



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

11281
21



PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

CENTRO DE INVESTIGACIÓN SOBRE FIJACIÓN DE
NITRÓGENO

*“ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES DE
HEMOGLOBINA EN EL ARROZ (*Oryza sativa*)”*

Tesis que para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biomédicas

presenta la

cDr. Verónica Lira Ruan

Cuernavaca, Morelos.

Febrero de 2003.

TESIS
FALLA DE CUBEN



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.

**TESIS
CON
FALLA DE
ORIGEN**

PAGINACIÓN DISCONTINUA

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional

NOMBRE: _____

FECHA: _____

FIRMA: _____

Esta Tesis se realizó bajo la tutoría del

Dr. Raúl Arredondo Peter

En el laboratorio del Programa de Biología Molecular de Plantas
del Centro de Fijación de Nitrógeno, UNAM

(Julio 1999-Septiembre 2001).

y en el Laboratorio de Biofísica y Biología Molecular

de la Facultad de Ciencias, UAEM

(Octubre 2001-Febrero 2003).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

AGRADECIMIENTOS

A LAS PERSONAS

A mi tutor el Dr. Raúl Arredondo-Peter por ser mi guía y principal apoyo durante los últimos siete años.

A mis compañeros del laboratorio: Elena, Miriam, Juan, Francisco Obregón, Emma, Betty, Mayra, Laura y Lulú por su apoyo y compañía.

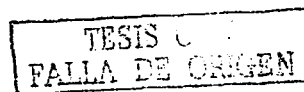
A mis compañeros del Doctorado Jacobo, Manuel y Eliza por sus consejos y ayuda.

Al Dr. Robert. V. Klucas de la Universidad de Nebraska-Lincoln, por invitarme a trabajar en su laboratorio, por ayudarme a analizar mis resultados y por sus útiles e inolvidables consejos.

Al Dr. Cyril Appleby por contribuir en mi formación al analizar y discutir mis resultados, por darme consejos y sugerencias, y por su apoyo.

A los Dres. Gautam Sarath, S. Madhavan y Kit Lee, de la Universidad de Nebraska-Lincoln, por permitirme trabajar a su lado y enseñarme algunas de las técnicas que más aprecio.

Al Dr. Edgardo Escamilla Marván y a todos los miembros de su laboratorio en el Instituto de Fisiología Celular por abrirme las puertas del laboratorio durante mis estancias.



A LAS INSTITUCIONES

Al Conacyt y DGEP por apoyarme con una beca durante mis estudios de doctorado.

Al PDCB por brindarme el apoyo económico para realizar una estancia en la Universidad de Nebraska-Lincoln, Nebraska, EUA en el verano del año 2000, y para asistir al congreso "Plant Biology 2002" que se realizó en Denver, Colorado, EUA en el mes de Agosto de 2002.

A la American Society of Plant Biologists por brindarme el apoyo económico para asistir al congreso "Plant Biology 2002" que se realizó en Denver, Colorado, EUA en el mes de Agosto de 2002.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

INDICE

ABREVIATURAS.	iii
RESUMEN/ABSTRACT.	1
Capítulo I. INTRODUCCIÓN.	2
LAS HEMOGLOBINAS NO SIMBIÓTICAS DE LAS PLANTAS.	3
RECENT INSIGHTS INTO PLANT HEMOGLOBINS.	11
Capítulo II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.	28
Capítulo IIIa. RESULTADOS.	31
ANÁLISIS DE LA SÍNTESIS DE LAS Hbns EN EL ARROZ.	32
Capítulo IIIb. RESULTADOS.	41
IDENTIFICACIÓN Y ANÁLISIS DE UNA FAMILIA DE GENES <i>hbns</i> EN EL ARROZ.	42
Capítulo IV. DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES.	
LAS Hbns. DEL ANÁLISIS BIOQUÍMICO Y MOLECULAR AL ANÁLISIS FUNCIONAL.	46
• LAS Hbns SE SINTETIZAN EN NUMEROSOS ÓRGANOS Y EN TEJIDOS ESPECÍFICOS DEL ARROZ.	48
• MODULACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE LAS Hbns CUANDO LA PLANTA CRECE EN CONDICIONES DE ESTRÉS.	51

TESIS CON
FALLA DE CUBRILLO

• INTERACCIONES POSIBLES DE LAS Hbns CON DIVERSAS MOLÉCULAS, Y LAS CONSECUENCIAS FUNCIONALES DE DICHAS INTERACCIONES.	53
• EL COMPORTAMIENTO DE LAS Hbns EN LOS SISTEMAS BIOLÓGICOS.	59
• CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES Y FUNCIONALES DE LA FAMILIA DE GENES <i>hbns</i> DEL ARROZ.	60
• LAS Hbns DURANTE LA HISTORIA DE LAS PLANTAS.	65
• CONCLUSIONES.	69
REFERENCIAS.	75

ABREVIATURAS

2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
ERO	Especies reactivas del oxígeno
Hb	Hemoglobina
Hbns	Hemoglobina no simbiótica
Hbsim	Hemoglobina simbiótica
Hbtr	Hemoglobina truncada
Lb	Leghemoglobina
MCP	Muerte celular programada
N- y C-terminal	Extremos amino y carboxilo terminal
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa ("Polymerase Chain Reaction")
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa ("Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction")
SNP	Nitroprusiato de sodio ("Sodium Nitroprusside")
VHb	Hemoglobina de <i>Vitreoscilla</i> sp.

RESUMEN

La función de las hemoglobinas no simbióticas (Hbns) en las plantas se desconoce. El estudio de la regulación de la expresión de los genes *hbns* es importante para entender la función de las Hbns. Por ello, el objetivo de esta tesis fue analizar la expresión de los genes *hbns* del arroz. El análisis por "western blot" mostró que las Hbns se sintetizan en los órganos embrionarios y en las hojas y raíces de plantas de arroz de 2 a 14 semanas de edad. La detección de Hbns en plantas estresadas mostró que la abundancia relativa de las Hbns aumenta cuando la planta crece en condiciones de estrés energético o hipoxia, aunque la abundancia de las Hbns no varió en plantas que se sometieron a estrés oxidativo, nitrosativo u hormonal. Estos resultados muestran que las Hbns se sintetizan en numerosos órganos del arroz y durante el desarrollo de la planta, y que la síntesis de Hbns se modula por tipos específicos de estrés. El análisis del genoma del arroz mostró que en esta planta existe una familia de genes *hbns*, *hbns1* a 4. La región 5' no codificante de los genes *hbns* contiene secuencias que son similares a los promotores de los genes de globinas animales y genes que se regulan por hormonas vegetales o que codifican para proteínas de defensa. Estas observaciones sugieren que los genes *hbns* se regulan por separado, y que las Hbns del arroz realizan diversas funciones en la planta, probablemente al regular el metabolismo de la célula vegetal.

ABSTRACT

Non-symbiotic hemoglobins (nsHbs) are widely distributed in the plant kingdom, however their function in plant organs is not known. Studying the regulation of the *nshb* gene expression is important to understand the function of nsHbs in plants. Thus, the objective of this thesis was to analyze the expression of rice *nshb* genes. Western blot analysis showed that rice nsHbs are localized in embryonic organs and in roots and leaves from 2 to 14 weeks old plants. Also, detection of nsHbs in stressed rice showed that the relative abundance of these proteins increases in plants subjected to energetic stress and hypoxia. The relative abundance of nsHbs did not change in plants subjected to oxidative, nitrosative and hormonal stresses. The above results showed that nsHbs are synthesized in several plant organs and during plant development, and that the synthesis of nsHbs is modulated by specific (but not general) stress conditions. Analysis of a rice genome database showed that a family of *nshb* genes (*nshb1* to 4) exists in this plant, and that the 5'-upstream non-coding sequences to each *nshb* gene contains promoter sequences that are similar to promoters from animal globins, genes that are regulated by plant hormones and genes that code for defense proteins. These observations suggest that *nshb* genes are regulated independently from each other, and that nsHbs with different functions exist in rice organs. Results from this thesis suggest that nsHbs function in plant organs and during plant development probably by regulating the cell metabolism.

TESIS C-1
FALLA DE ORIGEN

Capítulo I. INTRODUCCIÓN.

Artículo:

K. Lira Ruan, E. Aréchaga Ocampo, M. Ramírez Yáñez, M. Sánchez Sánchez y

R. Arredondo Peter. 2000.

LAS HEMOGLOBINAS NO SIMBIÓTICAS DE LAS PLANTAS.

Bol. Educ. Bioq. 19: 87-94.

Artículo:

E.J.H. Ross, V. Lira-Ruan, R. Arredondo-Peter, R.V. Klucas and

G. Sarath. 2002.

RECENT INSIGHTS INTO PLANT HEMOGLOBINS.

Rev. Plant Biochem. Biotechnol. 1: 173-189.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

LAS HEMOGLOBINAS NO SIMBIÓTICAS DE LAS PLANTAS

Katerina Lira Ruan, Elena Aréclaga Ocampo, Mario Ramírez Yáñez, Miriam Sánchez Sánchez y Raúl Arredondo Peter, Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 565-A, 62210 Cuernavaca, Morelos, México. Correo electrónico: ra@cifn.unam.mx

RESUMEN

Las hemoglobinas (Hbs) son proteínas que transportan el O_2 en los organismos. En las plantas existen dos tipos de Hbs: las Hbs no simbióticas (del Tipo 1), y las Hbs simbióticas (del Tipo 2). La mayoría de las Hbs simbióticas se sintetizan exclusivamente en los nódulos de las plantas fijadoras de N_2 , en donde funcionan como transportadores de O_2 a los bacteroides. Las Hbs no simbióticas se distribuyen ampliamente en el reino vegetal, desde las plantas terrestres más primitivas hasta las especies dicotiledóneas y monocotiledóneas más evolucionadas, en donde se sintetizan en diversos órganos de la planta. La función de las Hbs no simbióticas se desconoce, sin embargo, con base en algunas características bioquímicas, como su elevada afinidad por el O_2 , y el patrón de expresión de los genes *hb* en las plantas se ha sugerido que estas proteínas tienen funciones distintas al transporte de O_2 . El análisis de la estructura de los genes *hb* vegetales sugiere que las Hbs simbióticas podrían ser el resultado de la especialización de algunas Hbs no simbióticas, y que las Hbs vegetales descendieron a partir del mismo ancestro.

PALABRAS CLAVE: Estrés, evolución, fijación de nitrógeno, hemoglobina, oxígeno, simbiosis.

ABSTRACT

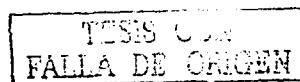
Hemoglobins (Hbs) are heme proteins that transport O_2 in organisms. In plants, two classes of Hbs have been described: the non symbiotic (Class 1) and symbiotic (Class 2) Hbs. Most of symbiotic Hbs are synthesized only in nodules of nitrogen-fixing plants, and function by facilitating the diffusion of O_2 to the bacteroids. Non symbiotic Hbs are widely distributed in the plant kingdom, ranging from bryophytes to the most evolved dicots and monocots, and they are synthesized in dif-

ferent plant organs. The function of non symbiotic Hbs is not known, however based on their biochemical properties, such as the very high affinity for O_2 , and the *hb* gene expression pattern in plants, it has been suggested that the non symbiotic Hbs have different or additional functions to O_2 transport. Structure analysis of plant *hb* genes suggests that symbiotic Hbs evolved as a specialization of non symbiotic *hb* genes, and that symbiotic and non symbiotic Hbs evolved from a common ancestor.

KEY WORDS: Evolution, hemoglobin, nitrogen fixation, oxygen, stress, symbiosis.

GENERALIDADES

Las hemoglobinas (Hbs) son proteínas que pertenecen al grupo de las globinas y que contienen hemo como grupo prostético, el cual permite la unión reversible del oxígeno (O_2) y otros ligandos gaseosos. Las Hbs se han detectado en todos los grupos de organismos, desde las bacterias hasta los vertebrados, en donde su función principal se relaciona con el transporte y almacén de O_2 . Las Hbs son proteínas ubicuas en las plantas, ya que se localizan en los nódulos de especies leguminosas y actinorrizas que fijan el nitrógeno, N_2 , y en diversos órganos de especies no fijadoras de N_2 . El análisis comparativo entre las secuencias de residuos de aminoácidos sugiere que en las plantas existen dos tipos de Hbs que se relacionan estrechamente: las Hbs del Tipo 1, o Hbs no simbióticas, y las Hbs del Tipo 2, o Hbs simbióticas (Fig. 1A) (1). Las Hbs no simbióticas se descubrieron recientemente y constituyen un grupo de proteínas con características bioquímicas particulares, cuya función en las plantas se desconoce. Por su parte, las Hbs simbióticas que se sintetizan en los nódulos se han caracterizado con detalle, y se cree que su función es transportar el O_2 hasta los bacteroides fijadores



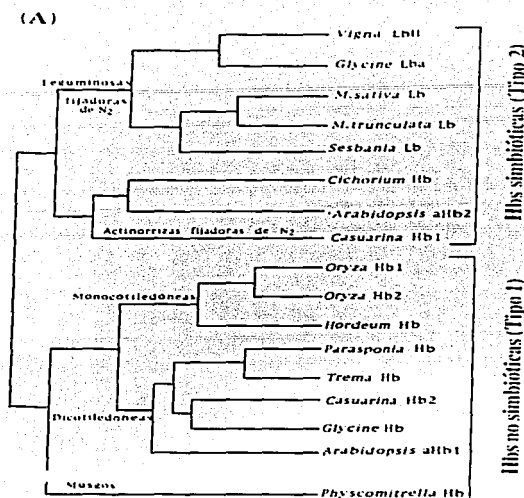


Figura 1 (A) Fenograma que muestra la similitud entre las secuencias de residuos de aminoácidos de las Hbs vegetales que se alinean en (B), y que se obtuvo al utilizar la rutina PILEUP del programa GCG.

de N₂ (2). En esta revisión se discuten aspectos generales sobre las Hbs simbióticas y, con mayor detalle, las características de las Hbs no simbióticas en relación con (i) su función en los tejidos vegetales, (ii) la relación que tienen estas proteínas con las Hbs simbióticas, y (iii) la evolución de las Hbs en las plantas.

HEMOGLOBINAS SIMBIÓTICAS

Las Hbs simbióticas se descubrieron en 1939 en los nódulos de plantas leguminosas (3), por lo que se les llama leghemoglobinas (Lbs). Desde entonces estas proteínas se han estudiado en diversas especies de leguminosas, tal como el frijol (*Phaseolus vulgaris*), la soya (*Glycine max*), la alfalfa (*Medicago sativa*), el trébol (*Trifolium repens*) y el lupino (*Lupinus luteus*). Las Hbs simbióticas son las proteínas más abundantes en los nódulos, en donde representan hasta el 30% de las proteínas

solubles. Estas proteínas tienen una afinidad alta por el O₂, debido a que la constante de asociación, "k on", es elevada y a que la constante de disociación, "k off", es moderadamente baja. Por lo tanto, se cree que las Hbs simbióticas contribuyen al proceso de fijación de N₂, al facilitar la difusión del O₂ hasta los bacteroides para mantener la respiración y la producción de energía en la forma de ATP. Las Lbs se sintetizan específicamente en los nódulos, y no se les ha detectado en otros órganos de la planta (2).

Además de las Lbs, también se ha estudiado una Hb que se localiza en los nódulos de *Parasponia andersonii* (4). Esta planta pertenece a la familia Ulmaceae, y es la única especie no leguminosa conocida que es nodulada por *Rhizobium*. La Hb de *Parasponia* es una proteína homodimérica con masa molecular de ~ 35 kDa, y cuya afinidad por el O₂ es similar a la afinidad que tienen las Lbs por este elemento. Por lo tanto, se cree que la función de la Hb en los nódulos de *Parasponia* es transportar el O₂ hacia los bacteroides. No obstante, a diferencia de los genes *hb*, el gen *hb* de *Parasponia* se expresa en tejidos diferentes a los nódulos: sin embargo, la función de la Hb de *Parasponia* en esos tejidos se desconoce.

Las Hbs simbióticas se han detectado en otras especies de plantas dicotiledóneas. En *Arabidopsis thaliana* se detectaron dos genes *hb*, *aHb1* y *aHb2*. La similitud entre la secuencia de residuos de aminoácidos de *aHb1* y *aHb2* es del 69%, sin embargo, *aHb1* y *aHb2* tienen mayor similitud con las Hbs no simbióticas y simbióticas, respectivamente, por lo que *aHb1* se considera como una Hb no simbiótica y *aHb2* como una Hb simbiótica (Fig 1A). Los genes *hb* de *Arabidopsis* se expresan en las rosetas y raíces cuando la planta crece en condiciones normales (1). En *Cichorium* se aisló un ADNc que codifica para una Hb. Esta Hb es un péptido de 161 residuos de aminoácidos y una masa molecular de 18 kDa. Mediante la comparación de las secuencias de residuos de aminoácidos se determinó que la Hb de *Cichorium* tiene mayor similitud con las Hbs simbióticas (Fig 1A). El gen *hb* de *Cichorium* se expresa durante el inicio de la embriogénesis somática de las hojas, y la función de la Hb en esos tejidos se desconoce (5).

HEMOGLOBINAS NO SIMBIÓTICAS

a) Hemoglobinas no simbióticas de plantas dicotiledóneas

La clonación del gen *hb* de *Parasponia* permitió la detección de los genes *hb* en otras especies dicotiledóneas. *Trema tomentosa* es una planta que pertenece a la familia Ulmaceae, pero que no nodula, y por lo tanto tampoco fija N₂. Mediante el uso del gen *hb* de *Parasponia* como sonda molecular, fue posible aislar el gen *hb* de *Trema* el cual codifica para una Hb monomérica que se sintetiza en bajas concentraciones en las raíces de la planta (6). En la soya, existen al menos dos genes *hb* no simbióticos, los cuales se regulan independientemente a los genes *lb*. Los transcritos, ARNm, de la Hb no simbiótica de la soya se detectaron en cotiledones, nódulos, raíces, tallos y hojas de plantas maduras (7). Aunque el nivel de expresión del gen *hb* no simbiótico es semejante en las raíces y los nódulos de las plantas de soya, la expresión de estos genes no simbióticos difiere considerablemente del patrón de expresión de los genes *lb*, el cual es muy alto y exclusivo de los nódulos.

b) Hemoglobinas no simbióticas de plantas monocotiledóneas

Los genes y transcritos de Hbs no simbióticas se han detectado en las plantas monocotiledóneas. Taylor et al (8) clonaron el ADNc de la Hb de la cebada, *Hordeum vulgare*. Al comparar la secuencia de los residuos de aminoácidos de la Hb de la cebada con la Hb de *Parasponia* se encontró que ambas proteínas tienen una similitud del 71%, y que la Hb de la cebada contiene los residuos de aminoácidos que están altamente conservados en las Hbs vegetales, tal como las histidinas distal y proximal (Fig. 1B), que son los aminoácidos que coordinan al Hierro (Fe) del grupo hemo en la mayoría de las Hbs. Al parecer, en la cebada existe una sola copia del gen *hb* que codifica para una Hb homodimérica de 37 kDa, la cual se localiza en las raíces y semillas de la planta. En el arroz, *Oryza sativa*, existen por lo menos tres copias del gen *hb*, de las cuales dos son funcionales, es decir, que se transcriben en ARNm. La comparación de las secuencias de residuos de aminoácidos entre Hb1 y Hb2 del arroz muestra que ambas proteínas son similares en un 93%, y entre 68 y 82% con otras Hbs no simbióticas. Los genes *hb1* y *hb2* se expresan diferencialmente en plantas maduras de arroz:

hb1 se expresa en las hojas y raíces, y *hb2* se expresa sólo en las hojas, lo que indica que los genes *hb* del arroz se regulan por diferentes promotores (9).

EXPRESIÓN DE LOS GENES *hb* NO SIMBIÓTICOS EN PLANTAS QUE CRECEN EN CONDICIONES DE ESTRÉS

La función de las Hbs no simbióticas se desconoce. Sin embargo, el análisis de la expresión de los genes *hb* es una herramienta útil para entender la función de estas proteínas. Se ha observado que la expresión de los genes *hb* no simbióticos se modifica cuando la planta crece en condiciones de estrés, lo que sugiere que la función de las Hbs no simbióticas se relaciona con la respuesta de la planta al estrés. El gen *ahb1* de *Arabidopsis* se expresa en las raíces de plantas que crecen en condiciones normales, y se sobreexpresa en las hojas y raíces cuando las plantas se encuentran en condiciones de hipoxia. Por su parte, el gen *ahb2* de la misma especie se expresa en las hojas de plantas que crecen en condiciones normales, y se sobreexpresa cuando las plantas se someten a bajas temperaturas (1). La expresión del gen *hb* de la cebada se incrementa cuando las plantas se someten a condiciones de microaerobiosis (8), y cuando se bloquea la síntesis de ATP (en 10). En condiciones de microaerobiosis el gen *hb* de la cebada se expresa en niveles que son comparables a la expresión de los genes *ldh* y *adh*, que codifican para las enzimas lactato deshidrogenasa (LDH) y alcohol deshidrogenasa (ADH), respectivamente, las cuales son marcadores del metabolismo anaerobio (glucolítico). Mas aún, al transformar células de maíz con el gen *hb* de la cebada, el nivel energético de estas células no se altera cuando el gen *hb* se expresa constitutivamente bajo condiciones de hipoxia; en cambio, en las células de maíz no transformadas descendió el nivel energético (cuantificado como la concentración de ATP) bajo las mismas condiciones. Estos resultados sugieren que las Hbs no simbióticas podrían funcionar en el metabolismo energético de las células vegetales (10).

CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS DE LAS HEMOGLOBINAS NO SIMBIÓTICAS

Para estudiar las características bioquímicas de las proteínas es necesario obtener cantidades considerables de la proteína de interés. La concentración de las Hbs no simbióticas en los tendos de las

(B)

```

1
1495com Hb MASAVVNSQA AAVRAFKPV KYTSKNEQL VKQSWELLRK DADRAGINFF KVTEFI
Oryza Hb2 NALV EDNNV...A VSFSEDEAL VLRSAWLRK DSANGLRFF LKIFEV
Oryza Hb1 NSARLWV V.FSEDEAL VLRSAWLRK DSANGLRFF LKIFEV
Hordeum Hb HSSSEVTK V.FTEDEAL VVKSAYVHKR NSAEGLGRFF LKIFEI
Parasponia Hb HSSSEVTK V.FTEDEAL VVKSAYVHKR NSAEGLGRFF LKIFEI
Trena Hb HSSSEVTK V.FTEDEAL VVKSAYVHKR NSAEGLGRFF LKIFEI
Casuarina Hb2 HSSSTLGR G.FTEDEAL VVKSAYVHKR NSAEGLGRFF LKIFEI
Glycine Hb HMTTLER G.FSEDEAL VVKSAYVHKR NSAEGLGRFF LKIFEI
Arabidopsis aHb1 HSESEK IVPFTEDEAL VVKSAYVHKR NSAEGLGRFF LKIFEI
Cichorium Hb HGR IGFTEDEAL VVKSAYVHKR NSAEGLGRFF LKIFEI
Casuarina Hb1 M.G.FSEDEAL VVKSAYVHKR DIPALSILVY AMILEI
Vigna LB11 HV A.LTDEKDAL LKQSWELLRK HIFPALSILV ALITLTA
Glycine LbA MV A.FTEKDAL VSSSEAFKA NIPQSVVVF TSILK
M. truncatula Lb1 M.S.FTDEKDAL VNSSEYFAFK NLSGYSVEFF TITLK
M. sativa Lb M.C.FTDEKDAL VNSSEYFAFK N.PGNSVLFY TITLK
Sesbania Lb2 H.C.FTEKDAL VNASYFAFK NLPGNSVLFY SFILK

```

```

          |-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
          A           B

```

```

100
Physoctenella Hb APGA KAHYSFLRDS TIPPEENPKV KHMARTVFMH TQDAVAOLGE KGAYOV
Oryza Hb2 APGA SOMPFLRNS DVPLEKHPKL KTRAHNVFVM TCEAAQRLK AGKVTV
Oryza Hb1 APGA SOMPFLRNS DVPLEKHPKL KTRAHNVFVM TCEAAQRLK AGKVTV
Hordeum Hb APGA ROMPFLLRDS VPLETPNPKL KTHAVSVFVM TCEAAQRLK AGKITV
Parasponia Hb APGA KMLFSLKDS VPLEKHPKL KTRAHNVFVM TCEAAVQLK AGKVTV
Trena Hb APGA KMLFSLKDS VPLEKHPKL KTRAHNVFVM TCEAAVQLK AGKVTV
Casuarina Hb2 APGA OKLFSFLKDS VPLEKHPKL KTRAHNVFVM TCEAAVQLK AGKVTV
Glycine Hb APGA OKLFSFLKDS VPLEKHPKL KTRAHNVFVM TCEAAVQLK AGKVTV
Arabidopsis aHb1 APGA KMLFSLKDS VPLEKHPKL KTRAHNVFVM TCEAAVQLK AGKVTV
Arabidopsis aHb2 APAA KGLFSLRDS DEVPNNPKL KAHAVYFKM TCEAIOLEK EGKVVV
Cichorium Hb APEA KGLFSLKDT NVLPNNPKL KSHAVYFKM VCESAIOLEK KGEVVV
Casuarina Hb1 APTT KMLFSLKDS NVPENPKL KAHAVYFKM TCEAIOLEK KGHAVV
Vigna LB11 APAA KMLFSL...A NGVDATNPKL TGHAEKFLGL VRDSAAQLRA SGGVV
Glycine LbA APAA KDLFSL...A NGVDTPNPKL TGHAEKFLPAL VRDSAAQLRA SGTVV
M. truncatula Lb1 APAA KGLFSLKDS AGV.QDSPKL QAHAEKVTGL VRDSAAQLRA TGGVVV
M. sativa Lb APAA KGHFSLKDS AGV.QDSPKL QSHAKEKVTGH VRDSAAQLRA TGVVVV
Sesbania Lb2 APAA KGHFSLKDS DGVPPNNPKL QAHAEKVTGL VRDSAAQLRA TGVVVV

```

```

          |-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
          C           D           E

```

```

150
Physoctenella Hb LESK LOKLAATHVN AGVTDQDFEI VKEALILYAE MGVP DLMSP ELKSAW
Oryza Hb2 RDTT LKRLGATNFK YGVGDGHFEV TRFALLETIK EAVPDMWSP ANKSAW
Oryza Hb1 RDTT LKRLGATNFK YGVGDGHFEV TRFALLETIK EAVPDMWSP ANKSAW
Hordeum Hb RETT LKRLGATNFK YGVGDGHFEV TRFALLETIK EALPADWMP EBNNAW
Parasponia Hb KESD LRFICATNFK YGVNHEFEV TRFALLETIK EAVP EMMSP EBNNAW
Trena Hb RESN LRLGATNFK NGVNEHFEV TRFALLETIK EAVP EMMSP EBNNAW
Casuarina Hb2 RESN LKRLGATNFK YGVNHEFEV TRFALLETIK EAVP EMMSP EBNNAW
Glycine Hb RESN LKRLGATNFK YGVNHEFEV TRFALLETIK EAVP EMMSP ANGNAN
Arabidopsis aHb1 RDTT LKRLGATNFK YGVGDGHFEV AKFALLETIK EAVP EMMSP EBNNAW
Arabidopsis aHb2 ADOT LQYSGIMLE SGVDHPHFEV VVEALLTIK EGGLEKYNE EVECAG
Cichorium Hb SGGT LKRLGATNFK NGVTDPHFEV VVEALLITVA PANG EMMSP EBNNAW
Casuarina Hb1 DNTT LRFICATNFK NGVTDPHFEV VVEALLITVA EAVP EMMSP EBNNAW
Vigna LB11 ADAAL L...GAVN.GK FAVNDA.FVYV VVEALLITK EAVG.DPMSD ELGTAV
Glycine LbA ADAAL L...GAVN.WK KAVTDPHFEV VVEALLITK AAVG.DPMSD ELSAVV
M. truncatula Lb1 GDAAL L...GAVN.GK KAVTDPHFEV VVEALLITK KAAG.DPMSD ELSAVV
M. sativa Lb GDAT L...GAVN.WK KAVTDPHFEV VVEALLITK EVSG.DPMSD ELSAVV
Sesbania Lb2 ADAS L...GAVN.WK KAVTDPHFEV VVEALLITK EAAG.DPMSD EYSNAW

```

```

          |-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
          F           G

```

```

180
Physoctenella Hb GQAY DMLAEVYFAE MHAQPSAATS
Oryza Hb2 GQAY DMLAAVYFAE MHPAE
Oryza Hb1 GQAY DMLAAVYFAE MHPAE
Hordeum Hb GQAY DMLAAVYFAE MHPAE
Parasponia Hb GQAY DMLAAVYFAE MHPSP
Trena Hb GQAY DMLAAVYFAE MHPSP
Casuarina Hb2 GQAY DMLAAVYFAE MHPSP
Glycine Hb GQAY DMLAAVYFAE MHPSP
Arabidopsis aHb1 GQAY DMLAAVYFAE MHPSP
Arabidopsis aHb2 GQAY DMLAAVYFAE MHPSP
Cichorium Hb GQAY DMLAAVYFAE MHPSP
Casuarina Hb1 GQAY DMLAAVYFAE MHPSP
Vigna LB11 ELAY DELAAATPFA V
Glycine LbA ELAY DELAAATPFA V
M. truncatula Lb1 ELAY DALATPFA M
M. sativa Lb ELAY DALATPFA M
Sesbania Lb2 ELAY DELAAATPFA V

```

plantas es muy baja, aproximadamente 100 nM (2), por ello el aislamiento de las proteínas nativas a partir de los tejidos fue un obstáculo para su estudio. Sin embargo, el problema se resolvió al clonar y expresar en *Escherichia coli* los ADNc de diversas Hbs no simbióticas, lo cual permitió obtener cantidades suficientes de proteínas recombinantes para su estudio. Los análisis previos a esos estudios permitieron comprobar que las Hbs recombinantes, que se aíslan a partir de *E. coli*, y las nativas, que se aíslan a partir de los nódulos, tienen características bioquímicas idénticas (11, 12). Por lo tanto, se ha utilizado el sistema de expresión en *E. coli* para obtener cantidades suficientes de Hbs no simbióticas para llevar a cabo análisis bioquímicos.

Las Hbs no simbióticas tienen características que son similares al resto de las globinas ya que unen reversiblemente el O₂ sin embargo, también difieren en algunos aspectos. La estructura terciaria de las Hbs vegetales, incluyendo a las

Figura 1 (B). Alineamiento de las secuencias de residuos de aminoácidos de las Hbs no simbióticas y algunas Hbs simbióticas. El alineamiento se realizó al utilizar la rutina PILEUP del programa CGC. Las porciones que forman parte de las hebras alta se indican con las letras A a la H las Hbs vegetales carecen de la hebra D, se calcularon con base en la estructura de la Hb δ de la soya (2). Los residuos de histidina distal y proximal (Hs83 e Hs118, respectivamente) se muestran en negritas. Los residuos de aminoácidos que están absolutamente conservados se muestran con asteriscos, y las flechas verticales señalan la posición de los intrones. Los números de acceso de cada secuencia en el banco de datos GenBank son los siguientes: *Physoctenella* Hb, AF218049; *Oryza* Hb1, U76030; *Oryza* Hb2, U76031; *Hordeum* Hb, U00228; *Parasponia* Hb, U27194; *Trena* Hb, Y00296; *Casuarina* Hb2, X53950; *Glycine* Hb, U47145; *Arabidopsis* aHb1, U94998; *Arabidopsis* aHb2, U94999; *Cichorium* Hb, A1007507; *Casuarina* Hb1, L28826; *Vigna* Lb1, U33207; *Glycine* LbA, P02238; *Medicago truncatula* Lb1, X57733; *M. sativa* Lb, X53989; *Sesbania* Lb2, P14848.

Hbs no simbióticas, es similar a la estructura de las Hbs de diversos organismos, ya que todas presentan el plegamiento del tipo globina, el cual comprende de 7 a 8 hélices alfa que se denominan con las letras A a la H. La hendidura para el hemo es una región conservada y se forma entre las hélices E y F. En esta región se localizan las histidinas distal y proximal, His E7 y F8, respectivamente, que coordinan al Fe del hemo. El átomo de Fe también está coordinado por los cuatro anillos pirrólicos del hemo. Por lo tanto, se dice que el Fe está pentacoordinado cuando establece un enlace electrostático con los cuatro pirroles del hemo y el imidazol de la histidina proximal (Fig 2A); en estas circunstancias el átomo de Fe puede unir ligandos en la sexta posición.

El estado de óxido-reducción de las Hbs, la coordinación del Fe y la unión de ligandos se puede estudiar mediante el uso de técnicas espectrofotométricas. En la figura 2A se

muestran los espectros de absorción de una Hb simbiótica en las formas reducida (Fe^{2+}), oxigenada ($Fe^{2+}O_2$), y oxidada (Fe^{3+}). En las Hbs en general, en donde el Fe se encuentra pentacoordinado (en la forma Fe^{2+} , o reducida desoxigenada), se observa un pico amplio con un máximo de absorción a 557 nm, y otro en la región Soret con un máximo a 427 nm. Sin embargo, las Hbs no simbióticas del arroz y la cebada tienen máximos de absorción a 556 y 526 nm cuando se encuentran en la forma reducida desoxigenada (Fig 2B), lo cual indica que la sexta posición del Fe está coordinada por algún ligando. Mediante el uso de mutagénesis dirigida. Arredondo-Peter et al (9) demostraron que el sexto ligando del Fe^{2+} en la Hb1 no simbiótica del arroz es la histidina distal. Por lo tanto, en estas condiciones el Fe de Hb1 se encuentra hexacoordinado (Fig 2B), lo cual es una característica única en el grupo de las globinas.

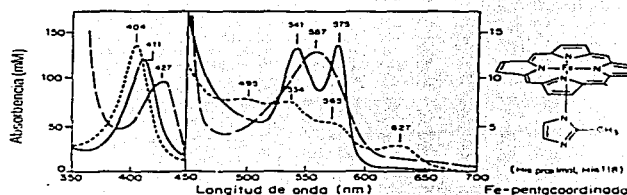
Otra característica distintiva de las Hbs no simbióticas es que tienen una afinidad muy alta por el O_2 , lo que se debe a que la k_{off} del O_2 es extraordinaria-

mente baja (Tabla I). Es decir, bajo las condiciones de estudio estas Hbs no liberan el O_2 una vez que se une al Fe^{2+} del hemo. Se ha sugerido que la cercanía de la histidina distal estabiliza al O_2 en la sexta posición, lo que resulta en una afinidad muy alta por este elemento, la más alta que se conoce dentro del grupo de las globinas. Por ejemplo, la afinidad de Hb1 del arroz por el O_2 es 78 y 1,384 veces mayor que la Lba de la soya y la mioglobina (Mb) del esperma de ballena, respectivamente (Tabla I). La alta afinidad de las Hbs no simbióticas por el O_2 ha llevado a pensar que la función de estas proteínas en los tejidos de las plantas es distinta al transporte de O_2 (9, 13).

FUNCIÓN DE LAS HEMOGLOBINAS NO SIMBIÓTICAS

El estudio de las características bioquímicas de las Hbs no simbióticas, y la expresión de los genes que

(A)



(B)

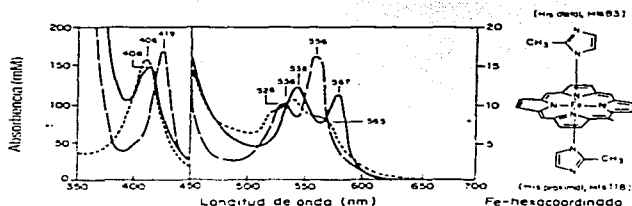


Figura 2. Espectros de absorción de (A) una Hb simbiótica, la Lba de la soya (2), y (B) de una Hb no simbiótica, la Hb1 del arroz (9), en las formas oxigenada (—), ferrosa desoxigenada (---) y ferrica (· · ·). A la izquierda de los espectros se muestra el estado de coordinación del Fe cuando la Hb se encuentra en la forma desoxigenada.

TABLA I

CONSTANTES DE AFINIDAD DE ALGUNAS HBS VEGETALES POR O ₂			
PROTEÍNA	k on ² (μM ²)	k off (s ⁻¹)	K ₁ (μM)
<u>Hbs no simbióticas</u>			
Hb1 del arroz	68	0.038	1.800
Hb de la cebada	2.4	0.028	86
αHb1 de <i>Arabidopsis</i>	74	0.12	617
<u>Hbs simbióticas</u>			
Lba de la soya	130	5.6	23
αHb2 de <i>Arabidopsis</i>	1	0.14	7
<u>Hbs animales</u>			
Mb del espermatozoide de ballena	14	11	1.3

Tomado de 13. Las constantes de la Mb del espermatozoide de ballena (14) se incluyeron como referencia. k on²: constante de asociación (afinidad con la cual el O₂ se une al Fe²⁺); k off⁻¹: constante de disociación (afinidad con la cual el Fe²⁺ libera el O₂); K₁: constante de afinidad (k on/k off)

las codifican, han permitido sugerir cual es la función de estas proteínas en las plantas (10, 13). En la Figura 3 se presenta un esquema general que ilustra las posibles funciones de las Hbs no simbióticas, las cuales se describen a continuación.

(i) Las Hbs no simbióticas podrían actuar como sensores de la concentración de O₂ en las células de la planta, de tal manera que las Hbs no simbióticas se encontrarían en la forma desoxigenada al disminuir la concentración de O₂ en la célula, lo que constituiría una señal para iniciar la respuesta anaeróbica. Sin embargo, dadas las constantes de disociación de las Hbs no simbióticas, las cuales son extraordinariamente bajas (Tabla I), la Hb podría estar oxigenada aun cuando la presión de O₂ sea insuficiente, y así mantener la respiración aeróbica (Fig. 3, ruta I).

(ii) Las Hbs no simbióticas funcionan como transportadores de O₂ en los tejidos en donde se sintetizan. Sin embargo, para que las Hbs puedan actuar como transportadores de O₂, se requiere que la concentración de Hb exceda la concentración de O₂ en la célula. Por ejemplo, en los nódulos de

Parasponia la concentración de Hb es 100 μM y la concentración de O₂ es 100 nM (2), es decir, que la concentración de Hb excede en tres órdenes de magnitud a la concentración de O₂. En cambio, en los tejidos vegetales la concentración de las Hbs no simbióticas es muy baja, del orden de 100 nM, mientras que la concentración de O₂ en la raíz es aproximadamente de 1.4 μM (2). Por lo tanto, es poco probable que en estos tejidos las Hbs no simbióticas funcionen como acarreadores de O₂. Sin embargo, en el tallo de plantas de soya se detectaron concentraciones elevadas de transcritos para Hbs no simbióticas (7). En esos tejidos el metabolismo es especialmente activo debido al transporte de metabolitos y, por lo tanto, el O₂ se consume rápidamente. Por ello se ha propuesto que, bajo esas condiciones, la Hb no simbiótica de la soya podría transportar el O₂ hacia las mitocondrias para mantener el metabolismo aerobio y la síntesis de ATP (Fig. 3, ruta II).

(iii) La expresión de los genes *hb* aumenta en la detrona de las semillas de la cebada cuando los tejidos se someten a condiciones de hipoxia (8). A partir de estas evidencias se sugirió que las Hbs no

TESIS DE GRADUACIÓN
FALLA DE CALIFICACIÓN

simbióticas juegan un papel importante en la respuesta de la planta a condiciones de microaerobiosis. De manera similar, la expresión de *hb* se incrementa cuando la síntesis de ATP se inactiva, lo que condujo a sugerir que las Hbs no simbióticas podrían participar en el mantenimiento del nivel energético de las células. Es decir, cuando las células se encuentran en condiciones anaeróbicas la Hb oxida el NADH y genera NAD⁺, el cual es necesario para mantener la glucólisis y los niveles adecuados de ATP (10) (Fig 3, ruta III).

(iv) Recientemente se obtuvieron evidencias que sugieren que las Hbs de diversos organismos tienen funciones adicionales al transporte de O₂, tales como: a) el transporte de óxido nítrico, NO, y monóxido de carbono, CO (Fig 3, ruta IV); b) la interacción con otras moléculas, lo que resultaría en la modificación de las constantes de afinidad por los ligandos, lo que afectaría directamente su función (Fig 3, ruta V); y c) debido a su alta afinidad por el O₂, las Hbs no simbióticas podrían conservar algunas funciones primigenias, como el transporte de electrones y el secuestro ("scavenging") del O₂ (Fig 3, ruta VI), lo cual pudo suceder previo al advenimiento de la atmósfera oxidante en la Tierra primitiva.

EVOLUCIÓN DE LAS HEMOGLOBINAS VEGETALES

La existencia de Hbs en plantas primitivas, como es el caso de la briofita *Physcomitrella patens*, y en especies monocotiledóneas y dicotiledóneas (Fig 4), indica que las Hbs se distribuyen ampliamente en el reino Plantae, lo cual sugiere que las Hbs vegetales evolucionaron a partir de un ancestro común. Con base en el análisis de la estructura genética y la estructura terciaria de las Hbs, se ha propuesto que el origen de estas proteínas se remonta a un periodo anterior a la divergencia entre los animales y las plantas (15). Las unidades monoméricas de diversas Hbs, incluyendo a las Hbs vegetales y animales, se pliegan en la estructura del tipo globina, la cual está altamente conservada. Más aún, se conoce la secuencia de los genes *hb*

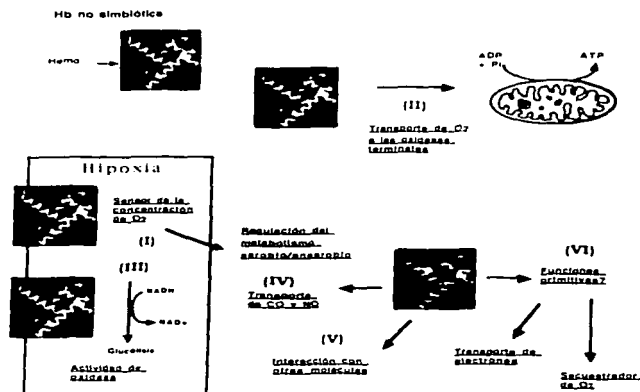


Figura 3. Esquema que muestra las posibles funciones de las Hbs no simbióticas en las células vegetales (modificado de 13). En el texto se explica con detalle cada ruta del modelo.

de diversas especies mono y dicotiledóneas. Los genes *hb* de plantas tienen tres intrones, IVS-I, IVS-II e IVS-III, que se localizan en posiciones muy conservadas, lo cual sugiere que el gen *hb* ancestral de las angiospermas tenía la estructura 4 exones/3 intrones; los intrones IVS-I e IVS-III de los genes *hb* vegetales se localizan en la misma posición que los intrones del gen de la Mb del esperma de ballena. Estas evidencias sugieren que las Hbs vegetales y animales evolucionaron a partir de un ancestro común hace más de 1,500 millones de años.

Las Hbs no simbióticas están ampliamente distribuidas en las plantas, en tanto que muchas Hbs simbióticas están restringidas a los nódulos de las plantas fijadoras de N₂ y existen solamente en los grupos más evolucionados de las plantas dicotiledóneas (Fig 4). Al parecer, las Hbs simbióticas de los nódulos de las plantas fijadoras de N₂ surgieron a partir de la duplicación de un gen *hb* no simbiótico, en donde una de las copias fue secuestrada para llevar a cabo una función específica en los nódulos (2). A partir de ese momento los dos tipos de Hbs vegetales evolucionaron independientemente con funciones diferentes.

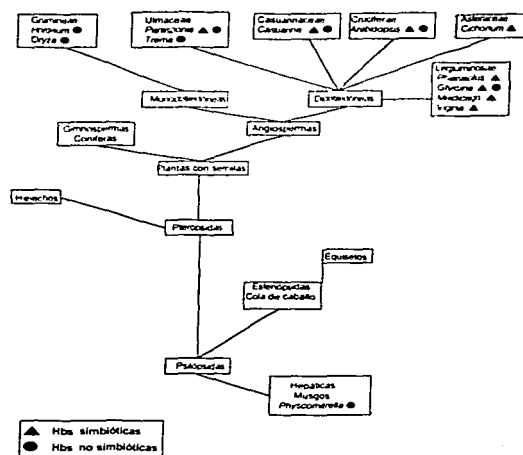


Figura 4. Distribución de las Hbs simbióticas y no simbióticas en las plantas terrestres.

AGRADECIMIENTOS

El trabajo que se lleva a cabo en el laboratorio de los autores está financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (proyecto número 25229-N).

REFERENCIAS

- Treyaskis B, Watts R A, Andersson S R, Llewellyn D J, Hargrove M S, Olson J S, Dennis E S y Peacock W J (1997) Two hemoglobin genes in *Arabidopsis thaliana*: The evolutionary origins of leghemoglobins. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:12230-12234.
- Appleby C A (1992) The origin and functions of haemoglobin in plants. *Sci Progr* 76:365-398.
- Kuro H (1939) Ueber hamoprotein aus den wurzelknöllchen von Leguminosen. *Acta Phytochim (Tokyo)* 11:195-200.
- Appleby C A, Tjepkema J D y Trinick M J (1983) Hemoglobin in a nonleguminous plant *Parasponia*: possible genetic origin and function in nitrogen fixation. *Science* 220:951-953.
- Hendriks T, Scheer I, Quillet M C, Randoux B, Delbreil B, Vasseur J y Hillbert J L (1998) A nonsymbiotic hemoglobin gene is expressed during somatic embryogenesis in *Cichorium*. *Biochim Biophys Acta* 1443:193-197.
- Bogusz D, Appleby C A, Dennis E S y Trinick W J (1988) Functioning haemoglobin genes in non-nodulating plants. *Nature* 331:178-180.
- Andersson C R, Jensen E O, Llewellyn D J, Dennis E S y Peacock W J (1996) A new hemoglobin gene from soybean: a role for hemoglobin in all plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:5682-5687.
- Taylor E R, Nie X Z, MacGregor A W y Hill R D (1994) A cereal haemoglobin gene is expressed in seed and root tissues under anaerobic conditions. *Plant Mol Biol* 24:853-862.
- Arredondo-Peter R, Hargrove M S, Sarath G, Moran J F, Lohman J, Olson J S y Klucas R V (1997) Rice hemoglobins: gene cloning, analysis and oxygen-binding kinetics of a recombinant protein synthesized in *Escherichia coli*. *Plant Physiol* 115:1259-1266.
- Hill R D (1998) What are hemoglobins doing in plants? *Can J Microbiol* 76:707-712.
- Arredondo-Peter R, Moran J F, Sarath G, Luan P y Klucas R V (1997) Molecular cloning of the cowpea (*Vigna unguiculata*) leghemoglobin II gene and expression of its cDNA in *Escherichia coli*: purification and characterization of the recombinant protein. *Plant Physiol* 114:493-500.
- Hargrove M S, Barry J K, Brucker E A, Berry M B, Phillips G N, Olson J S, Arredondo-Peter R, Dean J M, Klucas R V y Sarath G (1997) Characterization of recombinant soybean leghemoglobin α and apolar distal histidine mutants. *J Mol Biol* 267:1032-1042.
- Arredondo-Peter R, Hargrove M S, Moran J F, Sarath G y Klucas R V (1998) Plant Hemoglobins. *Plant Physiol* 118:1121-1126.
- Springer B A y Sligar S G (1987) High-level expression of sperm whale myoglobin in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:8961-8965.
- Hardisson R (1998) Hemoglobins from bacteria to man: evolution of different patterns of gene expression. *J Exp Biol* 201:1099-1117.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Recent Insights into Plant Hemoglobins^a

Emily J.H. Ross¹, Verónica Lira-Ruan², Raúl Arredondo-Peter², Robert V. Klucas¹
and Gautam Sarath^{1*}

¹Department of Biochemistry, George W. Beadle Center, University of Nebraska-Lincoln,
Lincoln, NE 68588-0664, USA

²Laboratorio de Biofísica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma
del Estado de Morelos, Avenida Universidad 1001, Colonia Chumilpa, 62210
Cuernavaca, Morelos, México

Summary

Hemoglobins (Hbs) are proteins that reversibly bind O₂. They are widespread in nature and have been identified in bacteria, fungi, protozoans, plants and animals. Hbs are predominantly α -helical and are characterized by the globin backbone containing a non-covalently bound heme. Functionally, all Hbs can bind small gaseous ligands and small cellular molecules. Although first extracted from soybean root nodules, it has become apparent that all plants contain Hbs, which are divided in three types: the truncated, symbiotic, and nonsymbiotic Hbs. The truncated Hbs are localized in the chloroplasts of algae, but their subcellular localization in higher plants is not known. They are composed of a smaller α -helical globin fold than that of the symbiotic and nonsymbiotic Hbs, have a lower O₂-affinity than the nonsymbiotic Hbs, are expressed in both root and shoot tissue and have no assigned function. Symbiotic Hbs are present in nitrogen-fixing nodules and facilitate the diffusion of O₂ to the respiring endosymbiotic bacteria. This type of plant Hbs is well-characterized biochemically, and recent studies have focused on the cellular mechanisms that control their tissue-specific expression and their structure-function relationships. The nonsymbiotic Hbs are cytoplasmic, exhibit very high affinity for O₂, and are synthesized during seed germination and in plant vegetative organs, as well as in response to stress. Based on tissue expression profiles, kinetic properties and cellular Hb levels, it has been suggested that nonsymbiotic Hbs may play a role in regulating the metabolism of specific plant cells, such as the xylem and differentiating xylem.

Key words: hemoglobin, leghemoglobin, nonsymbiotic, symbiotic.

Hemoglobins (Hbs) are proteins that reversibly bind O₂. They are ubiquitous and have been identified in bacteria, fungi, protozoans, plants and animals (1-3). The existence of Hbs in such a wide range of organisms suggests that there was a gene that coded for a common ancestral Hb, which might have existed about 1.8 billion years ago (4). Hbs can bind several

^aThis review is dedicated to the memory of Dr. Robert V. Klucas.

*Corresponding author. E-mail: gsarath1@unl.edu

Abbreviations: 2,4-D, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid; GUS, glucuronidase; Hb, hemoglobin; Lb, leghemoglobin; N₂, nitrogen; N₂, nonsymbiotic; NNF, sodium nitroprusside; Syn, symbiotic; Tr, truncated.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

gaseous ligands such as O₂, CO and NO, as well as other small organic molecules. Ligand binding occurs specifically to an iron atom coordinated within the tetrapyrrole protoporphyrin IX. The Fe-protoporphyrin IX (heme) prosthetic group is found in all Hbs in a one to one molar ratio within the globin backbone. The iron atom of the heme can undergo redox chemistry and will bind O₂ only in the ferrous (Fe²⁺) state. Most Hbs studied, with the exception of the truncated Hbs, fold into the same 3-over-3 α -helical three-dimensional structure, also known as the "globin fold" (5).

Non-plant Hemoglobins

Because of space limitation this review will only describe some characteristics of non plant Hbs, however the reader is referred to an excellent review by Weber and Vinogradov (3) on this subject. Vertebrates contain four types of Hbs. The most abundant is the O₂-carrying heterotetramer Hb found in the red blood cells, which in adults is composed of two α - and two β -globin polypeptides. The α and β subunits exhibit cooperativity in the binding of O₂ that is pH dependent. Vertebrates also contain a Hb named myoglobin (Mb), which is a monomer found in muscle and cardiac tissues and is involved in O₂ storage and transport (6). Recently, a Hb from brain tissue was discovered and was named neuroglobin (7). There is no known function of neuroglobins, however based on sequence homology and kinetic properties, which are similar to other Hbs, it has been postulated that neuroglobin folds and functions in a manner similar to Mb. The fourth Hb, named histoglobins has just been described (8).

Invertebrates contain somewhat different Hbs as compared to the vertebrate Hbs. Pesce *et al* (9) have reported crystal structures of a new class of Hbs, the truncated Hbs (trHbs) from the ciliated protozoan *Paramecium caudatum* and green unicellular algae *Chlamydomonas reinhardtii*. These proteins display medium to high O₂-affinity and have substantial deletions in amino-terminal and C/D-D α helical regions of the vertebrate globin fold. They fold in a 2-over-2 α -helical sandwich, which is atypical of most other known Hb structures. Other major differences between trHb and animal Hbs are the E7 residue (helix E, residue 7): in most Hbs, E7 typically is a His residue (distal His), involved in stabilizing the heme bound ligand through H-bonding. The equivalent residue in known trHbs is a Gln.

Bacteria contain two types of Hbs, a Hb that is similar in protein sequence to plant Hbs and a flavohemoglobin (flavoHb). The first type of bacterial Hb was identified in *Vitreoscilla* (10), and the second type, the flavoHbs, was identified in *Alcaligenes eutrophus* (11) and *Escherichia coli* (12, 13). Additionally, yeasts such as *Saccharomyces cerevisiae* (14) and *Candida norvegensis* (15) contain flavoHbs. In contrast to the *Vitreoscilla*-like Hbs, flavoHbs consist of an amino-terminal Hb globin domain, but also a carboxy-terminal flavin domain containing a FAD- and NADP⁺-binding sites. These proteins are related to proteins in the ferredoxin-NADP⁺ reductase family (12). The function of bacterial *Vitreoscilla*-like Hbs is still under investigation, however it has been argued that these proteins function in O₂ storage and diffusion (16, 17). It seems unlikely that the flavoHbs function in this manner based on

the ability of the protein to undergo oxidation and reduction reactions from the flavin domain (18). It has been proposed that the flavoHbs serve as NO dioxygenases [for example see Poole *et al* (19), Liu *et al* (20) and Gardner *et al* (21)]. FlavoHbs have been also cloned and characterized from the slime mold *Dictyostelium discoideum* and apparently they are involved in NO signaling (22).

Plant Hemoglobins

Hbs are widely distributed among the plant kingdom, ranging from primitive non-vascular plants to angiosperms. The reader is also referred to Appleby (23), Arredondo-Peier *et al* (24), Hill (25) and Watts *et al* (26) for more details and discussion on plant Hbs. Based on analysis of expression patterns and kinetics the plant Hbs can be separated into symbiotic (symHb) and nonsymbiotic (nsHb) types. Based on analysis of gene sequences and protein structures the nsHbs can be separated further into class 1 and class 2 (33), and the newly-recognized truncated Hbs (26). It is thought that the genes for most symHbs (e.g. the legume Lbs and *Cuscutaria* Hb I) were recruited from nsHb class 1 genes and the gene for *Parasponia* symHb from a nsHb class 2 gene (33). It has been known since 1939 (27) that plants forming nitrogen-fixing symbioses contain a Hb that is present in the nodules of legumes and nonlegumes, henceforth referred to as symHbs because they have not been detected in plant organs other than nodules. These proteins are often named leghemoglobins (Lbs) based on their original identification within the legume root nodules. For many years it was assumed that Lbs were the only types of Hbs present in plants. However, a Hb that was identified in root nodules from *Parasponia andersonii* (28) indicated that Hbs may be more widely distributed in plant organs. Subsequently, a nsHb was identified in roots of *Trema tomentosa* a non-nodulating close relative of *Parasponia* (29). Since then nsHbs have been identified and cloned from a number of land plants. TrHbs are a new class of plant Hbs that were originally identified in the chloroplast of *Chlamydomonas eugametes* (30), and subsequently in organs from *Arabidopsis* and other higher plants (26).

Based on the analysis of protein sequences it is evident that symHbs and nsHbs are closely related to one another. Both types of plant *hb* genes contain three introns and four exons, whereas vertebrate Hbs contain two introns (6). The two introns of the vertebrate *hb* genes are in the same positions as the first and third introns of the plant *hb* genes. These data indicate that the symHbs and nsHbs are related to vertebrate Hbs and evolved from a common ancestor. Based on a wider distribution in land plants, it would appear that the nsHbs are ancestral to the symHbs, that may have evolved to specifically function in nodules of nitrogen-fixing plants. TrHbs exhibit a different gene structure (26), and thus it is likely that plant trHbs evolved separately from the ancestor of nsHbs and symHbs (see below).

The overall biochemical features of plant Hbs are similar to those of non-plant Hbs, although some of these proteins exhibit differences in the globin-heme linkage as is evident from deoxyferrous UV/Vis spectra. Deoxyferrous symHbs, animal Hbs and Mbs display a

pentacoordination of the heme, resulting in a broad peak centered at 556 nm (23). The nsHbs exhibit two peaks in the deoxyferrous state at 526 and 556 nm, respectively, indicating that the heme is hexacoordinated (32-34). This absorption spectrum is similar to other hexacoordinated heme proteins such as cytochrome *b* (35, 36). Recent spectroscopic analysis showed that a number of other Hbs are also hexacoordinate, including trHbs (26, 37), *Synechocystis* PCC6803 Hb (38), human neuroglobin (7, 39), and human histogloblin (8). The physiological significance of hexacoordination in these Hbs is not known, but is currently under investigation. Initial studies suggest that hexacoordination could be involved in determining the function of the protein *in vivo* (34, 39, 40).

Plant trHbs

Truncated hemoglobins (trHbs), found in prokaryotes, protozoa and algae have an unknown function. They fold in a 2-over-2 α -helical pattern. The amino-terminal A helix is almost completely deleted and the CD-D region only consists of approximately 3 amino acid residues in length. TrHbs are not simply a truncated version of the typical globin fold, but are a unique structure based on residue deletions and substitutions that give it conformational stability (41).

A gene in *Arabidopsis*, *glb3*, was identified that codes for a protein that is approximately 48% similar to bacterial, protist, and algal 2-over-2 trHbs (26). *Arabidopsis* GLB3 shares approximately 25% sequence identity with nsHb1 and nsHb2 of the same organism. Northern blot analysis indicated that *Arabidopsis glb3* is expressed 4-fold higher in root tissue as compared to shoot tissue. In addition, levels of GLB3 mRNA are not dramatically effected after addition of 2,4-D, cytokinins or abscisic acid, but is upregulated upon auxin treatment as observed by microarray analysis. Expression of *glb3* decreases under hypoxic growth conditions (26), which is distinct from the regulation of *Arabidopsis nshb1* and *nshb2* indicating differential regulation of these genes. Analysis of recombinant *Arabidopsis* GLB3 indicates that this protein forms dimers when the concentration is higher than 3-30 μ M, and it is presumed to be hexacoordinated in the deoxyferrous state, based on the Soret absorbance at 411 nm, which is similar to the nsHbs. The O₂-binding rate constant for *Arabidopsis* GLB3 is 150- and 10-fold higher than *Arabidopsis* nsHb1 and nsHb2, respectively, but only slightly higher than trHbs of *Paramecium* (42) and *Chlamydomonas* (43).

Expressed sequence tags containing a high similarity to *Arabidopsis* GLB3 were identified in a number of monocots, including barley and rice, and dicots, including soybean, cotton, and tomato (26). These data indicate that it is likely that trHbs are ubiquitous in higher plants. The physiological relevance of the trHbs is not yet understood. In *Chlamydomonas*, trHb is induced in response to active photosynthesis and localizes to the thylakoid membrane of the chloroplast (30). In *Nostoc commune*, a *trhb* gene (formerly named as cyanoglobin) is coexpressed with genes coding for nitrogen fixation (44). *Nostoc* trHb is also localized on the cytoplasmic side of the cell membrane, but only under anaerobic conditions (45). Additionally,

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

there is a *trHb* that is thought to be involved in the protection of bacilli against NO during infection of *Mycobacterium tuberculosis* in humans (21, 46, 47). NO-scavenging could occur by promoting deoxygenation, as observed in oxyHb, oxyMb, and flavoHbs, which converts NO to nitrate (21). In plants, analysis of recombinant *Arabidopsis* GLB3 indicates that this protein is involved in functions other than O₂ storage or transport (26).

The *glb3* gene contains three introns, with the first being located in a similar position as the 3-over-3 Hbs (symHb, nsHb, vertebrate Hb, and Mb). The second and third introns are in different positions as compared to the other plant Hbs. Additionally, none of *glb3*'s introns are in similar positions as the *trhb* genes from *Paramecium* or *Chlamydomonas* (30, 48). Differences in the tertiary structure and position of second and third introns suggest that plant *trHbs* and symHbs and nsHbs evolved from different ancestors.

Symbiotic plant hemoglobins

The symHbs were first identified in soybean root nodules (27), and since then they have been studied and characterized from a number of leguminous [reviewed by Appleby (23)] and nonleguminous species (28, 49-51). SymHbs are primarily involved in the facilitation of O₂-diffusion to the aerobically respiring bacterial symbiont in the infected tissues of nitrogen-fixing nodules of legumes and nonlegumes (23). Its presence is essential for nitrogen fixation in higher plants. SymHbs are found in high concentrations, up to 3 mM in soybean nodules, and have a high affinity for O₂ coupled to a fast O₂-dissociation rate, allowing for the facilitated diffusion of O₂ to actively nitrogen-fixing bacteroids. The most studied symHbs are the Lbs.

Regulation of *symhb* genes - The structural and functional properties of *symhb* gene promoters have been extensively studied, primarily by Mancker and colleagues, however they are not entirely understood yet. All known *symhb* gene promoters contain a two-motif nodulin consensus element: AACAT and CTCCT (52), with a conserved 6-9 nucleotide distance between the two of them (53). These motifs are essential for high level nodule specific expression of *symhb* genes (54). The 831 bp promoter of the leghemoglobin I (*lbI*) gene from lupin contains none of the nodulin-like motifs as a perfect match, but *lbI* expression is similar as in other systems (55). The *lbI* promoter is unlike all of the *symhb* promoters studied thus far. Therefore, the lupin *lbI* gene promoter was analyzed for functionality by fusion to the reporter gene *gus* and transformed into *Lotus corniculatus* and tobacco (55). GUS activity was detected at the highest levels in root nodules, and in uninfected roots of *L. corniculatus*. In tobacco, GUS activity was localized to roots and leaves, as well as in cultured cells. These results indicate that the lupin *lbI* promoter is not fully nodule specific in transgenic plants. This corroborates previous findings of the *Sesbania rostrata glb3* promoter (56) in which activity of the promoter was detected in nodules, stem and leaves of transformed *L. corniculatus*. Therefore, the activity of *lb* promoters in organs other than nodules suggests that possibly *lb* promoters may have functional similarity to *nsHb* genes. Nevertheless, despite the detection of the activity of *lb* promoters, no Lb proteins and transcripts have been detected in plant organs

other than effective (nitrogen-fixing) nodules, which indicates that Lbs are specifically synthesized for the process of symbiotic nitrogen fixation.

In legumes, the *lbs* are usually part of a multigene family, and as of yet the specific role(s) of each Lb is not known (23). Lb α and LbIV are the major Lbs in mature soybean and pea nodules, respectively, and have slightly but not significantly higher O₂-binding affinities than the other major Lbs (Lbc and Lbl, respectively) (57). Although, the ratios of the different Lbs (Lb α /Lbc for soybean and LbIV/Lbl for pea) change during root nodule development, the underlying physiological consequences on root nodule function are unclear. Kawashima *et al* (58) characterized two cDNA clones from pea: PsN5, a PsLbA type or LbIV-like Lb, and PsN120, a PsLbB type or Lbl-like Lb. Following analysis of O₂-binding affinity, these authors found that recombinant PsN5 had a higher O₂-affinity than recombinant PsN120, which was consistent with previous findings (59, 60). In addition, the two *lb* genes were differentially regulated, with expression of *psn5* in the central tissue of effective nodules, and *psn120* expression restricted to the region from the infection zone II to the distal part of the nitrogen fixation zone III (58). These results indicate that the PsLbA type protein, having a higher O₂-affinity, likely plays a major role in nitrogen fixation and in the O₂-consumption of the bacteroids as compared to the PsLbB type protein.

Little is known about the trans-acting factors that regulate *lb* genes, however work has begun on identifying proteins that function as transcriptional regulators of Lbs. A novel type of DNA-binding protein, CPP1, has been identified to interact with the promoter of a soybean *lb* gene, *gnlbc3* (61). CPP1 is nuclear localized and contains two cysteine-rich regions with 9 and 10 cysteines, respectively. The *cpl1* gene is expressed in the distal portion of the central infected tissue during a late phase of nodule development. Transcripts of *gnlbc3* are not detected in this region of the nodule, but only in the central infected region. This supports the hypothesis that CPP1 is either a repressor of *gnlbc3* gene expression or maintains a repressed state of the *lb* genes in these cells. Analysis of the expression of the symbiotic bacterial genes in *Phaseolus vulgaris* nodules showed that the cells at the periphery of the infected zone contain bacteria that have not differentiated into mature nitrogen-fixing cells (62). This suggests that the peripheral cells of the nodule are at a different developmental stage than the central infected cells. Similarly, studies of *gnmda*, a homeobox gene, suggested that the soybean nodule has a zone containing less differentiated cells (63). It is therefore possible that genes such as *cpl1* are expressed in less differentiated cells and are responsible for the negative regulation of *lb* genes.

Structural properties of symHbs - The crystal structures of lupin Lb (64) and wild type and mutant soybean Lb α (65) have been published. Both sets of crystal structure data indicate similar overall folds as observed for other Hbs. The Lbs contain seven α -helices in a 3-over-3 fold, which enclose an Fe-protoporphyrin IX prosthetic group. They have a distal His in close-proximity to the ligand binding site found in a similar location to the one found in vertebrate Mb and Hbs. This His residue plays a less important role in ligand regulation as compared to Mb and Hbs of vertebrates (65). Lbs are less stable than vertebrate Hbs as a

result of higher levels of heme dissociation and autooxidation (65). While the structural basis for this is not known, it is possible that the distal His is needed to maintain the heme within the globin and thereby influences ligand interactions. This His is conserved among the symHbs (66). It has been demonstrated that soybean Lba, but not animal Mb or Hb, is able to bind large ligands, such as long-chain isocyanides, imidazole and nicotinate (67-69). It is thought that the binding of bulky groups is the result of the free movement of the distal His. Lbs also contain a proximal His (F8) residue that interacts with the heme group, resulting in a pentacoordinate high-spin UV/Vis spectra. Harutyunyan *et al* (64) reported that this His residue in lupin Lb is free to rotate and move toward the heme plane as compared to Mb. This is similar in soybean Lba (65) and could explain the structural basis for the high degree of reactivity of Lbs, which is a characteristic important to their function as an O₂-carrier in root nodules.

Nonsymbiotic plant hemoglobins

The finding of a Hb in uninfected tissues of *Trema tomentosa* was the first suggestion that all plants might contain nsHbs. Since that time, nsHbs have been identified from a number of monocots such as maize, rye, and wheat (71), and cloned from the monocots barley (71), rice (31), maize and teosinte (72), and dicots such as soybean (73), *Arbutus* (33), chicory (74), tomato (75) (Garvin *et al*, personal communication), cotton, citrus, and sugar beet (75), and alfalfa (76). nsHbs have also been identified in primitive land plants, such as mosses (77) and liverworts (75), indicating that nsHbs are widespread in land plants.

Nshb gene families - Most plants have at least two known *nshb* genes, except for barley in which only one *nshb* gene has been identified (71). Recently, Lira-Ruan *et al* (78) reported the existence of a rice *nshb* gene family in which four *nshb* sequences were identified. This family is clustered in two regions: the first contains *hb1*, *hb3* and *hb4* and the second contains only *hb2*. All four genes code for the highly conserved amino acids of plant Hbs (66), including the distal and proximal His, as well as residues located at the dimer interface of rice Hb1 (V50, S53, E123, V124, F127, and A128) as described by Hargrove *et al* (79). This observation suggested that potential homo and/or heterodimers from nsHb 1, 2, 3 and 4 could assemble in rice tissues. Two of the rice *nshb* genes, *hb1* and *hb2*, have been cloned and their respective recombinant proteins were characterized in detail (31, 79; Ross *et al*, in preparation). The existence of different promoters upstream of the rice *nshb* genes (78) suggests that each *nshb* gene is regulated by separate mechanisms, and is expressed in different organs and/or under different growth conditions. The potential for understanding the differential regulation of rice *nshb* genes and the presence of novel *cis* and *trans*-acting elements can now be elucidated.

Expression of *nshb* genes - In a number of systems *nshb* promoters have been analyzed. For example, the activity of *nshb* promoters of *Parasponia andersonii* and *Trema tomentosa* was localized to the root meristem and vascular cylinder of transgenic tobacco, using *gus* as a reporter gene (80). Despite these findings, there is no substantial evidence that nsHb

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

proteins are found in *Parasponia* roots. Jacobsen-Lyon *et al* (81) reported that when the *Catuarina glauca hb* gene was fused to *gus* and transformed into *L. corniculatus*, GUS expression was found in the meristem of the root tips, the vascular stele of roots, and the parenchyma internal to the endodermis. These observations showed that *nshb* genes express in diverse plant organs.

Transcripts for *nHbs* have primarily been identified in a number of plant organs, including tissues that are metabolically active, such as the stems of soybean (73), suggesting that these proteins are involved during the normal growth of the plant. In monocots, the earliest expression of *nshbs* is observed in germinating seeds. In barley, *nshb* transcripts and proteins were detected predominantly in the aleurone cells (71). The presence of *nHbs* was also reported in excised barley embryos (82), embryo-containing and embryoless half seeds, and aleurone tissue using immunoblotting methods (82, 83). Arredondo-Peier *et al* (31) showed that under normal growth conditions, *hb1* and *hb2* are expressed in rice leaves, but that only *hb1* is expressed in roots, suggesting differential regulation of this gene family during plant development. Using immunological detection, Aréchaga-Ocampo *et al* (72) identified a *nshb* in maize embryos, root and leaf tissues and teosinte root and leaf tissues.

Other studies suggest that *nHbs* are stress-related proteins. For example, under hypoxic conditions the *nshb* gene is expressed in germinating barley aleurone (25, 71, 84). Nie *et al* (85) found induction of the barley *hb* gene under low O₂ tension, high levels of CO in aleurone tissue, as well as in the presence of 10 mM nitrate. Two *hb* genes exist in *Arabidopsis* which are expressed in plant rosette leaves and roots under normal conditions, however when grown under stress conditions, such as microaerobiosis or low temperature both *Arabidopsis nshbs* are overexpressed as compared to normal growth (33). *Arabidopsis nshb1* and *nshb2* were fused to *gus* to determine promoter tissue specificity (75). The *nshb1::gus* fusion was expressed during germination in the hypocotyl and cotyledons, and *nshb2::gus* activity was not found in young plants but in the bolt stem, rosette leaves and roots of mature flowering plants. During an analysis of hormone induction, *Arabidopsis nshb1::gus* is expressed under hypoxia (5% O₂), whereas *nshb2::gus* is expressed under cytokinin induction (75). Similarly, rice *nshb2* promoter was fused to *gus* and exhibited induction by cytokinins, and is expressed in similar plant organs as *Arabidopsis nshb1::gus* and *nshb2::gus* (Ross *et al*, unpublished results). Lim-Ruan *et al* (86) reported that *nshb* levels in rice increase in leaves and roots from plants subjected to darkness and flooding. However, *nshb* levels did not change when plants were subjected to oxidative (H₂O₂), nitrosative (SNP) and hormonal (2,4-D) stresses, suggesting that *nshbs* do not participate in a generalized plant response to stress, but rather to specific stress conditions. Analysis of the expression of two tomato *nshb* genes indicates that *hb1* responds to nitrate resupply, addition of phosphate, potassium and iron, whereas *hb2* is not significantly induced, suggesting that *nshbs* may be involved in the responses to nutrient stress, perhaps by participating in signaling mechanisms (Garvin *et al*, USDA-ARS, University of Minnesota, personal communication).

Organ and tissue localization of *nshbs* – Seregélyes *et al* (76) provided the first immunocytolocalization of the alfalfa *nshb* protein. Using cell suspension cultures they were able to detect alfalfa *nshb* in the nucleus of cells cultivated under hypoxia. The lack of a nuclear localization signal on the amino-terminus in any of the known *nshbs* questions this preliminary data. However, there is a possibility that under particular environmental conditions *nshbs* are able to translocate from the cytoplasm to the nucleus. At this time, there is very limited information on the potential partitioning of *nshbs* to different cellular compartments. Recently, Ross *et al* (83) and Lira-Ruan *et al* (86) investigated the immunolocalization of *nshbs* in rice tissues and the synthesis of *nshbs* during the development of rice plants, respectively. These authors showed that *nshbs* are synthesized in organs from young and mature rice and are localized in the cytoplasm of differentiating cells of the root cap, sclerenchyma, aleurone, and in the vasculature, principally in the differentiating xylem (Fig. 1). The detection of *nshb* proteins in vascular regions is consistent with earlier studies (75, 80, 81) that have documented *nshb* promoter-driven *gus* expression in the vascular stele. The existence of *nshbs* in terminally differentiating tissue, such as the aleurone, and in terminally differentiating cells, such as the tracheary elements, is particularly interesting. All of these cell types undergo some form of programmed cell death (87, 88) and exhibit tissue-specific metabolism suggesting a potential role for *nshbs* in these specific cellular environments.

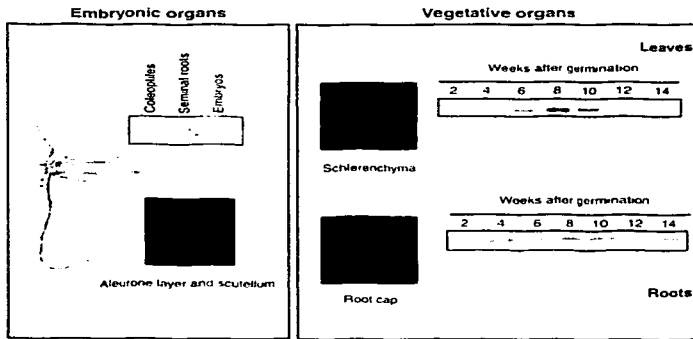


Fig. 1. Detection of *nshBs* in rice embryonic (coleoptiles, seedling roots and embryos) and vegetative (2 to 14 weeks old leaves and roots) organs by Western blot, and localization of *nshBs* in rice aleurone layer, scutellum, sclerenchyma and root cap tissues by confocal microscopy. *nshBs* were detected by using anti-rice Hb1 antibodies. Figures reproduced from Lira-Ruan *et al* (86) (with permission).

Structural properties of nsHbs - The first crystal structure of a nsHb, rice Hb1, was reported by Hargrove *et al* (79). Rice recombinant Hb1 is a concentration dependent dimer, as observed by FPLC analysis (40), and crystallizes as such. Rice Hb1 has the same overall structure as other Hbs, the globin fold, and the heme pocket for ferric Hb1 contains a proximal and distal His residue. The unusually high O_2 -affinity ($K_D = 1$ nM) of this protein has been explained by the combined effect of the close proximity of the distal His to Fe and the positioning of the Phe40 residue. This latter amino acid is found atypically close to the Cyproximal His as compared to vertebrate and symHbs. This is a highly conserved residue in plant nsHbs and it is likely that it is functionally significant. The unfavorable steric interaction between Phe40 and His73 (distal His) may promote dissociation of the distal His from the Fe atom and permit O_2 -binding. A mutation of Phe40 to Leu results in a His73 dissociation rate decrease of ~ 10 -fold from ~ 1900 s^{-1} in wild type Hb1 to 200 s^{-1} in the mutant (Hargrove and Goodman, unpublished).

Kinetic analysis of ligand binding for the nsHbs shows that this type of Hb has unusually high affinity for O_2 . The O_2 -association constant for recombinant rice Hb1 (31), rice Hb2 (Ross *et al*, unpublished), barley Hb (32) and *Arabidopsis* nsHb1 (33) (Table 1) is similar to other O_2 transport and storage proteins, such as soybean Lba. However, the extremely high O_2 -affinity for many of these proteins is the result of a very low dissociation rate. These rate constants indicate that the unique reactivity is the result of the positioning of amino acids and O_2 within the heme pocket of the protein (79). What is interesting is that the *Arabidopsis* nsHb2 protein has oxygen binding characteristics more similar to those of the symHbs (Table 1). The functional consequences of differences in ligand-binding kinetics are not known at present. However, the biochemical properties of nsHbs specifically the high affinity for O_2 , raises interesting questions about the function(s) of these proteins in plant organs. Some of these possibilities are discussed below.

Table 1. Rate and equilibrium constants for the reaction of O_2 from some plant Hbs

Protein	k^*O_2 ($\mu M^{-1}s^{-1}$)	kO_2 (s^{-1})	KO_2 (μM^{-1})	Reference
SymHbs				
Soybean Lb	120	5.6	21	94
Lupin Lbl	540	20	27	94
Lupin Lbl1	320	25	12.8	94
NsHbs				
Rice Hb1	68	0.038	1800	31
Rice Hb2	50	0.038	1316	Ross <i>et al</i>
Barley Hb	2.4	0.028	86	32
<i>Arabidopsis</i> Hb1	74	0.12	617	33
<i>Arabidopsis</i> Hb2	1	0.17	7	33
TvHbs				
<i>Arabidopsis</i> GLB3	0.2	0.3	0.66	26

k^*O_2 is the O_2 -association constant; kO_2 is the O_2 -dissociation constant; KO_2 (k^*O_2/kO_2) is the O_2 -affinity constant.

Potential functions of nsHbs – While data on the localization, kinetics, regulation and structure of the nsHbs have begun to accumulate, their physiological function still eludes us. Based on their presence under both normal and stressed growth conditions, it is conceivable that these proteins maintain a 'housekeeping' function as well as potential cell-specific functions. The very tight binding of O_2 by recombinant nsHbs does not readily support an O_2 -sensor or O_2 -transport role for these proteins. Appleby *et al* (89) postulated that under normal aerobic growth conditions, nsHbs would be oxygenated, however under microaerobic or anaerobic conditions nsHbs would be deoxygenated and would trigger an anaerobic response making these proteins involved in O_2 -sensing. Andersson *et al* (73) questioned this hypothesis by suggesting that these proteins could function as O_2 -carriers in metabolically active tissues, such as the stems of soybean, which contain high levels of nsHb transcripts. However, no evidence on nsHb protein levels nor their ligand binding properties were reported for the soybean Hb to critically evaluate this hypothesis.

NsHbs have been implicated as O_2 -scavengers or in O_2 -signaling (23). However, as compared to symHbs, which are found in cellular concentrations of 1 to 3 mM (90), nsHbs are found in nM concentrations (25, 83). In addition, given the *in vivo* tissue localization of nsHbs in metabolically active tissues [e.g. root cap cells and differentiating xylem (83) and aleurone (71, 83)] and the very low O_2 -dissociation constant of several recombinant nsHbs (Table 1), it is unlikely that they function as O_2 -scavengers or directly in O_2 -signaling (24, 25). These proteins may have a number of other functions, including binding and/or transporting ligands, such as CO or NO, and/or may interact with organic molecules and/or proteins under specific conditions (24).

Both, Arredondo-Peter *et al* (24) and Hill (25) have suggested that plant nsHbs could act as NO-scavengers, in a similar manner to those of the bacterial and yeast flavoHbs, documented to possess NO dioxygenase properties (21, 91, 92). Recently, Wang *et al* (93) found that a *nshb* gene from *Arabidopsis* is transiently induced upon addition of 250 μ M nitrate, and sustained induction occurs upon addition of 5-10 mM nitrate, using microarray and gel blot analysis. Additionally, tomato Hb1 is induced under nitrate resupply (Garvin *et al*, personal communication). These data suggest that the nsHbs have a possible role in nutrient signaling, and particularly in nitrogen signaling.

Based on studies in barley cells (71) and from over and under-expressing barley Hb in maize cells (84) it has been postulated that barley nsHb is involved in ATP metabolism in stressed tissues. Maize suspension cells containing antisense barley nsHb cDNA have considerably lower levels of ATP and total adenylates when grown in hypoxic conditions as compared to the controls or cells that were engineered to overproduce barley nsHb protein. These results have been interpreted as an indication that nsHbs maintain a direct involvement with cellular energy status under O_2 -limiting conditions. Hill (25) has suggested that barley nsHb functions as an oxygenase by oxidizing NADH in association with other proteins, such as a flavoprotein. He also suggested that barley nsHb is involved in maintaining a proper redox state under hypoxic/anoxic conditions by directly interacting with pyruvate. Localization

data presented by Ross *et al* (83) shows that rice nsHbs are synthesized in differentiating cells. Metabolism of these cells are in flux and metabolic redirection occurs in response to specific differentiation signals, one of which is likely to be a change in the cell's redox state. nsHbs could be involved in redox signaling, especially if the redox state of the heme is functionally important (79; Hargrove, personal communication). Thus, nsHbs may function to sense/or maintain a particular redox environment that promotes cell viability in response to differentiation or environmental cues.

Conclusions

Hbs are very ancient proteins. Apparently their evolution occurred in many directions, with the numerous types of Hbs that have been identified throughout the kingdoms of life: trHb, flavoHb, symHb, nsHb, vertebrate Hb, Mb, neuroglobin, and histoglobln. The biochemical and regulatory properties of Hbs suggest that these proteins may function in organisms according to the metabolic status in the cell, such as a response to changes in pH and/or availability of interacting metabolites. It is very likely that Hbs do not play a single but many roles in different compartments of the cell under particular physiological conditions.

The plant trHbs and symHbs and nsHbs are likely to have evolved independently and function differently in plants today. As discussed above, the symHbs are involved in the facilitation of O₂-diffusion in actively nitrogen-fixing organisms (23). However, the physiological functions of the nsHbs and trHbs are still not known. Little information is available about plant trHbs, and thus it is still too premature to propose a function for this group of proteins in plants. In contrast, progress has been made in the analysis of nsHbs and functions for nsHbs in plant organs have been already proposed (24, 25). However, the precise function(s) of nsHbs is still not understood. An intriguing question that may help to understand the current function of nsHbs and their evolutionary relationships is: what was the function of the ancestral nsHb of land plants? An analysis of the nsHbs from the mosses *Physcomitrella patens* and *Ceratodon purpureus* (77) (Arredondo-Peter *et al*, unpublished observations) aids in answering this question. Sequence alignments of moss Hbs and a number of symHbs and nsHbs, indicate that the size of the Hb polypeptide has decreased over time. This reduction has resulted in the loss of amino acids in the amino-terminal portion of the polypeptide, principally in the pre-A helix region (Fig. 2A). Thus, did this pre-A helix have a function in the past? An interesting possibility is that the pre-A helix functioned as a leader peptide. For example, the moss nsHbs contain a predicted leader peptidase site at position 20 to 25 of the pre-A helix. Additionally, the amino-terminal portion of the moss nsHb has physicochemical properties of a leader peptide, similar to those existing in the *Chlamydomonas* trHb (Fig. 2B), which is translocated from the cell cytoplasm to chloroplasts (30). However, it is not known if the pre-A helix from moss nsHbs is an authentic leader peptide. All other higher plant nsHbs appear to be localized in the cytoplasm. Does this indicate that the ancestor of plant nsHbs was originally translocated to cellular organelles, such as the mitochondria or chloroplast, and that nsHbs became cytoplasmic during evolution? An answer to the above possibilities

may be obtained from the analysis of Hbs from the algal ancestor to land plants, i.e. by determining whether cytoplasmic or organelle nsHbs-like exist in Chlorophyta species. Whatever the function of ancestral nsHbs was, it was probably important for the adaptation of first plants to a land environment. Moreover, after 360 million years of plant evolution the function of nsHbs is apparently still important to the adaptation and survival of a large diversity of present land plants.

Acknowledgements

Work in the authors' laboratories has been funded by the National Science Foundation (grant no. OSR-92552255) and the United States Department of Agriculture (grant no. 95-37305-2441) to RVK/GS; Center for Biotechnology-LNL, funded through The Nebraska Research Initiative to GS; Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (grant no. 25229N) and Dirección General de Asuntos de Personal Académico-UNAM (grant no. IN202399), México, to RA-P VL-R is a PhD fellow from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México (reg. no. 143896). This work is published as Journal Series No. 13742 from the Agriculture Research Division, University of Nebraska.

REFERENCES

1. Riggs, AF (1991). *Amier Zool.* 31:535-545.
2. Vinogradov SN, Waltz DA, Pohajdak B, Moens L, Kepp OH, Suzuki T & Trotman CAN (1993). *Comp Biochem Physiol.* 106B:1-26.
3. Weber R & Vinogradov SN (2001). *Physiol Rev.* 81:569-628.
4. Hardison R (1998). *J Exp Biol.* 201:1099-1117.
5. Dickerson RE & Geis I (1983). *Hemoglobin: Structure, Function, Evolution, and Pathology.* The Benjamin/Cummings Pub. Co., Inc., Menlo Park, California.
6. Hardison RC (1996). *Proc Natl Acad Sci, USA.* 93:5675-5679.
7. Burnester T, Welch B, Reinhardt S & Hankcio T (2000). *Nature* 407:520-523.
8. Treat III JT & Hargrove MS (2002). *J Biol Chem.* in press.
9. Pesev A, Costare M, Dawida S, Gaertlin M, Yamauchi K, Asczel P, Moens L & Bologniet M (2000). *EMBO J.* 19:2424-2434.
10. Wakabayashi S, Matsumura H & Webster DA (1986). *Nature* 322:481-483.
11. Cramon R, Siddiqui RA & Friedrich B (1994). *J Biol Chem.* 269:7349-7354.
12. Andrews SC, Shipley D, Keen JN, Pindley JB, Harrison PM & Guest JR (1992). *FEBS Lett.* 302:247-252.
13. Ioannidis N, Cooper CE & Poole RK (1992). *Biochem J.* 288:649-655.
14. Zhao XJ, Raitt DV, Burke F, Clewett AS, Kwast KE & Poyton RO (1996). *J Biol Chem.* 271:25131-25138.
15. Shikama K, Matveeva A & Iwasa H (1995). *Int J Biochem Cell Biol.* 27:1107-1115.
16. Boerman SJ & Webster DA (1982). *J Gen Appl Microbiol.* 28:35-43.
17. Dikshit KP, Dikshit KL, Liu Y & Webster DA (1992). *Arch Biochem Biophys.* 293:241-245.
18. Cooper CE, Ioannidis N, Dawida S & Poole RK (1994). *Biochem Soc Trans.* 22:709-713.
19. Poole RK & Hughes MN (2000). *Mol Microbiol.* 36:775-783.
20. Liu LM, Zeng M, Haselnden A, Hekman J & Stamler JS (2000). *Proc Natl Acad Sci, USA.* 97:4672-4676.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

21. Gardner PR, Gardner AN, Martin LA & Saltzman AL (1998). *Proc Natl Acad Sci, USA*. 95:10378-10383.
22. Fujima M, Shimizu H, Tanaka Y & Urushihara H (2000). *Cell Struct Funct*. 25:47-55.
23. Appleby CA (1992). *Sci Progress* 76:365-398.
24. Arredondo-Peter R, Hargrove MS, Moran JP, Sarath G & Klucas RV (1998). *Plant Physiol*. 118:1121-1126.
25. Hill RD (1996). *Can J Microbiol*. 76:707-712.
26. Watis RA, Hunt PW, Hvitved AN, Hargrove MS, Peacock WJ & Dennis ES (2001). *Proc Natl Acad Sci, USA*. 98:10119-10124.
27. Kubo H (1939). *Acta Phytchim. (Tokyo)* 11:195-200.
28. Appleby CA, Tjepkema JD & Trinick MJ (1983). *Science* 220:951-953.
29. Boguss D, Appleby CA, Landsmann J, Dennis ES, Trinick MJ & Peacock WJ (1988). *Nature* 331:178-180.
30. Couture M, Chamberland H, St-Pierre B, Lafontaine J & Guertin M (1994). *Mol Gen Genet*. 243:185-197.
31. Arredondo-Peter R, Hargrove MS, Sarath G, Moran JP, Lohrman J, Olson JS & Klucas RV (1997). *Plant Physiol*. 115:1259-1266.
32. Duff SMG, Wittenberg JB & Hill RD (1997). *J Biol Chem*. 272:16746-16752.
33. Trevaszka B, Watis RA, Andersson SR, Llewellyn DJ, Hargrove MS, Olson JS, Dennis ES & Peacock WJ (1997). *Proc Natl Acad Sci, USA*. 94:12230-12234.
34. Hargrove MS (2000). *Biophys J*. 79:2733-2738.
35. Smith L (1978). *Methods Enzymology* 53:202-212.
36. Weiss H & Ziganke B (1978). *Methods Enzymology* 53:212-221.
37. Das TK, Couture M, Lee HC, Peisach J, Rousseau DL, Wittenberg BA, Wittenberg JB & Guertin M (1999). *Biochemistry* 38:15360-15368.
38. Couture M, Das T, Navard P, Ouellet Y, Wittenberg J, Wittenberg B, Rousseau D & Guertin M (2000). *Eur J Biochem*. 267:4770-4780.
39. Hvitved AN, Tveit III JT, Premier SA & Hargrove MS (2001). *J Biol Chem*. 276:34714-34721.
40. Goodman MD & Hargrove MS (2001). *J Biol Chem*. 276:6834-6839.
41. Wittenberg JB, Bolognini M, Wittenberg BA & Guertin M (2002). *J Biol Chem*. 277:871-874.
42. Das TK, Weber RF, Dewilde S, Wittenberg JB, Wittenberg BA, Yamauchi K, Vanhaenwaert ML, Moens L & Rousseau DL (2000). *Biochemistry* 39:14330-14340.
43. Couture M, Das TK, Lee HC, Peisach J, Rousseau DL, Wittenberg BA, Wittenberg JB & Guertin M (1999). *J Biol Chem*. 274:6898-6910.
44. Potts M, Aagehaug SV, Ebel R & Bassam D (1992). *Science* 256:1690-1692.
45. Hill DR, Bellini TJ, Thorsteinsson MV, Bassam D, Brass S, Ernst A, Jeger P, Paerl H, Mulligan ME & Potts M (1996). *J Bacteriol*. 178:6587-6598.
46. Eich RF, Li T, Lemus DD, Doherty DH, Curry SR, Aitken JF, Mathews AJ, Johnson KA, Smith RD, Phillips Jr GN & Olson JS (1996). *Biochemistry* 35:6976-6983.
47. Herold S, Exner M & Neuser T (2001). *Biochemistry* 40:3385-3395.
48. Yamauchi K, Oshida T & Usuki I (1992). *Biochim Biophys Acta* 1171:81-87.
49. Fleming AL, Wittenberg JB, Wittenberg BA, Dudman WF & Appleby CA (1987). *Biochim Biophys Acta* 911:209-220.
50. Pathirana SM & Tjepkema JD (1995). *Plant Physiol*. 107:827-831.
51. Suharjo UKJ & Tjepkema JD (1995). *Physiol Plant*. 95:247-252.
52. Stougaard J, Jorgensen J, Christensen T, Kühle A & Marker KA (1990). *Mol Gen Genet*. 220:353-360.
53. Ramlow KB, Laursten NH, Stougaard J & Marker KA (1993). *Plant J*. 4:577-580.
54. She QX, Laursten P, Stougaard J & Marker KA (1993). *Plant Mol Biol*. 22:945-956.
55. Stroycki FM, Karlowski WM, Demaux Y, Petit A & Legocki AB (2000). *Mol Gen Genet*. 263:173-182.

56. Szabadus L, Ratet P, Grunenberg B & deBruijn FJ (1990). *Plant Cell* 2:973-986.
57. Martin KD, Saari L, Guang-Xin W, Wang T, Parkhurst LJ & Klucas RV (1990). *J Biol Chem* 265:19588-19593.
58. Kawashima K, Suganuma N, Tamaaki M & Kouchi H (2001). *Plant Physiol* 125:641-651.
59. Ubeda E & Syono K (1982). *Plant & Cell Physiol* 23:85-90.
60. Ubeda E & Syono K (1982). *Plant & Cell Physiol* 23:75-84.
61. Cvitanich C, Pallisgaard N, Nielsen KA, Hansen AC, Larsen K, Pihlakski-Maunsbach K, Marker KA & Jensen EO (2000). *Proc Natl Acad Sci, USA*. 97:8163-8168.
62. Patriarca JE, Tate R, Fedorova E, Rocio A, Defez R & Iaccarino M (1996). *Mol Plant-Microbe Interact* 9:243-251.
63. Jørgensen JF, Christlund M, Pallisgaard N, Larssen K, Marker KA & Jensen EO (1999). *Plant Mol Biol* 40:65-77.
64. Harutyunyan EH, Safonova TN, Kuranova IP, Popov AN, Teplyakov AV, Obmolova GV, Rostakov AA, Valnshtein BK, Dodson GG, Wilson JC & Perutz MF (1995). *J Mol Biol* 251:104-115.
65. Hargrove MS, Barry JK, Brucker EA, Berry MB, Phillips GN, Olson JS, Arredondo-Peter R, Dean JM, Klucas RV & Sarah G (1997). *J Mol Biol* 267:1032-1042.
66. Arredondo-Peter R & Escamilla E (1991). *Plant Mol Biol Rep* 9:195-207.
67. Stetzkowski F, Cassoly R & Banerjee R (1979). *J Biol Chem* 254:11351-11356.
68. Kong SB, Cutler JD & Mar GLL (1983). *J Biol Chem* 258:3843-3849.
69. Mims MP, Porras AG, Olson JS, Noble RW & Peterson JA (1983). *J Biol Chem* 258:14219-14232.
70. Wittenberg JH, Wittenberg BA, Gibson QH, Trinick MJ & Appleby CA (1986). *J Biol Chem* 261:13624-13631.
71. Taylor ER, Nie XZ, MacGregor AW & Hill RD (1994). *Plant Mol Biol* 24:853-862.
72. Aréchaga-Ocampo E, Sáenz-Rivera J, Sarah G, Klucas RV & Arredondo-Peter R (2001). *Biochim Biophys Acta* 1522:1-8.
73. Anderson CR, Jensen EO, Llewellyn DJ, Dennis ES & Peacock WJ (1996). *Proc Natl Acad Sci, USA* 93:5682-5687.
74. Hendriks T, Scheer I, Quillet MC, Randonx B, Delbrel B, Vasseur J & Hilbert JL (1998). *Biochim Biophys Acta* 1443:193-197.
75. Hunt PW, Watts RA, Trevashts R, Llewellyn DJ, Burnell J, Dennis ES & Peacock WJ (2001). *Plant Mol Biol* 47:677-692.
76. Sereghyes C, Mustaruy L, Aysaydin F, Susa L, Kovács L, Endre G, Lukács N, Kovács I, Vass I, Kiss GB, Horváth GV & Dudits D (2000). *FEBS Lett* 482:125-130.
77. Arredondo-Peter R, Ramírez M, Sarah G & Klucas RV (2000). *Plant Physiol* 122:1457.
78. Lira-Ruan V, Ross E, Sarah G, Klucas RV & Arredondo-Peter R (2002). *Plant Physiol Biochem* 40:199-202.
79. Hargrove M, Brucker EA, Stec B, Sarah G, Arredondo-Peter R, Klucas RV, Olson JS & Phillips GN (2000). *Structure* 8:1005-1014.
80. Bogusz D, Llewellyn DJ, Craig S, Dennis ES, Appleby CA & Peacock WJ (1990). *Plant Cell* 2:633-641.
81. Jacobsen-Lyon K, Jensen EO, Jørgensen J, Marker KA, Peacock WJ & Dennis ES (1995). *Plant Cell* 7:213-223.
82. Duff SMG, Guy PA, Nie X, Durain DC & Hill RD (1998). *Seed Sci Res* 8:431-436.
83. Ross EJJ, Sherman L, Matheson M, Zhou J, Arredondo-Peter R, Sarah G & Klucas RV (2001). *Protoplasma* 218:125-133.
84. Sawa AW, Duff SMG, Guy PA & Hill RD (1998). *Proc Natl Acad Sci, USA* 95:10317-10321.
85. Nie X & Hill RD (1997). *Plant Physiol* 114:835-840.
86. Lira-Ruan V, Sarah G, Klucas RV & Arredondo-Peter R (2001). *Plant Sci* 161:279-287.
87. Radl SH & Maeda E (1987). *Jpn J Crop Sci* 56:73-84.
88. Fukuda H (1996). *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 47:299-325.
89. Appleby CA, Bogusz V, Dennis ES & Peacock WJ (1988). *Plant Cell Environ* 11:359-367.

90. Appleby CA (1974). In *The Biology of Nitrogen Fixation* (A Quispel, Editor), American Elsevier Publishing Co., New York, NY, pp 521-554.
91. Gardner AM, Martin LA, Gardner PR, Dou Y & Olson JS (2000). *J Biol Chem.* 275:12581-12589.
92. Gardner PR, Gardner AM, Martin LA, Dou Y, Li TS, Olson, JS, Zhu H & Riggs AF (2000). *J Biol Chem.* 275:31581-31587.
93. Wang R, Guegler K, LaBrie ST & Crawford NM (2001). *Plant Cell* 12:1491-1509.
94. Gibson QH, Wittenberg JR, Wittenberg BA, Bogusz D & Appleby CA (1989). *J Biol Chem.* 264:100-107.

Capítulo II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.

El estudio de las Hbns se inició hace casi 20 años, cuando se describieron las Hbns de *Parasponia andersonii* y *Trema tomentosa* (Appleby et al., 1983; Bogusz et al., 1988). Desde entonces, se han obtenido evidencias que indican que las Hbns están presentes en todas las plantas terrestres, desde las briofitas hasta las plantas superiores (Arredondo-Peter et al., 2000; Watts et al., 2001). Actualmente, se conocen las características bioquímicas, estructurales y moleculares de las Hbns de diferentes especies de plantas monocotiledóneas, como las Hbns de la cebada (Taylor et al., 1994; Duff et al., 1997), el arroz (Arredondo-Peter et al., 1997a; Hargrove et al., 2000), y el maíz y teosinte (Aréchaga-Ocampo et al., 2001), y de plantas dicotiledóneas, como la soya (Andersson et al., 1996) y *Arabidopsis thaliana* (Trevaskis et al., 1997; Hunt et al., 2001). Los genes *hbns* se expresan diferencialmente en los órganos de plantas que crecen en condiciones normales (Taylor et al., 1994; Arredondo-Peter et al., 1997a), y se sobreexpresan cuando la planta se encuentra en condiciones de estrés (Taylor et al., 1994; Trevaskis et al., 1997). El análisis de las constantes cinéticas de HbI recombinante del arroz (Arredondo-Peter et al., 1997a) y Hb de la cebada (Duff et al., 1997) mostró que estas proteínas tienen una afinidad muy elevada por el O₂, debido a que la constante de disociación (k_{off}) es extraordinariamente baja, por lo cual resulta poco probable que las Hbns funcionen como transportadores de O₂ (Arredondo-Peter et al., 1997a, 1998). Por otro lado, se ha reportado que las Hbns de diversos organismos desempeñan funciones que son alternativas al transporte del O₂, tal como transportar CO, NO y moléculas orgánicas pequeñas, así como llevar a cabo actividades pseudoenzimáticas (Wittenberg y Wittenberg, 1990; Weber y Vinogradov, 2001). Estas evidencias sugieren que en las células vegetales las Hbns podrían desempeñar funciones que son adicionales al transporte de O₂. Sin embargo, la(s) función(es) de las Hbns todavía se desconoce(n).

Las Hbns del arroz se han estudiado con detalle. El análisis por "Southern blot" mostró que en

esta planta existen al menos tres copias de los genes *hbns*, de las cuales *hbns1* y *hbns2* se expresan diferencialmente en las hojas y las raíces de plantas maduras (Arredondo-Peter et al., 1997a). Además, el análisis cinético de HbI recombinante del arroz mostró que esta proteína tiene una afinidad muy alta por el O₂, lo cual sugiere que HbI se encuentra oxigenada aún en condiciones de microaerobiosis (Arredondo-Peter et al., 1997a, 1998). El estudio de la regulación de los genes *hbns* y la síntesis de las Hbns en los órganos de la planta aportará información importante para entender la función de las Hbns. Para este fin, el arroz (*Oryza sativa*) resulta un modelo adecuado debido a que las Hbns de esta planta se han estudiado con detalle, y además a que el arroz es un cultivo que está adaptado a diferentes condiciones de crecimiento, que incluyen a los suelos inundados, lo que da lugar a estrés por microaerobiosis.

El análisis de la síntesis de las Hbns durante el desarrollo de la planta es de gran utilidad para comprender el ambiente en donde las Hbns llevan a cabo su(s) función(es). Este análisis permite relacionar la expresión de los genes *hbns* con las condiciones fisiológicas del tejido y la etapa de desarrollo de la planta. Por lo tanto, los objetivos de esta tesis fueron:

- Analizar la síntesis de Hbns en los órganos embrionarios y vegetativos de plantas de arroz cuando crecen en condiciones normales.
- Analizar la síntesis de Hbns en los órganos embrionarios y vegetativos de plantas de arroz cuando crecen en condiciones de estrés.
- Identificar y analizar los promotores de los genes *hbns* del arroz.

Capítulo IIIa. RESULTADOS.

ANÁLISIS DE LA SÍNTESIS DE LAS Hbns EN EL ARROZ.

Artículo :

V. Lira-Ruan, G. Sarath, R.V. Klucas and R. Arredondo-Peter. 2001 .

SYNTHESIS OF HEMOGLOBINS IN RICE (*Oryza sativa* var. Jackson) PLANTS

GROWING IN NORMAL AND STRESS CONDITIONS.

Plant Sci. 161:279-287.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Synthesis of hemoglobins in rice (*Oryza sativa* var. Jackson) plants growing in normal and stress conditions

Verónica Lira-Ruan^a, Gautam Sarath^b, Robert V. Klucas^b, Raúl Arredondo-Peter^{a,*}

^a Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 565-A, 62210 Cuernavaca, Morelos, México

^b Department of Biochemistry, The George W. Beadle Center, University of Nebraska-Lincoln, Lincoln NE 68588-0664, USA

Received 14 December 2000; received in revised form 5 March 2001; accepted 12 March 2001

Abstract

In rice (*Oryza sativa* var. Jackson) at least three copies of hemoglobin (*hb*) gene exist. Rice *hb1* and *hb2* genes are differentially expressed in roots and leaves from mature plants. We used polyclonal antibodies raised to recombinant rice Hb1 and Western blotting to analyze the synthesis of Hbs in rice plants growing under normal or stress conditions. Results showed that rice Hbs are synthesized in coleoptiles, seminal roots and embryos from seeds germinated for 6 days, and also in leaves and roots from plants 2–14 weeks after germination. Analysis of Hb synthesis in stressed rice showed that: (i) level of Hbs was higher in etiolated than control plants, (ii) level of Hbs increased in roots from flooded rice, and (iii) level of Hbs did not change under oxidative (H_2O_2), nitrosative (SNP) and hormonal (2,4-D) stresses. These results suggest that the effect of light withdrawal in etiolated leaves and O_2 -limiting conditions in flooded roots, but not oxidative, nitrosative and hormonal stresses, modulate the synthesis of rice Hbs. © 2001 Elsevier Science Ireland Ltd. All rights reserved.

Keywords: Function; Hemoglobin; Non-symbiotic; *Oryza*; Stress; Synthesis

1. Introduction

Hemoglobins (Hbs) are heme proteins that reversibly bind O_2 and other gaseous ligands. Hbs are widely distributed in organisms as they have been detected in bacteria, protozoans, fungi, plants and animals [1,2]. In plants two types of Hbs exist: non-symbiotic (type I) and symbiotic (type II) Hbs [3–5]. Symbiotic Hbs are specifically synthesized in the root nodules of nitrogen-fixing plants, and they function to facilitate the diffusion of O_2 to the respiring bacteroids [6,7]. Non-symbi-

otic Hbs are widely distributed in land plants, and have been found in non-vascular [8] and vascular [5] plants. The function of non-symbiotic Hbs is not known.

Non-symbiotic Hbs have been detected in organs of a number of dicot plants. For example, in soybean at least two copies of the non-symbiotic *hb* gene exist, which are regulated independently from the symbiotic soybean *hb* genes [9]. Transcripts of non-symbiotic Hbs were detected in cotyledons, root nodules, roots, stems and leaves of mature soybean plants. In *Arabidopsis thaliana* two *hb* genes exist, *ahb1* and *ahb2*, which are expressed in rosettes and roots of plants growing in normal conditions. *Arabidopsis ahb1* and *ahb2* overexpress when the plants grow under stress conditions, such as microaerobiosis or low temperatures [3]. In monocots, non-symbiotic *hb* genes have been cloned and analyzed from barley and rice. In barley, a single copy of the non-symbiotic

Abbreviations BCP, bromo-chloro-indolyl phosphate; BSA, bovine serum albumin; 2,4-D, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid; Hb, hemoglobin; LDH, lactate dehydrogenase; NBT, nitroblue tetrazolium; NO, nitric oxide; PMSF, phenylmethylsulfonyl fluoride; SDS-PAGE, denaturing polyacrylamide gel electrophoresis; SNP, sodium nitroprusside

* Corresponding author. Tel.: +52-7-3291814; fax: +52-7-317-5581

E-mail address: ra@ciqa.unam.mx (R. Arredondo-Peter).

hb gene exists, which is expressed in barley seeds and roots, but overexpresses when the plants grow either under microaerobiosis [10] or when the synthesis of ATP is blocked [11].

In rice at least three copies of the *hb* gene exist. Rice *hb1* and *hb2* genes are differentially expressed in rice organs, as Hb1 and Hb2 transcripts were detected in leaves and only Hb1 transcripts were detected in roots of mature (6 weeks old) plants. This suggested that rice *hb1* and *hb2* genes are regulated by different promoters [12]. A rice Hb1 has been generated in *Escherichia coli* and the recombinant protein was kinetically characterized [12]. Results showed that recombinant rice Hb1 has a very high affinity for O₂ because of an extremely low dissociation constant (k_{d,O_2}), which suggested that rice Hb1 remains oxygenated even at low concentrations of O₂. Thus, based on the gene expression pattern in plant organs and biochemical properties of recombinant rice Hb1 [12] and other non-symbiotic Hbs [3,13] it was proposed that the function of non-symbiotic Hbs is

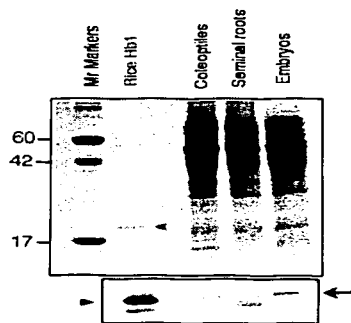


Fig. 1. Synthesis of Hbs in rice seeds germinated for 6 days in normal conditions. Upper panel: electrophoretic separation of proteins in a 15% (w/v) SDS-PAGE gel. The gel was stained with Coomassie blue. A 40 µg aliquot of total soluble proteins and 2 µg of Hb1 were loaded in sample and control (Hb1) lanes, respectively. Molecular weight markers were BSA (60 kDa), horseradish peroxidase (42 kDa) and sperm whale myoglobin (17 kDa). Molecular weights are shown in kDa. Lower panel: detection of Hbs (arrow) by Western blot using the anti-rice Hb1 antibodies. Arrowheads show the recombinant control Hb1.

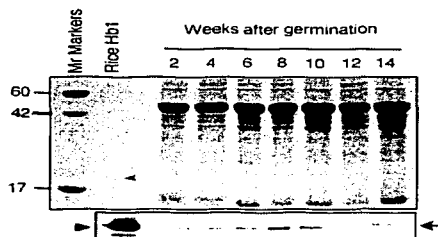


Fig. 2. Synthesis of Hbs during development of rice leaves from plants growing in normal conditions. Upper panel: electrophoretic separation of proteins in a 15% (w/v) SDS-PAGE gel. The gel was stained with Coomassie blue. A 40 µg aliquot of total soluble proteins and 2 µg of Hb1 were loaded in sample and control (Hb1) lanes, respectively. Molecular weight markers were BSA (60 kDa), horseradish peroxidase (42 kDa) and sperm whale myoglobin (17 kDa). Molecular weights are shown in kDa. Lower panel: detection of Hbs (arrow) by Western blot using the anti-rice Hb1 antibodies. Arrowheads show the recombinant control Hb1.

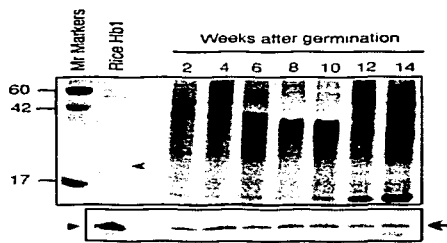


Fig. 3. Synthesis of Hbs during development of rice roots from plants growing in normal conditions. Upper panel: electrophoretic separation of proteins in a 15% (w/v) SDS-PAGE gel. The gel was stained with Coomassie blue. A 40 µg aliquot of total soluble proteins and 2 µg of Hb1 were loaded in sample and control (Hb1) lanes, respectively. Molecular weight markers were BSA (60 kDa), horseradish peroxidase (42 kDa) and sperm whale myoglobin (17 kDa). Molecular weights are shown in kDa. Lower panel: detection of Hbs (arrow) by Western blot using the anti-rice Hb1 antibodies. Arrowheads show the recombinant control Hb1.

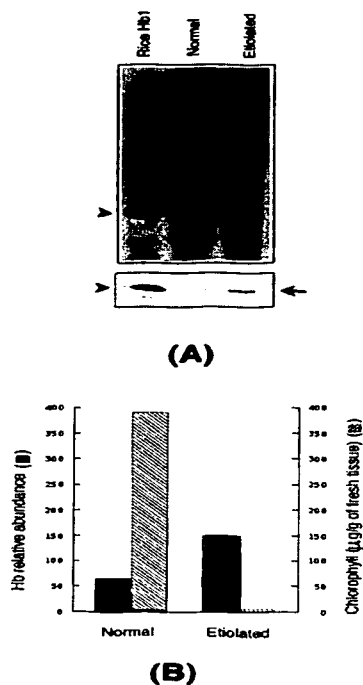


Fig. 4. Synthesis of Hbs in etiolated rice. (A) Upper panel, electrophoretic separation of proteins in a 15% (w/v) SDS-PAGE gel. The gel was stained with Coomassie blue. A 40 μ g aliquot of total soluble proteins and 2 μ g of Hb1 were loaded in sample and control (Hb1) lanes, respectively. Lower panel, detection of Hbs (arrow) by Western blot using the anti-rice Hb1 antibodies. Arrowheads show the recombinant control Hb1 (Hb) histogram that shows the relative abundance of Hbs in normal and etiolated leaves, and was constructed from the densitometric analysis of the membrane strip shown in (A). Chlorophyll was quantitated as an estimation of the extent of light exposure. Data presented are representative of three replicates.

other than the transport of O_2 , i.e. they may play specialized rather than general roles depending on the tissues, developmental stage or plant growth conditions [4,5].

Recently, Ross et al. (submitted) used confocal microscopy to immunolocalize rice non-symbiotic Hbs. Results from these authors showed that Hbs are synthesized in specific tissues, such as the root cap, seed aleurone and scutellum, leaf sclerenchyma sheath and differentiating xylem, and suggested that Hbs may play specific roles in rice tissues. In this work we have analyzed the synthesis of Hbs in rice embryonic and vegetative organs, during plant development and in plants grown under stress conditions using anti-rice Hb1 antibodies and Western blotting.

2. Materials and methods

2.1. Plant growth

Rice (*Oryza sativa* var. Jackson) seeds were germinated for 6 days on paper towels imbibed with water. Germinated seeds were planted in pots containing a 1:1 mixture of soil:vermiculite. Plants were grown in a greenhouse at 27°C, and were watered with tap water every day and with a nutrient solution [14] every 3rd day. Unless indicated otherwise, plants were grown for 14 weeks and leaves and roots were collected at 2-week intervals. For detection of Hbs in embryonic organs, coleoptiles, seminal roots and embryos were collected from seeds germinated for 6 days. Plant organs were washed with tap water, collected in liquid N_2 and stored at $-80^\circ C$ until used.

2.2. Isolation of total soluble proteins from plant organs

Total soluble proteins were obtained by grinding 1 g of rice organs in 1 ml of the extraction buffer [20 mM Tris-HCl (pH 8)/1 mM PMSF]. The resulting solution was cleared by centrifugation at $15000 \times g$ for 30 min. Concentration of soluble proteins was quantitated by a dye binding assay (Protein Dye Reagent, Sigma) using BSA as a standard.

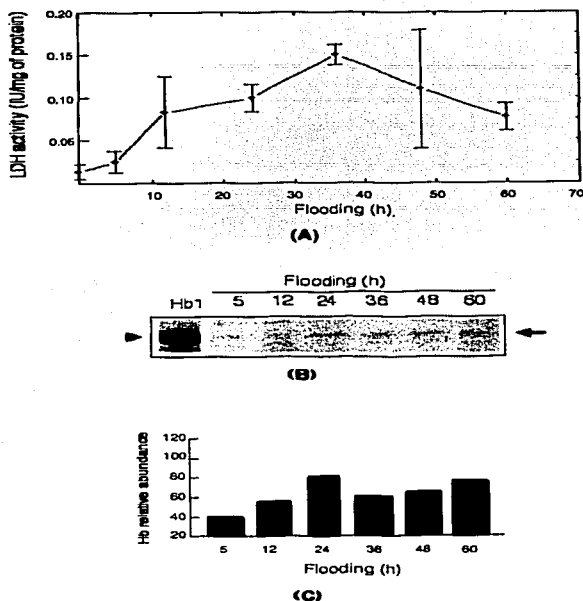


Fig. 5. Synthesis of Hb1 in flooded rice. (A) LDH activity in roots flooded for 5–60 h. Mean values were calculated from determinations performed by triplicate. (B) Detection of Hb1 (arrow) by Western blot using the anti-rice Hb1 antibodies. Aliquots (10 μ g) of total soluble proteins were electrophoresed on SDS-PAGE gel and Western blotted. Arrowhead shows the recombinant control Hb1. (C) Histogram that shows the relative abundance of Hb1 in flooded roots, and was constructed from the densitometric analysis of the membrane strip shown in (B). Data presented in (B) and (C) are representative of two replicates.

2.3. Purification of recombinant rice Hb1 and generation of anti-rice Hb1 antibodies

Recombinant rice Hb1 was purified from 25 g of recombinant *E. coli* pEMBL18⁺ rHb1 cells [12] using standard protocols [15]. Briefly, recombinant cells were broken by sonication and then incubated with lysozyme overnight at 4°C with gentle agitation. The resulting solution was cleared by centrifugation at 20000 \times g for 30 min, and the supernatant was fractionated with solid ammo-

nium sulphate between 50 and 90% (w/v) saturation. Fractionated proteins were chromatographed over a Phenyl Sepharose (Pharmacia Amersham) and DEAE Cellulose (DE52, Whatman) resins. Fractions containing rice Hb1 were spectroscopically detected at 410 nm [16], concentrated by ultrafiltration using Amicon concentrators (Amicon), and Hb1 was purified to homogeneity by using a Mono-Q resin on a BioCad Workstation (Applied Biosystems). The concentration of Hb1 was quantitated on the heme basis using the pyri-

dine-hemochrome method [17]. Purification of Hb1 was verified by SDS-PAGE [18]. Pure recombinant rice Hb1 was used to generate polyclonal anti-rice Hb1 antibodies in rabbits at the Monoclonal Antibody Facility of the University of Nebraska-Lincoln, USA.

2.4. Detection of Hbs in organs from rice plants growing in normal conditions

Western blot analysis was performed following standard protocols [19]. Briefly, duplicate samples consisting of 40 µg of total proteins isolated from plant organs (10 µg for flooded roots) were electrophoresed in two 15% (w/v) SDS-PAGE gels. After electrophoresis one gel was stained with Coomassie blue to visualize proteins and a second gel was used to transfer proteins to a nitrocellulose membrane (Hybond C' extra, Amersham). As positive control 2 µg (on heme basis) of recombinant rice Hb1 was used. Proteins were transferred to membranes using an electroblotting apparatus

(Bio-Rad) and transfer buffer [25 mM Tris-HCl (pH 8)/200 mM glycine/20% (v/v) methanol] at 4°C overnight. Hbs were detected in membranes using a 1:5000 dilution of the anti-rice Hb1 antibodies, and a 1:3000 dilution of the secondary anti-IgG-alkaline phosphatase conjugate (Boehringer-Roche). Signals were detected in membranes using the chromogenic mix NBT/BCIP (Boehringer-Roche). Relative abundance of Hbs in plant organs was calculated using the NIH Image 1.6.1 program (<http://rsb.info.nih.gov/ni-image>).

2.5. Detection of Hbs in organs from rice plants growing under stress conditions

2.5.1. Etiolated rice

Etiolated plants were obtained from rice seedlings grown at 24°C for 2 weeks in darkness. Etiolated leaves were collected in liquid N₂ and stored at -80°C until used. Soluble protein extracts were obtained, quantitated and Western

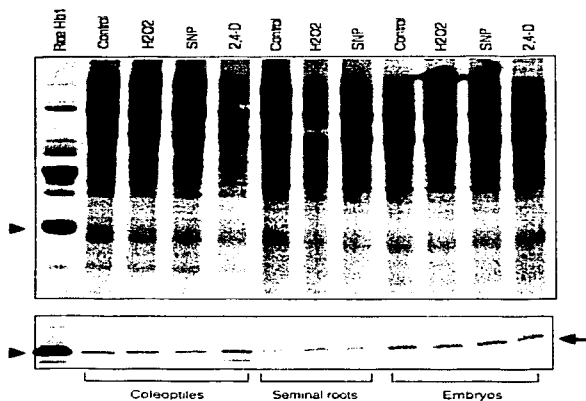


Fig. 6. Synthesis of Hbs in embryonic organs from rice seeds germinated under oxidative (H₂O₂), intrusive (SNP) and hormonal (2,4-D) stresses. Upper panel: prominent gel electrophoresis in a 15% (w/v) SDS-PAGE gel of a 40 µg aliquot of total soluble proteins and 2 µg of Hb1. Lower panel: detection of Hbs (arrow) by Western blot using the anti-rice Hb1 antibodies. Arrowheads show the recombinant control Hb1. Data for seminal roots from seedlings treated with 2,4-D was not reported as no seminal roots developed in seedlings stressed with 2,4-D. Data presented are representative of three replicates.

blotted as described above, using leaves from plants grown in normal conditions (light/dark periods of 12/12 h) as controls. To estimate the extent of light exposure, chlorophyll was extracted from etiolated and control leaves with 80% (v/v) acetone and quantitated using the chlorophyll $E_{682} = 27.7 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [20]. Estimations were performed by triplicate.

2.5.2. Flooded rice

Rice seeds were germinated and grown for 4 weeks as described above. Pots with plants were transferred to large containers and then flooded for 60 h with tap water. Roots from flooded plants were collected at different times and soluble protein extracts were obtained for Western blotting and determination of enzyme activity. LDH activity was determined as described by Hanson and Jacobsen [21]: 133 μl of protein extracts were mixed with 330 μl of 0.5 M Tris-HCl (pH 8), 133 μg of NADH (Sigma) and 30 μmol Na pyruvate (Sigma) in a final volume of 1 ml. Samples were incubated for 10 min at room temperature and LDH activity was quantitated by following the oxidation of NADH, using the NADH $E_{340} = 6.3 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [21]. Determinations were performed in triplicate.

2.5.3. Oxidative, nitrosative and hormonal stresses

Rice seeds were imbibed in water for 1 h with vigorous agitation, and then transferred to Petri dishes containing filter paper imbibed with stress-inducing solutions. For oxidative, nitrosative and hormonal stresses, rice seeds were germinated in 10 mM H_2O_2 [22], 100 μM SNP [23] and 2.3 μM 2,4-D [24], respectively. Control seeds were germinated in filter paper imbibed with distilled water. Seeds were germinated for 7 days, and solutions were renewed every day. Coleoptiles, seminal roots and embryos from plant seedlings that were actively growing were collected in liquid N_2 and stored at -80°C until used. Soluble proteins from embryonic organs were isolated and Hb levels were estimated by Western blot using anti-rice Hb1 antibodies and the NIH Image 1.6.1 program as described above.

To verify that the stress solutions had affected germinating seeds, lots of 20 seeds were germinated in the above stress solutions for 7 days and lengths of coleoptiles and seminal roots were measured and compared with lengths in control

seedlings (germinated in water). Total peroxidase activity was evaluated in extracts from embryonic organs of seedlings germinated in 10 mM H_2O_2 by following the oxidation of guaiacol [25]. Reaction mixtures (1 ml) contained 1 μl of protein extract, 12 mM H_2O_2 and 7.2 mM guaiacol (Sigma) in 50 mM Na phosphate buffer (pH 5.8). Samples were incubated at room temperature for 1 min, and the activity was calculated in triplicate using $E_{470} = 26.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ for tetraguaiacol [25,26].

3. Results and discussion

3.1. Analysis of Hb synthesis in rice embryonic and vegetative organs

In rice at least three copies of the *hb* gene exist, of which *hb1* and *hb2* are expressed differentially in roots and leaves of mature plants [12]. However, not much is known about the synthesis of Hbs during development of plant organs. In this work we used Western blotting and polyclonal anti-rice Hb1 antibodies to analyze the synthesis of Hbs in embryonic and vegetative organs and during development of rice plants growing in normal or stress conditions. Ross et al. (submitted) showed that the anti-rice Hb1 antibodies react equally to recombinant Hb1 and Hb2 and thus can be used to detect total Hb levels in tissues or tissue extracts.

To analyze levels of Hbs in rice organs, extracts containing equal amounts of total soluble proteins were separated by SDS-PAGE. Signals corresponding to proteins that co-migrated with the control recombinant rice Hb1 were detected in rice organs by Western blot (lower panels in Figs. 1–3). Few weak signals corresponding to non-specific interaction between anti-rice Hb1 antibodies and abundant proteins of large molecular weight ($> 60 \text{ KDa}$) were only observed in overexposed membranes, indicating that the reaction of anti-rice Hb1 antibodies with Hbs from rice organs was highly specific.

Hbs were detected in embryonic organs from seeds germinated for 6 days (Fig. 1). Qualitatively, the abundance of Hbs varied among embryonic organs as shown by higher levels of Hbs in embryos than in coleoptiles and seminal roots. In addition to Hb signals, signals corresponding to lower molecular weight peptides that migrated be-

low the Hbs were detected in seminal roots and embryos. It is likely that these peptides resulted from proteolytic degradation of Hbs in seminal root and embryo extracts.

Rice variety Jackson flowers approximately 16 weeks after germination [27]. To analyze the synthesis of Hbs in rice vegetative organs, rice leaves and roots were collected every 2 weeks for 14 weeks, and protein extracts were processed by Western blotting. The results showed that Hbs are synthesized in rice leaves and roots from 2 to 14 weeks after germination (Figs. 2 and 3). In rice leaves, the highest level of Hbs occurred in plants 8 weeks after germination (Fig. 2). In rice roots, the level of Hbs was approximately the same in plants of different ages (Fig. 3).

These results showed that Hbs are synthesized in different rice organs and during plant development. Although the function of non-symbiotic Hbs is not known, the expression pattern of *hb* genes and biochemical properties of recombinant non-symbiotic Hbs suggest that this group of proteins have functions other than transport of O_2 [4,5]. It has been postulated that the synthesis of Hbs is modulated by the metabolic status of plant tissues [7,9,11]. Rice Hbs are primarily detected in differentiating tissues (Ross et al., submitted), thus it is possible that Hbs have tissue-specific functions which are related to metabolism or metabolic status of a particular organ.

3.2. Analysis of Hb synthesis in rice plants growing under stress conditions

Expression of non-symbiotic *hb* genes is up-regulated in plants growing under stress conditions [3,10,11], which suggests that non-symbiotic Hbs function in the plant response to stress. Our results presented so far and those from Ross et al. (submitted) suggest that rice Hbs have specific functions during normal (non-stressed) plant development. To learn more about the regulation of rice *hb* genes, we decided to evaluate the effect of stress conditions in the synthesis of rice Hbs.

The effect of shutting down photosynthesis on the levels of Hbs was evaluated in etiolated plants. Fig. 4 shows that levels of Hbs increased 2.4-fold in etiolated leaves compared to control plants grown under a normal light/dark regimen, showing that the synthesis of Hbs is up-regulated as the extent of light exposure (evaluated by the content

of chlorophyll) decreased (Fig. 4B). The effect of withdrawing light from a plant is a decrease in chemical energy (ATP) and reducing power (NADH), which reduces levels of carbon fixation. The increase of Hb levels in etiolated rice is consistent with earlier reports that suggest that non-symbiotic Hbs maintain the energy status of plant cells [28].

Taylor et al. [10] and Trevaskis et al. [3] showed that *hb* genes overexpress in barley and *Arabidopsis* growing in microaerobic conditions, such as flooding. Rice is a flooding-resistant crop and an interesting model to analyze the effect of microaerobiosis in the synthesis of Hbs. In this work, the effect of O_2 -limiting conditions in the synthesis of Hbs was evaluated in flooded rice. Glycolysis (evaluated by LDH activity [29]) increased in rice roots with flooding time (Fig. 5A), indicating that the plant roots were becoming microaerobic. Under these conditions levels of Hbs increased in roots from flooded plants (Fig. 5B and C), indicating that the synthesis of rice Hbs increases under O_2 -limiting conditions. These observations are consistent with earlier reports on the effect of microaerobiosis on the expression of *hb* genes in other monocot [10] and dicot [3] species.

We also analyzed the effect of oxidative (H_2O_2), nitrosative (SNP) and hormonal (2,4-D) stresses on the synthesis of Hbs during rice seed germination. After 6 days of germination coleoptiles of seedlings from H_2O_2 , SNP and 2,4-D treatments were 78, 134 and 90% longer than those of control seedlings germinated in water. Seminal roots were 30% longer and 18% shorter than controls in seedlings treated with SNP and H_2O_2 , respectively, and no seminal roots developed in seedlings treated with 2,4-D. Moreover, total peroxidase activity in embryos from seedlings treated with H_2O_2 was 40% higher than controls. These observations indicated that the above treatments stressed germinating seeds, but did not cause seedling death. However, Western blot analysis of protein extracts showed that Hb levels did not change between control and stressed seedlings (Fig. 6). These observations suggest that, under the conditions tested in this work, rice Hb levels are apparently not influenced by oxidative, nitrosative and hormonal stresses.

Results from this work suggest that rice Hbs are important for the development of normal rice tissues. Under conditions of imposed stress, in-



creased Hb synthesis in rice does not appear to be part of a generalized stress response, but may be confined to tissues stressed for chemical and reductive energy (etiolation) and for oxygen limitation (flooding). Hypoxia has been documented to enhance Hb synthesis in other plants. Thus, our results also suggest that rice Hb promoters may be responding differentially to stress-related signalling cascades in the plant.

Acknowledgements

Authors wish to express their gratitude to Dr H. E. Bockelman (US Department of Agriculture–Agricultural Research Service) for supplying the rice seeds. To two anonymous reviewers for useful suggestions. This work was partially funded by DGAPA-PAPIIT/UNAM (project number IN202399) and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (project no. 25229-N), México. V.L.R. was supported by a graduate fellowship from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México (reg. no. 143896).

References

- [1] A.F. Riggs, Aspects of the origin and evolution of non-vertebrate hemoglobins, *Am. Zool.* 31 (1991) 535–545.
- [2] S.N. Vinogradov, D.A. Waltz, B. Pohajdak, L. Moens, O.H. Kapp, T. Suzuki, C.N.A. Trotman, Adventitious variability? The amino acid sequences of nonvertebrate globins, *Comp. Biochem. Physiol.* 106B (1993) 1–26.
- [3] B. Trevisan, R.A. Watts, S.R. Andersson, D.J. Llewellyn, M.S. Hargrove, J.S. Olson, E.S. Dennis, W.J. Peacock, wo hemoglobin genes in *Arabidopsis thaliana*: the evolutionary origins of leghemoglobins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94 (1997) 12230–12234.
- [4] R.D. Hill, What are hemoglobins doing in plants?, *Can. J. Microbiol.* 76 (1998) 707–712.
- [5] R. Arredondo-Peter, M.S. Hargrove, J.F. Moran, G. Sarath, R.V. Klucas, Plant hemoglobins, *Plant Physiol.* 118 (1998) 1121–1126.
- [6] C.A. Appleby, Leghemoglobin and *Rhizobium* respiration, *Annu. Rev. Plant Physiol.* 35 (1984) 443–478.
- [7] C.A. Appleby, The origin and functions of haemoglobin in plants, *Sci. Progress* 76 (1992) 365–398.
- [8] R. Arredondo-Peter, M. Ramirez, G. Sarath, R.V. Klucas, Sequence analysis of an ancient hemoglobin cDNA isolated from the moss *Physcomitrella patens* (Accession No. AF218049), *Plant Physiol.* 122 (2000) 1457.
- [9] C.R. Andersson, E.O. Jensen, D.J. Llewellyn, E.S. Dennis, W.J. Peacock, A new hemoglobin gene from soybean: a role for hemoglobin in all plants, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93 (1996) 5682–5687.
- [10] E.R. Taylor, X.Z. Nie, A.W. MacGregor, R.D. Hill, A cereal haemoglobin gene is expressed in seed and root tissues under anaerobic conditions, *Plant Mol. Biol.* 24 (1994) 853–862.
- [11] X. Nie, R.D. Hill, Mitochondrial respiration and hemoglobin gene expression in barley aleurone tissue, *Plant Physiol.* 114 (1997) 835–840.
- [12] R. Arredondo-Peter, M.S. Hargrove, G. Sarath, J.F. Moran, J. Lohrman, J.S. Olson, R.V. Klucas, Rice hemoglobins: gene cloning, analysis and oxygen-binding kinetics of a recombinant protein synthesized in *Escherichia coli*, *Plant Physiol.* 115 (1997) 1259–1266.
- [13] S.M.G. Duff, J.B. Wittenberg, R.D. Hill, Expression, purification and properties of recombinant barley (*Hordeum* sp.) hemoglobin: optical spectra and reactions with gaseous ligands, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 16746–16752.
- [14] M. Becana, M.L. Sahn, L. Ji, R.V. Klucas, Flavin-mediated reduction of ferric leghemoglobin from soybean nodules, *Planta* 183 (1991) 575–583.
- [15] R. Arredondo-Peter, J.F. Moran, G. Sarath, P. Luan, R.V. Klucas, Molecular cloning of the cowpea (*Vigna unguiculata*) leghemoglobin II gene and expression of its cDNA in *Escherichia coli*: purification and characterization of the recombinant protein, *Plant Physiol.* 114 (1997) 493–500.
- [16] A.I. Fleming, J.B. Wittenberg, B.A. Wittenberg, W.F. Dudman, C.A. Appleby, The purification, characterization and ligand-binding kinetics of hemoglobin from root nodules of the non-leguminous *Casuarina glauca*–*Frankia* symbiosis, *Biochim. Biophys. Acta* 911 (1987) 209–220.
- [17] C.A. Appleby, F.J. Bergersen, Preparation and experimental use of leghemoglobin, In: F.J. Bergersen (Ed.), *Methods for evaluating biological nitrogen fixation*, Wiley, Chichester, 1980, pp. 315–335.
- [18] U.K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227 (1970) 680–685.
- [19] G. Sarath, F.W. Wagner, Immunological detection of nitrogenase, in: H.F. Linnsens, J.F. Jackson (Eds.), *Modern Methods of Plant Analysis*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 1989, pp. 227–239.
- [20] M.V. Beligni, L. Lamattina, Nitric oxide protects against cellular damage produced by methylviologen herbicides in potato plants, *Nitric Oxide: Biol. Chem.* 3 (1999) 199–208.
- [21] A.D. Hanson, J.V. Jacobsen, Control of lactate dehydrogenase, lactate glycolysis, and α -amylase by O₂ deficit in barley aleurone layers, *Plant Physiol.* 75 (1984) 566–572.
- [22] Y. Hu, P.D. Butcher, J.A. Mangan, M.A. Rajandream, A.R. Coates, Regulation of *hmp* gene transcription in *Mycobacterium tuberculosis*: effects of oxygen limitation and nitrosative and oxidative stress, *J. Bacteriol.* 181 (1999) 3486–3493.
- [23] M.V. Beligni, L. Lamattina, Nitric oxide stimulates seed germination and de-etiolation, and inhibits elongation, three light-inducible responses in plants, *Planta* 210 (2000) 215–221.
- [24] R.W. Rudge, K.M. Ride, B.G. Rolfe, Nodule-like structures induced on the roots of rice seedlings by addition of the synthetic auxin 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, *Aust. J. Plant Physiol.* 20 (1993) 705–717.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- [25] W.C. Fang, C.H. Kao, Enhanced peroxidase activity in rice leaves in response to excess iron, copper and zinc, *Plant Sci.* 158 (2000) 71–76.
- [26] D.R. Doerge, R.L. Day, M.I. Churchwell, Identification of the colored guineaol oxidation product produced by peroxidases, *Anal. Biochem.* 250 (1997) 10–17.
- [27] D.G. Kanter, T.C. Miller, Rice, variety trials, Mississippi State University, 1996, pp. 14.
- [28] A.W. Sowa, S.M.G. Duff, P.A. Guy, R.D. Hill, Altering hemoglobin levels changes energy status in maize cells under hypoxia, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 (1998) 10317–10321.
- [29] M.M. Sachs, M. Freeling, R. Okimoto, The anaerobic proteins of maize, *Cell* 20 (1980) 761–767.

Capítulo IIIb. RESULTADOS.

**IDENTIFICACIÓN Y ANÁLISIS DE UNA FAMILIA DE GENES *hbns*
EN EL ARROZ.**

Artículo :

**V. Lira-Ruan, E.J.H. Ross, G. Sarath, R.V. Klucas and
R. Arredondo-Peter. 2002.**

**MAPPING AND ANALYSIS OF A HEMOGLOBIN GENE FAMILY FROM
Oryza sativa.**

***Plant Physiol. Biochem.* 40: 199-202.**

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Mapping and analysis of a hemoglobin gene family from *Oryza sativa*

Verónica Lira-Ruan ^{a,b} Emily J.H. Ross ^c Gautam Sarath ^c Robert V. Klucas ^c
Raúl Arredondo-Peter ^{a,*}

^aFacultad de Ciencias, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Avenida Universidad 1001, Colonia Chamilpa, 62210 Cuernavaca, Morelos, México

^bCentro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 565-A, 62210 Cuernavaca, Morelos, México

^cDepartment of Biochemistry, The George W. Beadle Center, University of Nebraska-Lincoln, Lincoln, NE 68588-0664, USA

Received 22 May 2001; accepted 18 November 2001

Abstract

A hemoglobin (*hb*) gene family was identified in rice, consisting of four functional *hb* copies located in BAC inserts OSM11719 and OSM11676, which contain the gene clusters *hb1/hb3/hb4* and *hb2*, respectively. Sequence comparison with databases revealed that a number of potential promoters exist upstream from the *hb* genes suggesting that these genes are differentially expressed in rice. © 2002 Éditions scientifiques et médicales Elsevier SAS. All rights reserved.

Keywords: Function; Gene family; Hemoglobin; *Oryza*; Promoters

1. Introduction

Non-symbiotic hemoglobins (Hbs) are widespread proteins that have been detected in organs of lower [5] and higher [3] plants. Genes coding for non-symbiotic Hbs are expressed in diverse plant organs, however the function of non-symbiotic Hbs is still not known [3]. The biochemical properties and gene expression patterns suggest that non-symbiotic Hbs play a number of roles besides transport of O₂, such as sensing or scavenging of O₂ [2,3,7].

In monocots, non-symbiotic Hbs have been studied in detail from barley (*Hordeum vulgare*) and rice (*Oryza sativa*). In barley, presumably a single copy of the *hb* gene exists which is expressed in seed and root tissues, and is over expressed when the plants are grown under microaerobiosis [11] or when ATP synthesis is blocked [9]. In rice at least three copies of the *hb* gene were expected to be present, of these *hb1* and *hb2* are functional genes that are differentially expressed in plant roots and leaves, suggesting

that rice *hb1* and *hb2* are regulated by different promoters [4]. Using anti-rice Hb1 antibodies and confocal microscopy and western blotting, Ross et al. [10] and Lira-Ruan et al. [8] showed that Hb proteins are synthesized in specialized tissues of rice seeds, roots and leaves, and that carbon-stress and microaerobiosis up-regulate the synthesis of Hbs in rice leaves and roots, respectively.

Analysis of recombinant rice Hb1 [4] showed that this protein has a very high affinity for O₂, because the dissociation constant (k_{on}) is extraordinarily low. Analysis of mutant (H77L) rice Hb1 indicated that the distal histidine is a sixth ligand to Fe and stabilizes bound O₂, resulting in an extremely low k_{on} for O₂ [4]. Thus, the biochemical properties of rice Hb1 suggest that the function of this protein in plant organs is other than transport of O₂.

A major goal in the study of non-symbiotic Hbs is to elucidate their function(s) in plant tissues. Although much is known about the biochemical properties of recombinant rice non-symbiotic Hb1, little is known about the structure and regulation of *hb* genes in rice. This information is crucial to clarify the function of non-symbiotic Hbs in plants. In this work we report the detection of a rice *hb* gene family, organization of *hb* genes in the rice genome and identification of *hb* gene promoters.

Abbreviations: BAC, bacterial artificial chromosome; bp, base pair; Hb, hemoglobin; Kb, kilobase pair

* Corresponding author. Fax: +52 777-329-7040.

E-mail address: ra@cihu.unam.mx (R. Arredondo-Peter).

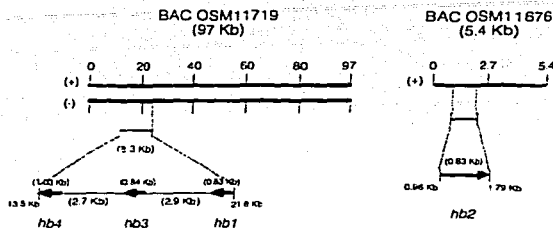


Fig. 1. Map of the rice *hb* gene family. BACs correspond to inserts from the rice genome database (<http://www.rice-research.org>). Arrows show the translation orientation of *hb* genes. Sequences represented in this figure are deposited in the Genbank database under the accession numbers AF335504 and AF335503 for the *hb1/hb3/hb4* cluster and *hb2* plus 5' and 3' non-coding sequences, respectively. Map drawn not to scale.

2. Results and discussion

Previous analysis by Southern blotting showed that at least three copies of the *hb* gene exist in rice, and cloning of cDNAs for Hb1 and Hb2 indicated that *hb1* and *hb2* genes were functional [4]. Little is known about the existence and properties of *hb* copies in rice other than *hb1* and *hb2*. Also, analysis by RT-PCR suggested that the expression of *hb1* and *hb2* is regulated by different promoters [4], but nothing is known about promoter sequences that regulate the expression of rice *hb* genes. To detect copies of rice *hb* genes and promoter sequences, we used *hb1* and *hb2* as probes to screen BAC inserts from a rice genome database. The BLAST results showed that *hb* genes exist in BAC inserts OSM11719 and OSM11676 (Fig. 1). Rice *hb1* and two copies named *hb3* and *hb4* were identified in an 8.3 kb fragment of the 'minus' strand of OSM11719, and all have a transcriptional polarity right to left. A single copy of rice *hb*, corresponding to *hb2*, was identified in the 'plus' strand of OSM11676 and has a transcriptional polarity left to right. No additional copies of *hb* genes were identified in the rice genome, thus a *hb* gene family formed by *hb1*, *hb2*, *hb3* and *hb4* exists in rice.

Rice *hb* genes contain three introns located at identical positions as other plant *hb* genes [4], and sequence analysis showed that novel *hb3* and *hb4* are functional genes that code for predicted polypeptides nearly identical to Hb1 and Hb2 (see the following). Sizes of *hb1*, *hb2* and *hb3* are similar, ranging from 826 to 841 nucleotides in length, but the size of *hb4* is 1032 nucleotides in length because intron III is ~220 nucleotides longer than the average length (97 nucleotides) of intron III in *hb1*, *hb2* and *hb3*.

Predicted rice Hb3 and Hb4 are 87.1% similar to each other, and 85.5% and 84.7%, and 79.2% and 82.2% similar to Hb1 and Hb2, respectively. Highly conserved amino acid residues include the distal and proximal histidines (H177 and H112, respectively) as well as residues located at the monomer-monomer interface of dimeric Hb1 (V50, S53, E123, V124 and F127) described by Hargrove et al. [6] (Fig. 2A). This observation suggests that Hb1, Hb2, Hb3 and Hb4 can potentially form homo- or hetero-dimers *in vivo*. Moreover, phenetic analysis showed that rice Hbs are grouped in two clusters (Fig. 2B); cluster Hb1/Hb2 and Hb3/Hb4. Topology of the phonogram suggests that the cluster Hb3/Hb4 is ancestral because it is closer to the outgroup *Physcomitrella* Hb.

Table 1

Selected plant and globin promoters producing significant alignments with upstream sequences of rice *hb* genes (promoter sequences were retrieved from the Eukaryotic Promoter Database release 45)

<i>hb</i> gene	Promoter	EPD accession No.	<i>Hb</i> upstream location
<i>hb1</i>	<i>Lycopersicon esculentum</i> 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase (ethylene synthesis)	35029	432–447
	<i>Pisum sativum</i> Rubisco small subunit (photo-regulated)	16011	372–590
	<i>Homo sapiens</i> β -globin	11105	2034–2047
	<i>Halichoerus grypus</i> myoglobin	7070	1134–1157
<i>hb2</i>	<i>Zea mays</i> (waxy) ADP-glucose starch-glucosyl transferase	14012	553–569
<i>hb3</i>	<i>Glycine max</i> heat shock protein P2	36084	1628–1643
	<i>Arabidopsis thaliana</i> β -tubulin AB14	28003	1630–1644
	<i>Chironomus thummi</i> globin VIII-5	37002	1808–1821
	<i>Helianthus annuus</i> anther-specific gene SF2	35047	751–764
	<i>Glycine max</i> isoform 23K	11008	1716–1729
<i>hb4</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i> chalcone synthase (acyl transferase)	35074	808–826

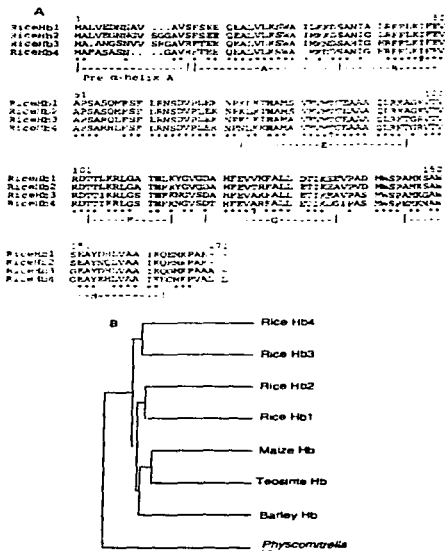


Fig. 2. Primary structure and relationships among rice Hbs. A, sequence alignment of predicted rice Hb proteins. Asterisks show the highest conserved amino acid residues. Distal (H77) and proximal (H112) histidines are shown in bold. Vertical arrows show the introns position. Alpha-helix regions A to H are those described for rice Hb1 [6]. B, phylogenetic tree that shows the sequence relationship among rice and other monocotyledonous (maize [*Zea mays* ssp. *mays*], teosinte [*Zea mays* ssp. *parviglumis*] and barley) Hbs. Moss (*Physcomitrella patens*) Hb is the outgroup. Sequence alignment and phenogram were constructed using the PileUp routine of the GCG program. Genbank accession numbers for *Physcomitrella*, maize, teosinte and barley Hbs are AF218049, AY005818, AF291052 and U94968, respectively.

Rice *hb* genes contain canonical TATA boxes located upstream of the start codon at positions -135, -115, -150 and -164 for *hb1*, *hb2*, *hb3* and *hb4*, respectively. Sequence comparison of *hb* 5'-upstream sequences with eukaryotic promoter sequences deposited in databases showed that a number of potential promoters exist upstream of *hb* genes, including those for human δ -globin, stress-related and heat-shock proteins and soybean (*Glycine max*) nodulin 23 (Table 1). The existence of diverse promoters suggests that rice *hb* genes are regulated by different *trans*-acting factors.

3. Conclusions

Gene analysis reported in this work shows that a family of functional *hb* genes exist in rice, and that Hb proteins are highly conserved suggesting that they have similar functions. However, the existence of different promoters upstream of these genes suggests that individual *hb*s are regulated by separate signals, and could result in the differential expression of the four *hb* genes in the different organs or under different conditions of plant growth.

4. Methods

Rice *hb1* and *hb2* genes (Genbank accession numbers U76028 and U76029, respectively) were used as probes to scan the rice genome from a Monsanto Company database (<http://www.rice-research.org>) using the Blastn routine of the BLAST program [1]. Partial sequences (~1000 bp in length) were retrieved by walking up and down from the target sequence, and were processed using the following routines of the GCG (Genetics Computing Group, Madison, WI) program: partial sequences were copied as individual files with GetInfer, edited with GelAssemble and displayed with GelView. Full sequences were obtained from the consensus sequence of the GelAssemble routine.

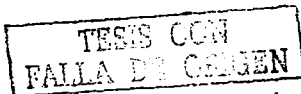
Intron positions were identified by comparing retrieved *hb* gene sequences with rice *hb1* and *hb2*. Coding sequences were translated into predicted proteins and sequence alignment and cluster analysis were performed using the Translate and PileUp routines of the GCG program, respectively. To identify promoters, the 5'-non-coding sequences of rice *hb* genes were compared with promoter sequences deposited in the EPD (Eukaryotic Promoter Database at <http://www.epd.isb-sib.ch>) database.

Acknowledgements

Authors express their gratitude to the Monsanto Company for providing access to the rice genome database. This work was partially funded by DGAPA-PAPIIT/UNAM (project number IN202399), Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (project number 25229-N), México, and by the Center for Biotechnology University of Nebraska-Lincoln, funded through the Nebraska Research Initiative. V.L.R. is a graduate fellow from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (registration number 143896), México.

References

- S.F. Altschul, W. Gish, W. Miller, E.W. Myers, D.J. Lipman, Basic local alignment search tool, *J. Mol. Biol.* 215 (1990) 403–410.
- C.A. Appleby, The origin and functions of haemoglobin in plants, *Sci. Progr.* 76 (1992) 365–398.



- [13] R. Arredondo-Peter, M.S. Hargrove, J.F. Moran, G. Sarath, R.V. Klucas, Plant hemoglobins, *Plant Physiol.* 118 (1998) 1121–1126.
- [14] R. Arredondo-Peter, M.S. Hargrove, G. Sarath, J.F. Moran, J. Lohrman, J.S. Olson, R.V. Klucas, Rice hemoglobins: gene cloning, analysis and oxygen-binding kinetics of a recombinant protein synthesized in *Escherichia coli*, *Plant Physiol.* 115 (1997) 1259–1266.
- [15] R. Arredondo-Peter, M. Ramirez, G. Sarath, R.V. Klucas, Sequence analysis of an ancient hemoglobin cDNA isolated from the moss *Physcomitrella patens* (accession No. AF218049), *Plant Physiol.* 122 (2000) 1457–1457.
- [16] M. Hargrove, E.A. Brucker, B. Stee, G. Sarath, R. Arredondo-Peter, R.V. Klucas, J.S. Olson, G.N. Phillips Jr., Crystal structure of a non-symbiotic hemoglobin, *Structure* 8 (2000) 1005–1014.
- [7] R.D. Hill, What are hemoglobins doing in plants?, *Can J. Microbiol.* 76 (1998) 707–712.
- [8] V. Lara-Ruan, G. Sarath, R.V. Klucas, R. Arredondo-Peter, Synthesis of hemoglobins in rice (*Oryza sativa* var. Jackson) plants growing in normal and stress conditions, *Plant Sci.* 161 (2001) 279–287.
- [9] X. Nie, R.D. Hill, Mitochondrial respiration and hemoglobin gene expression in barley aleurone tissue, *Plant Physiol.* 114 (1997) 835–840.
- [10] E.J.H. Ross, L. Shearman, M. Mahiesen, Y.J. Zhou, R. Arredondo-Peter, G. Sarath, R.V. Klucas, Nonsymbiotic hemoglobins in rice are synthesized during germination and in differentiating cell types, *Protoplasma* 218 (2002) 125–133.
- [11] E.R. Taylor, X.Z. Nie, A.W. MacGregor, R.D. Hill, A cereal haemoglobin gene is expressed in seed and root tissues under anaerobic conditions, *Plant Mol. Biol.* 24 (1994) 853–862.

Capítulo IV. DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES.
LAS Hbns, DEL ANÁLISIS BIOQUÍMICO Y MOLECULAR AL ANÁLISIS
FUNCIONAL.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Las Hbns se han caracterizado en diferentes especies de plantas, desde los musgos (Arredondo-Peter et al., 2000) hasta las angiospermas (Taylor et al., 1994; Andersson et al., 1996; Duff et al., 1997; Arredondo-Peter et al., 1997a; Trevaskis et al., 1997). Entre las características más conspicuas de este grupo de proteínas se encuentra la hexacoordinación del hierro del hemo por la histidina distal (E7), lo cual resulta en una afinidad por el O_2 extremadamente elevada (Arredondo-Peter et al., 1997a; Hargrove et al., 2000). Las proteínas Hbns se localizan en tejidos específicos de la planta (Hunt et al., 2001; Ross et al., 2001), y los genes *hbns* se sobreexpresan en los tejidos que se encuentran en condiciones de estrés, tal como la hipoxia, bajas temperaturas y bajos niveles de ATP (Taylor et al., 1994; Nie and Hill, 1997; Trevaskis et al., 1997; Sowa et al., 1998). La función de las Hbns en las plantas se desconoce, sin embargo, con base en el análisis bioquímico y molecular de las Hbns de las plantas y de las Hbs de diversos organismos, se ha sugerido que estas proteínas funcionan al actuar como sensores de la concentración de O_2 , secuestrar el O_2 , controlar el nivel de especies reactivas del O_2 (ERO) y transferir electrones (Wittenberg yWittenberg, 1990; Arredondo-Peter et al., 1998; Suzuki e Imai, 1998; Weber y Vinogradov, 2001).

El estudio molecular, bioquímico, biofísico y estructural de las Hbns del arroz ha aportado un cúmulo de información que es importante para comprender el escenario en el cual funcionan estas proteínas. En los capítulos anteriores se presentan los principales resultados que se obtuvieron en esta tesis, los cuales permiten entender la síntesis y regulación de las Hbns del arroz. En este capítulo se incluyen algunos resultados preliminares que se obtuvieron durante el desarrollo de este trabajo, los cuales aportan información que resulta de interés en la discusión de las características y posibles funciones de las Hbns del arroz. La discusión global de los resultados que se obtuvieron durante este trabajo, en conjunto con los resultados publicados por otros autores, permitió elaborar un modelo que

explica las posibles funciones de las Hbns en los órganos de la planta, el cual se presenta en las conclusiones de este capítulo.

LAS Hbns SE SINTETIZAN EN NUMEROSOS ÓRGANOS Y EN TEJIDOS ESPECÍFICOS DEL ARROZ

El análisis de la expresión de los genes *hbns* en diferentes especies vegetales, como la soya, *A. thaliana* y la cebada, sugieren que las Hbns se sintetizan en órganos específicos de la planta (Taylor et al., 1994; Andersson et al., 1996; Trevaskis et al., 1997). En el caso del arroz, el análisis por "western blot", que se presenta en el capítulo IIIa de esta tesis, mostró que las Hbns se sintetizan en los órganos embrionarios y vegetativos durante el desarrollo de la planta de 2 a 14 semanas de edad (Figuras 1, 2 y 3, Capítulo IIIa). Estos resultados sugieren que las Hbns realizan una función importante en diferentes órganos y durante el desarrollo de la planta. Sin embargo, el análisis por "western blot" no permite detectar a las Hbns en los tejidos que forman a los órganos de la planta, lo cual es importante para determinar el tejido en donde se localizan las Hbns y, por lo tanto, el contexto fisiológico en donde actúan estas proteínas. Por esta razón, Ross y colaboradores (Ross et al., 2001) realizaron la inmunolocalización de las Hbns en los tejidos del arroz, mediante el uso de la técnica de microscopía confocal. La figura 1 de Ross et al. (2002) del capítulo I de esta tesis, muestra que las Hbns se localizan en numerosos órganos del arroz, pero en tejidos específicos, como la aleurona y el escutelo de las semillas, la coña de la raíz y el esclerénquima de las hojas. Con el objeto de analizar con mayor detalle el lugar de síntesis de las Hbns al nivel intracelular, en esta tesis se utilizaron los anticuerpos anti-Hb I para inmunocitocalizar a las Hbns en las células de la aleurona del arroz, mediante microscopía electrónica de transmisión. Este análisis se realizó al utilizar técnicas estándar (ver por

ejemplo a Goodchild y Miller [1997]). Los resultados que se obtuvieron muestran que las Hbns se localizan en el citoplasma, particularmente alrededor de los oleosomas (Figura 1), lo cual sugiere que las Hbns realizan una función en el metabolismo de estas células, probablemente en el metabolismo oxidativo de los lípidos de reserva.

Durante la germinación de la semilla, las células de la aleurona sintetizan y liberan enzimas hidrolíticas, como la α -amilasa, que se emplean en la movilización hacia el embrión de los nutrientes que se almacenan en el endospermo. La actividad de las células de la aleurona requiere energía, la cual se obtiene mediante la β -oxidación de los lípidos que se almacenan en los oleosomas (Fath et al., 2002). Además, la síntesis de las enzimas hidrolíticas de la aleurona se regula por el ácido giberélico, el cual también activa el proceso de muerte celular programada (MCP). Durante el proceso de MCP se genera un estrés oxidativo, en el cual las ERO (como el H_2O_2 y NO) operan como moduladores de las señales que controlan el proceso de MCP, y a la vez como agentes citotóxicos (Bethke et al., 1999). Se ha propuesto que las Hbns participan en el mantenimiento del nivel energético de la célula (Nie y Hill, 1997; Sowa et al., 1998), y se ha observado que las Hbs de diversos organismos tienen actividades pseudoenzimáticas, como la actividad peroxidasa y dioxigenasa en el metabolismo del NO (Wittenberg y Wittenberg, 1990; Gardner et al., 1998). Por lo tanto, es probable que en la aleurona del arroz las Hbns realicen diferentes funciones que se relacionan con el mantenimiento del nivel energético, y que al mismo tiempo participen en el control de las ERO que se generan durante la β -oxidación de los lípidos y la MCP que ocurre en este tejido. La acumulación de las Hbns en los tejidos que se encuentran en diferenciación y en donde se lleva a cabo la MCP, tal como la cofia de la raíz, las células del protoxilema (Ross et al., 2001) y la zona de abscisión de las hojas (Ross E.J.H., 2002. Tesis de Doctorado. Universidad de Nebraska en Lincoln, EUA), sugiere que las Hbns podrían desempeñar una

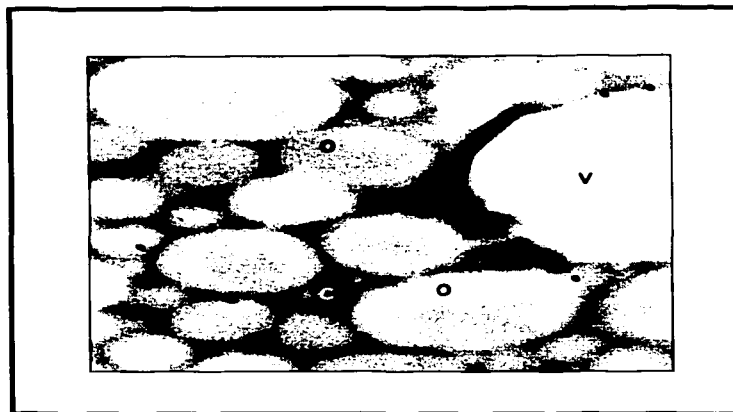


Figura 1. Micrografía electrónica que muestra la localización de las Hbns (puntos negros) en el interior de las células de la aleurona del arroz. C, Citoplasma; O, oleosomas; V, vacuola.

función que se relaciona con el metabolismo de las ERO durante el proceso de MCP.

MODULACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE LAS Hbns CUANDO LA PLANTA CRECE EN CONDICIONES DE ESTRÉS

Como se describió en el capítulo IIIa de esta tesis, la acumulación de las Hbns aumenta en los órganos vegetativos del arroz cuando las plantas se someten a condiciones de estrés por hipoxia y estrés energético, es decir, en las raíces inundadas y en las hojas caquéticas, respectivamente (Figuras 4 y 5, Capítulo IIIa). Estos resultados muestran que las Hbns del arroz se comportan de manera similar a las Hbns de otras especies vegetales (Taylor et al., 1994; Nie y Hill, 1997; Trevaskis et al., 1997; Sowa et al., 1998), ya que responden positivamente a las condiciones de estrés. Sin embargo, en este trabajo no se detectaron variaciones en el nivel de Hbns en las plántulas de arroz que se sometieron a estrés oxidativo (por la adición de H_2O_2), nitrosativo (por la adición de SNP) y hormonal (por la adición de la auxina 2,4-D) (Figura 6, Capítulo IIIa). La interpretación inicial de estas observaciones fue que las Hbns del arroz no responden a dichas condiciones de estrés y, por lo tanto, que las Hbns no forman parte de la respuesta de la planta a condiciones generales de estrés.

Sin embargo, el avance reciente en el estudio del papel que juegan el NO y H_2O_2 en la fisiología vegetal indican que existe una relación sinérgica entre estas dos moléculas, ya que regulan procesos fisiológicos que son importantes en la planta. Por ejemplo, la respuesta de defensa contra el ataque de patógenos genera una explosión oxidativa que conduce a la MCP (Durner y Klessig, 1999); así mismo, el daño mecánico a los tejidos de la planta promueve la MCP que está mediada por el incremento de las ERO (Delledonne et al., 1998). La alteración del balance entre la concentración del H_2O_2 y NO en las

células que se retaron previamente con un patógeno, o que sufrieron un daño mecánico, inhibe el inicio de la MCP, lo cual podría comprometer la supervivencia de la planta (Delledonne et al., 2001). Más aún, los estudios sobre el papel que juegan las ERO en la MCP de las células vegetales reveló que el efecto regulatorio del H_2O_2 puede alterarse selectivamente mediante la presencia de hormonas, como el ácido giberélico y el ácido abscísico (Fath et al., 2002). Por otro lado, el NO desempeña diversos papeles en la fisiología vegetal, ya que participa en la defensa contra el ataque de patógenos (Durner et al., 1998), controla la concentración de algunas ERO (Beligni y Lamattina, 2001) y funciona conjuntamente con hormonas vegetales en diversos procesos del desarrollo, tal como la germinación y el cierre de los estomas (Beligni y Lamattina, 2000; García-Mata y Lamattina, 2002). El conjunto de estos resultados muestra que existe una red metabólica intrincada en la cual las ERO, el NO y las hormonas vegetales actúan en conjunto para regular diversos procesos fisiológicos. En este contexto, la afirmación de que las Hbns del arroz no responden al estrés oxidativo, nitrosativo y hormonal, podría no ser concluyente, y debe revisarse con cuidado al tomar en cuenta que las Hbns unen al NO y catabolizan el H_2O_2 (Davies et al., 1999; Durner et al., 1999) lo que lleva a pensar que las Hbns podrían participar en procesos complejos de transducción de señales al interior de la célula. Para abordar este problema, es decir, la posible participación de las Hbns en la modulación de los niveles de NO y H_2O_2 , es necesario diseñar un modelo experimental que permita evaluar el efecto del cambio de la concentración de H_2O_2 y NO en la acumulación de las Hbns cuando la planta crece bajo estrés oxidativo y/o nitrosativo. Por otro lado, también es necesario continuar con el análisis de la respuesta de los promotores de los genes *hbns* a la presencia de diversas hormonas vegetales (ver más adelante), las cuales modulan la respuesta de los tejidos de la planta a diversos estímulos internos o medioambientales (externos).

INTERACCIONES POSIBLES DE LAS Hbns CON DIVERSAS MOLÉCULAS, Y LAS CONSECUENCIAS FUNCIONALES DE DICHAS INTERACCIONES

Se ha postulado que es poco probable que las Hbns funcionen al transportar O_2 o actuar como sensores de esta molécula, debido a que estas proteínas tienen una afinidad muy elevada por el O_2 , la cual es consecuencia de una k_{off} extraordinariamente baja. Sin embargo, también se ha propuesto que *in vivo* estas proteínas podrían interactuar con diversos componentes celulares, lo que traería consigo una modificación estructural que podría resultar en el cambio en las constantes cinéticas de la proteína, lo cual afectaría su función en la célula (Arredondo-Peter et al., 1998; Sowa et al., 1999).

Aunque a la fecha no se han publicado evidencias que demuestren que las Hbns interactúan con componentes celulares, en este trabajo se obtuvieron evidencias indirectas que sugieren que las Hbns interactúan con un componente celular que está presente en las hojas del arroz. Cuando el extracto soluble que se obtuvo a partir de los coleoptilos, hojas y raíces del arroz se sometió a electroforesis nativa y "western blot", fue posible detectar a las Hbns en los extractos de la raíz (las cuales comigran con el control Hb I recombinante), sin embargo, la señal de Hbns estuvo ausente en los extractos de las hojas y los coleoptilos (Figura 2A). No obstante, los análisis previos que se hicieron por "western blot" a partir de geles desnaturizantes mostraron que hay Hbns tanto en los coleoptilos como en las hojas del arroz (Capítulo IIIa). Una posible explicación para esta observación es que en su forma nativa las Hbns se encuentran en los coleoptilos y las hojas en forma de multímeros y, por lo tanto, no pueden entrar en el gel debido a su tamaño. Se ha observado que los monómeros de Hb I recombinante forman dímeros no cooperativos cuando la concentración del monómero es superior a 0.8 mM (Hargrove et al., 2000). Los residuos de aminoácidos que están implicados en la

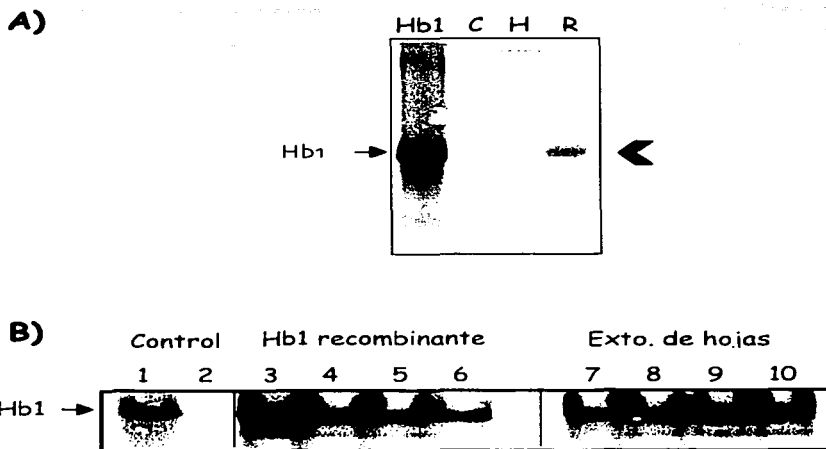


Figura 2. Detección de Hb1 y Hbns nativas de arroz mediante "western blot" a partir de geles nativos de poliacrilamida. A) Detección por "western blot" al utilizar anticuerpos anti-Hb1 del arroz de Hbns en extractos solubles (40 μ g de proteína total) de coleoptilos (C), hojas (H) y raíces (R); Hb1, Hb1 recombinante control. La flecha indica la señal que corresponde a Hb1 recombinante, y la punta de flecha señala a las Hbns nativas. B) "Western blot" a partir de un gel nativo al 10% que contiene los ensayos en donde se incubó Hb1 recombinante con extractos solubles de las hojas del arroz (las cuales crecieron durante 8 semanas en condiciones normales). Carriles 1 y 2 controles con Hb1 recombinante 4.5 y 0.6 μ M, respectivamente. En el panel central se incubaron 10 μ L del extracto soluble de hojas con Hb1 4.5 μ M (carril 3), Hb1 1.8 μ M (carril 4), Hb1 0.9 μ M (carril 5) y 0.6 μ M (carril 6). En el panel derecho se incubó Hb1 1.8 μ M con volúmenes crecientes del extracto soluble de hojas (1 μ L del extracto de hojas contiene 3.2 μ g de proteína total): 1 μ L (carril 7), 5 μ L (carril 8), 10 μ L (carril 9), 15 μ L (carril 10).

formación de los dímeros en Hb I se encuentran conservados en las Hbns del arroz (figura 2A, Capítulo IIIb), de modo que es probable que las Hbns 2, 3 y 4 también sean capaces de formar estructuras cuaternarias y complejos de alto peso molecular. Para verificar si la ausencia de la señal de las Hbns en las hojas y los coleóptilos se debe a la formación de Hbns multiméricas, se realizó un ensayo del tipo "western blot" a partir de un gel de acrilamida nativo en un gradiente de concentración del 5 al 20%. En este ensayo tampoco se detectó la señal correspondiente a las Hbns en las hojas y coleóptilos, aunque fue posible detectarla en los extractos de la raíz (el resultado no se muestra). Una conclusión de esta observación es que las Hbns del arroz no forman multímeros de alto peso molecular y, por lo tanto, es probable que las Hbns interactúen con algún componente celular en las hojas de la planta, lo cual impide su detección al utilizar los anticuerpos anti-Hb I.

Con el objeto de probar la hipótesis anterior, se incubó Hb I recombinante con el extracto soluble de las hojas, en donde presumiblemente existen los componentes que interactúan con las Hbns. Los extractos solubles a los que se añadió Hb I se incubaron a 20°C por 30 min, la mezcla se separó por electroforesis en un gel nativo al 10%, y las Hbns se detectaron por "western blot". En la figura 2B se muestra que Hb I control se detectó en la concentración 4.5 μM (carril 1), pero no en la concentración 0.6 μM (carril 2), y que en todas las muestras se detectó la señal correspondiente a las Hbns (carriles 3 a 10). Una observación interesante es que la intensidad de la señal en el carril 3 fue mayor que la intensidad del control que se encuentra en el carril 1, aún cuando ambas muestras contuvieron Hb I 4.5 μM . Del mismo modo, la señal de Hbns se detectó en el carril 6, pero no en el carril 2, aún cuando ambas muestras contuvieron Hb I 0.6 μM . Estas observaciones sugieren que el aumento en la intensidad de la señal en los carriles 3 a 6 se debe a las Hbns que existen en el extracto de las hojas. Por otro lado, en los carriles 7 a 10 de la figura 2B se analizaron muestras de Hb I 1.8

μM las cuales se incubaron previamente con concentraciones crecientes del extracto de las hojas de arroz. El resultado mostró que la intensidad de la señal aumenta conforme se incrementa la concentración del extracto de hojas, lo cual sugiere que el aumento en la intensidad de las señales también se debe a la señal de HbI más la señal de las Hbns de las hojas. Por lo tanto, aparentemente fue posible detectar Hbns en los extractos de hojas al incubar las muestras a 20°C durante 30 min, lo cual no ocurrió en los ensayos anteriores (Figura 2A), en donde las muestras se mantuvieron a 4°C . Estos resultados sugieren que en las hojas del arroz existe un componente molecular que se une a las Hbns a baja temperatura (a 4°C), el cual se libera a 20°C , y que interfiere con la detección de las Hbns al utilizar anticuerpos anti-HbI. Estos resultados preliminares son de gran interés, debido a que sugieren que las condiciones en las que se encuentran las Hbns son diferentes en las hojas y raíces del arroz. Además, estos resultados también sugieren que en los órganos fotosintéticos, como las hojas y los coleóptilos, las Hbns interactúan con componentes celulares que podrían modificar o regular su función.

Un método alternativo para explorar la posibilidad de interacción entre las Hbns y diversas moléculas es el análisis de la estructura terciaria de las Hbns. Por ello, en esta tesis se analizó la estructura terciaria de HbI recombinante del arroz (Hargrove et al., 2000) con el uso del programa de cómputo SwissPdbViewer (<http://www.expasy.ch/spdbv/>). Los resultados de este análisis permitieron identificar una cavidad que se forma entre los extremos N- y C-terminal de la proteína, en la cual podrían alojarse moléculas orgánicas o dominios proteínicos. El análisis de la distribución de cargas en la superficie de esta cavidad mostró que existe una proporción alta de aminoácidos con carga positiva o negativa en esta región (Figura 3A). Una observación de especial interés es la localización del residuo de lisina K94, el cual se localiza en el asa que une a las hélices E y F, y que se orienta hacia el centro de

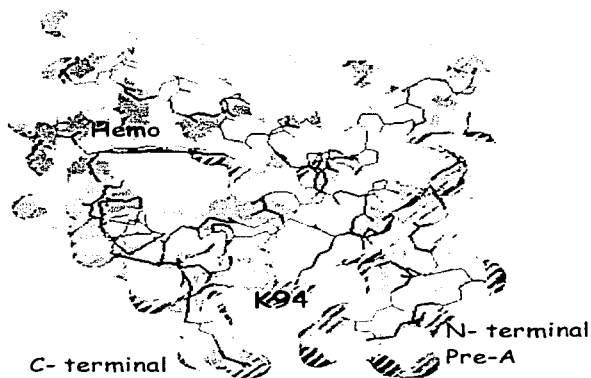
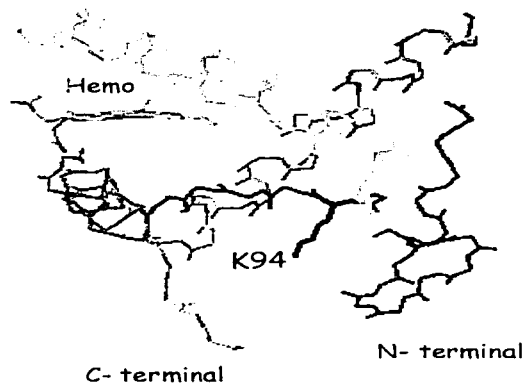
A)**B)**

Figura 3. Análisis de la cavidad que se forma entre los extremos N- y C-terminal de Hb1 del arroz, así como la posición del residuo K94. A) Modelo de la región de Hb1 del arroz en donde se localiza la cavidad entre los extremos N- y C-terminal. La distribución de cargas en la superficie de la proteína se muestra con los colores azul y rojo para las regiones con carga positiva o negativa, respectivamente. B) Modelo que muestra las regiones que forman a la cavidad que se localiza entre el N- y C-terminal en Hb1, así como la proyección de K94 hacia la región central de dicha cavidad. Pre-hélice A (rojo), hélice E (amarillo), asa E-F (azul), hélice F (verde), hélice G y C-terminal (tita).

el centro de la cavidad N/C (Figura 3B). Recientemente se realizó un análisis similar al de HbI, pero sobre la estructura de la Hbns del maíz (HbM). (Sáenz Rivera J. 2002. Tesis de Maestría. Maestría en Ciencias Químicas. UAP). Los resultados mostraron que, al igual que en HbI, en HbM también existe la cavidad que se forma entre los extremos N- y C-terminal. El análisis por computadora mostró que en HbM el cambio de orientación del residuo K94 produce un cambio en la posición de la hélice E, la cual contiene a la histidina distal (Sáenz Rivera J. op. cit). Debido a que en HbI y HbM el residuo K94 se localiza en la misma posición y orientación, es probable que el cambio en la posición de K94 afecte las constantes cinéticas de HbI al influir en la posición de las hélices E y F y en consecuencia también podría modificar la distancia que existe entre las His distal y/o proximal y el Fe del hemo. Si esto es así, la afinidad de HbI por el O_2 podría disminuir al interactuar con moléculas que se ubiquen en la cavidad N/C y que desplacen a K94 de su posición original, lo que resultaría en que esta proteína podría funcionar como un transportador o sensor de O_2 .

Para probar la hipótesis anterior, es necesario obtener un número mayor de evidencias que permitan confirmar que las Hbns interactúan con otras moléculas y, si es el caso, caracterizar a dichas moléculas. La estructura de la cavidad N/C en HbI y HbM, así como la naturaleza de los aminoácidos que la conforman, en particular la posición del residuo K94, junto con los resultados que se obtuvieron a partir de los geles nativos (Figura 2), sugieren que las Hbns interactúan con algún componente celular, el cual podría alterar las propiedades bioquímicas y la función de estas proteínas. Dicha interacción podría ser específica en ciertos órganos de la planta, lo que podría ser un mecanismo que permite regular la función de las Hbns de acuerdo con las condiciones fisiológicas de los tejidos vegetales.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

EL COMPORTAMIENTO DE LAS Hbns EN LOS SISTEMAS BIOLÓGICOS

A pesar de que se ha publicado abundante información sobre las características moleculares, bioquímicas, estructurales y cinéticas de las Hbns, se conoce poco acerca del comportamiento de estas proteínas dentro de la célula vegetal, es decir, *in vivo*. Esto se debe principalmente a que la concentración de Hbns en los tejidos de la planta es muy baja, y resulta difícil estudiar a estas proteínas en el estado nativo. Por esta razón se han producido Hbns recombinantes en *Escherichia coli*, lo que ha permitido obtener cantidades suficientes de estas proteínas para su caracterización bioquímica (Arredondo-Peter et al., 1997a, 1997b; Duff et al., 1997; Trevaskis et al., 1997).

El análisis del efecto fisiológico de la expresión heteróloga de diversos genes *hb* en bacterias y plantas ha aportado información valiosa para entender la función de las Hbs. Por ejemplo, la síntesis de la Hb de la bacteria *Vitreoscilla* sp. (VHb) en *E. coli* mostró que una función de VHb es facilitar la difusión del O₂ en condiciones de microaerobiosis, lo cual resulta en el aumento de la masa celular en los cultivos de *E. coli* (Koshla y Bailey, 1988; Kallio et al., 1994). Así mismo, la expresión de VHb en plantas de tabaco acelera la germinación, mejora el crecimiento de las plantas e incrementa la producción de nicotina (Holmberg et al., 1997). Estos estudios permitieron demostrar que *in vivo* VHb funciona como transportador de O₂. En este contexto, recientemente en nuestro laboratorio se evaluó el efecto que tiene la expresión constitutiva de diferentes Hbs recombinantes en *E. coli* TB1, al comparar las curvas de crecimiento de la cepa silvestre con las cepas que sintetizan Hbs recombinantes de diversos organismos, incluyendo a Hb1 y Hb2 del arroz (Álvarez-Salgado E. y Arredondo-Peter R., comunicación personal). Los resultados de este análisis indican que la síntesis de Hb1 y Hb2 tiene un

efecto diferente durante el crecimiento de *E. coli* recombinante. La curva de crecimiento de *E. coli* que sintetiza Hb1 es similar a las curvas que se obtienen cuando *E. coli* sintetiza Hbs que funcionan como transportadores de O₂, lo cual sugiere que en *E. coli* Hb1 recombinante actúa como un transportador de O₂. En cambio, el crecimiento de *E. coli* que sintetiza Hb2 es 36% menor con respecto a *E. coli* que sintetiza Hb1. Debido a que Hb2 tiene una afinidad muy elevada por el O₂, la cual es similar a la afinidad de Hb1 por esta molécula (EHJ Ross, 2002. op. cit.), es probable que Hb2 funcione en *E. coli* como un secuestrador del O₂, lo que resultaría en la disminución de la síntesis de ATP y, por lo tanto, en la disminución del nivel energético que se requiere para el crecimiento de la bacteria. Estas observaciones resultan de mucho interés debido a que sugieren que *in vivo* las características bioquímicas y la función de Hb1 y Hb2 probablemente son distintas, a pesar de que estas proteínas tienen una similitud alta, tanto en la secuencia de aminoácidos (93%), como en las constantes cinéticas.

Las observaciones sobre el efecto que tiene la síntesis de Hb1 y Hb2 en el crecimiento de *E. coli* sugiere que en la célula vegetal las Hbns realizan funciones que son adicionales al transporte de O₂. En este sentido, es importante recordar que en el arroz existe una familia que está compuesta por cuatro copias del gen *hbns* (Figura 1, Capítulo IIIb), de las cuales *hb1* y *hb2* se expresan diferencialmente (Arredondo-Peter et al., 1997a) (ver más abajo), de modo que cada Hbns podría llevar a cabo una función específica, la cual podría depender de las condiciones metabólicas de la célula.

CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES Y FUNCIONALES DE LA FAMILIA DE GENES *hbns* DEL ARROZ

Al inicio del estudio de las Hbns del arroz se identificaron al menos tres copias del gen *hbns*

mediante hibridación del tipo "Southern blot", de las cuales se clonaron y caracterizaron los genes *hb1* y *hb2* (Arredondo-Peter et al., 1997a). En esta tesis se identificó a la familia completa de genes *hbns* del arroz (Capítulo IIIb), la cual está compuesta por cuatro copias del gen *hbns*, que se designaron como *hb1*, *hb2*, *hb3* y *hb4*. El análisis de la secuencia de los genes *hb3* y *hb4* indica que estos genes son funcionales debido a que contienen un codón de inicio y un codón de término, lo cual indica que no se trata de pseudogenes o genes interrumpidos. Además, el análisis de la región 5' río arriba del inicio de la transcripción de los cuatro genes *hbns* mostró que existen diferentes secuencias promotoras, lo cual sugiere que estos genes se regulan diferencialmente. La comparación de la secuencia de aminoácidos entre las Hbns1 a 4 mostró que las Hbns del arroz se organizan en dos grupos, uno formado por Hb1 y Hb2, y otro formado por Hb3 y Hb4 (Figura 2B, Capítulo IIIb). Estas observaciones sugieren que existen diferencias bioquímicas, y probablemente funcionales, entre las Hbns del arroz, y que estas proteínas podrían sintetizarse diferencialmente en los órganos de la planta bajo diferentes condiciones metabólicas, de manera similar a lo que ocurre con AHb1 y AHb2 de *A. thaliana* (Trevaskis et al., 1997; Hunt et al., 2001).

Con el objeto de caracterizar a los genes *hb3* y *hb4* del arroz, en este trabajo se diseñaron iniciadores específicos que permitieron amplificar y clonar dichos genes (Figura 4A). Para este fin se compararon las regiones de inicio y término de la traducción de los cuatro genes *hbns*, se diseñaron iniciadores que permitieron la amplificación por PCR de fragmentos cuya longitud fue de 861 y 1,093 pb, los cuales corresponden al tamaño de los genes *hb3* y *hb4*, respectivamente (Figura 4B). La identidad de los genes *hb3* y *hb4* se verificó al clonar los productos de PCR en el vector pCR2.1 (Invitrogen) y al secuenciarlos parcialmente por el método de Sanger (Sanger et al., 1977). El resultado de la secuenciación de los genes *hb3* y *hb4* permitió verificar que los iniciadores que se diseñaron

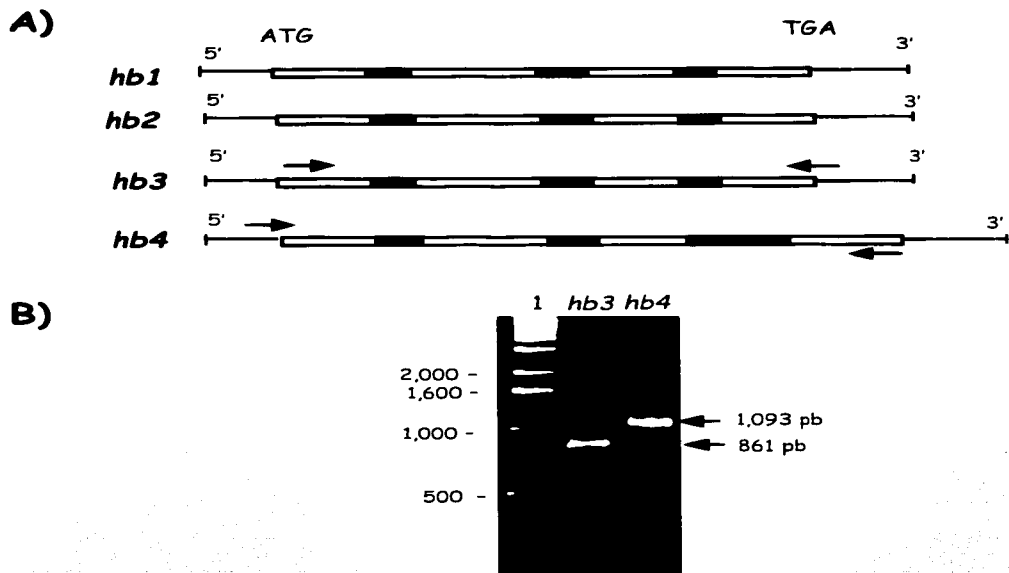
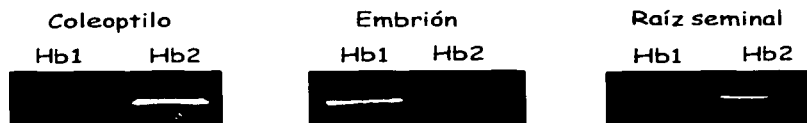


Figura 4. Amplificación y clonación de los genes *hb3* y *hb4* a partir del DNA total del arroz. A) La comparación entre la secuencia de los genes *hbns* del arroz permitió localizar las regiones que presentan mayores diferencias (áreas sombreadas), lo que permitió diseñar iniciadores que reconocen específicamente a *hb3* y *hb4*. Las flechas indican la localización de la secuencia que corresponde a los iniciadores para *hb3* o *hb4*. Las áreas negras en cada gen indican la posición y el tamaño aproximado de los intrones. B) Electroforesis en un gel de agarosa que muestra los productos de la amplificación por PCR que se obtuvieron al usar como molde el DNA total del arroz y los iniciadores *hb3* y *hb4* que se ilustran en (A). Los valores del marcador de tamaño molecular (carril 1) se muestran en pb. La secuencia de los iniciadores que se emplearon fue la siguiente: 5'-CCATGGCTGCGAACGGAAGC-3' (Hb3 sentido), 5'-GCTGCTGCGTAATACGTGTGAATTC-3' (Hb3 antisentido), 5'-CCATGGAGCAGGAAGCTGGTAGAT-3' (Hb4 sentido) y 5'-TAAGCGTACTGCCTCAGCGAATTC-3' (Hb4 antisentido). La temperatura de alineamiento que se empleó para la reacción de PCR fue de 60 y 48°C para *hb3* y *hb4*, respectivamente.

amplifican específicamente a los genes *hb3* y *hb4*. Con base en esta observación, se analizó la expresión de los genes *hb1*, *hb2*, *hb3* y *hb4* en los órganos embrionarios y vegetativos del arroz, mediante la técnica de RT-PCR y al utilizar los iniciadores específicos para las copias de los genes *hbns* 1 al 4 del arroz, incluyendo a los iniciadores para *hb1* y *hb2* que describen Arredondo-Peter et al., (1997a). Los resultados mostraron que los transcritos para *Hb1* y *Hb2* se sintetizan diferencialmente en los órganos embrionarios y vegetativos del arroz (Figura 5). Sin embargo, no fue posible detectar a los transcritos para *Hb3* y *Hb4*, lo que se puede deber a que el nivel de los transcritos de los genes *hb3* y *hb4* está por debajo del límite de detección de la técnica, o bien, a que estos genes no están activos en los órganos y/o bajo las condiciones que se analizaron en este estudio.

En este sentido, el análisis de la secuencia 5' río arriba del inicio de los genes *hbns* del arroz mostró que existen secuencias que son similares a las secuencias promotoras de diversos genes *hb* y otros genes vegetales (Tabla I, Capítulo IIIb), así como la existencia de cajas que son moduladas por hormonas vegetales (como las citocininas y el ácido abscísico) y señales de defensa (Ross EHJ, 2002, op. cit.). Existen numerosas evidencias que indican que los genes *hbns* de diversas especies se expresan en tejidos específicos y bajo condiciones metabólicas particulares (Andersson et al., 1996; Trevaskis et al., 1997; Hendriks et al., 1998). Recientemente, se analizó la actividad del promotor del gen *hb2* fusionado con el gen reportero *gus* (Ross et al., enviado a publicación). El análisis de la actividad de GUS en discos de tabaco mostró que el promotor *hb2* se regula positivamente por la presencia de citocininas, específicamente por la benziladenina. Más aún, en las plantas de *A. thaliana* transformadas con la fusión del promotor *hb2::gus* se detectó la actividad de GUS en la cofia de la raíz, el tejido vascular de las hojas, las anteras y las zonas de abscisión de las flores, así como en sitios de la planta que sufrieron daño físico (Ross EHJ, 2002, op. cit). El patrón de expresión del promotor *hb2* del arroz

A)



B)



Figura 5. Análisis de la expresión de los genes *hb1* y *hb2* en el arroz. A) Detección de los transcritos *Hb1* y *Hb2* por RT-PCR en órganos embrionarios de plántulas después de 7 días de la germinación. B) Detección de los transcritos *Hb1* y *Hb2* por RT-PCR en los órganos vegetativos de plantas después de 6 semanas de la germinación.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

coincide con los resultados reportados para los promotores de los genes *hb* de otras plantas, tal como *ahb1* y *ahb2* de *A. thaliana* (Hunt et al., 2001), *hbns* de la soya (Andersson et al., 1996), *hb* de *Parasponia* (Bogusz et al., 1990) y *lhl* de lupino (Strozycki et al., 2000). Estos resultados muestran que las Hbns de las plantas se regulan por estímulos que son comunes en diferentes especies.

El análisis detallado de los promotores de los genes *hbns* de arroz y *A. thaliana* mostró que los genes *hbns* tienen elementos *cis* que responden a señales hormonales, como el ácido abscísico, etileno y las citocininas, y en respuesta al ataque por patógenos (Hunt et al., 2001; Ross E.H.J. 2002 op.cit). Los genes *hbns* de la mayoría de las especies que se han estudiado forman familias multigenicas, cuyas copias se regulan diferencialmente en los órganos de la planta (Andersson et al., 1996; Trevaskis et al., 1997; Aréchaga-Ocampo et al., 2001; Figura 5). Por otro lado, diversas evidencias sugieren que las Hbns de la misma especie tienen características bioquímicas particulares y, por lo tanto, funciones diferentes. El análisis de la expresión de los genes *hbns1* a 4 del arroz (Figura 5), y los resultados de otros autores, sugieren que las Hbns se regulan diferencialmente en la planta, lo que les permite realizar más de una función en los tejidos en respuesta a una variedad de estímulos fisiológicos y medioambientales. El avance en el análisis de la actividad de los promotores de los genes *hbns* del arroz y otras especies vegetales brindará mayor información acerca de la regulación de estos genes y la función de las Hbns en la planta.

LAS Hbns DURANTE LA HISTORIA DE LAS PLANTAS

Las Hbns han estado presentes a lo largo de la evolución de los organismos, desde las primeras bacterias hasta los animales y plantas superiores actuales. Durante la historia evolutiva de los

coincide con los resultados reportados para los promotores de los genes *hb* de otras plantas, tal como *ahb1* y *ahb2* de *A. thaliana* (Hunt et al., 2001), *hbns* de la soya (Andersson et al., 1996), *hb* de *Parasponia* (Bogusz et al., 1990) y *hbll* de lupino (Strozycki et al., 2000). Estos resultados muestran que las Hbns de las plantas se regulan por estímulos que son comunes en diferentes especies.

El análisis detallado de los promotores de los genes *hbns* de arroz y *A. thaliana* mostró que los genes *hbns* tienen elementos *cis* que responden a señales hormonales, como el ácido abscísico, etileno y las citocininas, y en respuesta al ataque por patógenos (Hunt et al., 2001; Ross E.H.J., 2002 op.cit). Los genes *hbns* de la mayoría de las especies que se han estudiado forman familias multigénicas, cuyas copias se regulan diferencialmente en los órganos de la planta (Andersson et al., 1996; Trevaskis et al., 1997; Aréchaga-Ocampo et al., 2001; Figura 5). Por otro lado, diversas evidencias sugieren que las Hbns de la misma especie tienen características bioquímicas particulares y, por lo tanto, funciones diferentes. El análisis de la expresión de los genes *hbns1* a 4 del arroz (Figura 5), y los resultados de otros autores, sugieren que las Hbns se regulan diferencialmente en la planta, lo que les permite realizar más de una función en los tejidos en respuesta a una variedad de estímulos fisiológicos y medioambientales. El avance en el análisis de la actividad de los promotores de los genes *hbns* del arroz y otras especies vegetales brindará mayor información acerca de la regulación de estos genes y la función de las Hbns en la planta.

LAS Hbns DURANTE LA HISTORIA DE LAS PLANTAS

Las Hbns han estado presentes a lo largo de la evolución de los organismos, desde las primeras bacterias hasta los animales y plantas superiores actuales. Durante la historia evolutiva de los

diferentes grupos de organismos, las Hbs han conservado las características estructurales y bioquímicas que les permiten llevar a cabo diversas funciones, por ejemplo, transportar y almacenar el O_2 , transportar el CO y NO, metabolizar el NO y H_2O_2 , y transferir electrones (Wittenberg y Wittenberg, 1990; Arredondo-Peter et al., 1998; Weber y Vinogradov, 2001). Aunque la función de las Hbns se desconoce, la distribución amplia de las Hbns en las plantas, desde las briofitas (Arredondo-Peter et al., 2000) hasta las angiospermas (Revisado por Ross et al., 2002, en el Capítulo I de esta tesis), sugiere que estas proteínas realizan funciones que han sido importantes durante la evolución de las plantas.

El análisis de las Hbns de los representantes de las primeras plantas terrestres, tal como las que sintetizan los musgos, es un modelo útil para reconstruir la evolución de las Hbns. El alineamiento de la secuencia de aminoácidos de las Hbns de los musgos *Ceratodon purpureus* (CerHb) (No. de acceso AF309562 en la base de datos GenBank) y *Physcomitrella patens* (Arredondo-Peter et al., 2000), con otras Hbns y Hbsim, muestra que el tamaño de los péptidos disminuyó durante la evolución de las Hbs vegetales. El cambio principal se debe a la reducción en el tamaño de la pre-hélice A, que se localiza en el extremo N-terminal de las Hbns (Figura 2A en Ross et al., 2002, Capítulo I). El análisis de la pre-hélice A de CerHb muestra que en esta región existe una secuencia que es similar al sitio de corte por peptidasas, específicamente aquellas que eliminan las secuencias líder de las proteínas que atraviesan a las membranas. Esta observación sugiere que las Hbns primitivas pudieron ser exportadas desde el citoplasma al interior de un organelo. Las Hbtr del alga *Chlamydomonas eugametos* tienen un péptido señal para ingreso al cloroplasto que se localiza en el extremo N-terminal de la proteína. La función de las Hbtr de *C. eugametos* se desconoce, sin embargo, se ha observado que estas proteínas se localizan en el cloroplasto y que se regulan positivamente por la luz, lo cual sugiere que estas Hbtr funcionan durante la fotosíntesis (Couture et al., 1994). La comparación de la pre-hélice A de *Ceratodon* y

Physcomitrella con las Hbtr de *C. eugametos* mostró que existe homología en los aminoácidos que forman esta región, y que el carácter químico de los residuos de aminoácidos en las Hbns de los musgos, particularmente en CerHb es el mismo que el del péptido señal de la Hbtr de *C. eugametos*, es decir, esta región es rica en aminoácidos polares y no polares y carece de aminoácidos ácidos (Figura 2B en Ross et al., 2002, Capítulo I). El análisis *in silico* de la pre-hélice A de CerHb (Figura 6) permitió detectar la existencia de una hélice α , la cual está formada por aminoácidos polares y no polares. Esta observación resulta interesante, debido a que la formación de estructuras secundarias en el péptido señal es una característica común de varias proteínas que se importan al cloroplasto (Keegstra, 1989). Aunque las Hbns que se conocen son proteínas citoplásmicas, el análisis de la pre-hélice A de CerHb sugiere que las Hbns primigenias fueron proteínas que se localizaban en los organelos, y que con el tiempo se adaptaron para llevar a cabo su(s) función(es) en el citoplasma después de perder residuos de aminoácido en el extremo N-terminal.

Debido a la alta afinidad que tienen las Hbns por el O_2 , se ha propuesto que estas proteínas desempeñaron un papel importante en la adaptación de los organismos a la atmósfera oxidante durante el advenimiento de la fotosíntesis, y que su función primigenia fue secuestrar el O_2 o transferir electrones (Arredondo-Peter et al., 1998; Suzuki e Imai, 1998). Se ha reportado que las Hbs de diferentes organismos presentan actividad peroxidasa y dioxigenasa (Arredondo-Peter et al., 1998; Gardner et al., 1998), y por ello se cree que las Hbns funcionaban en los organelos al controlar los niveles de O_2 y ERO (como el H_2O_2 , NO y O_2^- , que se producen en la fotosíntesis y la fosforilación oxidativa) durante la colonización del medio terrestre por las plantas (Das et al., 1999; Neill et al., 2002). Sin embargo, durante la evolución las Hbns de los organelos pudieron ser reemplazadas por las Hbns citoplásmicas, las cuales se especializaron en realizar funciones variadas en los tejidos de

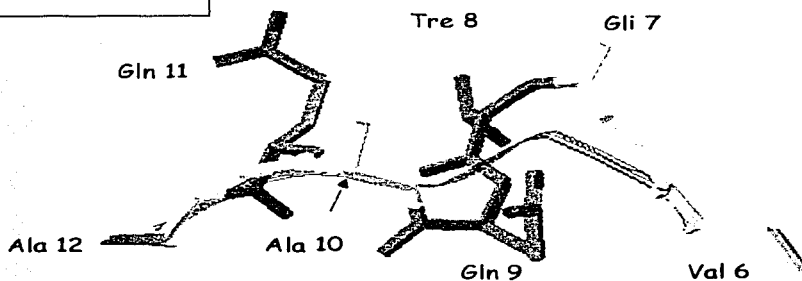
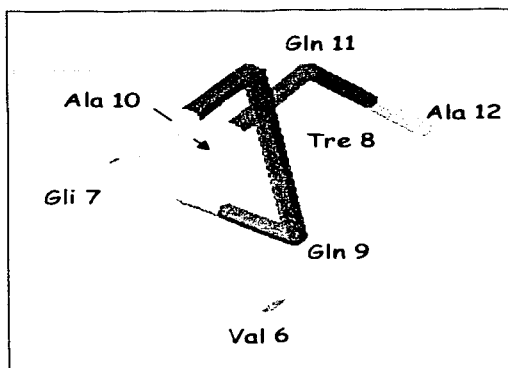


Figura 6 Modelamiento *in silico* de la pre-hélice A de CerHb. En el recuadro se muestra la vista frontal del esqueleto carbonado de la hélice que forman los aminoácidos 6 a 12. A la derecha se muestra la vista lateral de la misma hélice con la estructura de cada residuo de aminoácido. En color morado y magenta se muestra el modelo de listón predicho para esta región. Los colores de los aminoácidos indican su naturaleza química: los aminoácidos no polares se muestran en amarillo, y los aminoácidos polares en verde. La caracterización de la pre-hélice A de CerHb se realizó mediante el uso del programa SwissPdbViewer (<http://www.expasy.ch/spdbv/>)

la planta y en respuesta a cambios metabólicos y del medio ambiente.

CONCLUSIONES

El análisis de la expresión y síntesis de las Hbns que se llevó a cabo en esta tesis aportó información que es útil para entender las posibles funciones de este grupo de proteínas en la célula vegetal. Desde el punto de vista molecular, se mostró la existencia de una familia de genes *hbns* en el genoma del arroz, la cual está formada por las copias *hbns1* a 4. En la región 5' río arriba de los genes *hbns* del arroz se detectaron secuencias que tienen similitud con los promotores de otros genes vegetales y genes *hb* de diferentes organismos, así como cajas consenso que responden a las hormonas vegetales y que participan en la defensa de la planta contra los patógenos (Capítulo IIIb; Ross E.H.J., 2002 op. cit.). Estos resultados sugieren que los genes *hbns* del arroz se regulan diferencialmente en los órganos de la planta, tal como ocurre con los genes *hbns* de *A. thaliana* (Trevaskis et al., 1997; Hunt et al., 2001). El alineamiento de la secuencia de aminoácidos de las Hbns del arroz indica que la similitud entre dichas proteínas es muy alta: la identidad máxima existe entre Hb1 y Hb2 (93%), en tanto que la identidad menor ocurre entre Hb1 y Hb4 (79.2%). Los datos experimentales indican que Hb1 y Hb2 tienen una afinidad extremadamente alta por el O₂, la cual se debe a que la constante de disociación (K_{off}) es muy baja (Arredondo-Peter et al., 1997a; Ross E.H.J., 2002 op. cit.) Debido a esta característica es poco probable que las Hbns funcionen en los órganos de la planta como transportadores o sensores de O₂ (Arredondo-Peter et al., 1998; Hill, 1998). Sin embargo, las diferencias que existen en el crecimiento de los cultivos de *E. coli* recombinante cuando sintetizan a Hb1 o Hb2 del arroz, sugieren que Hb1 actúa *in vivo* como un transportador de O₂, en tanto que Hb2

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

actúa como un secuestrador de O_2 (Álvarez-Salgado E. y Arredondo-Peter R., comunicación personal). Estos datos también sugieren que la afinidad de algunas Hbns por el O_2 (Hb I, en este caso particular) se modifica *in vivo*. Se ha propuesto que las constantes cinéticas de las Hbns se podrían modificar mediante la interacción con otras moléculas, como resultado de un cambio en la estructura terciaria de estas proteínas (Arredondo-Peter et al., 1998; Sowa et al., 1999). En este trabajo se obtuvieron evidencias preliminares que sugieren que las Hbns del arroz interactúan con algún componente que está presente en los extractos solubles de las hojas y, además, mediante el análisis *in silico* se identificó una cavidad que se forma entre los extremos N- y C-terminal de Hb I (Figura 3), en donde se pueden alojar moléculas orgánicas o dominios proteínicos. Las observaciones anteriores sugieren que las características cinéticas de las Hbns pueden cambiar *in vivo*, lo que permitiría que estas proteínas puedan llevar a cabo diversas funciones que son adicionales o diferentes al transporte de O_2 .

El análisis de la detección de las Hbns en los órganos del arroz mostró que estas proteínas se localizan en los órganos embrionarios y vegetativos cuando las plantas crecen en condiciones normales (Capítulo IIIa). Además, la localización de las Hbns por microscopía confocal, y el análisis de expresión del gen *hb2* mostraron que las Hbns se expresan durante la diferenciación de los tejidos a lo largo del desarrollo de la planta, incluyendo a tejidos como el escutelo y la aleurona de la semilla, la cofia de la raíz, el tejido vascular de la raíz, hojas y flores, así como en la zona de abscisión de las flores (Ross et al., 2001; 2002. op. cit). Estos resultados sugieren que las Hbns realizan funciones que son importantes durante el desarrollo de la planta. Además, las Hbns del arroz, al igual que las Hbns de otras especies, tal como la cebada y *A. thaliana*, responden positivamente a condiciones de estrés, como la hipoxia y el estrés metabólico (Taylor et al., 1994; Trevaskis et al., 1997; Sowa et al., 1998; Capítulo IIIa). Estos resultados sugieren que las Hbns participan en la respuesta de la planta a ciertas

condiciones de estrés, particularmente al estrés energético.

La existencia de familias de genes *hbns* en el arroz (Capítulo IIIb), maíz (Sáenz Rivera J. op. cit.), *A. thaliana* (Trevaskis et al., 1997) y la soya (Andersson et al., 1996) resulta de gran interés, debido a que se ha demostrado que los genes *hbns* se expresan diferencialmente en los tejidos de la planta (Ross E.J.H. 2002. op. cit.; Hunt et al., 2001; Figura 5), lo que podría dar lugar a la síntesis de Hbns con diferentes características cinéticas. De este modo, se podrían sintetizar diferentes Hbns en los tejidos vegetales como respuesta a diversas condiciones fisiológicas durante el desarrollo de la planta, y en respuesta a las condiciones de estrés biótico y abiótico. En estas circunstancias, las Hbns vegetales podrían llevar a cabo funciones que son alternas al transporte del O₂, como es presentar actividad pseudoenzimática al metabolizar el H₂O₂ y NO, transferir electrones, o funcionar como oxidasas terminales (Wittenberg y Wittenberg, 1990; Arredondo-Peter et al., 1998; Gardner et al., 1998). Esta variedad de funciones se podrían regular en diferentes niveles, por ejemplo, desde la regulación de la expresión de los genes *hbns* por diferentes moduladores, como las hormonas vegetales, hasta la modulación de las constantes cinéticas, mediante la interacción de las Hbns con otras moléculas.

Con base en los resultados de esta tesis, y la información que se tiene acerca de las propiedades de las Hbns, en la figura 7 se presenta un modelo general que ilustra las posibles funciones de las Hbns en la planta. En la ruta 1 de este modelo se propone que la interacción de las Hbns con alguna molécula orgánica o un dominio proteínico (que se representa como la molécula X) podría inducir un cambio conformacional en la estructura de las Hbns, lo que resultaría en la disminución de la afinidad de la Hbns por el O₂; como consecuencia, esta situación permitiría que las Hbns funcionaran como transportadores o sensores de O₂. De este modo, las Hbns podrían contribuir a mantener el nivel energético cuando la célula tiene un metabolismo elevado, como en las células que forman a los tejidos

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

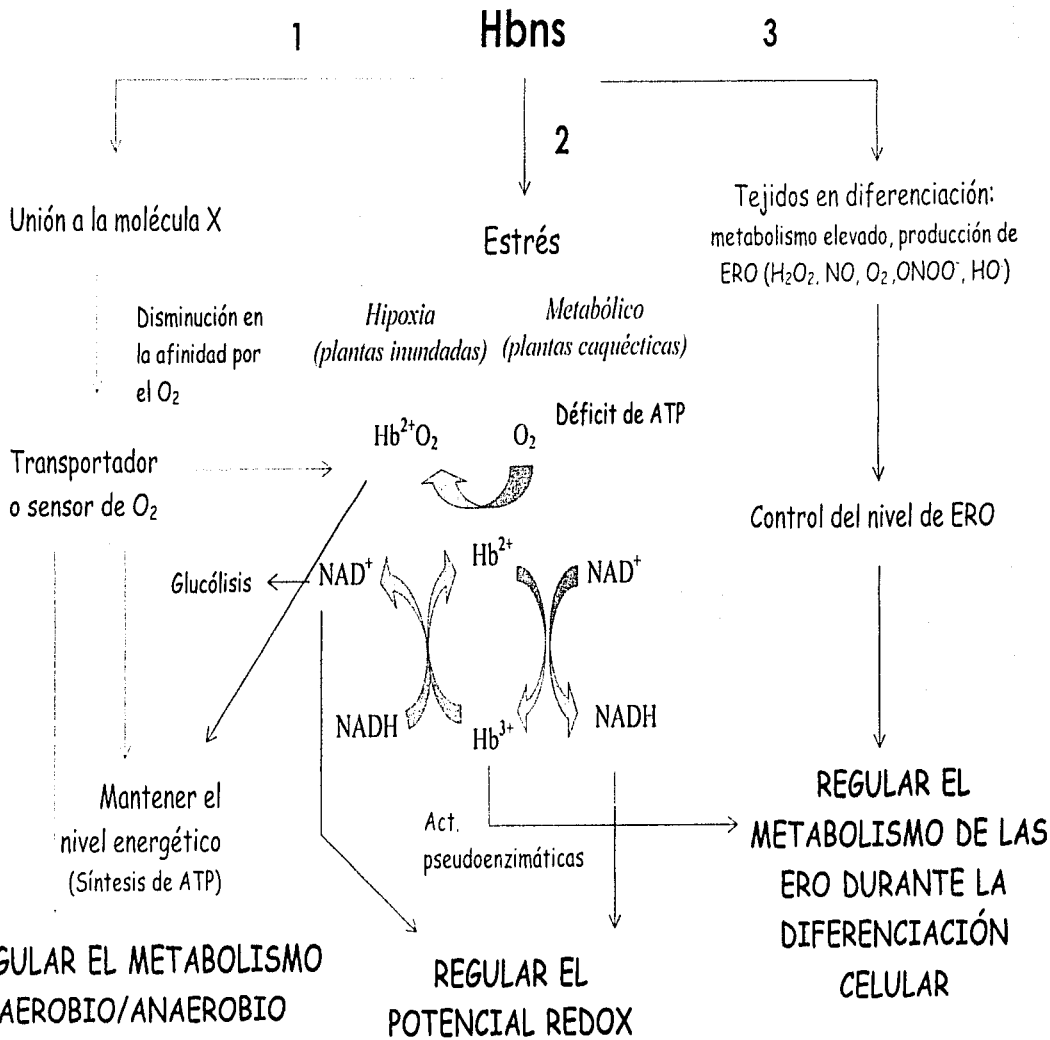


Figura 7. Modelo que ilustra las posibles funciones de las Hbns en las plantas. La explicación de las vías propuestas se describe en el texto.

en diferenciación, al transportar el O_2 hasta las mitocondrias para la síntesis de ATP. Por otro lado, las Hbns podrían funcionar en el sistema de regulación del metabolismo aerobio/anaerobio al detectar los cambios en la concentración del O_2 en el interior de la célula (Appleby et al., 1988).

La sobreexpresión de los genes *hbns* en las plantas que se someten a estrés por hipoxia o estrés metabólico resulta de interés debido a que las condiciones fisiológicas que generan estos tipos de estrés en la célula son opuestas. Es decir, en los tejidos que se someten a hipoxia se genera un ambiente reductor debido a la acidificación del medio y la acumulación de NADH (Drew, 1997). En cambio, en las plantas caquécticas se genera un ambiente oxidante debido a la acumulación de NAD^+ , la cual resulta de la ausencia de la actividad fotosintética. En este contexto, las Hbns podrían jugar un papel dual en la regulación del potencial redox al oxidar el NADH a NAD^+ durante la hipoxia para mantener la glucólisis (Hill, 1998), o al reducir al NAD^+ a NADH en las hojas caquécticas para generar el poder reductor que es necesario para mantener el desarrollo de las hojas (ruta 2 de la figura 7). En estas condiciones, el estado redox del Fe de las Hbns resultaría determinante para el funcionamiento de la proteína. Bajo condiciones de hipoxia la existencia de las Hbns en la forma Fe^{3+} permitiría la oxidación del NADH, para dar lugar al NAD^+ y $Hbns^{2+}$ (la cual puede unir al O_2 , para dar lugar a $Hbns^{2+}O_2$). Por otro lado, en los tejidos caquécticos la existencia de las Hbns en la forma Fe^{2+} permitiría la reducción del NAD^+ , para dar lugar a NADH y $Hbns^{3+}$ (la cual puede llevar a cabo actividades pseudoenzimáticas, como la actividad peroxidasa). La consecuencia general de la actividad de las Hbns en estas condiciones se traduce en la regulación de diversas vías metabólicas mediante el control del potencial redox, es decir, la proporción de NAD^+ a NADH, en la célula vegetal.

Diversas evidencias han mostrado que las Hbns se localizan en los tejidos que llevan a cabo el proceso de diferenciación celular, tal como la aleurona de la semilla, la cofia de la raíz, el tejido

vascular, las zonas de abscisión y los tejidos que sufrieron daño mecánico, así como en respuesta a la presencia de hormonas vegetales (Hunt et al., 2001; Ross EJH, 2002. op. cit). Es probable que las Hbns funcionen al mantener el nivel energético en dichos tejidos, mediante los mecanismos que se describieron en la ruta 1 de la figura 7. Sin embargo, es interesante hacer notar que la MCP es el destino de la mayoría de estos tejidos. La MCP se regula por los niveles de hormonas y de ERO, y se ha sugerido que las Hbs podrían tener actividades pseudoenzimáticas, y así participar en el metabolismo de las ERO, incluyendo al H_2O_2 y NO (Wittenberg y Wittenberg, 1990; Gardner et al., 1998). Por esta razón, en la ruta 3 de la figura 7 se propone que las Hbns podrían participar en el proceso de diferenciación celular al regular el metabolismo de las ERO.

En resumen, actualmente existen evidencias de que las Hbns son capaces de realizar diversas funciones que son alternativas al transporte de O_2 . Probablemente, estas funciones se llevan a cabo de manera simultánea en diferentes tejidos de la planta, y en respuesta a diversos estímulos fisiológicos. La comprensión detallada de la regulación de la expresión de los genes *hbns*, así como el avance en el estudio de las posibles interacciones de las Hbns con otras moléculas, permitirán definir el papel que desempeñan las Hbns en la regulación del metabolismo celular y su función en las plantas.

REFERENCIAS

- Andersson CR, Jensen EO, Llewellyn DJ, Dennis ES, Peacock WJ (1996) A new hemoglobin gene from soybean: a role for hemoglobin in all plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 5682-5687.
- Appleby CA, Bogusz V, Dennis ES, Peacock WJ (1988) A role for hemoglobin in all plant roots? *Plant Cell Environ* 11: 359-367
- Appleby CA, Tjepkema JD, Trinick MJ (1983) Hemoglobin in a nonleguminous plant *Parasponia*: possible genetic origin and function in nitrogen fixation. *Science* 220: 951-953
- Aréchaga-Ocampo E, Sáenz-Rivera J, Sarath G, Klucas RV, Arredondo-Peter R (2001) Cloning and expression analysis of hemoglobin genes from maize (*Zea mays* ssp. *mays*) and teosinte (*Zea mays* ssp. *parviglumis*). *Biochim Biophys Acta: Gene Struct Expr* 1522: 1-8.
- Arredondo-Peter R, Hargrove MS, Sarath G, Moran JF, Lohrman J, Olson JS, Klucas RV (1997a) Rice hemoglobins: gene cloning, analysis and oxygen-binding kinetics of a recombinant protein synthesized in *Escherichia coli*. *Plant Physiol* 115: 1259-1266
- Arredondo-Peter R, Moran JF, Sarath G, Luan P, Klucas RV (1997b) Molecular cloning of the cowpea (*Vigna unguiculata*) leghemoglobin II gene and expression of its cDNA in *Escherichia coli*, purification and characterization of the recombinant protein. *Plant Physiol* 114: 493-500.
- Arredondo-Peter R, Hargrove MS, Moran JF, Sarath G, Klucas RV (1998) Plant Hemoglobins. *Plant Physiol* 118: 1121-1126.
- Arredondo-Peter R, Ramírez M, Sarath G, Klucas RV (2000) Sequence analysis of an ancient hemoglobin cDNA isolated from the moss *Physcomitrella patens* (Accession No. AF218049). *Plant Physiol* 122: 1457.



Beligni MV, Lamattina L (2000) Nitric oxide stimulates seed germination and de-etiolation, and inhibits elongation, three light-inducible responses in plants. *Planta* 210: 215-221.

Beligni MV, Lamattina L (2001) Nitric oxide in plants: the history is just beginning. *Plant Cell Environm* 24: 267-278.

Bethke PC, Lonsdale JE, Fath A, Jones RL (1999) Hormonally regulated programmed cell death in barley aleurone cells. *Plant Cell* 11: 1033-1045.

Bogusz D, Appleby CA, Landsmann J, Dennis ES, Trinick MJ, Peacock WJ (1988) Functioning haemoglobin genes in a non-nodulating plant. *Nature* 331: 178-180.

Bogusz D, Llewellyn DJ, Craig S, Dennis ES, Appleby CA, Peacock WJ (1990) Nonlegume hemoglobin genes retain organ-specific expression in heterologous transgenic plants. *Plant Cell* 2: 633-641.

Couture M, Chamberland H, St-Pierre B, Lafontaine J, Guertin M (1994) Nuclear genes encoding chloroplast hemoglobins in the unicellular green alga *Chlamydomonas eugametos*. *Mol Gen Genet* 243: 185-197.

Das TK, Lee HC, Duff SMG, Hill RD, Peisach J, Rousseau DL, Wittenberg BA, Wittenberg JB (1999) The heme environment in barley hemoglobin. *J Biol Chem* 274: 4207-4212.

Davies MJ, Mathieu C, Puppo A (1999) Leghemoglobin: properties and reactions. *Adv Inorg Chem* 46: 495-542.

Delledonne M, Xia Y, Dixon RA, Lamb C (1998) Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature* 394: 585-588.

Delledonne M, Zeier J, Marocco A, Lamb C (2001) Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease resistance response. *Proc*

Natl Acad Sci USA 98:13454-13459

Drew MC (1997) Oxygen deficiency and root metabolism: injury and acclimation under hypoxia and anoxia. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 48: 223-250.

Duff SMG, Wittenberg JB, Hill RD (1997) Expression, purification and properties of recombinant barley (*Hordeum* sp.) hemoglobin: Optical spectra and reactions with gaseous ligands. *J Biol Chem* 272: 16746-16752.

Durner J, Gow AJ, Stamler JS, Glazebrook J (1999) Ancient origins of nitric oxide signaling in biological systems. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 14206-14207.

Durner J, Klessig DF (1999) Nitric oxide as a signal in plants. *Curr Op Plant Biol* 2: 369-374.

Durner J, Wendehenne D, Klessig DF (1998) Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP-ribose. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 10328-10333.

Fath A, Bethke P, Beligni V, Jones R (2002) Active oxygen and cell death in cereal aleurone cells. *J Exp Bot* 53: 1273-1282.

García-Mata C, Lamattina L (2002) Nitric oxide and abscisic acid cross talk in guard cells. *Plant Physiol* 128: 790-792.

Gardner PR, Gardner AM, Martin LA, Salzman AL (1998) Nitric oxide dioxygenase: An enzymic function for flavohemoglobin. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 10378-10383.

Goodchild DJ, Miller C (1997) Immunogold localisation of hemoglobin in *Casuarina* root nodules. *Protoplasma* 198: 130-134

Hargrove M, Brucker EA, Stec B, Sarath G, Arredondo-Peter R, Klucas RV, Olson JS, Philips Jr. GN (2000) Crystal structure of a non-symbiotic hemoglobin. *Structure* 8: 1005-1014.

Hendriks T, Scheer I, Quillet MC, Randoux B, Delbreil B, Vasseur J, Hilbert JL (1998) A

TESIS
FALLA DE ORIGEN

- nonsymbiotic hemoglobin gene is expressed during somatic embryogenesis in *Cichorium*.
Biochim Biophys Acta 1443: 193-197.
- Hill RD (1998) What are hemoglobins doing in plants? *Can J Microbiol* 76: 707-712.
- Holmberg N, Lilius G, Bailey JE, Bulow L (1997) Transgenic tobacco expressing *Vitreoscilla* hemoglobin exhibits enhanced growth and altered metabolite production. *Nature* 15: 244-247.
- Hunt PW, Watts RA, Trevaskis B, Llewelyn DJ, Burnell J, Dennis ES, Peacock WJ (2001) Expression and evolution of functionally distinct haemoglobin genes in plants. *Plant Mol Biol* 47: 677-692.
- Kallio WT, Kim DJ, Tsai PS, Bailey JE (1994) Intracellular expression of *Vitreoscilla* hemoglobin alters *Escherichia coli* energy metabolism under oxygen-limited conditions. *Eur J Biochem* 219: 201-208.
- Keegstra K (1989) Transport and routing of proteins into chloroplasts. *Cell* 56: 247-253.
- Koshla C, Bailey JE (1988) Heterologous expression of a bacterial haemoglobin improves the growth properties of recombinant *Escherichia coli*. *Nature* 331: 633-635.
- Neill SJ, Desikan R, Clarke A, Hurst RD, Hancock JT (2002) Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants. *J Exp Bot* 53: 1237-1247.
- Nie X, Hill RD (1997) Mitochondrial respiration and hemoglobin gene expression in barley aleurone tissue. *Plant Physiol* 114: 835-840.
- Ross EJH, Shearman L, Mathiesen M, Zhou J, Arredondo-Peter R, Sarath G, Klucas RV (2001) Nonsymbiotic hemoglobins are synthesized during germination and in differentiating cell types. *Protoplasma* 218: 125-133.

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci USA 74: 5463-5467
- Sowa AW, Duff SMG, Guy PA, Hill RD (1998) Altering hemoglobin levels changes energy status in maize cells under hypoxia. Proc Natl Acad Sci USA 95: 10317-10321.
- Sowa AW, Guy PA, Sowa S, Hill RD (1999) Nonsymbiotic hemoglobins in plants. Acta Biochim Pol 46: 431-445.
- Strozycki PM, Karlowski WM, Dessaux Y, Petit A, Legocki AB (2000) Lupine leghemoglobin I: expression in transgenic *Lotus* and tobacco tissues. Mol Gen Genet 263: 173-182.
- Suzuki T, Imai K (1998) Evolution of myoglobin. CMLS Cell Mol Life Sci 54: 979-1004.
- Taylor ER, Nie XZ, MacGregor AW, Hill RD (1994) A cereal haemoglobin gene is expressed in seed and root tissues under anaerobic conditions. Plant Mol Biol 24: 853-862
- Trevaskis B, Watts RA, Andersson SR, Llewellyn DJ, Hargrove MS, Olson JS, Dennis ES, Peacock WJ (1997) Two hemoglobin genes in *Arabidopsis thaliana*: the evolutionary origins of leghemoglobins. Proc Natl Acad Sci USA 94: 12230-12234
- Watts RA, Hunt PW, Hvitved AN, Hargrove MS, Peacock WJ, Dennis ES (2001) A hemoglobin from plants homologous to truncated hemoglobins of microorganisms. Proc Natl Acad Sci USA 98: 10119-10124.
- Weber R, Vinogradov SN (2001) Nonvertebrate hemoglobins: functions and molecular adaptations. Physiol Rev 81: 569-628.
- Wittenberg JB, Wittenberg BA (1990) Mechanism of cytoplasmic hemoglobin and myoglobin function. Annu Rev Biophys Chem 19: 217-241.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA