplazando al promotor 35S. Así se obtuvieron las construcciones pBI66, pBI187, pBI329, pBI471, pBI735, pBI870, pBI977, pBI1093 y pBI1312 (Fig 15A) y p66, p187, p329, p471, p735, p870, p977, p1093, p1312 (Fig 15B), respectivamente.

Con este trabajo se pusieron a punto las herramientas necesarias para llevar a cabo estos estudios de regulación en *cis* con el gen de uricasa II. Es necesario aclarar que para llevar a cabo un estudio riguroso de la regulación de la expresión de un gen hay que analizar otras regiones del gen distintas a la región 5' regulatoria, como la región intergénica, incluyendo intrones y exones, y la región 3' no codificante (Sieburth and Meyerowitz, 1997; Taylor, 1997) Sin embargo, se propone el análisis de la región 5' regulatoria como primer paso para llevar a cabo este objetivo.

## **4. Estudios de regulación en *cis***

Con las herramientas moleculares obtenidas se iniciaron dos tipos de estudios de regulación en *cis* utilizando dos sistemas vegetales:

- 4.1. Estudios de expresión estable mediante la obtención de plantas transgénicas de *Lotus corniculatus*.
- 4.2. Estudios de expresión transitoria mediante la electroporación de protoplastos de células no infectadas de frijol.

#### 4.1. Estudios de expresión estable: obtención de plantas transgénicas de *Lotus corniculatus*

Para la obtención de plantas transgénicas de *Lotus corniculatus* se utilizó la técnica de transformación mediada por *Agrobacterium rhizogenes*. *A. rhizogenes* es una bacteria patógena del suelo que porta en su genoma el plásmido Ri (inductor de raíces). Una vez que la bacteria infecta a la planta, es capaz de transferir al genoma de la misma una porción de su plásmido Ri, denominada T-DNA, y provocar en la planta el fenotipo denominado "raíces velludas". El T-DNA está flanqueado por dos secuencias repetidas de 25 pb, y puede ser sustituido por el fragmento de ADN de interés que queremos estudiar (en nuestro caso, la fusión Promotor de uricasa II: GUS: nos). La transferencia del fragmento de ADN flanqueado por los bordes repetitivos al genoma de la planta se produce gracias a la acción de genes de virulencia (genes *vir*), localizados en el plásmido Ri, y genes cromosomales *chv*, que facilitan la adhesión de *Agrobacterium* a la célula vegetal. Para llevar a cabo la transformación de *Lotus corniculatus* es necesario obtener cepas de *A. rhizogenes* portadoras del plásmido Ri y del plásmido que porta el gen de interés entre los bordes del T-DNA (en nuestro caso, el plásmido pBI121 y todos los derivados del mismo) (ver Fig. 15A). La transferencia del T-DNA del plásmido Ri al genoma vegetal va a permitir hacer una selección directa de la planta transformada por la formación de raíces velludas. La transferencia del ADN de interés va a ser monitoreada por la resistencia a Km que adquiere la planta, gracias a gen de resistencia a ese antibiótico que porta el T-DNA transferido.

Para obtener plantas transgénicas de *Lotus* se obtuvieron por conjugación triparental cepas de *A. rhizogenes* portadoras de las siguientes construcciones:

CONTROL POSITIVO	pBI121 (35S:GUS:nos)
PROMOTOR URICASA	pBIURI (Puricasa:GUS:nos)
DELECCIONES	pBI66 (TATA:GUS:nos)
	pBI329 (ATRE, OSE, TATA:GUS:nos)

En el protocolo de transformación, detallado en Materiales y Métodos, se emplearon reguladores de crecimiento vegetal: la citocinina BAP (Benzil

amino purina), para inducir brotes, y la auxina ANA (ácido  $\alpha$ -naftalacético), para inducir raíces. En presencia de un agente de selección ( $Km_{50}$ ), se pueden obtener plantas transgénicas a las 18.5 semanas después de la germinación.

Con cada una de las construcciones antes mencionadas se obtuvieron plantas transgénicas, pero no en cantidad suficiente como para hacer estudios fidedignos de expresión. Debido a la complejidad del sistema y a lo prolongado del experimento, se proponen hacer estos estudios de regulación con la leguminosa *Lotus japonicus*, cuyas ventajas se comentan en las Perspectivas de este trabajo.

#### **4.2. Estudios de expresión transitoria: electroporación de protoplastos de células no infectadas de nódulos.**

Para llevar a cabo los estudios de expresión transitoria de uricasa II con las construcciones obtenidas en el vector pBI426 (Fig.15B), utilizamos como estrategia la electroporación de protoplastos de células no infectadas de nódulos de frijol, debido a que es en este tipo celular en donde se obtienen los máximos niveles de expresión del gen de uricasa II. Para ello, pusimos a punto un sistema de obtención de protoplastos de células de nódulo, basándonos en la diferencia de tamaño que existe entre las células infectadas y no infectadas (Ver Materiales y Métodos). Se probaron varias edades de nódulos: 11 días, cuando tiene lugar la fuerte inducción de la expresión, y 21 días, cuando se produce el pico de acumulación de ARNm de uricasa II, que no necesariamente tiene que coincidir con el máximo nivel de expresión (ver Fig. 13 de la introducción de la tesis). Se comprobó que los nódulos de 11 días, además de ser de muy pequeño tamaño y poco manejables, presentaban unas células no infectadas con una gran cantidad de amiloplastos que hacían muy frágiles los protoplastos y, por tanto, disminuía considerablemente el rendimiento de obtención de los mismos. Los pocos que se obtenían se fragmentaban fácilmente durante la electroporación. Por esta razón, decidimos utilizar los nódulos de 21 días cuyas células no infectadas tienen menor proporción de amiloplastos y son más estables. La concentración osmótica óptima para aislar células no infectadas fue 450 mM de Sorbitol.

Para la transformación de protoplastos decidimos utilizar la electroporación por ser el método más eficiente para la transferencia de ADN y expresión transitoria. Se hicieron ensayos probando distintas condiciones de voltaje, capacitancia y tiempo de descarga y utilizando distintos aparatos de electroporación para monitorear la viabilidad de los protoplastos 8 horas después de ser electroporados. Las condiciones óptimas de electroporación se describen en Materiales y Métodos.

Los DNA plasmídicos utilizados fueron los siguientes:

PROMOTOR URICASA II	pPuri (uricasa:GUS:nos)
DELECCIONES	p66 (TATA:GUS:nos) p329 (TATA, OSE, ATRE:GUS:nos) p471 (TATA, OSE, ATRE, 2 cajas G:GUS:nos)
CONTROL NEGATIVO	sin ADN

A pesar de que pusimos a punto la técnica de obtención de protoplastos de células no infectadas de nódulo, no pudimos monitorear la actividad del promotor 35S ni el de uricasa II en los protoplastos electroporados, debido a que no soportaban el periodo de recuperación y se lisaban. Las células no infectadas del nódulo contienen una gran cantidad de amiloplastos que son, posiblemente, los que provocan la inestabilidad de estas células. Como se indica en las Perspectivas del trabajo, se proponen hacer estos estudios utilizando protoplastos de células de hoja de frijol, de más fácil obtención y mayor resistencia.

GENOTECA DE *Phaseolus vulgaris* EN  $\lambda$ -EMBL3A

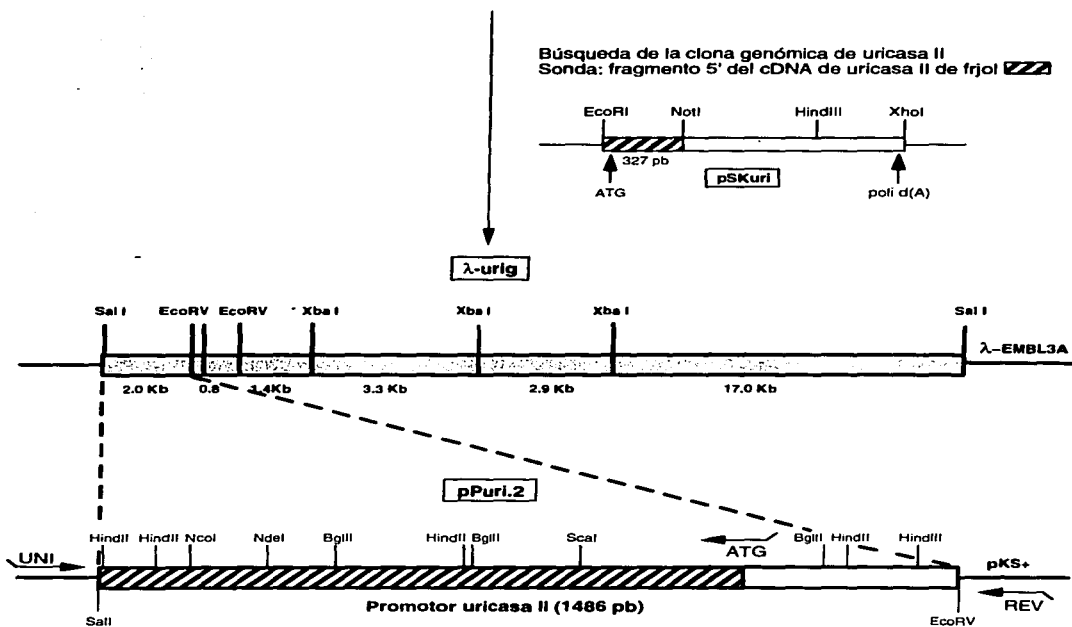


Fig. 6: Aislamiento de la clona genómica de uricasa II,  $\lambda$ -urIIg, y construcción de la clona pPuri.2: A partir de una genoteca de *P.vulgaris* en  $\lambda$ -EMBL3A se aisló una clona genómica de uricasa II,  $\lambda$ -urIIg, usando como sonda el fragmento 5' del cDNA de uricasa II de frijol. A partir de esta clona se subclonó un fragmento de 2.0 Kb que contenía 1486 pb correspondientes a la región 5' regulatoria del gen de uricasa II. Se presenta el mapeo parcial de ambas clonas y los primers utilizados para la secuenciación (  $\leftarrow$   $\rightarrow$  ).



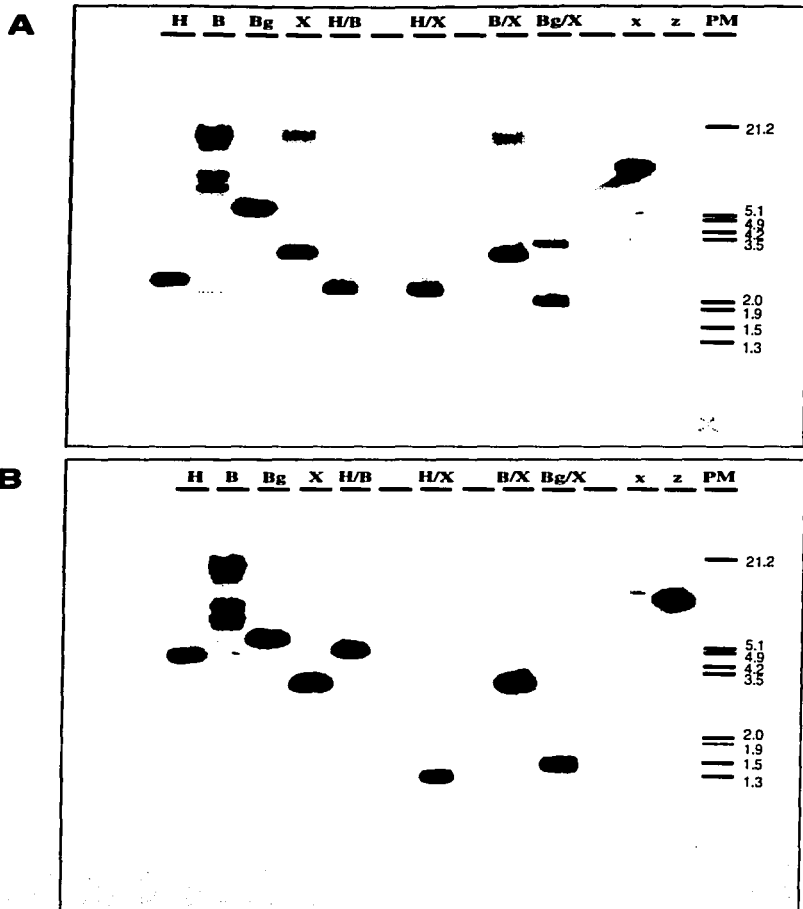


Fig 7: Análisis por Southern de la clona genómica  $\lambda$ -urig digerida con varias enzimas de restricción. Como sondas se usaron las regiones 5' (fragmento EcoRI-NcoI) ó 3' (fragmento HindIII-XhoI) de la clona de cDNA de uricasa II (paneles A y B, respectivamente). H, HindIII; B, BamHI; Bg, BglII; X, XbaI, x, fragmento 5' del cDNA de uricasa II; z, fragmento 3' del cDNA de uricasa II; PM, peso molecular en Kb

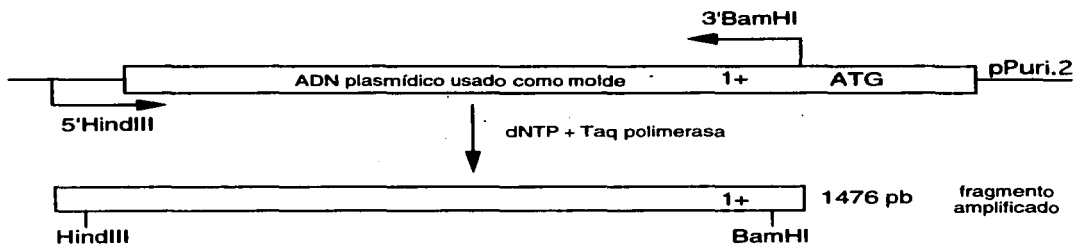
AGT	GTT	TAT	TCC	GAA	AAG	M	A	Q	E	V	V	E	G	F	K	F	11			
		◀															51			
E	Q	R	H	G	K	E	R	V	R	V	A	R	V	W	R	T	P	Q	30	
GAG	CAG	AGG	CAC	GGG	AAA	GAG	CGC	GTC	AGA	GTT	GCG	CGC	GTG	TGG	AGG	ACG	CCG	CAG	108	
G	R	H	F	V	V	E	W	R	V	G	I	T	L	F	S	D	C	V	49	
GGT	CGC	CAC	TTC	GTT	GTG	GAG	TGG	CGC	GTA	GGT	ATT	ACT	CTC	TTC	TCT	GAT	TGC	GTC	165	
N	S	Y	L	R	D	D	N	S	D	I	V	A	T	D	T	M	K	N	68	
AAC	TCG	TAT	CTC	CGC	GAT	GAT	AAC	TCT	GAC	ATC	GTT	GCC	ACT	GAC	ACC	ATG	AAA	AAC	222	
T	V	Y	A	K	A	K	E	C	S	D	I	L	S	V	E	D	F	A	87	
ACG	GTG	TAT	GCA	AAA	GCA	AAG	GAA	TGC	TCG	GAT	ATA	CTT	TCT	GTC	GAG	GAC	TTT	GCT	279	
I	L	L	A	K	H	F	V	S	F	Y	K	K	V	T	G	A	I	V	106	
ATT	CTA	CTT	GCC	AAG	CAC	TTT	GTA	TCA	TTT	TAC	AAG	AAG	GTT	ACT	GGT	GCT	ATT	GTG	336	
N	I	V	E	K	P	W	E	R	V	I	V	D	G	Q	P	H	Q	H	125	
AAT	ATC	GTG	GAA	AAA	CCA	TGG	GAG	CGT	GTC	ATT	GTG	GAT	GGT	CAA	FCT	CAT	CAA	CAT	393	
▼																				
G	F	T	L	G	S	E	K	H	T	T	E	A	I	V	Q	K	S	G	144	
GGT	TTC	ACA	CTT	GGG	TCT	GAG	AAG	CAT	ACA	ACA	GAG	GCA	ATA	GTA	CAG	AAG	TCT	GGT	450	
S	L	Q	L	T	S	G	I	E	G	L	S	V	L	K	T	T	Q	S	163	
TCA	CTA	CAA	TTG	ACT	TCT	GGT	ATT	GAA	GGA	TTG	TCA	GTG	TTG	AAG	ACA	ACC	CAG	TCT	507	
G	F	E	N	F	I	R	N	K	Y	T	A	L	P	D	T	R	E	R	182	
GGT	TTT	GAG	AAT	TTC	ATT	AGA	AAC	AAG	TAC	ACA	GCA	CTT	CCA	GAT	ACC	CGC	GAA	AGG	564	
I	L	A	T	E	V	T	A	L	W	R	Y	S	Y	E	S	L	Y	N	201	
ATT	TTG	GCA	ACA	GAA	GTA	ACT	GCT	CTG	TGG	AGG	TAT	TCG	TAC	GAA	TCT	CTA	TAC	AAC	621	
L	P	Q	K	P	L	Y	F	T	D	K	Y	L	E	V	K	K	V	L	220	
CTC	CCT	CAG	AAG	CCA	CTA	TAC	TTC	ACA	GAC	AAG	TAT	CTG	GAA	GTG	AAA	AAA	GTT	CTG	678	
A	D	T	F	F	G	P	P	N	R	G	V	Y	S	P	S	V	Q	N	239	
GCT	GAC	ACA	TTT	TTT	GGG	CCA	CCA	AAC	AGG	GGA	GTC	TAT	AGC	CCA	TCT	GTT	CAA	AAC	735	
T	L	Y	L	M	A	K	A	T	L	N	R	F	P	D	I	A	Y	V	258	
ACA	CTC	TAC	CTT	ATG	GCA	AAG	GCC	ACA	CTG	AAC	AGA	TTT	CCT	GAT	ATT	GCT	TAT	GTC	792	
H	L	K	M	P	N	L	H	F	L	P	V	N	I	S	S	K	D	G	277	
CAT	CTA	AAG	ATG	CCA	AAT	CTT	CAT	TTC	TTA	CCA	GTC	AAC	ATC	TCA	AGC	AAG	GAT	GGT	849	
P	I	V	K	F	E	D	D	V	Y	L	P	T	D	E	P	H	G	S	296	
CCA	ATT	GTG	AAG	TTT	GAG	GAT	GAT	GTT	TAT	TTA	CCA	ACG	GAC	GAG	CCT	CAT	GGC	TCA	906	
I	E	A	S	L	S	R	V	W	S	K	L	*							308	
ATT	GAA	GCA	AGC	TTG	AGC	CGG	GTT	TGG	TCA	AAG	CTG	TAG	AAA	CTG	CAG	AAG	CTA	TGT	963	
GTG	GTG	CTC	ATC	CCT	TCT	GGC	CTC	AGA	GAT	GCT	GAT	TTT	CAT	TAA	TGC	ACG	TGT	CAT	1020	
CAT	GTA	ATT	CTG	GTT	TTT	GTT	ATC	TTT	ATG	TTT	TGT	TTA	ATG	GAG	AAA	CTA	ATA	TGC	1077	
ATG	AAT	AAC	TTC	CAC	GAG	GGA	TAT	TCT	GCA	GGT	TGC	ACC	AAT	GCT	AAG	TTT	TTG	ATG	1134	
TCC	AAA	AAT	CCA	ATA	AAT	TTC	CTT	GTG	ATC	TTT	ATG	GAA	ACT	GAA	ATA	AGT	GTT	ATT	1191	
CTT	ATG	AAG	TTG	ATG	AAA	TGC	TTC	TTT	AAA	AAA	AAA	AAA	AAA	AAA	AAA	AAA	AAA	AAA	1236	

Fig 8: Secuencia de nucleótidos y la deducida de aminoácidos del cDNA de uricasa II de nódulos de frijol. Se señalan los motivos conservados en otras urato oxidasas: ▼dominio de unión a cobre; SKL señal de importe a peroxisomas;            motivos conservados de función desconocida; \* codon de término; AATAAAT putativa señal de poliadenilación; ◀ primer diseñado para secuenciación de la región 5' regulatoria.

GTCGACCTGC	AGGTCAACGG	ATCTTTTCTA	CATATTATTA	ATGTAATTAA
TAATAATAAT	AATAATAATA	ATAATATCAA	TAACGACCAT	ATTAATATTA
TTGTTAGTAT	TATTAATTAT	TATTAGCAGT	ATTGTTATTA	TGACTATTA
TTTATTATAA	TATTAATAAT	ATTATTGCAT	AATACTTAAA	TTTAAATCAA
AACAATACCG	TCCATGGAAT	GAAATTCAAG	CTGAATCTCA	ACAATTC AAC
GTACAAATTT	AAACATTCA	AATTTTGT	GAATATAGTT	CAACTCTTTT
TACCTTTACT	TCACAAGTAA	TAGTAACTTT	AAACTACGTG	AAAAAAAAT
AAAAATATCC	TAAAACCTCT	AAACCACCAA	ACTAATCAA	ACACATATGA
AAAAATTAAC	TAAATCAGAT	AATAACATTT	TCAATTTATT	GAACATACGA
AAATACTTAT	AAACACAAG	TTGAAATTTT	TTAGAATAAA	GGATAAATTT
ACACCAAATT	AAATCTGAT	AAAGGTAAAA	TCAATTTAGA	TTATGTGACT
TTCTAACCAG	TTAGACTTTA	TTGAAAAAAC	AACTACAAC	AACTTTAAAA
TCATAATATA	GAAAAAATG	TTTTTTAGAG	ATGATAATTA	TTCTATAAAT
TAATAACTAA	ATGATTA AAA	CATCAATTTA	TACTTTTAAA	TATAGTTTAT
AATTTTGATT	ACTATTGTTA	ATGTAATGTA	ATGAATAAAG	ATGAGTCTTG
TATAATGT	TATGCGTTAA	TAGTCTCTTA	TTATTTTTTC	TTCTTTCTT
TTGTTATGGT	AGTCTTTAG	TGGTGAATCT	GAAAAAGATA	CTCCGACACT
ATTATACTG	TTATTATTGT	CAACAGATCT	GAGACTGACT	CGTCCGATAC
CAATTAGTAG	AGTAAAATTA	TFACAAAAAT	AGTAAATTTA	TTATAATTCA
TAACATAAAG	TTTTACAATA	AGCATATAAA	TTATATTCAT	TGCCGTACTG
AGTTTAACT	TATTTTAAAA	ATCTTACTTT	AAAATCTGCA	GGTCCTTATC
CCATCCTAGT	AACATCACGA	CACATCCATG	ATTTTCAAAT	TAGGTTTCTT
GCCACCTAAC	AATTTACAG	AAAAAGGAGA	AAATTTCTAAC	ACATTTTCTA
AGTACTCTTT	TTTTATTATT	ATTTAAATTT	TAAAAAATTA	AAAAAACGTT
AGTCTCTAAT	TTCACTTTTG	TATCTCTTAA	TTATATAATT	TTTAACCAAT
TATAATTAAC	AAGAATCAAT	CCCTTAAAGT	TAAGACCAA	TTGTTGATAG
AAAAAAATG	AAAATTTTGG	AATTTGTTG	GACGATGATG	TAACCGGCAC
ACAGAGTTAC	GGTGAAACAG	GCAAAGATGG	TCGTGTCTC	ACGCGAAACA
CCGCGGAGTA	TAAATAAAGT	GAAACTCGAA	AGCGTAAAT	CACTCACTCT
TTCACTTAAC	TAAACAGTGT	TTATCCGAA	AAG GCGC	AGGAGTTGT
GGAGGGGTTG	AAGTTTGAGC	AGAGGCACGG	GAAAGAGCGC	GTCAGAGTTG
CGCGCGTGTG	GAGGACGCGC	AG		

	caja G		OSE (Organ Specific Element)
	1+ (inicio transcripción)		ATRE (rgión rica en AT)
	caja TATA		caja G

Fig 9: Secuencia de nucleótidos de la región 5' regulatoria del gen de uricasa II de *Phaseolus vulgaris*. Se muestran las putativas cajas de regulación en *cis* y los sitios de inicio de la transcripción y traducción.

**A**

### OLIGONUCLEÓTIDOS UTILIZADOS EN LA AMPLIFICACIÓN

<b>3'BamHI</b> : 5'CGCCATCTTTTC	<b>BamHI</b> GGATCCA	AACTGTTT 3'	28-mero	Tm:61°C
<b>5'HindIII</b> : 5'CTCACTATAGGG	<b>HindIII</b> AAGCTT	GGGTACCGGC 3'	29-mero	Tm: 65°C

### CONDICIONES DE LA PCR

n° de ciclos	tiempo	temperatura
1 ciclo	2'	95°C
25 ciclos	1.5'	92°C
		58°C
		72°C
1 ciclo	10'	72°C

ADNcs A T G C

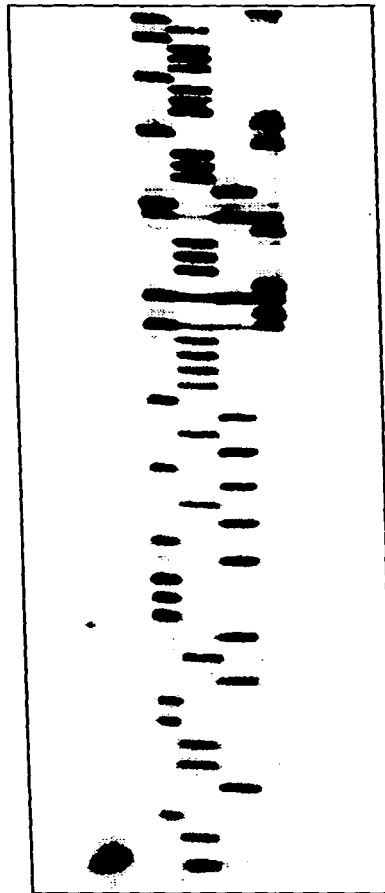
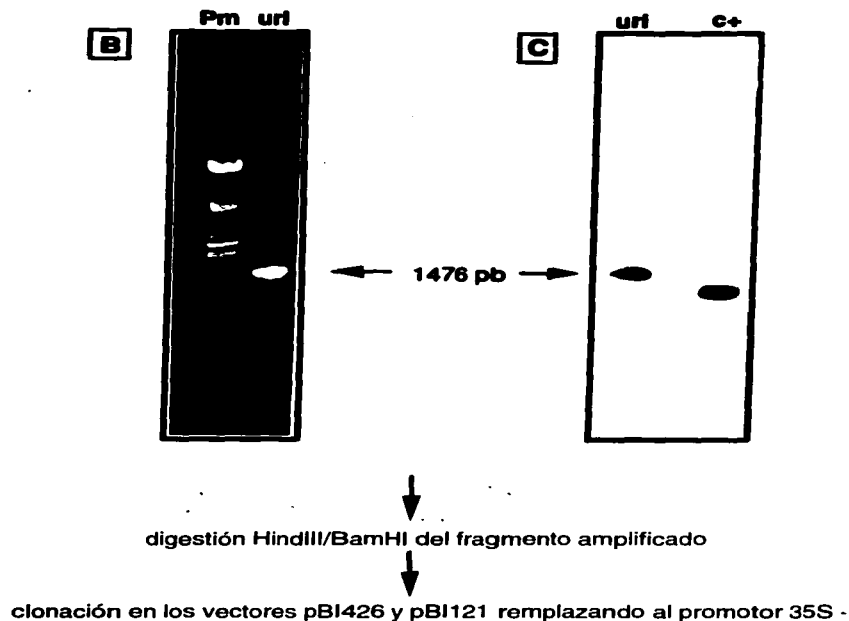
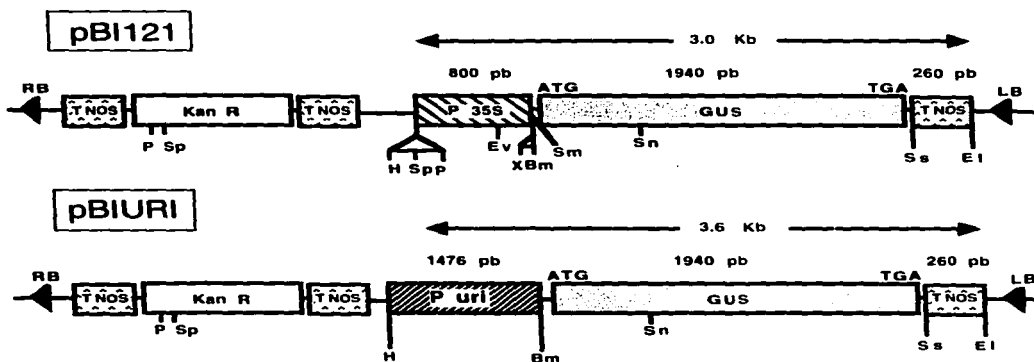


Fig 10: Determinación del sitio de inicio de la transcripción (+1) del promotor de uricasa II. Autorradiografía resultado del experimento de "primer extension" ADNcs, fragmento de ADN de cadena simple extendido a partir del primer. Su tamaño es de 27 nucleótidos. La secuencia del promotor de uricasa II correspondiente a la zona proximal corrida en el mismo gel nos indica que el primer nucleótido es una A.



**Fig 11: Amplificación por PCR del promotor de uricasa II. A:** Elementos utilizados en la amplificación del promotor de uricasa II por PCR. **B:** Electroforesis del producto de la amplificación en un gel de agarosa teñido con EtBr. **C:** Southern blot del fragmento amplificado por PCR usando como sonda un fragmento BgIII-BgIII de 1100 pb correspondiente a la zona proximal del promotor de uricasa II. Pm, peso molecular estándar; uri, fragmento amplificado por PCR; c +, control positivo correspondiente al fragmento BgIII-BgIII de la zona proximal del promotor de uricasa II.

## A. Estudios de expresión estable



## B. Estudios de expresión transitoria

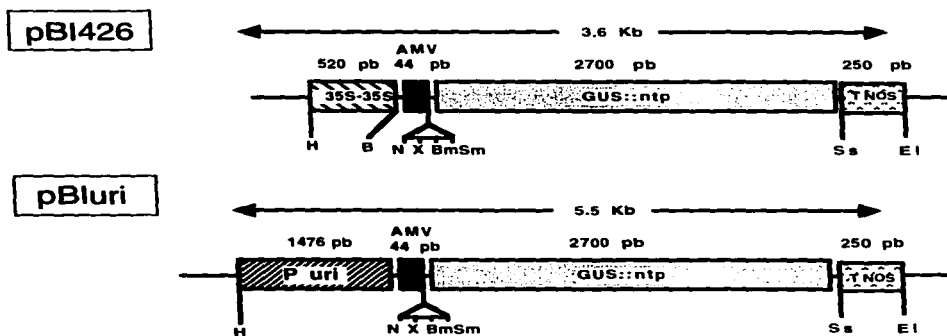
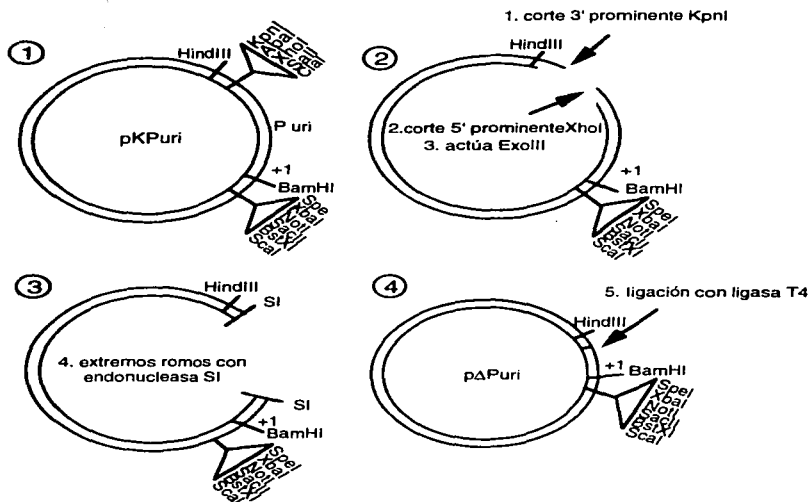
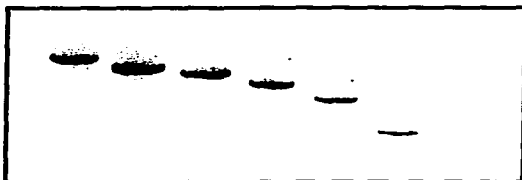


Fig 12: Vectores utilizados para llevar a cabo las fusiones transcripcionales del promotor de uricasa II con el gen reportero GUS y las construcciones derivadas de ellos. **A:** al vector pBI121 se le sustituyó el promotor 35S por las 1476 pb correspondientes a la zona proximal del promotor de uricasa II, dando lugar a la construcción pBIURI. **B:** al vector pBI426 se le sustituyó el promotor 35S por las 1476 pb correspondientes a la zona proximal del promotor de uricasa II, dando lugar a la construcción pBluri.

**A****B**

1312 | 1093 | 977 | 870 | 735 | 471 | ♀

**C**

1312 | 1093 | 977 | 870 | 735 | 471 | ♀

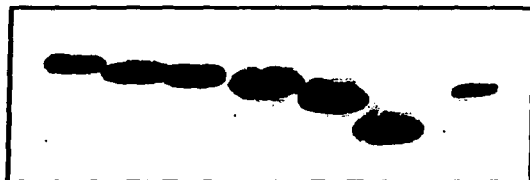
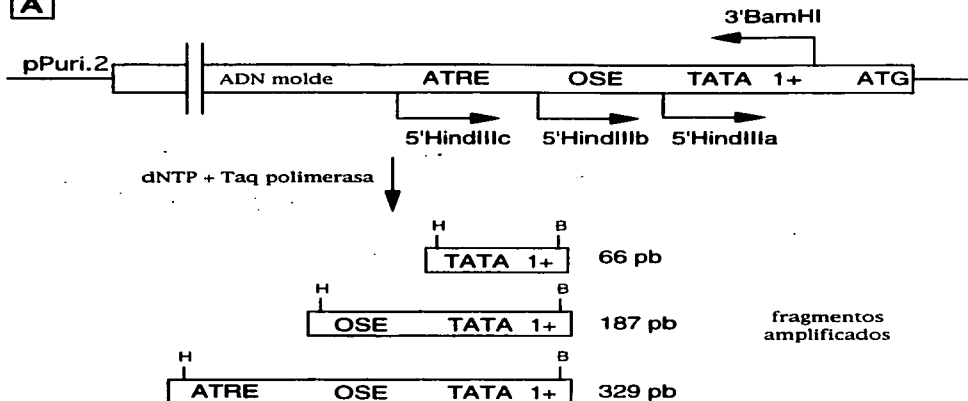


Fig 13: A: Esquema de la obtención de las deleciones 5' del promotor de uricasa II mediante digestión ExoIII/Sall. 1: plásmido a partir del cual se hicieron las deleciones 5' del promotor de uricasa II; 2: corte del plásmido con una enzima que deja el extremo 3' prominente donde no actúa ExoIII, y posterior corte con una enzima que deja el extremo 5' prominente por donde actúa ExoIII. 3: creación de extremos romos con la endonucleasa SmaI. 4: ligación de los extremos romos con ligasa T4. B: Electroforesis de las deleciones seleccionadas; C: Southern blot de las deleciones hibridadas contra el fragmento de 1476 pb correspondiente al promotor de uricasa II.



**A**

### OLIGONUCLEÓTIDOS UTILIZADOS EN LA AMPLIFICACION

<b>3'BamHI</b> : 5'CGCCATCTTTTCGGATCCAACACTGTTT 3'	28-mero	Tm:61°C
<b>5'HindIIIa</b> : 5' TGGTCGTGTCCTCTTCGAAACACGCG 3'	26-mero	Tm:63°C
<b>5'HindIIIb</b> : 5' ATCAATCCCTTAAGCTTAAGACCAAAT 3'	27-mero	Tm:63°C
<b>5'HindIIIc</b> : 5' GAATCTACACATTTCGAAGTACTACT 3'	26-mero	Tm: 61°C

### CONDICIONES DE LAS PCR

n° de ciclos	tiempo	temperatura
1 ciclo	3'	95°C
25 ciclos	1'	92°C
	1'	58°C
1 ciclo	1'	72°C
	10'	72°C

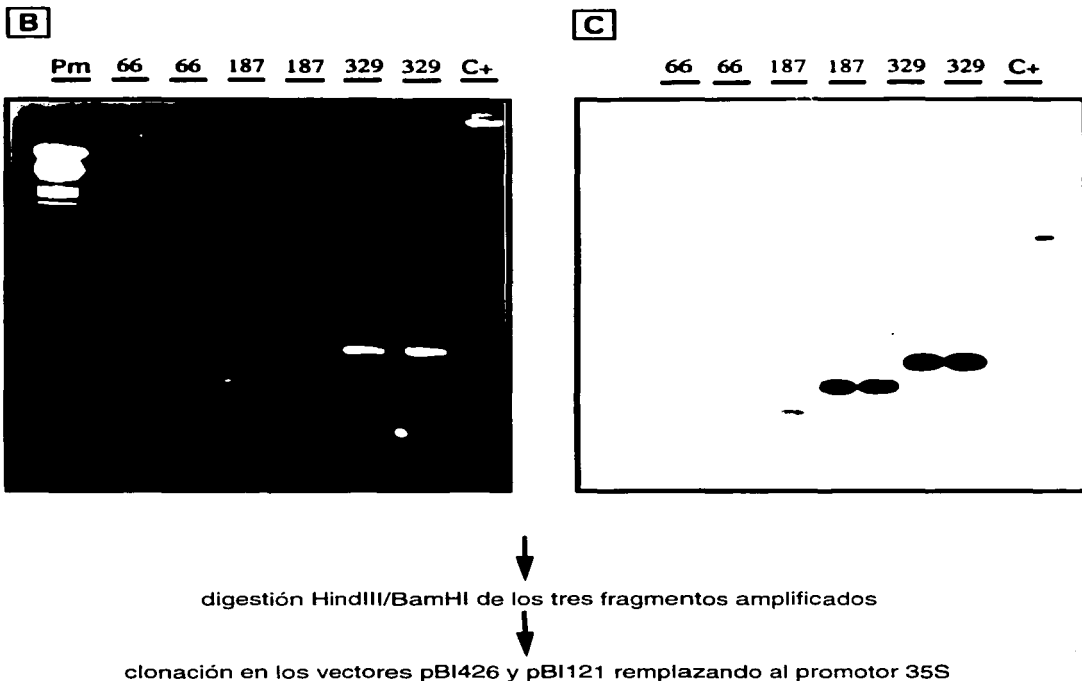
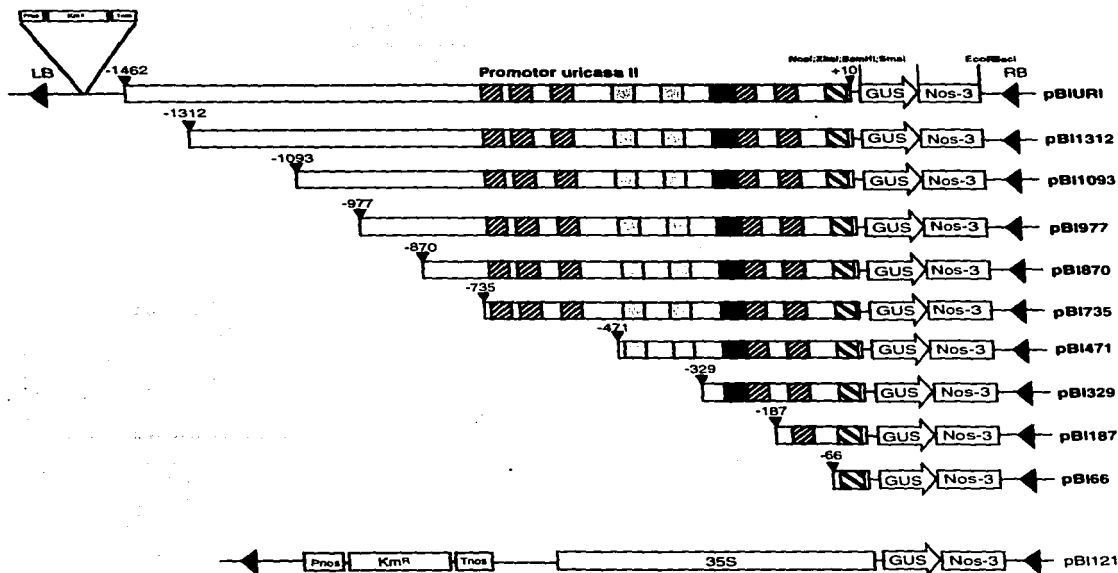





Fig 14: A: Elementos utilizados para la obtención de las tres deleciones proximales del promotor de uricasa II. B: Electroforesis de los productos de la amplificación. C: Southern blot de los fragmentos amplificados por PCR usando como sonda el fragmento de 1476 pb correspondiente al promotor de uricasa II.

**A**

-  **caja TATA**
-  **OSE (Organ Specific Element)**
-  **ATRE (región rica en AT)**
-  **caja G**

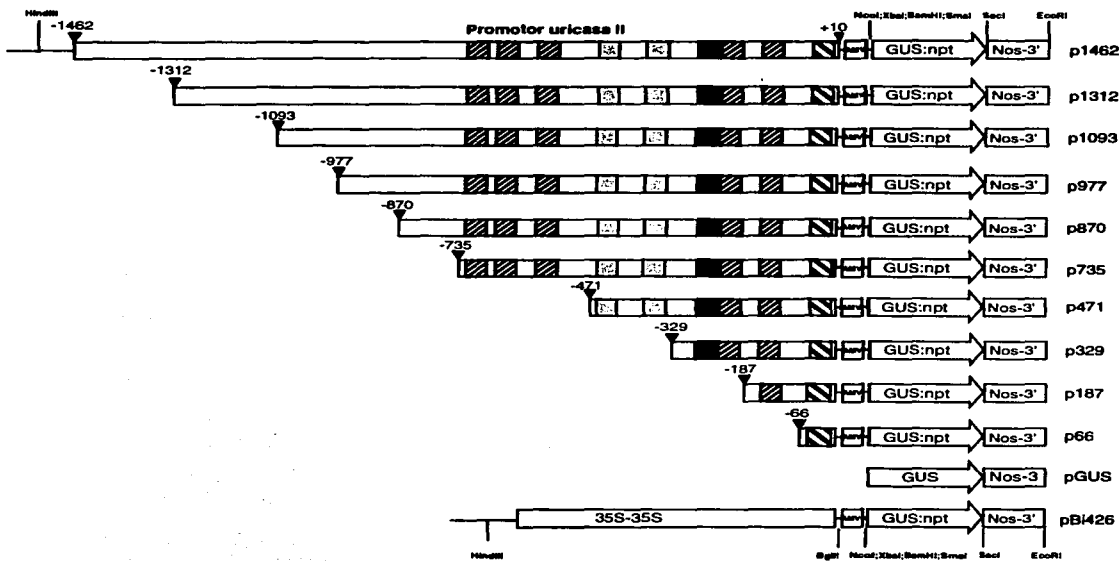
**B**

Fig 15: Diagrama de las fusiones uricasa II::GUS en los vectores pBI121 y pBI426. Las deleciones se llevaron a cabo en la región -1462 a +10 del promotor de uricasa II clonada en pKS (PKuri) y luego insertadas en los vectores pBI121 (panel A) y pBI426 (panel B) en sustitución del promotor 35S. La posición exacta de las deleciones con respecto al sitio de inicio de la transcripción (+1) se indican con flechas y números

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Hibridación *in situ*

Se colectaron raíces, cotiledones e hipocotilos de plántulas de frijol de 4 días después de la imbibición (ddi), se cortaron en porciones pequeñas y se fijaron en 4% (w/v) paraformaldehído, 0.25% (v/v) glutaraldehído en 10 mM de fosfato de sodio (pH 6.8), suplementado con 1 M NaCl, durante toda la noche a temperatura ambiente, estando la primera hora sometidas a vacío. Los tejidos fijados se deshidrataron y se embebieron en parafina siguiendo el método descrito por Van den Wiel et al., (1990). Con un microtomo manual, se obtuvieron cortes de 7  $\mu$ m. La clona de cDNA de uricasa II, pSKuri, (ver Fig. 1 del artículo) digerida con la enzima de restricción HindIII se usó como molde para transcribir *in vitro* el ARNm antisentido a partir del promotor T7, resultando una sonda de 293 b marcada con (DIG)-11-rUTP (Boehringer, Germany). La misma clona digerida con NcoI se transcribió *in vitro* a partir del promotor T3 para obtener el ARNm sentido marcado por el mismo método. Los ARNm sentido y antisentido se hibridaron contra las secciones montadas en portaobjetos tratados previamente con poli-L-Lisina (Sigma), según el método descrito por McKhann and Hirsch (1993). Los portaobjetos hibridados se secaron y se montaron en Poly/Mount (Polyscience, Inc., Washington, PA). Las fotografías fueron tomadas en un microscopio Zeiss con objetivos de 6.3X, 10X y 40X, usando una película Kodak de 35mm y 100 ASA

### Inmunolocalización

Se obtuvieron cortes de 7  $\mu$ m de raíces, cotiledones e hipocotilos de plántulas de frijol de 4 ddi como se detalla en el apartado anterior y se montaron en portaobjetos previamente tratados con poli-L-Lisina (Sigma). Las secciones se desparafinaron con xilol 100% y después de sucesivos pasos de deshidratación con alcoholes, se bloquearon en 5% (w/v) de leche descremada comercial en TBST (10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.05% (v/v) Tween 20, pH 8.0) a 42°C durante 4-8 h. Posteriormente, se incubaron con el anticuerpo anti-uricasa II (1:100) en TBST conteniendo 5% de leche descremada comercial, durante toda la noche a temperatura ambiente. Se hicieron 4 lavados de 20 min con TBST y luego se incubaron con un anticuerpo anti-conejo acoplado a fosfatasa alcalina (1:1500) (Boehringer Mannheim). Para la detección del antígeno se usaron los sustratos NBT y BCIP en solución AP (100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 9.5)

más una gota de levamisole (Vector laboratories). Los portaobjetos inmunodetectados se secaron y se montaron en Poly/Mount (Polyscience, Inc., Washington, PA). Las fotografías fueron tomadas en un microscopio Zeiss con objetivos de 6.3X, 10X y 40X, usando una película Kodak de 35mm y 100 ASA.

### **Aislamiento y secuenciación de la región 5' regulatoria**

A partir de una genoteca de *Phaseolus vulgaris* en  $\lambda$ -EMBL3A se aisló una clona genómica de uricasa II, usando como sonda un fragmento EcoRI-NotI de 327 pb del cDNA de uricasa II de nódulo marcado radiactivamente con  $\alpha$ - $^{32}$ P[cCTP]. En el vector pBluescript KS+ (Stratagene Inc., USA) se subclonó un fragmento de 2 Kb que contenía 1572 pb correspondientes a la región 5' regulatoria del gen. Para obtener la secuencia del promotor se construyó un sistema de delecciones 5' del promotor. Las delecciones se obtuvieron por el método ExoIII-SI o utilizando PCR (reacción en cadena de la polimerasa). La secuencia de nucleótidos se determinó siguiendo el método de Sanger et al. (1977) utilizando el kit de Sequenase de United States Biochemical (USB) según indican los fabricantes. La búsqueda de posibles cajas de regulación y motivos conservados en otros protores de genes de plantas se hizo mediante el programa "find pattern"(Wisconsin package Version 9.0, Genetics Computer Group (GCG), Madison, WIS)

### **Primer extension**

El protocolo seguido para realizar el experimento de "primer extension" es el indicado en Current Protocols in Molecular Biology, unidad 4.8. El ARN utilizado se extrajo a partir de nódulos frescos de frijol de 21 días según el protocolo de Vries et al., (1988). El oligonucleótido utilizado como primer se marcó radiactivamente con  $[\gamma$ - $^{32}$ P]ATP usando polinucleótido kinasa T4 de Boehringer. La reacción de retrotranscripción se realizó usando transcriptasa reversa y deoxirribonucleótidos de Amersham. Las muestras se corrieron en un gel de 8% poli(acrilamida)/7M urea. El gel se secó y se expuso con películas Kodak X-OMAT.

### **Creación de un sistema de delecciones 5' mediante digestión ExoIII/SalI.**

Para obtener un sistema de delecciones 5' de la región regulatoria del gen de uricasa II se partió de la construcción pKPuri (promotor de uricasa clonado en el vector pKS+). El método seguido fue el siguiente:

- 1. Corte protectorio: digestión del plásmido pKPuri con la enzima de restricción KpnI, que deja un extremo 3' prominente que no es digerido por la exonucleasa ExoIII.
- 2. Corte permisivo: digestión del plásmido con la enzima XhoI que deja extremo 5' prominente sustrato de la ExoIII.
- 3. Incubación a 37°C con la exonucleasa ExoIII que va digiriendo progresivamente nucleótidos por el extremo del plásmido digerido con XhoI. Cada 45 seg se toman muestras de la digestión y se paran en una solución 10 mM Tris HCl pH 7.5, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl<sub>2</sub>, 20 µg/ml RNasa A.
- 4. Digestión con endonucleasa SI para hacer extremos romos.
- 5. El volumen de la digestión se divide en dos:
  - 5a. Digestión con BamHI para liberar los insertos y poder checarlos en un gel de agarosa.
  - 5b. Ligación de los plásmidos con ligasa T4.
- 6. Transformación de *E.coli* DH5α con las distintas construcciones mediante electroporación.
- 7. Transformación de *A. rhizógenes* mediante conjugación triparental con las distintas cepas de *E. coli*.

### **Creación de deleciones 5' mediante PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)**

Para obtener las tres deleciones proximales del promotor de uricasa II se usó como ADN molde la clona pPuri.2 que contiene el fragmento de 2 Kb correspondiente a la región 5' regulatoria del gen fusionada a GUS. Para amplificar los fragmentos de 66 pb (que contiene la caja TATA), el fragmento de 174 pb (que contiene la caja TATA y un motivo OSE) y el fragmento de 329 pb (que contiene la caja TATA, un motivo OSE y una región rica en A/T ó ATRE) se diseñaron los oligonucleótidos:

3'BamHI (5' CGCCATCTTTTCGGATCCAACACTGTTT 3')  
 5'HindIIIa (5' TGGTCGTGTCTCTTCGAAACACGCG 3')  
 5'HindIIIb (5' ATCAATCCCTTAAGCTTAAGACCAAAT 3')  
 5'HindIIIc (5' GAATCTACACATTTCGAAGTACTACT 3')

Los tres fragmentos se amplificaron en ciclos de PCR programados en las siguientes condiciones: 1 ciclo de desnaturalización de 2 min a 95°C; 25 ciclos que incluyen cada uno 3 ciclos: desnaturalización (1 min a 94°C),

alineamiento (1 min a 58°C) y polimerización (1 min a 72°C); por último, 1 ciclo de extensión de 10 min a 72°C.

Los fragmentos amplificados se digirieron con las enzimas HindIII y BamHI y se clonaron en los plásmidos pBI121 y pBI426 a los que previamente se había eliminado el promotor 35S.

#### **Preparación de células electrocompetentes de *E. coli*.**

- 1. Se creció un preinóculo de 5 ml (LB) de *E. coli* CMK o DH5 $\alpha$  durante 8 horas.
- 2. Con el preinóculo se inocularon matraces con medio 2YT, y se dejaron crecer 4 horas a 37°C.
- 3. Se cosecharon las células de todo el medio a 10 000 rpm 6 min a 4°C.
- 4. Se resuspendió suavemente la pastilla en 10 ml de agua destilada estéril y fría y se le dieron otros 3 lavados.
- 5. Se resuspendió la pastilla en 10 ml de 10% glicerol estéril y frío.
- 6. Se hicieron alícuotas de 70  $\mu$ l en eppendorff estériles. Las células se guardaron a - 70°C.

#### **Electroporación de *E. coli*.**

- 1. Se mezclaron perfectamente en hielo ~ 50 ng de ADN plasmídico con células electrocompetentes de *E. coli*. A continuación se electroporaron las bacterias utilizando un aparato de electroporación en las siguientes condiciones: capacitancia 25  $\mu$ FD, resistencia 800 ohmios y 2500 voltios, en celdas de 0.4 cm de ancho.
- 2. Inmediatamente después de dar el pulso eléctrico se crecieron las células en 1 ml de medio LB sin antibiótico durante una hora; se plaquearon en césped 3 diferentes diluciones del cultivo y se incubaron a 37°C por ~ 15 horas.

#### **Conjugación triparental.**

Para obtener las clonas de *Agrobacterium rhizógenes* portadoras de las construcciones se llevaron a cabo conjugaciones triparentales en las que intervinieron tres cepas:

*E. coli* (clona con la construcción correspondiente)

*E. coli* pRK 2013 (coadyuvante)

*Agrobacterium silvestre* (receptora): *A. rhizogenes* 15834



- 1. Se crecieron cultivos líquidos de las tres cepas con sus antibióticos respectivos.
- 2. Se centrifugaron 3 ml de cada cultivo 15 seg a 14 000 rpm, y se lavaron dos veces las pastillas con 1 ml de  $MgSO_4$  100mM. Se centrifugaron y resuspendieron las pastillas en 100  $\mu$ l de  $MgSO_4$  100 mM y se mezclaron en un solo tubo.
- 3. Se depositaron 300  $\mu$ l de esta mezcla en una caja Petri conteniendo medio LB sólido sin antibiótico, dejándose secar bien para después incubar las bacterias durante 24 hrs a 30°C. Al término de esta incubación se aislaron colonias en medio LB sólido con antibiótico ( $Km_{50}$ ) y se incubaron 48 hrs a 30°C.

#### **Obtención de plantas transgénicas de *Lotus corniculatus***

Para las transformaciones realizadas en *Lotus corniculatus* se emplearon semillas de la variedad "Rodeo".

- 1. Se colocaron las semillas de 15 a 30 min en una solución de benlate (1 gr/ lt), se esterilizaron con una solución de hipoclorito de sodio al 20% durante 15 min y se enjuagaron con agua destilada estéril tres veces, dejándolas hidratando una noche en agua estéril.
- 2. Se germinaron en cajas de Petri con medio B5 (50%) sin sacarosa y gelrite al 0.9%. Se colocaron 10-12 semillas por caja y se dejaron en fotoperíodo 16:8 luz:oscuridad a 25°C.
- 3. Se hirieron plántulas de 10-12 días de germinación en el hipocotilo con una aguja embebida de *A. rhizogenes*. Las bacterias se tomaron directamente de colonias frescas crecidas previamente en medio sólido con sus respectivos antibióticos a 30°C durante 2 días. Las plantas infectadas se dejaron 24 horas en oscuridad y después se sometieron a fotoperíodo.
- 4. Después de 2-4 semanas de cultivo en fotoperíodo, a las plantas que desarrollaron raíces velludas, se les cortó la raíz principal y se subcultivaron como plantas compuestas durante 2 semanas en medio B5, con el objeto de que la raíz velluda creciera más.
- 5. A las raíces bien desarrolladas se les cortó la parte aérea y la raíz velluda se subcultivó durante 2 ó 3 semanas en medio B5, sacarosa 2%, gelrite 0.2%, 10mM  $(NH_4)_2SO_4$ , BAP 0.2  $\mu$ g/ml, cefatoxina<sub>300</sub> y  $km_{50}$  (selección) para obtener brotes.
- 6. Los brotes emergentes se subcultivaron en el medio señalado en el punto 5 varias semanas más hasta que éstos elongaran.

- 7. Los brotes elongados se cortaron y subcultivaron en B5 (50%), sacarosa 1%, gelrite 0.4%, ANA 0.5µg/ml, cefatxina<sub>300</sub> y km<sub>50</sub>, para inducir raíces.
- 8. Los brotes enraizados se cultivan en B5, sacarosa 2%, gelrite 0.2%, cefatoxina<sub>300</sub> y Km<sub>50</sub>, para elongar las raíces.
- 9. Las plántulas enraizadas se transfirieron a macetas con vermiculita y se cubren con bolsas para evitar desecación. Las plantas se regaron con una solución nutritiva para plantas libre de nitrógeno.
- 10. Una vez que se obtuvieron brotes ya acondicionados en macetas, se inocularon con *R. loti* NZP 2037. Se obtiene nódulos maduros a las 5 semanas.

### **Obtención de protoplastos de células no infectadas de nódulos de frijol**

- 1. Partir de 3-4 g de nódulos frescos de 21 días. Hacer rebanadas de 1 mm de grosor.
- 2. Incubarlas durante 2-3 horas a temperatura ambiente con agitación suave (50 rpm) en solución enzimática estéril (10 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM MES-KOH pH 5.6, 450 mM sorbitol, 1% celulasa, 0.1% pectoliasa, 1% β-mercaptoetanol, 0.5% BSA).
- 3. Filtrar a través de 4 capas de gasa estéril (en la gasa se quedan residuos y células del cortex).
- 4. Filtrar a través de una capa de nylon de 20 µm de poro (en el filtro se quedan las células infectadas).
- 5. Dejar decantar o centrifugar 2 min a 30-60 x g.
- 6. Resuspender en 2-5 ml de solución de enjuague (450 mM sorbitol, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 20 mM MES-KOH pH 7.5).
- 7. Filtrar nuevamente a través de una capa de nylon de 20µm de poro.
- 8. Dejar decantar o centrifugar 2 min a 30-60 x g.
- 9. Resuspender en 1 ml de solución de enjuague.
- 10. Conteo en hematocitómetro.
- 11. Diluir los protoplastos hasta una concentración de 2-4 x10<sup>6</sup> protoplastos/ml.

### **Electroporación de protoplastos de células no infectadas de nódulos de frijol**

Los protoplastos obtenidos por el método descrito anteriormente

deben estar más de 30 min en hielo antes de ser electroporados.

- 1. Pasar 200  $\mu$ l de solución de protoplastos ( $2-4 \times 10^6$  protoplastos/ml) a una cubeta de electroporación de 0.4 cm de ancho.
- 2. Añadir 10-25  $\mu$ g de ADN plasmídico y 10-25  $\mu$ g de DNA de esperma de salmón sonicado.
- 3. Incubar 10 min en hielo.
- 4. Introducir los electrodos en la cubeta y electroporar en las siguientes condiciones:

Capacitancia: 220  $\mu$ F

Voltaje: 300 V

Tiempo de descarga: 10 mseg

- 5. Dejar las cubetas 10 min en hielo para permitir que los poros queden abiertos y el flujo de ADN sea mayor. Tomar 100  $\mu$ l para analizar viabilidad.
- 6. Trasladar la solución de protoplastos electroporados a cajas de Petri de 5 ml e incubar en medio K3 (ver apéndice A) con 450mM de sorbitol. Sellar las cajas e incubarlas durante 8 horas a 22-26°C en la oscuridad.

## CONCLUSIONES

1. Existe un sólo gen de uricasa II en el genoma de *Phaseolus vulgaris*.

2. Este gen único se expresa en distintos estadios del desarrollo del frijol (simbiosis y establecimiento de la plántula) y en distintos órganos de la plántula (cotiledón, raíz e hipocotilo) y de la planta adulta (nódulo, raíz, tallo y hoja).

3. Durante la simbiosis, la expresión de uricasa II aumenta de unas 100 a 150 veces, 2 ó 3 días antes de que inicie la fijación de  $N_2$ . Uricasa II se localiza en los peroxisomas de las células no infectadas del nódulo de frijol y participa en la vía de síntesis de ureidos, formas nitrogenadas que el nódulo exporta al resto de la planta.

4. Durante la germinación de la semilla de frijol no se detectaron niveles de transcrito ni de proteína de uricasa II. Su expresión se induce cuando inicia el establecimiento de la plántula, es decir, aproximadamente 1 día después de la imbibición de la semilla. En la plántula de frijol los niveles de transcrito y proteína son mucho más bajos, comparados con los detectados en el nódulo simbiótico.

5. En los cotiledones de plántulas de frijol el transcrito y la proteína de uricasa II se localizan en las células que están en un estado metabólico activo. Posiblemente, uricasa II participa en la síntesis de ureidos como parte del programa de movilización de reservas que tiene lugar durante el establecimiento de la plántula. Los ureidos se sintetizan como estrategia para economizar carbono en condiciones en que la relación C/N es baja, por ejemplo, durante la simbiosis o durante el desarrollo de la plántula antes de que ésta sea desarrolle su hojas fotosintéticas.

6. En las raíces de plántulas de frijol el transcrito y la proteína de uricasa II se localizan en las células parenquimáticas del xilema y en las fibras del floema. Las células parenquimáticas que rodean al xilema tienen, por tanto, la capacidad para sintetizar ureidos, que se distribuirán a través del xilema al resto de la planta. En las fibras del floema uricasa II podría estar derivando a la formación de ureidos los altos niveles de  $NH_4^+$  que se

producen durante la activa síntesis de pared celular que tiene lugar en estas células.

7. En los hipocotilos de plántulas de frijol el transcrito y la proteína de uricasa II se localiza en las células parenquimáticas que rodean al xilema y en el floema. Del mismo modo que en la raíz, las células parenquimáticas del xilema sintetizan ureidos que serán distribuidos al resto de la plántula a través de los vasos del xilema.

8. En el promotor de uricasa II se han encontrado posibles cajas de regulación homólogas a las presentes en otros promotores de plantas y de otras nodulinas, que podrían estar controlando la expresión órgano-, tejido-, célula- y organelo- específica de uricasa II y su expresión durante la simbiosis y el establecimiento de la plántula.

## PERSPECTIVAS

Una de nuestras principales inquietudes es la caracterización de la proteína de 50-kD relacionada con uricasa II. Para ello se proponen las siguientes metas:

1. Microsecuenciación del polipéptido de 50-kD. De esta forma sabremos si esta proteína conserva los motivos característicos de las urato oxidasas. Para ello, se partirá de un extracto de raíces de frijol de 4 ddi y se separará y aislará la banda de 50-kD de un gel de SDS-PAGE para, posteriormente, analizar su secuencia de aminoácidos.

2. Determinación de sus parámetros cinéticos y bioquímicos ( $K_M$ , pH óptimo de actividad, pI, etc)

3. Localización subcelular de la proteína de 50-kD en cotiledones, raíces e hipocotilos de frijol. Para llevar a cabo este objetivo se propone realizar un fraccionamiento de un extracto de alguno de los órganos de plántulas de frijol, por ejemplo, raíces de 4 días, para obtener por un lado, una fracción conteniendo peroxisomas y por otro, una fracción soluble que corresponda al citoplasma. Determinar mediante ensayo tipo western donde se encuentran las proteínas de 35- y 50-kD.

4. Determinar la posible función de la proteína: podríamos determinar la relación de la proteína de 50-kD con apoptosis, analizando la presencia de esta proteína en sistemas que incluyan programas de desarrollo que lleven asociados muerte celular programada; por ejemplo, senescencia de hojas, xilogenesis, ataque por patógenos, etc. Por otro lado, la obtención de plantas transgénicas de *Lotus japonicus* y *Arabidopsis thaliana* transformadas con ARN antimensajero de uricasa II y el análisis de su fenotipo, nos podrían indicar la función de uricasa II en plantas leguminosas y no leguminosas no transportadoras de ureidos.

Como otra meta no menos importante nos proponemos llevar a cabo los estudios de regulación en *cis* de la expresión del gen único de uricasa II de frijol. Para ello proponemos hacer uso de los genes quiméricos construídos y de técnicas de transformación vegetal alternativas a las ya probadas:

1. Obtención de plantas transgénicas de *Lotus japonicus*. En este sistema se pueden llevar a cabo estudios de expresión estable para monitorear la expresión de las construcciones obtenidas durante el

desarrollo y a nivel de órgano- tejido y célula-especificidad. Para esta leguminosa se han reportado protocolos de transformación exitosos (Handbergk, Stougaard, 1992). Posee algunas características que la hacen ventajosa como modelo de estudio: es una especie autógama diploide, posee un genoma pequeño (3-5 veces el genoma de *Arabidopsis*) y tiene tiempo de generación corto. En general, se pueden obtener plantas transgénicas en 4 meses y semillas en 6 meses.

Lo ideal para hacer estos estudios de expresión estable sería conseguir un sistema de transformación para frijol. En nuestro laboratorio se han obtenido plantas quimeras de frijol transformadas mediante imbibición de plántulas germinadas con cultivos saturados de *Agrobacterium tumefaciens*. Se pretende poner a punto este método embebiendo ejes embrionarios de frijol para aumentar la probabilidad de que la bacteria infecte una célula meristemática que de lugar a una planta transgénica completa.

2. Transformación de protoplastos de células de frijol. En este sistema se pueden hacer estudios de expresión transitoria para medir los niveles de transcripción que dirigen cada una de las construcciones. Además, el uso de protoplastos permite la transformación no sólo de DNA sino de otros compuestos que podrían alterar los niveles de transcripción, actuando como activadores o inhibidores de la misma. Por otro lado, en este sistema también se puede monitorear el efecto de algunas condiciones de incubación sobre la expresión (hormonas, microaerobiosis).

En nuestro laboratorio se puso a punto el protocolo para la obtención de protoplastos de células no infectadas de nódulos de frijol. Sin embargo, los ensayos de transformación mediante electroporación no fueron exitosos. Se propone utilizar otro método de transformación, como la mediada por polietilenglicol, o alternativamente, monitorear la expresión del promotor de uricasa II y sus deleciones mediante la transformación de protoplastos de otro tipo celular, como por ejemplo protoplastos de células de hoja (en hojas de frijol se ha detectado la expresión de uricasa II (ver artículo)), que permitan una más fácil extracción y una menor fragilidad de las células.

Adicionalmente se tratará de realizar estos estudios utilizando un gen reportero más sensible como es la proteína verde fluorescente (GFP) (Chalfie et al., 1994). Esto permitirá observar niveles bajos de expresión, como los que se encuentran en órganos de la planta distintos al nódulo.

## BIBLIOGRAFÍA

- Allen NS, Bennett MN, Cox DN, Shipley A, Ehrhardt DW, Lonf SR (1994).** Effects of Nod factors on alfalfa root hair, Ca<sup>2+</sup> and H<sup>+</sup> currents and on cytoskeleton behavior. In *Advances in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions*. MG Daniels, JA Downie, AE Osbourne, eds (Dordrecht: Kluwer Academic Publishers) **3**:107-114
- Appleby CA (1984).** Leghemoglobin and *Rhizobium* respiration. *Ann Rev Plant Physiol* **35**:443-478
- Asad S, Fang Y, Wycoff KL, Hirsch AM (1994).** Isolation and characterization of cDNA and genomic clones of *MsENOD40* transcripts are detected in meristematic cells of alfalfa. *Protoplasts* **183**:10-23
- Atkins C.A. (1982).** Ureide metabolism and the significance of ureides in legumes. In Subba Rao, N.S. eds. *Advances in Agricultural Microbiology* Oxford and IBH, New Delhi pp 53-80
- Basset B, Goodman RN, Novachy A (1977).** Ultrastructure of soybean nodules: release of rhizobia from the infection thread. *Can. J. Microbiol.* **23**:573-582
- Bennet MJ, Lightfoot DA, Cullimore JV (1989a).** cDNA sequence and differential expression of the gene encoding the glutamine synthetase gamma polypeptide of *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Mol Biol* **12**:553-565
- Bennet MJ, Cullimore JV (1989b).** Glutamine synthetase isoenzymes of *Phaseolus vulgaris* L: subunit composition in developing root nodules and plumules. *Planta* **179**:433-440
- Bergmann H, Preddie E, Verma DPS (1983).** Nodulin-35: a subunit of specific uricase (uricase II) induced and localized in the uninfected cells of soybean nodules. *EMBO J.* **2**: 2333-2339
- Birdsey EC, Lynch VH (1962)** Utilization of nitrogen compounds by unicellular algae. *Science* **137**: 763-764
- Bloemberg GV, Kamst E, Hartveld M, van der Drift KM, Haverkamp J, Thomas-Oates J, Lugtenberg BJ, Spain HP (1995).** A central domain of Rhizobium Node protein mediates host specificity by determining the hydrophobicity of fatty acyl moieties of nodulation factors. *Mol Microbiol* **16**:1123-1136
- Brewin NJ, Rae AL, Perotto S, Kannenberg AL, Rathbun EA, Lucas MM, Gunter A, Bolanos L, Kardailsky IV, Wilson KE (1994).** Bacterial and plant glycoconjugates at the *Rhizobium*-legume interface. *Biochem Soc Symp* **60**:61-73
- Campos F, Carsolio C, Kuin H, Bisseling T, Rocha-Sosa M, Sánchez F (1995).** Characterization and gene expression of nodulin npv30 from common bean. *Plant Physiol* **109**:363-370



- Cárdenas L, Domínguez J, Quinto C, López-Lara IM, Lugtenberg BJ, Spaink HP, Rademaker GJ, Haverkamp J, Thomas-Oates JE (1995).** Isolation, chemical structures and biological activity of the lipo-chitin oligosaccharide nodulation signals from *Rhizobium elii*. *Plant Mol Biol* **29**:453-464
- Chalfie MY, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC (1994)** Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* **263**:802-805
- Cheon CI, Hong Z, Verma DPS. (1994).** Nodulin-24 follows a novel pathway for integration into the peribacterioid membrane in soybean root nodules. *J Biol Chem* **269**:6598-6602
- Cook D, Dreyer D, Bonnet D, Howell M, Nony E, VandenBosch K (1995).** Transient induction of a peroxidase gene in *Medicago truncatula* precedes infection by *Rhizobium meliloti*. *Plant Cell* **7**:43-55
- Cooper JB, Long SR (1994).** Morphogenetic rescue of *Rhizobium meliloti* nodulation mutants by *trans*-zeatin secretion. *Plant Cell* **6**:215-225
- Crespi MD, Jurkevitch E, Poiret M, d'Aubenton-Carafa Y, Petrovics G, Kondorosi E, Kondorosi A (1994).** *enod40*, a gene expressed during nodule organogenesis, codes for a non-translatable RNA involved in plant growth. *EMBO J* **13**:5099-5112
- Damsz B, Dannenhoffer JM, Bell JA, Webb MA (1994).** Immunocytochemical localization of uricase in soybean cotyledons. *Plant Cell Physiol* **35**:979-982
- Debellé F, Plazanet C, Roche P, Pjo C, Savagnac A, Rosenberg C, Promé JC, Dénarié J (1996)** The NodA proteins of *Rhizobium meliloti* and *Rhizobium tropici* specify the *N*-acylation of Nod factors by different fatty acids. *Mol Microbiol* **22**:303-314
- Debellé F, Roche P, Plazanet C, Maillet F, Pujol C (1995)** In *Nitrogen Fixation: Fundamentals and Applications*, ed.1A Tikhonovich, VI Romonov, NA provorov, WE Newton, Netherlands: Kluwer Academic, pp 275-280.
- de Bruijn FJ, Felix G, Grunenberg B, Hoffmann H-J, Metz B, Ratet P, Simons-Schreier A, Szabados L, Welters P, Schell J (1989).** Regulation of plant genes specifically induced in nitrogen-fixing nodules: Role of *cis*-acting elements and *trans*-acting factors in leghemoglobin gene expression. *Plant Mol Biol* **13**:319-325
- de Bruijn FJ, Jensen EO, Metz BA, Hoffman HJ, Welters P, Marcker KA, Schell J (1988).** Interactions of *trans*-acting factors with distinct DNA elements in the promoter regions of the *Glycine max* and *Sesbania rostrata* leghemoglobin genes. In: *Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions*. Palacios R., Verma DPS. (eds) St. Paul, MN; APS Press; The American Phytopathological Society. pp 333-339.
- de Bruijn FJ, Schell J (1992).** Regulation of plant genes specifically induced in developing and mature nitrogen-fixing nodules: *cis*-acting elements and *trans*-acting factors. In: *Control of Plant Gene Expression*, DPS Verma, Ed (Boca Raton, FL:

CRC Press), pp 241-257

**de Bruijn FJ, Szabados L, Schell J (1990).** Chimeric genes and transgenic plants are used to study the regulation of genes involved in symbiotic plant-microbe interactions (nodulin genes). *Developmental Genetics* **11**:182-196

**Dehio C, de Bruijn FJ (1992).** The early nodulin gene *SrEnod2* from *Sesbania rostrata* is inducible by cytokinin. *Plant J* **2**:117-128

**Devi Prasad PV (1983)** Hypoxanthine and allantoin as nitrogen sources for the growth of some freshwater green algae. *New Phytol* **93**:575-580

**de Vries S, Hoge H, Bisseling T (1988).** Isolation of total polysomal RNA from plant tissues. *Plant Molec Biol Manual* **B6**:1-13

**Ehrhardt DW, Atkinson EM, Long SL (1992).** Depolarization of alfalfa root hair membrane potential by *Rhizobium meliloti* Nod factors. *Science* **256**:998-1000

**Fisher MH, Long SR (1992)** *Rhizobium*-plant signal exchange. *Nature* **357**:655-660

**Forde BG, Freeman J, Oliver JE, Pineda M (1990).** Nuclear factors interact with conserved A/T rich elements upstream of a nodule enhanced glutamine synthetase gene from French Bean. *Plant Cell* **2**:925-939

**Forde BG (1994).** AT-rich elements (ATREs) in the promoter regions of nodulin and other higher plant genes: a novel class of cis-acting regulatory element?. *Results Probl Cell Differ* **20**:87-103

**Franssen HJ, Vijn I, Yang WC, Bisseling T (1992).** Developmental aspects of the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Plant Mol Biol* **19**:89-107

**Friedman TB, Burnet JB, Lootens S, Steinman R, Wallrath LL (1992).** The urate oxidase gene of *Drosophila pseudoobscura* and *Drosophila melanogaster*: evolutionary changes of sequence and regulation. *J Mol Evol* **34**:62-77

**Fujihara S, Yamaguchi M (1980)** Nitrogen fixation and allantoin formation in soybean plants. *Agric Biol Chem* **44**:2569-2573.

**Geremia RA, Mergaert P, Geelen M, van Montagu M, Holsters M (1994).** The Nod C protein of *Azorhizobium caulinodans* is a N-acetylglucosamyltransferase. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**:2669-2673

**Goethals K, Van Montagu M, Holster M (1992)** Conserved motifs in a divergent *nod* box of *Azorhizobium caulinodans* ORS571 reveals a common structure in promoters regulated by LysR-type proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**:1646-1650

**Govers F. et al (1990)** Function and regulation of the early nodulin gene ENOD2. In *Genetic Engineering of Crop Plants* (Lycett G.W. and Grierson D.W. eds) London: Butterwoths, pp 259-269

**Greenberg J (1996)** Programmed cell death: A way of life for plants. *Proc Natl Acad*

- Handberg K, Stiller J, Thykjær, Stougaard J** (1994) Transgenic plants: *Agrobacterium* mediated transformation of the diploid legume *Lotus japonicus*. Cell Biology 1-9
- Handberg K, Stougaard J** (1992) *Lotus japonicus*, an autogamous diploid legume species for classical and molecular genetics. Plant J 2: 487-496
- Hanks FJ, Tolbert NE, Schubert KR** (1981). Localization of enzymes of ureide biosynthesis in peroxisomes and microsomes of nodules. Plant Physiol. 68:65-69
- Harter K, Kircher S, Frohnmeyer H, Krenz M, Nagy F, Schafer E** (1994). Light-regulated modification and nuclear translocation of cytosolic G-box binding factors in parsley. Plant Cell 6:545-59
- Hawker S** (1985). Sucrose. In Biochemistry of Storage Carbohydrates in Green Plants, PM Dey and RA Dixon, eds (London: Academic Press), pp 1-51
- Heard J, Dunn K** (1995). Symbiotic induction of MADS-box gene during development of alfalfa root nodules. Proc Natl Acad Sci USA 92:5273-5277
- Heidstra R, Geurts R, Franssen H, Spaink HP, van Kammen A, Bisseling T** (1994). Root hair deformation activity of nodulation factors and their fate on *Vicia sativa*. Plant Physiol. 105:787-797
- Hirsch AM** (1992). Developmental biology of legume nodulation. New Phitol 122: 211-237
- Hirsch AM, Bhuvaneswari TV, Torrey JG, Bisseling T** (1989). Early nodulin genes are induced in alfalfa root outgrowths elicited by auxin transport inhibitors. Proc Natl Acad Sci USA 86:1244-1248
- Hockenberry DM, Oltvai ZN, Yin XM, Milliman CL, Korsmeyer SJ** (1993) Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. Cell 75: 241-251
- Hong JC, Cheong YH, Nagao RT, Bahk JD, Key JL, Cho MJ** (1995). Isolation of two soybean G-box binding factors which interact with a G-box sequence of an auxin-responsive gene. Plant J 8:199-211
- Horvath B, Heidstra R, Lados M, Moerman M, Spaink HP, Promé JC, van Kammen A, Bisseling T** (1993). Lipo-oligosaccharides of *Rhizobium* induce infection-related early nodulin gene expression in pea roots hairs. Plant J 4:727-733
- Hungria M, Johnston AW, Phillips DA** (1992) Effects of flavonoids released naturally from bean (*Phaseolus vulgaris*) on nodD-regulated gene transcription in *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*. Mol Plant Microbe Interact 5:199-203
- Jacobsen K, Laursen NA, Jensen OE, Marcker A, Poulsen C, Marcker KA** (1990). HMG I-like proteins from leaf and nodule nuclei interact with different AT motifs in soybean nodulin promoter. Plant Cell 2:85-94

- Jensen EO, Marcker KA, Schell J, de Bruijn F.** (1988). Interaction of a nodule specific *trans*-acting factor with distinct DNA elements in the soybean leghemoglobin *lbc3* 5' upstream region. *EMBO J* 7:1265-1271
- John M, Röhrig H, Schmidt J, Wieneke U, Schell J** (1993). *Rhizobium* Nod B protein involved in nodulation signal synthesis is a chitoooligosaccharide deacetylase. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:625-629
- Jørgensen JE, Stougaard J, Marcker A, Marcker KA** (1988). Root nodule specific gene regulation: analysis of the soybean N23 gene promoter in heterologous symbiotic systems. *Nucl Acids Res* 6:39-50.
- Journet EP, Pichon M, Dedieu A, de Billy F, Truchet G, Barker DG** (1994). *Rhizobium meliloti* Nod factors elicit cell-specific transcription of the ENOD12 gene in transgenic alfalfa. *Plant J* 6:241-249
- Kouchi H, Hata S** (1993). Isolation and characterization of novel cDNAs representing genes expressed at early stages of soybean nodule development. *Mol Gen Genet* 238:106-119
- Kouchi H, Hata S** (1995). GmN56, a novel nodule-specific cDNA from soybean root nodules encodes a protein homologous to isopropylmalate synthase and homocitrate synthase. *Mol Plant Microbe Interact* 8:172-176
- Kouchi H, Tsukamoto, Tajima S** (1989). Differential expression of nodule specific (nodulin) genes in the infected, uninfected and cortical cells of soybean (*Glycine max*) root nodules. *J Plant Physiol* 135:608-617
- Küster H, Perlick AM, Puhler A** (1994) Members of a broadbean nodulin family with partial homologies to the alfalfa nodulin 25 are composed of two types of amino acid repeats flanked by unique amino acid sequence termini. *Plant Mol Biol* 24:143-157
- Lam HM, Coschigano K, Schultz C, Melo-Oliveira R, Tjaden G, Oliveira I, Ngai N, Hsieh MH, Coruzzi G** (1995). Use of *Arabidopsis* mutants and genes to study amide amino acid biosynthesis. *Plant Cell* 7:887-898
- Lara M, Cullimore JV, Lea PJ, Mifflin BJ, Johnson AWB, Lamb JW** (1983). Appearance of a novel form of plant glutamine synthetase in *Phaseolus vulgaris* L. *Planta* 157:254-258
- Larsen K, Jochimsem BU** (1986). Expression of nodule-specific uricase in soybean callus tissue is regulated by oxygen. *EMBO J* 5:15-19
- Lauridsen P, Franssen H, Stougaard J, Bisseling T, Marcker KA** (1993). Conserved regulation of the soybean early nodulin ENOD2 gene promoter in determine and indeterminate transgenic root nodules. *Plant J* 3:483-492
- Lee N-G, Stein B, Suzuki H, Verma DPS** (1994). Expression of antisense nodulin-35 RNA in *Vigna aconitifolia* transgenic root nodules retards peroxisome development

and affects nitrogen availability to the plant. *Plant J* 3:599-606

**Legocki RP, Verma DPS** (1979). A nodule specific plant protein (Nodulin-35) from soybean. *Science* 205:190-192

**Legoux R, Delpech B, Dumont X, Guillemot JC, Ramond P, Shire D, Caput D, Ferrara P, Loison G** (1992) Cloning and expression in *Escherichia coli* of the gene encoding *Aspergillus flavus* urate oxidase. *J Biol Chem* 267:8566-8570.

**Levine A, Pennell RI, Alvarez ME, Palmer R, Lamb C** (1996) Calcium-mediated apoptosis in a plant hypersensitive disease resistance response. *Curr Biol* 6:427-437

**Levine A, Tenhaken R, Dixon R, Lamb C** (1994) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* 79:583-593

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

**Lucas K, Boland MJ, Schubert KR** (1983). Uricase from soybean root nodules: purification, properties and comparison with the enzyme from cowpea. *Arch Biochem. Biophys* 226:190-197.

**Marsolier MC, Debrosses G, Hirel B** (1995). Identification of several soybean cytosolic glutamine synthetase transcripts highly or specifically expressed in nodules: expression studies using one of the corresponding gene in transgenic *Lotus corniculatus*. *Plant Mol Biol* 27:1-15

**Mason HS, DeWald DB, Mullet JE** (1993). Identification of a methyl jasmonate-responsive domain in the soybean *vspB* promoter. *Plant Cell* 5:241-51

**Matsumoto T, Yatazawa M, Yamamoto Y** (1977) Distribution and change in the contents of allantoin and allantoic acid in developing nodulating and non-nodulating plants. *Plant Cell Physiol* 18:353-359

**Matvienko M, van de Sande K, Yang WC, van Kammen A, Bisseling T, Franssen H** (1994). Comparison of soybean and pea *ENOD40* cDNA clones representing genes expressed during both early and late stages of nodule development. *Plant Mol Biol* 26:487-493

**McKendree WL, Ferl RJ** (1992). Functional elements of the *Arabidopsis Adh* promoter include the G-box. *Plant Mol Biol* 19:859-62

**McKhann HI, Hirsch AM** (1993). *In situ* localization of specific mRNAs in plant tissues. In BR Glick, JE Thompson, eds, *Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology*, CRC press, Inc.

**Meier I, Callan KL, Fleming AJ, Gruissem W** (1995). Organ-specific differential regulation of a promoter subfamily for the ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase small subunit genes in tomato. *Plant Physiol* 107:1105-1118

**Metz BA, Welters P, Hoffman HJ, Jensen OE, Schell J, de Bruijn FJ (1988).** Primary structure and promoter analysis of leghemoglobin genes of the stem-nodulated tropical legume *Sesbania rostrata*: conserved coding sequences *cis*-elements and *trans*-acting factors. *Mol Gen Genet* **214**:181-191

**Miao GH, Hong Z, Verma DPS (1992).** Topology and phosphorylation of soybean nodulin-26, an intrinsic protein of the peribacteroid membrane. *J Cell Biol* **118**:481-490

**Miller FDA, Fogg GE (1958)** Studies on the growth of *Xanthophyceae* in pure culture. The relations of *Monodus subterraneus* to organic substances. *Arch Microbiol* **30**:1-16

**Mothes K. (1961).** The metabolism of urea and ureides. *Can J Bot* **39**:1785-1807

**Motojima K, Goto S (1989)** Cloning of rabbit uricase cDNA reveals a conserved carboxy-terminal tripeptide in three species. *Biochim Biophys Acta* **1008**: 116-118

**Mylona P, Pawlowski, Bisseling T (1995).** Symbiotic nitrogen fixation. *The Plant Cell* **7**:869-885

**Nadler KD, Avissar YJ (1977).** Heme biosynthesis in soybean root nodules. *Plant Physiol.* **60**:433-436

**Nap JP, Bisseling T (1990).** Developmental biology of a plant-prokaryote symbiosis: The legume root nodule. *Science* **250**:948-954

**Newcomb EH, Tandom SR, Kowal RR (1985).** Ultrastructure specialization for ureide production in uninfected cells of soybean root nodules. *Protoplasma* **125**:1-12

**Nguyen T, Zelechowska M, Foster V, Bergmann H, Verma DPS (1985).** Primary structure of the soybean nodulin-35 gene encoding uricase II is localized in the peroxisomes of uninfected cells of nodules. *Proc Natl Acad Sci USA* **82**:5040-5044

**Oestreicher N, Scazzocchio C (1993)** Sequence, regulation, and mutational analysis of the gene encoding urate oxydase in *Aspergillus nidulans*. *J Biol Chem* **268**:23382-23389

**O'Gara F, Shanmugam KT (1976).** Regulation of nitrogen fixation by rhizobia. Export of fixed  $N_2$  as  $NH_4^+$ . *Biochim Biophys Acta* **437**:313-321

**Padilla JE, Miranda J, Sánchez F (1991).** Nodulin regulation in common bean nodules induced by bacterial mutants. *Mol Plant Microbe Interaction* **4**:433-439

**Papadopolou K, Roussis A, Kuin H, Katinakis P (1995).** Expression pattern of uricase II gene during root nodule development in *Phaseolus vulgaris*. *Experientia* **51**:90-94

**Papadopolou K, Roussis A, Katinakis P (1996)** *Phaseolus* ENOD40 is involved in symbiotic and non-symbiotic organogenetic processes: expression during nodule and

lateral root development. **30**:403-417

**Peters NK, Verma DPS (1990).** Phenolic compounds as regulators of gene expression in plant-microbe interactions. *Mol Plant-Microbe Interact* **3**:4-8

**Polayes DA, Schubert KR (1984).** Purine synthesis and catabolism in soybean seedlings. *Plant Physiol* **75**:1104-1110

**Postgate J (1981).** Fijación de nitrógeno. Barcelona: Omega. p 83

**Price NPJ, Relic B, Talmont F, Lewin A, Promé D, Pueppke SG, Maillet F, Dénarié J, Promé JC, Broughton WJ (1992).** Broad-host-range *Rhizobium* species strain NGR234 secretes a family of carbamoylated, and fucosylated, nodulation signals that are *O*-acetylated or sulphated. *Mol Microbiol* **6**:3575-3584

**Ramlov KB, Laursen NB, Stougaard J, Marcker A (1993).** Site-directed mutagenesis of the organ-specific element in the soybean leghemoglobin *lbc3* gene promoter. *Plant J* **4**:577-580

**Ranbird RM, Atkins CA (1981).** Purification and some properties of urate oxidase from nitrogen-fixing nodules of cowpea. *Biochimica et Biophysica Acta* **659**:132-140

**Reddy PG, Nemali MR, Reddy MK Yuan PM, Yuen S, Laffer TG, Shiroza T, Kuramitsu HK, Usuda N, Chisholm RL, Rao M, Sambasiva R, Reddy JK (1988)** Isolation and sequence determination of a cDNA clone for rat peroxisomal ureide oxidase: liver-specific expression in rat. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**:9081-9085

**Relic B, Talmont F, Kopcinska J, Golinowski W, Promé JC, Broughton WJ (1993).** Biological activity of *Rhizobium* sp. NGR234 Nod-factors on *Macroptilium atropurpureum*. *Mol Plant-Microbe Interact* **6**:764-774

**Reynolds PHS, Boland MJ, Blevins DG, Randall DD, Schubert KR (1982)** Ureide biogenesis in leguminous plants. *TIBS* **7**:366-368

**Ritsemá T, Wijffjes AH, Lugtenberg BJ, Spaink HP (1996).** nodulation protein NodA is a host-specific determinant of the transfer of fatty acids in Nod factor biosynthesis. *Mol Gen Genet* **251**:44-51

**Röhrig H, Schmidt J, Wieneke U, Kondorosi E, Barlier I, Schell J, John M (1994).** Biosynthesis of lipooligosaccharide nodulation factors: *Rhizobium* NodA protein is involved in *N*-acylation of the chitooligosaccharide backbone. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**:3122-3126

**Sánchez F, Campos F, Padilla J, Bonneville JM, Enriquez C, Caput D (1987).** Purification, cDNA cloning and developmental expression of the nodule-specific uricase from *Phaseolus vulgaris* L. Negro Jamapa. *Plant Physiol* **84**:1143-1147

**Sánchez F, Padilla J, Pérez H, Lara M (1991).** Control of nodulin genes in root-nodule development and metabolism. *Ann Rev Plant Physiol. Plant Mol Biol* **42**:507-528

**Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977).** DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**:5463-5467

**Scazzocchio C, Sdrin N, Ong G (1982)** Positive regulation in a eukaryote, a study of the *uaY* gene of *Aspergillus nidulans*: I. Characterization of alleles, dominance and complementation studies, and a fine structure map of the *uaY-oxpA* cluster. *Genetics* **100**:185-208

**Scheres B, van Engelen F, van der Knaap E, van del Wiel C, van Kammen A, Bisseling T (1990a).** Sequential induction of nodulin gene expression in the developing pea nodule. *Plant Cell* **2**:678-700

**Scheres B, van de Wiel C, Zalensky A, Horvath B, Spaink HP, van Eck H, Zwartkruis F, Wolters AM, Gloudemans T, van Kammen A, Bisseling T (1990b).** The ENOD12 gene product is involved in the infection process during pea-*Rhizobium* interaction. *Cell* **60**:281-294

**Schubert KR (1986).** Products of biological nitrogen fixation in higher plants: Synthesis, transport and metabolism. *Annu Rev Plant Physiol* **37**:539-574

**Schubert KR, Boland MJ (1990).** In Academic Press, Inc. The ureides. *In* The biochemistry of plants **16**:197-282.

**Selker JML (1988).** Three dimensional organization of uninfected tissue in soybean root nodules and its relation to cell specialization in the central region. *Protoplasma* **147**:178-190

**Sessa G, Meller Y, Fluhr R (1995).** A GCC element and a G-box motif participate in ethylene-induced expression of the PRB-1b gene. *Plant Mol Biol* **28**:145-153

**Shaw VK, Brill WJ (1997).** Isolation of an iron-molybdenum cofactor from nitrogenase. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**:3249-3253

**Shen Q, Ho TH (1995).** Functional dissection of an abscisic acid (ABA)-inducible gene reveals two independent ABA-responsive complexes each containing a G-box and a novel *cis*-acting element. *Plant Cell* **7**:295-307.

**Sieburth LE, Meyerowitz EM (1997)** Molecular dissection of the AGAMOUS control region shows that *cis* elements for spatial regulation are located intragenically. *Plant Cell* **9**:335-365

**Spaink HP, Sheely DM, van Brussel AAN, Glushka J, York WS, Tak T, Geiger O, Kennedy EP, Reinhold VN, Lugtenberg BJJ (1991).** A novel highly unsaturated fatty acid moiety of lipo-oligosaccharide signals determines host specificity of *Rhizobium*. *Nature* **354**:125-130

**Stougaard J, Jørgensen JE, Christensen T, Kühle A, Marcker KA (1990).** Interdependence and nodule specificity of *cis*-acting regulatory elements in the soybean leghemoglobin *lbc3* and N23 gene promoters. *Mol Gen Genet* **220**:353-360

**Suganuma N. et al (1987).** Carbon metabolism in relation to cellular organization of



soybean root nodules and respiration of mitochondria aided by leghemoglobin. *Plant Cell Physiol* **28**:113-122

**Suganuma M, Tamaoki M, Kouchi H (1995).** Expression of nodulin genes in plant-determined ineffective nodules of pea. *Plant Mol Biol* **28**:1027-1038

**Sutton MJ, Lea EJA, and Downie AJ (1994).** The nodulation-signaling protein NodO from *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae* forms ion channels in membranes. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**:9990-9994

**Szczyglowski K, Szabados L, Fujimoto SY, Silver D, de Bruijn FJ (1994).** Site-specific mutagenesis of the Nodule-Infected Cell Expression (NICE) element and the AT-rich element (ATRE-BS2\*) of the *Sesbania rostrata* leghemoglobin *glb3* promoter. *Plant Cell* **6**:317-332

**Tajima S, Ito H, Tanaka K, Nanakado T, Sugimoto A, Kouchi H, Okazaki K (1991).** Soybean cotyledons contain a uricase that cross-reacts with antibodies raised against the nodule uricase (Nod-35). *Plant Cell Physiol* **32**:1307-1311

**Tajima S, Kanazawa T, Takeuchi E, Yamamoto Y (1985).** Characteristics of a urate-degrading diamine oxidase-peroxidase enzyme system in soybean radicles. *Plant Cell Physiol* **26**:787-795

**Tajima S, Kato N, Yamamoto Y (1983).** Cadaverine involved in urate degrading activity (uricase activity) in soybean radicles. *Plant Cell Physiol* **24**:247-253

**Tajima S, Tanaka K, Takane K, Sugimoto A, Okazaki K, Kouchi H (1993).** Soybean nodule uricase gene (nodulin-35) is expressed in cotyledons during seed development and early germination. In R Palacios, J Mora, WE Newton, eds, *New Horizons in Nitrogen Fixation*. Kluwer, Dordrecht, The Netherlands, p 373.

**Tajima S, Yamamoto Y (1975).** *Plant Cell Physiol* **68**:1115-1122

**Takane K, Tanaka K, Tajima S, Okazaki K, Kouchi H (1997)** Expression of a gene for uricase II (nodulin-35) in cotyledons of soybean plants. *Plant Cell Physiol* **38**:149-154

**Taté R, Patriarca EJ, Riccio A, Defez R, Laccarino M (1994)** Development of *Phaseolus vulgaris* root nodules. *Mol Plant Microbe Interaction* **7**:582-589

**Taylor CB (1997)** Promoter fusion analysis: an insufficient measure of gene expression. *Plant Cell* **9**:273-275

**Truchet G, Roche P, Lerouge P, Vasse J, Camut S, de Billy F, Promé JC, Dénarié J (1991).** Sulphated lipooligosaccharide signals from *Rhizobium meliloti* elicit root nodule organogenesis in alfalfa. *Nature* **351**:670-673

**van Brussel AAN, Bakhuizen R, van Spronsen PC, Spalink HP, Tak T, Lugtenberg BJJ, Kijne JW (1992).** Induction of preinfection thread structures in the leguminous host plant by mitogenic lipo-oligosaccharides of *Rhizobium*. *Science* **257**:70-71

- Van den Bosch KA, Newcomb EH (1986)** Immunogold localization of nodule-specific uricase in developing soybean root nodules. *Planta* **167**:425-436.
- Van den Wiel C, Scheres B, Franssen H, van Lierop MJ, van Lammeren A, van Kammen A, Bisseling T (1990)**. The early nodulin transcript ENOD2 is located in the nodule parenchyma (inner cortex) of pea and soybean root nodules. *EMBO J* **9**:1-7
- Van Kammen A (1984)** Suggested nomenclature for plant genes involved in nodulation and symbiosis. *Plant Mol Biol Rep* **2**:43-45
- Van Spronsen PC, Bakhuizen R, van Brussel AAN, Kijne JW (1994)** Cell wall degradation during infection thread formation by the root nodule bacteria *Rhizobium leguminosarum* is a two-step process. *Eur J Cell Biol* **64**:88-94
- Vasse J, de Billy F, Camut S, Truchet G (1990)**. Correlation between ultrastructure differentiation of bacteroids and nitrogen fixation in alfalfa nodules. *J Bacteriol* **172**:4295-4306
- Vaughn KC, Stegink SJ (1987)**. Peroxisomes of soybean, *Glycine max*, root nodule vascular parenchyma cells contain a nodule-specific urate oxidase. *Physiol Plant* **71**:251-256
- Verma DPS (1992a)**. Signals in root nodule organogenesis and endocytosis of *Rhizobium*. *Plant Cell* **4**:373-382
- Verma DPS, Hu CA, Zhang M (1992b)**. Root nodule development: origin, function and regulation of nodulin genes. *Physiol Plant* **85**:253-265
- Vijn I, das Neves L, van Kammen A, Franssen H, Bisseling T (1993)**. Nod factors and nodulation in plants. *Science* **260**:1764-1765
- Wallrath LL, Burnett JB, Friedman TB (1990)** Molecular characterization of the *Drosophila melanogaster* urate oxidase gene, an ecdysone-repressible gene expressed only in the Malpighian tubules. *Mol Cell Biol* **10**:5114-5127.
- Weaver CD, Shower NH, Louis CF, Roberts DM (1994)**. Nodulin-26, a nodule specific symbiosome membrane protein from soybean, is an ion channel. *J Biol Chem* **269**:17858-17862
- Welters P, Metz B, Palme K, Szczyglowski K, de Bruijn FJ (1993)**. Interaction of a rhizobial DNA-binding protein with the promoter of a plant leghemoglobin gene. *Plant Physiol* **102**:1095-1107
- Werner D (1992)**. Physiology of nitrogen legume nodules: Compartments and functions. In *Biological nitrogen Fixation*, G Stacey, RH Burris, and HJ Evans, eds (New York: Chapman and Hall), pp. 399-431
- William ME, Foster R, Chua NH (1992)**. Sequences flanking the hexameric G-box core CACGTG affect the specificity of protein binding. *Plant Cell* **4**:485-496

**Wilson RC, Long F, Maruoka EM, Cooper JB (1994).** A new proline-rich early nodulin from *Medicago truncatula* is highly expressed in nodule meristematic cells. *Plant Cell* **6**:1265-1275

**Wittenberg JB, Wittenberg BA (1990).** Mechanisms of cytoplasmic hemoglobin and myoglobin function. *Annu Rev Biophys Chem* **19**:217-241

**Witty FJ, Minchi FR, Skot L, Sheely JE (1986).** Nitrogen fixation and oxygen in legume root nodules. *Oxford Surv Plant Cell Biol* **3**:275-315

**Wu XW, Lee CC, Muzny D M, Caskey CT (1989)** Urate oxidase: structure and evolutionary implications. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**:9412-9416

**Wu XW, Muzny DM, Lee CC, Caskey T (1992)** Two independent mutational events in the loss of urate oxidase during hominoid evolution. *J Mol Evol* **34**:78-84

**Yang WC, Katinakis P, Hendriks P, Smolders A, de Vries F, Spee J, van Kammen A, Bisseling T, Franssen H (1993).** Characterization of *GmENOD40*, a gene showing novel patterns of cell-specific expression during soybean nodule development. *Plant J* **3**:573-585

**Yang WC, de Blank C, Meskiene I, Hirt H, Bakker J, van Kammen, Franssen H, Bisseling T (1994).** *Rhizobium* Nod factors reactivate the cell cycle during infection and nodule primordium formation, but the cycle is only completed in primordium formation. *Plant Cell* **6**:1415-1426