

Universidad Nacional Autónoma de México

Unidad Académica de los Ciclos Profesional y de Posgrado.
Colegio de Ciencias y Humanidades

Centro de Investigación sobre
Fijación de Nitrógeno.

Expresión Glutámico Sintetasa en la simbiosis
Rhizobium phaseoli-Phaseolus vulgaris.

Tesis para obtener la maestría en
Investigación Biomédica Básica
que presenta
José Luis Ortega Carranza.

Cuernavaca, Morelos.

2 Junio,
1988.

73428
✓



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.

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi agradecimiento a Federico Sánchez, Guadalupe Espin, Georges Dreyfus y especialmente a Miguel Lara por su orientación y apoyo desinteresado durante mi formación académica.

Hago extensivo mi agradecimiento a Gloria Soberón, Carmen Quinto, Alejandra Covarrubias y nuevamente a Miguel Lara y Federico Sánchez por la revisión de esta tesis.

Gracias a mis amigos y compañeros del CIFN por enriquecer mi existencia.

Este trabajo fue posible gracias al apoyo económico otorgado por el CIFN y el CONCYT.

INDICE.

INTRODUCCION.....	1
METODOLOGIA.....	11
RESULTADOS.....	15
FIGURAS.....	20
DISCUSION Y CONCLUSIONES.....	28
REFERENCIAS.....	34
Expression of two different glutamine synthetase polypeptides during root development in <u>Phaseolus vulgaris</u> L.....	39
Localization of the glutamine synthetase polypeptides in <u>Phaseolus</u> root nodules.....	43
Nodulins expression and nitrogen metabolism in <u>Phaseolus vulgaris</u> root nodules.....	46

INTRODUCCION.

La glutamino sintetasa (GS) es una enzima esencial en las plantas superiores, desempeña un papel fundamental en la asimilación de nitrógeno en estos organismos. Este trabajo se originó a partir del descubrimiento de que las isoformas de GS en los diferentes tejidos de frijol se constituyen de distintos polipéptidos que se denominaron alfa, beta, gama, a, b, c y d. El principal propósito de este trabajo fuè analizar la expresión de los polipéptidos alfa, beta y gama de GS, en un intento por entender el papel que desempeñan estos polipéptidos de GS en la asimilación primaria de amonio que se lleva a cabo en la raíz y en los nódulos de la raíz de Phaseolus vulgaris.

Ciclo GS/GOGAT.

En plantas superiores el amonio (NH_4^+) es asimilado por la acción combinada de dos enzimas: la glutamino sintetasa (GS) y la glutamato sintasa (glutamina: 2-oxoglutarato aminotransferasa, GOGAT), en lo que se ha denominado el ciclo GS/GOGAT. La GS cataliza la asimilación de amonio en glutamina que es utilizada por la GOGAT para generar glutámico a partir de 2-oxoglutarato. El resultado es la biosíntesis de glutamato a partir de amonio y 2-oxoglutarato (Mifflin, 1980). El amonio asimilado en los diferentes tejidos se origina de diversas fuentes de nitrógeno. Puede provenir directamente del suelo, de la fijación simbiótica de nitrógeno o como resultado de un proceso metabólico. El análisis de la GS en diferentes tejidos vegetales, ha revelado la existencia de varias isoformas de esta enzima.

En frijol (Phaseolus vulgaris), como en otras plantas, la GS tiene un peso molecular de 350 000 a 400 000 daltons y está constituida de ocho subunidades de 41 000 a 45 000 daltons (Stewart et al., 1980). Se ha demostrado que las diferentes isoenzimas de GS en frijol son resultado de la expresión de distintos polipéptidos (Lara et al., 1984) codificados por una

pequeña familia multigénica (Cullimore et al., 1984; Gebhardt et al., 1986).

La raíz.

La absorción de agua y nutrientes se debe a la capacidad que tienen las plantas para formar sistemas radiculares con un área de superficie extremadamente grande. La forma y el tipo de raíz en las diferentes especies es muy variable y es controlada tanto genéticamente como por el medio ambiente (Feldman, 1984).

En la mayoría de las dicotiledoneas, el sistema radicular consiste de una raíz principal de la cuál se originan ramificaciones laterales. El orden de aparición de las raíces laterales es de la base (la parte que se une al tallo) hacia la punta de la raíz principal.

El criterio más común de germinación de semillas es la emergencia de la radícula o raíz embrionaria que se desarrolla a partir del ápice del embrión, destinado desde su formación, a dar origen a esta estructura. La radícula está constituida por el meristemo de la raíz, que da origen a la raíz primaria y posteriormente a la raíz principal con sus ramificaciones (Fahn, 1982).

Una característica de las raíces es la presencia de una cubierta en la punta que protege al meristemo y ayuda a la penetración en el suelo de las raíces en crecimiento. Las células de la cubierta secretan una sustancia con gran contenido de polisacáridos y otros compuestos orgánicos, que envuelve la punta de la raíz. La secreción involucra la actividad de vesículas características de estas células (dictiostomas). Esta secreción probablemente contenga sustancias quimiotácticas que favorezcan la colonización por microorganismos (Gulash et al., 1984) e influyan en la formación de nódulos y en la asimilación de nutrientes (Barlow, 1975).

Detrás de la cubierta de la raíz hay una región denominada centro quiescente. En esta región no ocurre división celular alguna, pero si el meristemo de la raíz o la cubierta son dañados, el

centro quiescente se vuelve activo y puede regenerar cualquiera de éstos tejidos (Clowes, 1975).

La porción madura de la raíz funciona sólo de sostén y para almacenar materiales de reserva. La asimilación de agua y solutos se realiza en las extremidades del sistema radicular, es decir, en las regiones de la raíz que aún se encuentran en etapa de crecimiento primario, principalmente en la región donde el xilema primario es casi completamente maduro. Esta región es también donde se forman los pelos de la raíz (Fahn, 1982).

El proceso simbiótico.

Las bacterias del género Rhizobium pueden infectar las raíces de leguminosas dando como resultado la formación de nódulos fijadores de nitrógeno. La infección ocurre con mayor frecuencia en una región pequeña y variable de la raíz que está localizada entre la zona de elongación y la zona de pelos en desarrollo, específicamente, en aquellas células que van a dar origen a los pelos de la raíz. De esta manera, la infección queda restringida a una etapa transitoria en el desarrollo (Bhuvaneshwari et al., 1980; Halverston y Stacey, 1985).

Durante el proceso de infección ocurren una serie de interacciones celulares entre Rhizobium y su huésped, iniciando un complejo proceso de desarrollo que permite que la bacteria penetre a la raíz. La idea prevalente para explicar el mecanismo de reconocimiento es la unión de la bacteria a las células de los pelos por una interacción específica mediada por lectinas de la planta (Dazzo y Truchet, 1983; Halverston y Stacey, 1985).

Se han identificado algunos genes bacterianos involucrados en el proceso de nodulación (genes nod), fijación de nitrógeno (genes fix) y la síntesis de nitrógenasa (genes nif). En Rhizobium de crecimiento rápido como R. phaseoli, estos genes están localizados en plásmidos de alto peso molecular, denominados plásmidos sym. Los genes nod son inducibles por metabolitos de la planta que han sido identificados como compuestos fenólicos del

tipo de los flavonoides (Redmond et al., 1986; Peters et al., 1986; Firmin et al., 1986). Estos compuestos son metabolitos secundarios habituales en las plantas y se sintetizan de los mismos precursores que las fitoalexinas, compuestos producidos en respuesta a la infección por patógenos. La secreción de compuestos flavonoides, necesarios para la activación de los genes nod coincide en localización con la región de la raíz susceptible a la infección por Rhizobium (Djordjevic et al., 1987). Algunos compuestos isoflavonoides, comunes en exudados vegetales, antagonizan la inducción de los genes nod.

Aparentemente, durante el proceso de nodulación, los genes nod están sujetos a una regulación por moléculas activadoras y antagonistas específicas (Firmin et al., 1986).

Durante la infección por Rhizobium ocurren eventos característicos como el enroscamiento de los pelos de la raíz, inducción de la actividad meristemática de las células corticales de la raíz y la formación del hilo de infección, estructura formada en las células de los pelos, por medio de la cuál los Rhizobia entran a la planta. Los genes nod A, B, C y D son responsables de la estimulación de estas respuestas iniciales del huésped a la infección (Peters et al., 1986).

Las bacterias causan distorsión y enroscamiento de los pelos de la raíz, provocando la migración del núcleo hacia el sitio de infección y modificando el patrón de crecimiento de los pelos (Dart, 1974) de manera que la pared celular se sintetiza hacia dentro de la célula formando el hilo de infección. Durante el crecimiento del hilo de infección Rhizobium se divide y prolifera. Mientras tanto, la actividad meristemática de las células corticales de la raíz es estimulada por alguna señal de la bacteria (Dudley et al., 1987). El hilo de infección penetra hacia las células corticales en división que formarán el tejido del nódulo. La región central del tejido en formación se diferencia en dos tipos celulares que van a dar origen las células infectadas y a las no infectadas; diferentes en

ultraestructura y metabolismo en cuanto a síntesis de ureidos (Newcomb y Tandon, 1981). El hilo de infección libera las bacterias por un proceso similar a endocitosis, dando origen a las células infectadas (Morrison y Verma, 1987). Durante este proceso, las bacterias se diferencian en bacteroides capaces de fijar nitrógeno. Los bacteroides liberados quedan envueltos en una membrana de origen vegetal denominada membrana peribacteroidal. Esta estructura representa una importante interfase en el intercambio de metabolitos entre el bacteroide y la planta, además de estar involucrada en interacciones que permiten un adecuado desarrollo del nódulo (Brewin et al., 1985). El proceso de desarrollo del nódulo involucra la participación específica de algunos genes del huésped. Los productos de estos genes (nodulinas) son responsables del apropiado desarrollo del nódulo y de mantener las condiciones metabólicas adecuadas para la reducción y asimilación del nitrógeno (Verma et al., 1986). Las nodulinas incluyen a la leghemoglobina y algunas enzimas importantes en el metabolismo del nitrógeno y el carbono del nódulo, como la forma nódulo específica de uricasa (Sanchez et al., 1987; Bergmann et al., 1983), el polipéptido nódulo específico de la glutamino sintetasa (gama) (Lara et al., 1984; Cullimore et al., 1984) y sacarosa sintetasa (Thummler y Verma, 1987). Además de las anteriores, varios estudios han demostrado cambios en los niveles de actividad de algunas enzimas, asociados con la aparición de actividad de nitrogenasa. Entre estas se encuentran actividades enzimáticas importantes como GOGAT, PEP carboxilasa, glutamato deshidrogenasa y asparagino sintetasa (Robertson y Farnden, 1980). La inducción de algunas de estas actividades posiblemente se deba a la síntesis de isoformas nódulo específicas.

Algunas otras nodulinas se han identificado por patrones de traducción *in vitro* en soya (Legocki y Verma, 1980), chícharo (Govers et al., 1985), alfalfa (Lang Unnash y Ausubel, 1985) y frijol (Campos et al., 1987), en la mayoría de los casos su papel

en el desarrollo y metabolismo del nódulo se desconoce. Algunas de ellas están asociadas a la membrana peribacteroidal del nódulo y probablemente participen en su formación (Fortin et al., 1985, 1987; Sandal et al., 1987; Jacobs et al., 1987). Una de las características importantes de algunas leguminosas que pertenecen a la familia Phaseolidae, como el frijol, es que cuando están noduladas por Rhizobium sintetizan ureidos a partir del amonio derivado de la fijación simbiótica de N_2 . Estos compuestos resultan de la síntesis de novo de purinas y su posterior degradación oxidativa (Schubert, 1986). En frijol (Phaseolus), soya (Glycine) y cowpea (Vigna) se han caracterizado algunas de las enzimas de la vía de degradación de purinas como Uricasa, Xantina deshidrogenasa, 5'-nucleotidasa, Purina nucleosidasa, Alantoinasa, Inosina monofosfato oxido-reductasa (Larsen y Jochimsen, 1987). De estas enzimas, solo uricasa puede ser considerada como una nodulina. El estudio de algunas de estas enzimas revela una compartimentalización celular y subcelular en la vía de síntesis de ureidos. La mayoría de las reacciones ocurren en las células infectadas, pero los pasos finales de la síntesis se realizan en las células no infectadas (Webb y Newcomb, 1987).

Asimilación de amonio.

Durante la germinación es esencial que las áreas en crecimiento tengan un aporte de aminoácidos. En la mayoría de las semillas el nitrógeno se almacena como proteína insoluble, aunque en varias leguminosas se almacenan cantidades considerables de aminoácidos no protéicos (homoserina, canavanina, gama-metilglutamina) y ureidos. Después de agotar el nitrógeno almacenado en las semillas, las plantas dependen de la raíz para obtener nitrógeno. Este es suministrado como NO_3^- o NH_4^+ del suelo o como NH_4^+ derivado de la fijación de N_2 . (Lea y Mifflin, 1980). Después que el nitrógeno ha sido asimilado en la raíz o nódulos, debe ser conducido hacia las hojas y semillas en formación. El

NO_3^- puede transportarse por el xilema sin ser metabolizado. su reducción a NH_4^+ puede llevarse a cabo tanto en la raíz como en las hojas (Oaks y Hirel, 1985). El NH_4^+ no es un constituyente normal del xilema, debe ser incorporado a un compuesto orgánico para prevenir su acción tóxica.

Se ha demostrado que la asparagina y la glutamina son importantes compuestos de transporte de nitrógeno en las plantas. Estos compuestos son fácilmente transferidos del xilema hacia el floema y al contrario, y pueden ser utilizados para transportar nitrógeno hacia los meristemas de la raíz y el tallo en crecimiento. La asparagina puede actuar como única fuente de nitrógeno para sostener el crecimiento de embriones jóvenes y cotiledones aislados. Los datos sugieren que la asparagina es metabolizada rápidamente por la enzima asparaginasa. En plantas se ha encontrado que la mayoría de la actividad de asparaginasa está distribuida en las raíces y en semillas en etapa de maduración. La actividad de asparaginasa es suficiente para suministrar el nitrógeno requerido para el incremento en el contenido de proteína de la semilla. Se ha podido demostrar que que el amonio liberado por la asparaginasa es reasimilado por la vía GS/GOGAT para su incorporación a las proteínas de la semilla (Lea y Mifflin, 1980).

Algunas leguminosas tropicales, como el frijol, sintetizan ureidos cuando están noduladas por Rhizobium. Estos compuestos se usan para transporte y almacenamiento de nitrógeno. Los ureidos más importantes en los sistemas biológicos son alantoína y ácido alantoico (Atkins, 1982). Estos compuestos presentan convenientes para el transporte de nitrógeno reducido a un mínimo costo de carbono. La producción de ureidos no es resultado directo de la formación del nódulo, sino un mecanismo de respuesta a la presencia de altas concentraciones de nitrógeno reducido. La expresión de algunas enzimas de la vía de síntesis de ureidos puede ser inducida por una baja concentración de oxígeno (Larsen y Jochimsen, 1987). Los ureidos se metabolizan en la cubierta de

la semilla o en las vainas, sin llegar nunca al embrión; la glutamina y asparagina son los compuestos de los que se nutre el embrión en desarrollo (Rainbird et al., 1984). Las enzimas involucradas en la degradación de ureidos son la alantoinasa y la alantoicasa. La alantoinasa, que cataliza la hidrólisis de alantoína a ácido alantóico, se ha encontrado en nódulos, tallos, hojas y vainas. La actividad de alantoicasa, que cataliza la degradación de ácido alantóico, corresponde a la alantoato amidinohidrolasa (Winkler et al., 1985). Esta enzima se encuentra en extractos de semillas en desarrollo y cataliza la conversión de ácido alantóico a NH_4^+ , CO_2 y ureidoglicolato. El amonio liberado en la degradación de ureidos debe ser asimilado por la vía GS/GOGAT para ser incorporado a las proteínas de la semilla. El desprendimiento de CO_2 que ocurre durante el proceso de fotorrespiración en las plantas C_3 involucra indirectamente la producción de NH_4^+ durante una reacción de oxidación de glicina en la mitocondria. La cantidad de NH_4^+ que se libera es tal que excede en un orden de magnitud lo calculado para la asimilación primaria de NH_4^+ (Keys et al., 1978). Se han aislado mutantes deficientes en GS, demostrando que la asimilación del NH_4^+ producido durante la fotorrespiración se lleva a cabo por la vía GS/GOGAT (Wallsgrave et al., 1987). Estas mutantes también demuestran la importancia de la GS cloroplástica (GS_2) en el ciclo del nitrógeno durante la fotorrespiración.

Heterogeneidad de la glutamino sintetasa.

Una vez que el amonio es asimilado en la raíz o nódulos, debe ser liberado y reasimilado varias veces en los diferentes tejidos durante el ciclo de vida de la planta, antes de entrar a formar parte de la semilla. Coincidente con estas diferentes situaciones en la asimilación de amonio, el análisis de la GS en los tejidos vegetales que se han estudiado, ha evidenciado la existencia de distintas isoformas de GS con distintos perfiles de elución en cromatografía de intercambio iónico. Algunas de estas isoformas

están asociadas a compartimientos celulares o tejidos específicos (McNally et al., 1983; Hirel y Gadai, 1980; Lara et al., 1983, 1984; Cullimore et al., 1983; Tingey et al., 1987).

En Phaseolus vulgaris se han caracterizado varias isoformas de GS. Se ha reportado que en el nódulo se presentan dos isoformas (GS_{n1} y GS_{n2}), una de las cuales es específica de este tejido (GS_{n1}), mientras que la otra (GS_{n2}) comigra con la única isoforma que se ha encontrado en la raíz (GS_r). (Cullimore et al., 1983; Lara et al., 1983). De la misma manera se han detectado en hoja dos isoformas, una en el citoplasma (GS₁), idéntica a la GS_r y otra específica del cloroplasto (GS₂) (Lara et al., 1984). La presencia de estas isoformas es el resultado de diferencias en su composición polipeptídica. Se han identificado siete diferentes polipéptidos que constituyen las diferentes isoenzimas de GS en Phaseolus vulgaris. Los polipéptidos alfa y beta son las subunidades de la GS_r y la GS₁ de hoja. Mientras que los polipéptidos a, b, c y d forman parte de la isoforma GS₂ de cloroplasto. La GS en nódulos está constituida por polipéptidos beta y gama, beta es el monómero predominante de la GS_{n2} y gama de la GS_{n1} (Lara et al., 1984). El polipéptido gama de GS es específico del tejido del nódulo. Este polipéptido comienza a expresarse antes de que se detecte actividad de nitrogenasa (Padilla et al., 1987). Su expresión se incrementa durante el desarrollo del nódulo, coincidente con el aumento en actividad de la GS_{n1} (Lara et al., 1983).

En frijol, lo mismo que en chícharo y soya, se ha demostrado que los diferentes polipéptidos de GS se codifican por una familia de genes relacionados, que se expresan diferencialmente en los distintos tejidos de la planta (Cullimore et al., 1984; Gebhardt et al., 1986; Tingey et al., 1987; Sengupta-Gopalan et al., 1986).

La heterogeneidad de GS en los tejidos vegetales plantea interrogantes respecto a la importancia biológica de los diferentes genes de GS y sus productos. Esta tesis se realizó con

el objetivo de analizar el significado fisiológico de los diferentes polipéptidos de GS, una enzima fundamental en el metabolismo del nitrógeno y tratar de comprender el papel que desempeñan en la asimilación primaria del amonio proveniente de distintas fuentes de nitrógeno, tanto en la raíz como en los nódulos de la raíz de Phaseolus vulgaris.

METODOLOGIA.

Material biológico. El material utilizado proviene de semillas de frijol (Phaseolus vulgaris) cultivar negro jamapa, proporcionada por PRONASE. Las raíces embrionarias fueron obtenidas por disección de semillas, removiendo los cotiledones y las hojas embrionarias. Las raíces no infectadas se obtuvieron de plantas de 8 a 14 días crecidas en macetas con vermiculita estéril en el invernadero, regando cada tercer día con solución nutritiva y agua alternativamente. Las raíces jóvenes se obtuvieron de plantas germinadas en obscuridad a 30°C. Los tejidos se congelaron a -70°C hasta ser usados.

Los nódulos se obtuvieron a los 24 días de infección con Rhizobium. Las semillas se esterilizaron con una solución de hipoclorito de sodio, se germinaron en charolas esteriles, se trasladaron a macetas, se infectaron con un cultivo de Rhizobium phaseoli CIAT 899 (Graham, 1980) y se crecieron en el invernadero, regando con solución nutritiva sin nitrógeno y agua alternativamente.

Preparación de extractos. Los extractos de raíz se prepararon por maceración del tejido en hielo seco, en presencia de 5% (peso/volumen) de polivinil polipirrolidona. El macerado se resuspendió en buffer de extracción (100mM de Tris-Cl pH 8.4, 10mM de acetato de magnesio y 10mM de 2-mercaptoetanol), se filtró por gasa y se centrifugó a 18 000x g. El sobrenadante (extracto crudo) se enriqueció en actividad de GS por precipitación con sulfato de amonio entre el 35 y 70% de saturación. El precipitado se resuspendió en buffer de lavado (10mM Tris pH 8.4, 10mM acetato de magnesio, 10mM 2-mercaptoetanol) y se dializó en una columna de Sephadex G-25. Todos los procedimientos se realizaron a 4°C.

Los extractos de nódulo se prepararon por homogenización del tejido en buffer TED (50mM Tris-Cl pH 8.8, 5mM EDTA, 1mM DTT) con 5% p/v PVPP. El homogenado se sonicó y se centrifugó a 18 000x g.

Fraccionamiento celular de nódulos.

La fracción peribacteroidal de nódulos se purificó por el procedimiento descrito en Fortin et al. (1985) con algunas modificaciones. Aproximadamente 40 gramos de nódulos frescos se homogenizaron suavemente en un mortero con 50 ml de buffer TED con 0.5M de sacarosa, en presencia de 5% p/v de PVPP. El homogenado se filtró por gasa y se centrifugó a 400x g por 10 min. El sobrenadante se centrifugó 90 min a 100 000x g sobre un gradiente discontinuo de 54 y 60% de sacarosa. La interfase 54/60 que consiste de bacteroides envueltos en membranas peribacteroidales (fracción peribacteroidal) se diluyó con buffer al 17% de sacarosa y se centrifugó 45 min a 100 000x g. El pellet se resuspendió en buffer TED sin sacarosa para romper las membranas por shock osmótico. La suspensión de bacteroides y membranas se centrifugó sobre un gradiente de 35, 45 y 60% de sacarosa a 100,000x g por 90 min. El sobrenadante (fluido peribacteroidal) se concentró y se dializó. El pellet (bacteroides) se resuspendió en buffer con 1% de SDS, se sonicó y se centrifugó a 10 000x g para obtener la proteína soluble. Las membranas peribacteroidales se recuperaron de la interfase 35/45 y se centrifugaron a 100 000x g por 45 min. El pellet de membranas se resuspendió en buffer con 60mM Na₂CO₃, 60mM DTT, 1% SDS y se centrifugó a 80 000x g para remover el material insoluble.

Determinación de proteínas y actividad enzimática. La actividad de GS se midió por el ensayo de transferasa (Ferguson y Sims, 1974). 1 unidad de transferasa equivale a 1umol de gama-glutamilhidroxamato formado por minuto. La actividad de GS en geles nativos se detectó por el ensayo de transferasa (Barrat, 1980), incubando 90 min. a 30°C.

La concentración de proteína se determinó por el metodo de Lowry (Lowry et al., 1951) y en el caso de proteínas de membrana por el metodo de Bradford (1976).

Cromatografía de intercambio iónico. Para la separación de isoformas de GS se utilizaron volúmenes de extracto enriquecido en GS equivalentes a 25 unidades de transferasa que se aplicaron a una columna de DEAE Sephacel de 1 x 8 cm, equilibradas en buffer de lavado. La columna se lavó con 40 ml de buffer antes de eluir con un gradiente lineal de KCl de 0 a 275mM en buffer de lavado. Se colectaron fracciones de 1 ml en las que se midió la actividad de GS. 100ug de proteína de los picos de mayor actividad de las fracciones predominantes de GS se precipitaron con 4 volúmenes de acetona por incubación durante 20 min. a -20°C, se centrifugaron 10 min a 10 000 x g. y se corrieron por electroforesis.

Electroforesis de proteínas. La electroforesis de proteínas nativas se realizó a 4°C en geles sin SDS al 7.5% de concentración de acrilamida conforme al procedimiento descrito por Laemli (1970), excepto que el pH final del gel resolvente fue 8.15 (Robert y Wong, 1986).

Las diferentes muestras de proteína se analizaron en geles desnaturalizantes de SDS (Laemli, 1970) o en geles de doble dimensión (O'Farrell, 1975). Los geles se tiñeron por comassie o se transfirieron a nitrocelulosa por el método de Western (Towbin et al., 1979). En los casos de productos de traducción, se utilizó fluorografía para detectar la marca radioactiva.

Análisis de la composición de GS. La composición de polipéptidos de GS se determinó por electroforesis en geles de doble dimensión a partir de inmunoprecipitados de GS de extractos crudos o de productos de traducción, usando anticuerpos dirigidos contra GS de nódulo. La composición de GS también se determinó por Western, con anticuerpos antiGS.

Aislamiento de RNA polisomal y traducción in vitro.

Para la obtención de RNA polisomal se aislaron polirribosomas por centrifugación diferencial y el RNA se extrajo por el procedimiento descrito por Christoferson y Laties (1982) con algunas modificaciones (Maniatis et al., 1982). Aproximadamente

10ug de RNA polisomal fueron traducidos in vitro en un lisado de reticulocito de conejo preparado de acuerdo a lo descrito por Pelham y Jackson (1976).

Microscopía electrónica y tinción con oro coloidal.

Los nódulos se fijaron con 2% de glutaraldehído en fosfato de potasio 50mM y posteriormente con tetraóxido de osmio en el mismo buffer. El tejido fijado se deshidrató con concentraciones crecientes de etanol y se incluyó en resina epoxica (Spurr, 1969). De las inclusiones se obtuvieron cortes semifinos para microscopía electrónica. Los cortes se trataron con metaperiodato de sodio para exponer los sitios antigénicos. Posteriormente se saturaron los sitios no antigénicos con albúmina al 2% en PBS, antes de incubar con el anticuerpo antiGS diluido 1 a 1000 en PBS, se saturaron con suero normal de cabra y se añadió un segundo anticuerpo (cabra anticonejo) conjugado a partículas de oro coloidal. Los cortes ya tratados se tiñeron con acetato de uranilo y citrato de plomo y se observaron al microscopio electrónico.

RESULTADOS.

Expresión de los polipéptidos alfa y beta de GS en la raíz de frijol.

Se ha reportado que la GS en raíz de frijol está constituida de dos polipéptidos denominados alfa y beta (Lara et al., 1984). Con el fin de tener un conocimiento del significado funcional de los polipéptidos alfa y beta de GS, se examinó su patrón de expresión durante el desarrollo de la raíz por electroforesis en geles de dos dimensiones, a partir de inmunoprecipitados de extractos de raíces de diferentes edades.

El análisis electroforético (fig. 1) muestra que en etapas tempranas de desarrollo el componente más abundante de la GS es el polipéptido alfa. A partir de los 2 días, la presencia del componente beta se incrementa, de tal manera que la GS en raíces maduras está constituida casi exclusivamente de polipéptidos beta.

Para determinar si la expresión diferencial de estos polipéptidos se debía a la expresión de dos especies moleculares distintas o era resultado de modificaciones postraduccionales, se analizó la expresión de la GS por inmunoprecipitación de productos de traducción de RNA polisomal obtenido de raíces de diferentes edades. Como puede observarse (fig. 2), la expresión de los polipéptidos alfa y beta corresponde a la expresión de dos distintos mensajeros. Esto se ha demostrado por la identificación de dos diferentes clonas de cDNA de GS en la raíz de frijol (Gebhardt et al., 1986). La proporción entre los monómeros alfa y beta de los productos de traducción es similar a la proporción que se observa en los extractos de raíz de la misma edad, demostrando que no existen modificaciones postraduccionales de estos polipéptidos y sugiriendo que la expresión de GS en el desarrollo es regulada a nivel transcripcional.

Dado el patrón de desarrollo de la raíz, es posible encontrar diferencias en la relación alfa/beta en diferentes zonas de la

raíz que probablemente corresponden a distintos estadios de diferenciación o diferentes tipos celulares. En la figura 3 puede observarse que a los 14 días de desarrollo la expresión del polipéptido alfa se mantiene en la zonas de crecimiento de la raíz (fig. 3a); mientras que en la región madura, la GS se encuentra constituida casi exclusivamente de polipéptidos beta. Un estudio similar sobre la expresión de la GS se ha realizado en nódulos de frijol (Padilla et al., 1987). Este análisis ha demostrado también una expresión diferencial de los polipéptidos alfa, beta y gama durante el desarrollo del nódulo (Padilla et al., 1987).

La expresión diferencial de los polipéptidos alfa y beta sugería la existencia de al menos dos isoformas en la raíz de frijol. Los resultados muestran que la GS de raíz está constituida por diferentes isoformas, en distintas etapas del desarrollo.

Isoformas de glutamino sintetasa en la raíz de frijol.

Para establecer la relación entre la expresión de los polipéptidos alfa y beta y la presencia de diferentes isoformas de GS en raíz, se analizó el perfil de actividad de la enzima en tejidos de diferentes edades, por cromatografía de intercambio iónico, utilizando un gradiente lineal de KCl. Los resultados muestran que la raíz embrionaria presenta dos isoformas (fig. 4) que se denominaron GSR₁ y GSR₂. La GSR₁ está compuesta de polipéptidos beta y es idéntica a la GSR de raíces maduras. La GSR₂ está constituida de polipéptidos alfa (fig. 5). Esta es una isoforma distinta a las que han sido reportadas en otros tejidos y parece ser específica del tejido meristemático de frijol. Como puede verse en la figura 4, la expresión diferencial de los polipéptidos alfa y beta en la raíz durante el desarrollo, se refleja en la composición de isoformas de GS.

A los 4 días de desarrollo de la raíz los polipéptidos alfa y beta se encuentran casi en la misma proporción. El perfil de elución en DEAE en esta etapa de desarrollo puede explicarse por

la presencia de varias isoenzimas, resultado de diferentes proporciones en las asociaciones alfa/beta. Esto mismo puede observarse cuando se analiza la GS por electroforesis nativa en gel de acrilamida y se tiñe el gel por actividad de transferasa (fig. 6). Con este procedimiento, a los 4 días de edad, se detecta una región de actividad que corresponde a múltiples isoformas de GS con diferente movilidad electroforética, mientras que solo se detecta una banda de actividad en raíces maduras y dos bandas de actividad de transferasa en raíces embrionarias. Las múltiples isoformas de GS a los 4 días podrían ser resultado de reasociaciones al azar de monómeros durante la homogenización del tejido, no obstante, en la raíz embrionaria aparecen dos isoformas claramente definidas, descartando posibles artificios en el análisis. Estos resultados sugieren que a los 4 días de edad, la GS de raíz puede estar constituida por heterooligómeros formados por diferentes proporciones de ambos monómeros. De manera semejante, se ha encontrado diferentes asociaciones entre los polipéptidos beta y gama en la GS de nódulos de frijol. Puesto que la GS es un octámero, existen nueve tipos distintos de posibilidades de asociación entre dos clases de polipéptidos (Robert y Wong, 1986).

Localización de los polipéptidos de GS en nódulos de frijol.

En el análisis del papel fisiológico de los polipéptidos de GS, surgió la idea de que el polipéptido nódulo específico (gama) podía estar involucrado directamente en la asimilación del amonio producido en el bacteroide durante la fijación simbiótica de N_2 . Existían antecedentes de que cierta actividad de GS estaba asociada a alguna estructura membranal del nódulo, por su solubilidad a Tritón X100. Esta estructura podía ser la membrana peribacteroidal que envuelve a los bacteroides. Para estudiar esta posibilidad se analizó la localización de la GS en nódulos por medio de fraccionamiento de organelos e inmunodetección con anticuerpos contra la GS de nódulo.

Los resultados (fig. 7) muestran que la mayor proporción de GS se encuentra en la fracción soluble del nódulo, pero que cierta proporción de GS puede observarse en las membranas peribacteroidales (fig. 7b). La ausencia de leghemoglobina en las membranas, una proteína abundante en la fracción soluble (fig. 7a), descarta la posibilidad de contaminación por proteínas citoplasmicas.

La GS que se encuentra en las membranas peribacteroidales esta constituida de polipéptidos beta y gama, con una mayor proporción del polipéptido específico del nódulo (gama, Fig. 8).

La cantidad de GS en las membranas peribacteroidales es pequeña, si se compara la cantidad de proteína de las diferentes fracciones teñidas por coomassie (fig. 7a). Por esta razón no era posible asignarle un papel significativo en la asimilación de amonio a la GS de esta fracción. Existía la posibilidad de que la GS estuviera presente, además de en las membranas peribacteroidales, en el espacio comprendido entre el bacteroide y las membranas peribacteroidales (fluido peribacteroidal).

En la figura 9 puede observarse que la GS se encuentra en la fracción soluble del nódulo (fig. 9b, carril 2) y que cierta proporción de GS se encuentra en las membranas peribacteroidales y en el fluido peribacteroidal (fig. 9b carriles 3 y 5).

En la fracción de fluido peribacteroidal se puede observar la presencia de leghemoglobina (fig 9a, carril 5). Algunos autores consideran esto como indicio de contaminación por proteínas de la fracción soluble (Fortin et al., 1985). Sin embargo, otros autores han reportado que cierta proporción de leghemoglobina se encuentra en la fracción peribacteroidal del nódulo (Appleby, 1984). Para demostrar que la GS en el fluido peribacteroidal no era un artificio debido a contaminación por proteínas de otras fracciones celulares, se analizó la presencia de GS y uricasa en las diferentes fracciones. La uricasa es una proteína abundante en el nódulo, que se ha localizado en los peroxisomas de las células no infectadas (Nguyen et al., 1985).

La inmunodetección con anticuerpos específicos contra GS y uricasa (fig. 10) muestra que la GS se encuentra en el extracto crudo, en la fracción soluble y en la fracción peribacteroidal del nódulo (fluido peribacteroidal y membranas peribacteroidales), mientras que la uricasa solo se observa en el extracto crudo y en la fracción soluble, descartando una posible contaminación. Este análisis también demuestra que durante la homogenización del tejido hay ruptura de organelos, sugiriendo que la proporción de GS que corresponde a la fracción peribacteroidal puede ser significativa.

Para confirmar la presencia de GS en la fracción peribacteroidal del nódulo, se llevó a cabo el análisis de localización por tinción con oro coloidal en cortes de nódulo, utilizando anticuerpos antiGS y anticuerpos acoplados a partículas de oro. La microscopía electrónica de las secciones de nódulo tratadas con anticuerpo antiGS confirma la presencia de la GS en el espacio que rodea a los bacteroides (fig. 11b). Un control tratado con suero preinmune en lugar del anticuerpo antiGS demuestra que no hay tinción inespecífica (fig. 11a).

Para demostrar el papel de los polipéptidos de GS en la asimilación del amonio derivado de la fijación de nitrógeno, se analizó la composición de la GS en las diferentes fracciones. La inmunodetección con anticuerpos antiGS revela que la GS del extracto total de nódulo está constituida de una proporción similar de polipéptidos beta y gama (fig 12a), la GS de la fracción soluble se compone principalmente de polipéptidos beta (fig. 12b), mientras que la GS del fluido peribacteroidal está constituida de una mayor proporción del polipéptido nódulo específico (gama).

Estos resultados sugieren que la asimilación de amonio derivado de la fijación de nitrógeno en el bacteroide puede llevarse a cabo en la fracción peribacteroidal del nódulo y que el polipéptido gama está involucrado en la asimilación de amonio en este compartimiento celular.

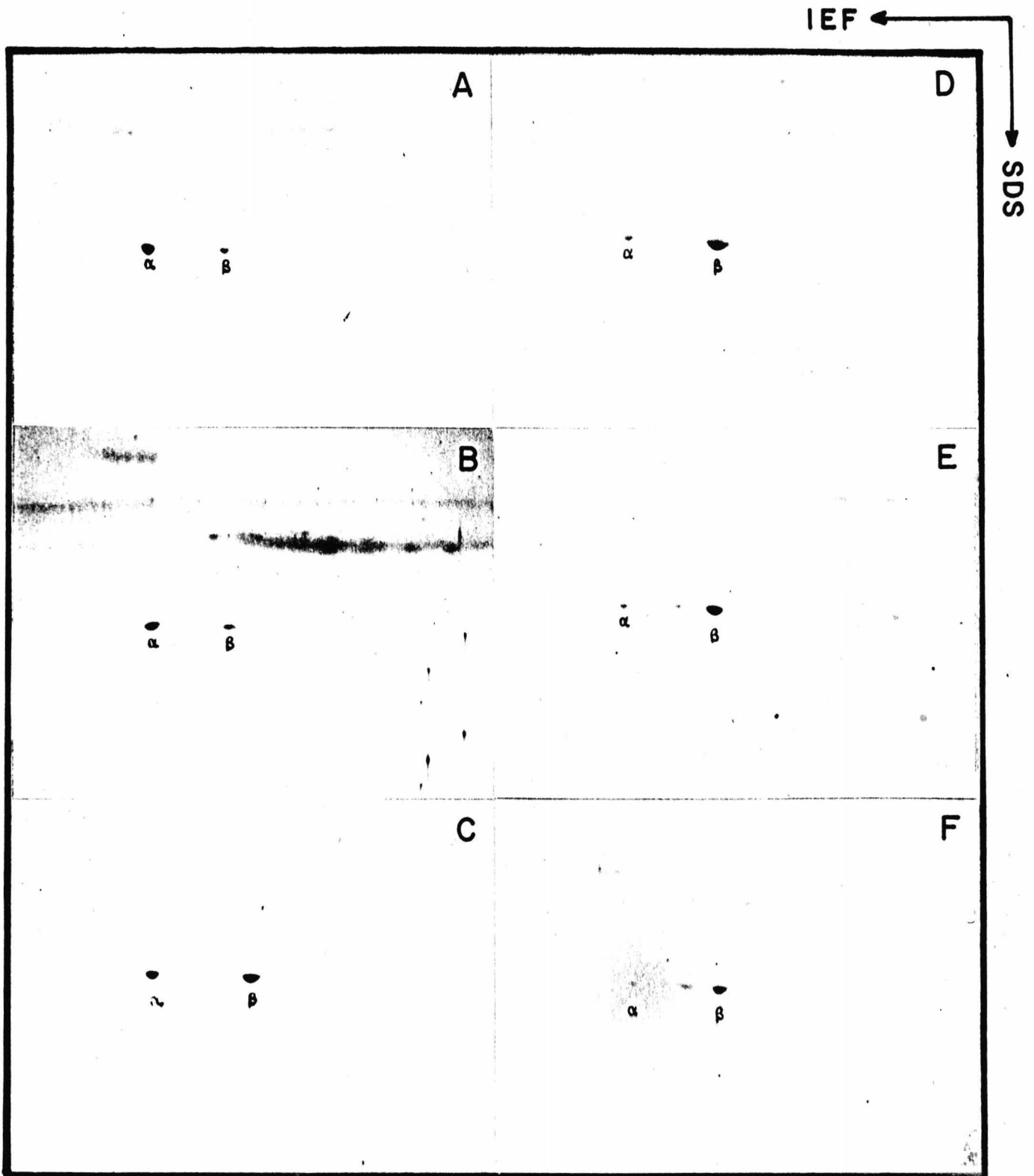


Figura 1. Análisis electroforético en dos dimensiones de inmunoprecipitados de GS de extractos de raíz embrionaria (A) y de raíces de 2 (B), 4 (C), 8 (D), 10 (E) y 14 días.

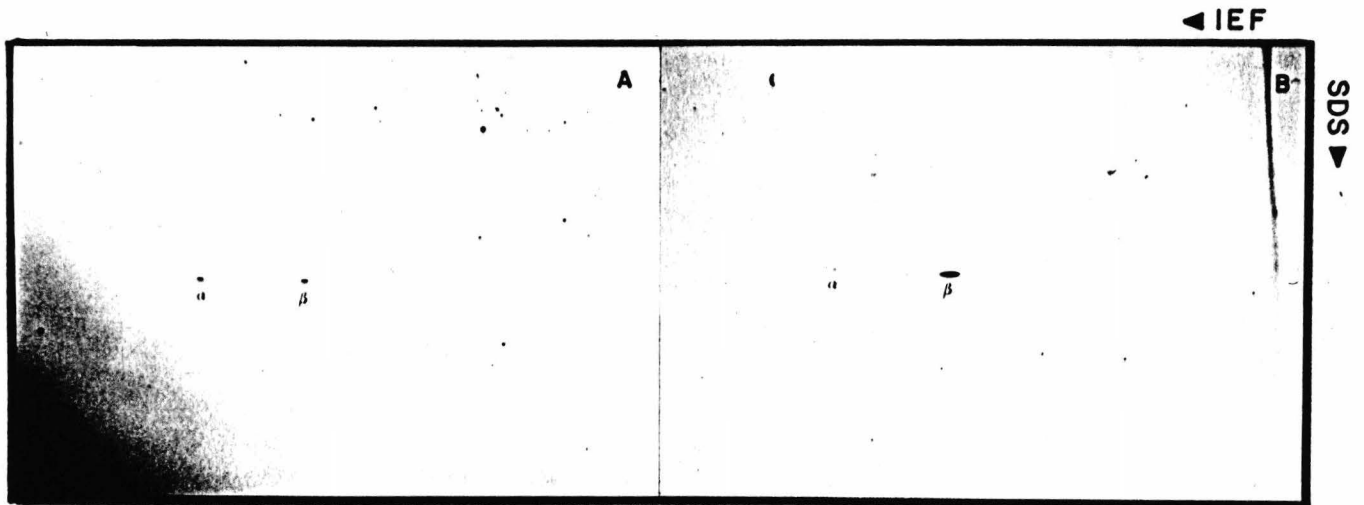


Figura 2. Electroforesis en dos dimensiones de inmunoprecipitados de GS de productos de traducción de RNA de raíces de 5 (A) y 8 (B) días de edad

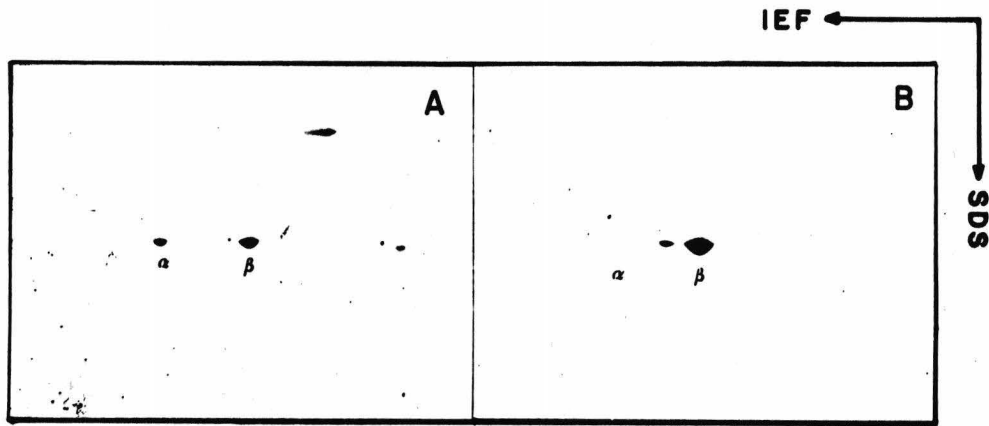


Figura 3. Composición de GS de distintas zonas de la raíz a los 14 días de crecimiento. Inmunoprecipitados de GS de las puntas de la raíz (A) y de la porción madura (B) se corrieron por electroforesis en dos dimensiones y se tiñeron con coomasie.

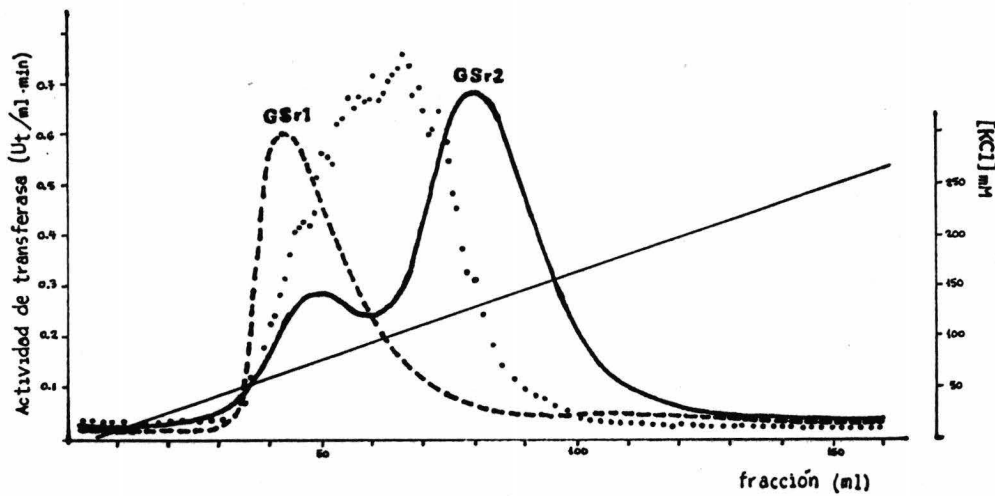


Figura 4. Perfiles de actividad de GS en columnas de DEAE-Sephacel. 25 unidades de transferasa fueron aplicados a la columna y eluidas con un gradiente lineal de KCl. (—) Raíz embrionaria. (.....) Raíz de 4 días. (----) Raíz de 14 días.

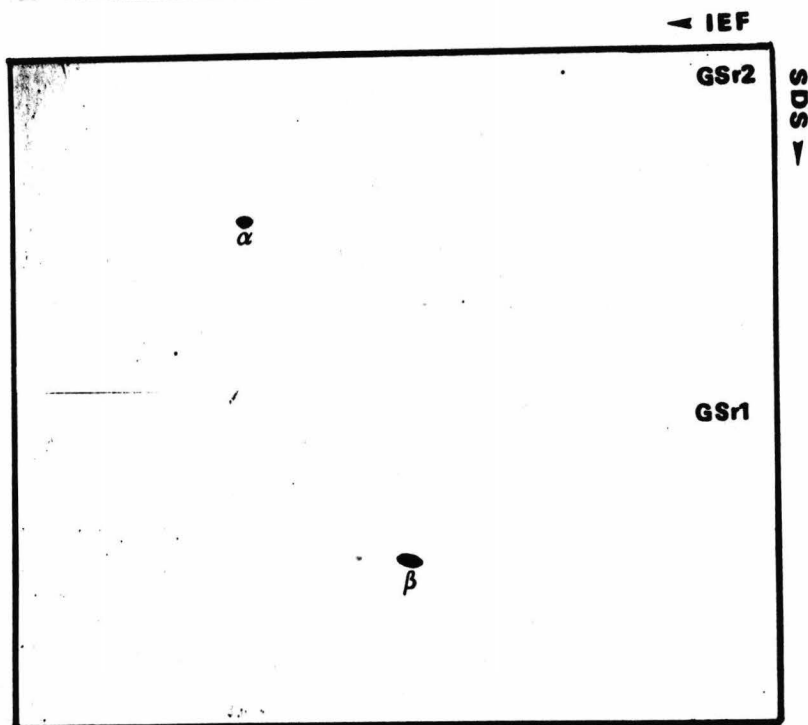


Figura 5. Análisis en de la composición de isoformas de la GS de raíz embrionaria por electroforesis en dos dimensiones seguida de inmunodetección en papel de nitrocelulosa utilizando anticuerpo anti-GS de nódulo.

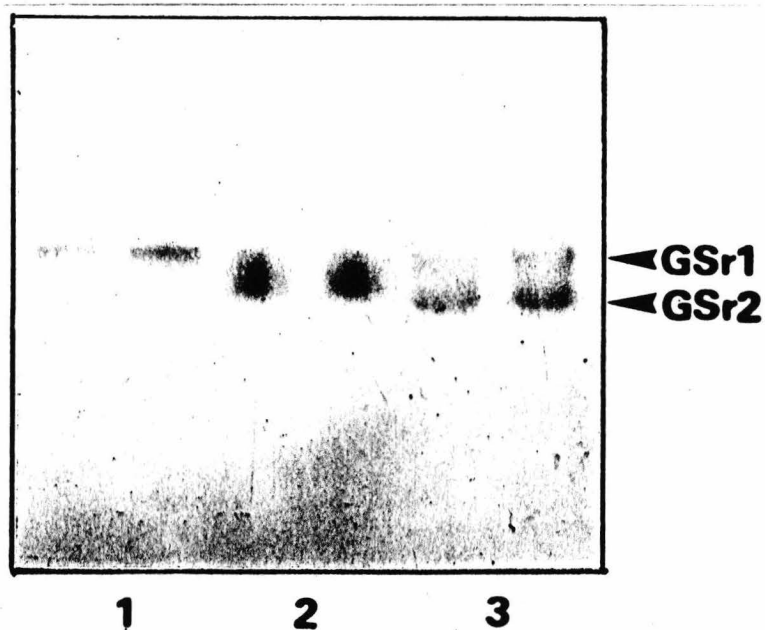


Figura 6. Electroforesis en gel nativo de acrilamida al 7.5%. La GS se detectó por actividad de transferasa. 1, Raíz de 14 días; 2, Raíz de 4 días; 3, Raíz embrionaria. Cada carril tiene 0.3 unidades de tranferasa.

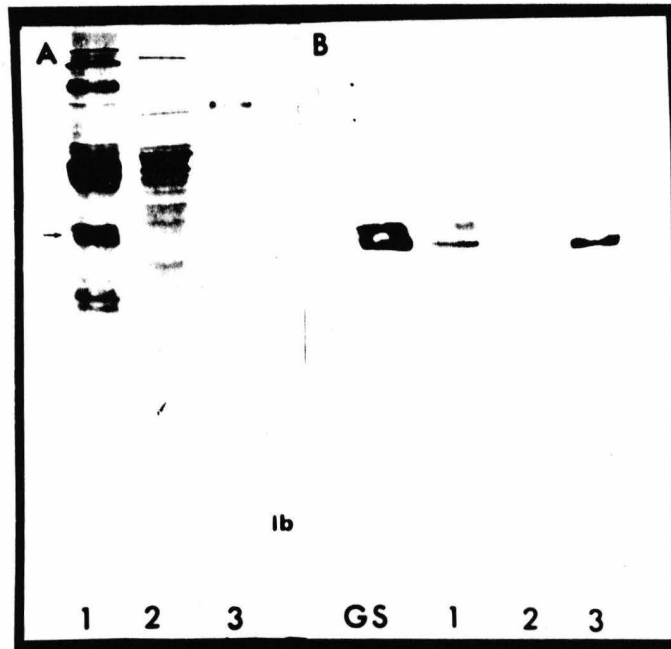


Figura 7. Electroforesis en poliacrilamida de diferentes fracciones celulares de nódulo, las proteínas se tiñeron por coomassie (A) y se analizaron por western (B) con anticuerpos antiGS. 1, membranas peribacteroidales. 2, bacteroides. 3, fracción soluble. La migración de la GS se marca con una flecha. La leghemoglobina se indica con lb. El carril GS corresponde a 3 μ g de GS pura.

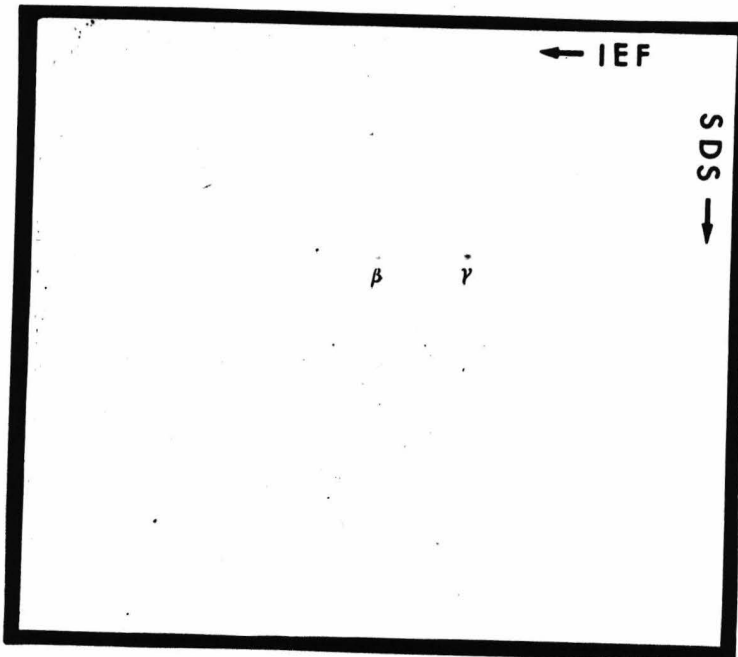


Figura 8. Composición de GS de membranas peribacteroidales. La GS se detectó por Western con anticuerpos antiGS, después de electroforesis en dos dimensiones.

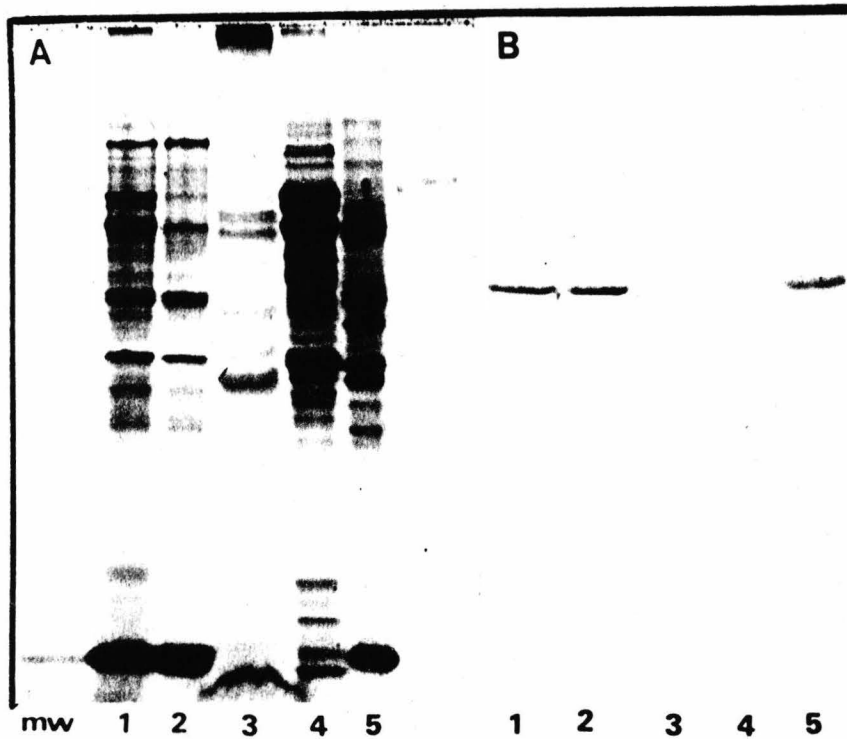


Figura 9. Detección de GS en diferentes fracciones celulares de nódulo. (A) Proteínas teñidas por coomassie. (B) Western con anticuerpos antiGS. 1, extracto crudo. 2, fracción soluble. 3, membranas peribacteroidales (mpb). 4, bacteroides. 5, fluido peribacteroidal (fpb).

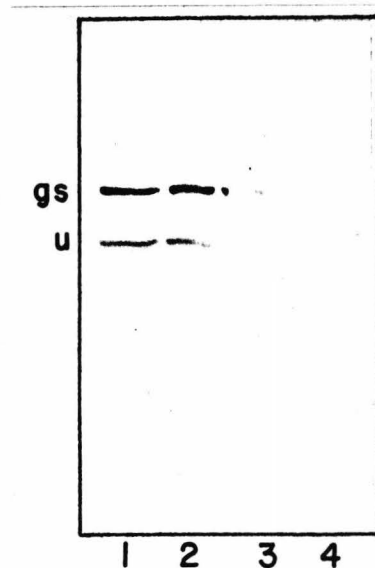


Figura 10. Inmunodetección de GS y uricasa en diferentes fracciones de nódulo. 1, extracto crudo. 2, fracción soluble. 3 y 4, fracción peribacteroidal (mpb + fpb).

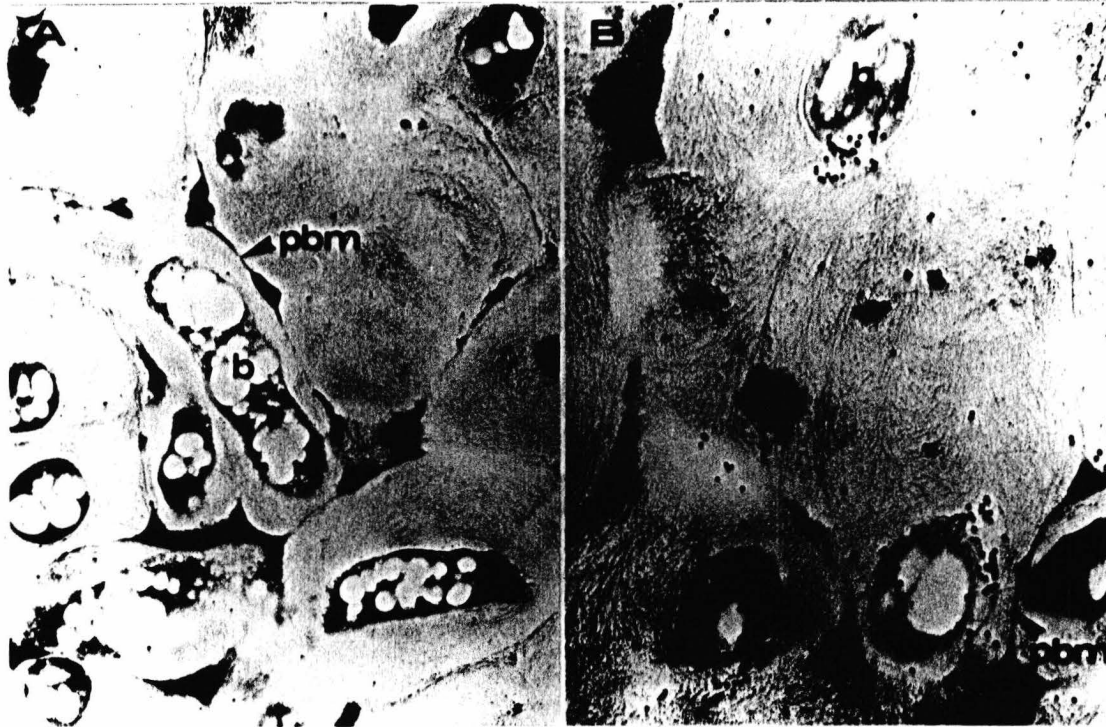


Figura 11. Tinción con oro coloidal de la GS en nódulos. Cortes de nódulo de 24 días se incubaron con suero preinmune (A) o anticuerpo antiGS (B) y se tiñeron con partículas de oro acopladas a un segundo anticuerpo. Se pueden observar bacteroides (b) envueltos en membranas peribacteroidales (pbm).

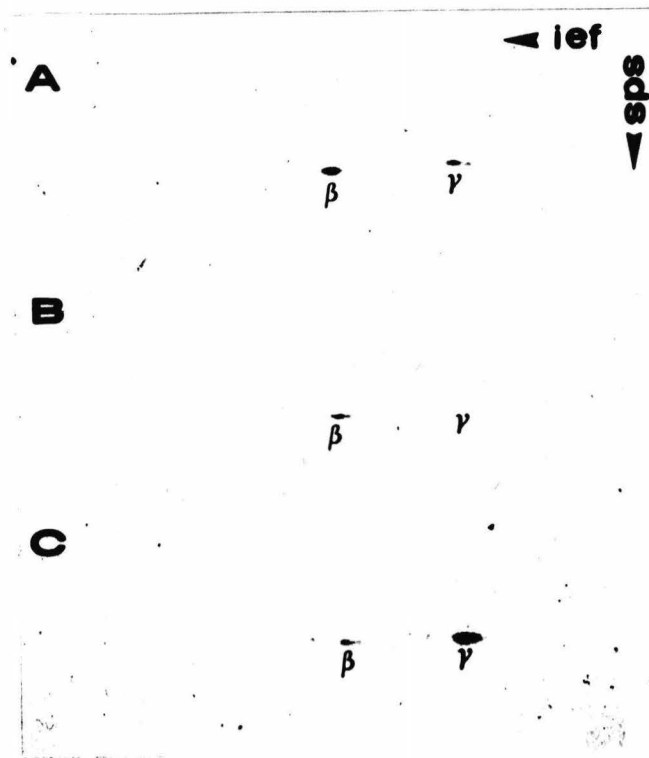


Figura 12. Composición de GS en fracciones celulares de nódulo. 120ug de proteína se corrieron por electroforesis en dos dimensiones y se analizaron por western con anticuerpos antiGS. A, extracto crudo. B, fracción soluble. C, fluido peribacteroidal. beta y gama son los polipéptidos de GS.

DISCUSION Y CONCLUSIONES.

La glutamino sintetasa es una enzima fundamental en el metabolismo de las plantas, pues constituye el primer paso en la via de asimilación de amonio (Miflin, 1980).

El amonio en los diferentes tejidos vegetales puede derivarse de diversas fuentes de nitrógeno (Lea y Miflin, 1980). Este hecho puede estar relacionado con la heterogeneidad de la GS. Las distintas isoformas de GS probablemente deban funcionar en situaciones que suponen diversas condiciones metabólicas. Las distintas condiciones de asimilación de amonio pudieran requerir enzimas con diferente estabilidad, pH óptimo o diferentes características en la regulación de su actividad. La considerable heterogeneidad en isoformas de GS que resulta de la diferente relación en las asociaciones de polipéptidos alfa y beta ó beta y gama (Robert y Wong, 1986) apoya la idea de una regulación a nivel de actividad enzimática. El comportamiento enzimático de algunas isoformas de GS en frijol, no revela diferencias significativas en cuanto a la afinidad por sus sustratos (Cullimore et al., 1983), sin embargo la actividad de GS puede ser regulada por algunos metabolitos como nucleótidos, algunos aminoácidos y metales divalentes (Stewart et al., 1980). Un análisis de los factores que regulan la actividad de las diferentes isoformas de GS será de utilidad en la comprensión del papel que desempeñan en el esquema general del metabolismo del nitrógeno en los diferentes tejidos.

Los polipéptidos de GS se expresan diferencialmente durante el desarrollo. Dado el patrón de desarrollo de la raíz, es posible que exista una distribución espacial de isoenzimas de GS, en donde las isoformas constituidas de una mayor proporción de polipéptidos alfa predominen en el tejido meristemático, en los extremos de la raíz; mientras que las isoformas compuestas de mayor proporción de monómeros beta predominen hacia las zonas maduras, en la base de la raíz. Sin embargo, el significado

fisiológico de la existencia de distintas isoformas de GS en la raíz de frijol, queda aún por resolverse.

La presencia del polipéptido alfa en la raíz embrionaria sugiere que la síntesis de GSr₂ es activada durante la embriogénesis. Es posible que la GSr₂ desempeñe alguna función en la asimilación del amonio durante la formación de la semilla y seguramente tiene un papel fundamental durante las primeras etapas de desarrollo, en las que el aporte de nitrógeno proviene de la degradación de proteínas de reserva. La permanencia de la GSr₂ en el tejido embrionario y el hecho de que en nódulos, la expresión del polipéptido alfa se mantiene aún después de que el RNA mensajero ha dejado de transcribirse (Padilla et al., 1987), sugieren que esta isoforma es muy estable. Esta debe ser una característica muy adecuada para una enzima que debe almacenarse en la semilla por largo tiempo y conservar su actividad para ser utilizada durante la germinación. Queda la posibilidad de que la GSr₂ este asociada a alguna estructura subcelular donde pueda almacenarse durante la embriogénesis, impidiendo la acción de proteasas presentes en el tejido embrionario (Higgins, 1984) y la posibilidad de que en el tejido meristemático, donde la expresión de la GSr₂ se mantiene, cierta proporción de la enzima se encuentre compartamentalizada. Se ha demostrado la presencia de GS en plástidos aislados a partir de meristemas de raíz de chícharo y alfalfa (Vézina et al., 1987). La GS que se encuentra en estos organelos es diferente de las isoformas cloroplástica o citoplásmica.

La mayoría de los reportes están de acuerdo en que en nódulos, la GS se encuentra en el citoplasma y que el amonio producido por la fijación de nitrógeno es excretado por el bacteroide hacia el citoplasma de la célula vegetal, donde es asimilado (Boland et al., 1980; Robertson y Farnden, 1980). En este trabajo, en el análisis del papel funcional de las diferentes isoformas de GS en frijol, se ha encontrado que cierta proporción de GS está asociada a la fracción peribacteroidal del nódulo (membranas

peribacteroidales y fluido peribacteroidal); sugiriendo que la asimilación de amonio puede llevarse a cabo en este compartimiento celular. La presencia de GS en la fracción peribacteroidal está en acuerdo con un reporte sobre la localización de enzimas de asimilación de amonio en nódulos de frijol (Awonaike et al., 1981), que ha mostrado que aunque la mayor parte de la actividad de GS se encuentra en la fracción citoplásmica, puede detectarse actividad de GS en alguna fracción particulada del nódulo.

La proporción de GS que se encuentra en el fluido peribacteroidal no ha podido ser cuantificada, debido a la falta de marcadores apropiados que permitan evaluar el porcentaje de recuperación de esta fracción del nódulo. La abundancia de uricasa en la fracción soluble del nódulo (fig. 10) sugiere que una gran proporción de peroxisomas se rompen durante la homogenización del tejido; la proporción de membranas peribacteroidales que se rompen también podría ser considerable, en tal caso, la GS que corresponde a la fracción peribacteroidal podría representar una cantidad importante de la GS total del nódulo. Para comprender la importancia de la GS peribacteroidal en la asimilación de amonio en el nódulo, será necesario obtener un estimado del porcentaje de GS que corresponde a esta fracción con respecto a la GS total del nódulo.

La presencia de GS en la fracción peribacteroidal no parece deberse a una contaminación, por el hecho de que uricasa, una proteína muy abundante en el nódulo, no se detecta en esta fracción (fig. 10); además de que existen diferencias en composición polipeptídica entre la GS citoplásmica y la GS peribacteroidal (fig. 12). Aún cuando haya diferencias en composición, la GS que se encuentra en el fluido peribacteroidal podría ser resultado de una asociación específica o inespecífica de GS citoplásmica a las membranas peribacteroidales. Sin embargo, se sigue detectando GS en la fracción peribacteroidal de una preparación que ha sido digerida con tripsina antes de la

lisis osmótica, con el fin de eliminar todas las proteínas expuestas por el lado citoplásmico de las membranas peribacteroidales, indicando que la GS se encuentra dentro de la fracción peribacteroidal. Por otro lado, la tinción con oro coloidal revela la presencia de GS en el espacio que rodea a los bacteroides (fig. 11), hay que destacar que con esta metodología, pero utilizando anticuerpos contra uricasa, esta enzima puede detectarse exclusivamente en los peroxisomas de las células no infectadas, como ha sido reportado en otras leguminosas (Nguyen et al., 1985; Webb y Newcomb, 1987).

La presencia de una GS peribacteroidal plantea algunas preguntas en cuanto al significado de su localización con respecto al metabolismo del nódulo. El compartimiento peribacteroidal es el sitio donde el amonio es excretado desde el bacteroide hacia el citoplasma. El amonio debe ser incorporado rápidamente a un compuesto orgánico y la presencia de GS en este compartimiento podría regular el flujo de amonio hacia el citoplasma, evitando una acción tóxica. La presencia de GS en el compartimiento peribacteroidal también plantea interrogantes respecto a las señales que determinan su localización. Es probable que la presencia del polipéptido gama sea importante para la translocación de la GS. Sin embargo, aparentemente no existen modificaciones postraduccionales del polipéptido gama que puedan explicar la compartimentalización (Padilla et al., 1987). Es importante investigar los factores involucrados en el proceso de compartimentalización, que probablemente estén estrechamente relacionados con la biogénesis de la membrana peribacteroidal. Se ha demostrado que la heterogeneidad de la GS está relacionada con la expresión de una familia de genes. La expresión de estos genes depende de factores tejido específicos (Cullimore et al., 1984; Gebhardt et al., 1985). La regulación en la expresión de GS ofrece aspectos interesantes para su estudio. Las condiciones metabólicas o los factores de desarrollo podrían involucrar diferentes circuitos de regulación que requieran de la actividad

de distintos promotores para su expresión tejido-específica o temporal durante el desarrollo. Los distintos genes de GS podrían formar parte de conjuntos de genes regulados por distintos programas de diferenciación.

Es muy probable que los factores que inducen la expresión del polipéptido gama de GS durante la simbiosis, dependan de señales simbióticas, puesto que su expresión comienza antes de que se detecte actividad de nitrogenasa (Padilla et al., 1987). En soya se ha demostrado que la expresión de GS depende de la disponibilidad de amonio tanto en raíz como en nódulos (Hirel et al., 1987). Sería importante averiguar si la concentración de amonio influye sobre la expresión de los polipéptidos alfa, beta y gama, o solo de beta, que es constitutivo, a diferencia de alfa y gama que son tejido-específicos.

Durante la embriogénesis debe haber una inducción en la expresión del gen del polipéptido alfa, la presencia de este polipéptido en las zonas de crecimiento de la raíz sugiere que la expresión de este gen debe mantenerse en los meristemos de la raíz y en los meristemos del tallo que finalmente van a dar origen a las semillas.

Los productos alfa y beta de GS en la raíz de frijol se expresan de manera diferencial tanto en las distintas etapas de desarrollo, como en las distintas zonas de la raíz. Esto debe ser resultado de la expresión diferencial de estos genes. El patrón de expresión sugiere la existencia de factores tanto espaciales como temporales involucrados en la regulación de los genes de alfa y beta, que posiblemente respondan a señales hormonales. Las señales involucradas en la expresión de GS pueden ser de naturaleza diversa. El entendimiento de los mecanismos moleculares que determinan la expresión de los polipéptidos de GS probablemente será importante para comprender algunos procesos de diferenciación de la planta, como el desarrollo del nódulo y la embriogénesis.

Parte de los resultados de este trabajo han sido publicados en los siguientes artículos:

Ortega J.L., F. Campos, F. Sánchez y M. Lara (1986) Expression of two different glutamine synthetase polypeptides during root development in Phaseolus vulgaris L. *Plant Physiol.* 80: 1051-1054.

Lara M., J.L. Ortega y B. Valderrama (1987). Localization of the glutamine synthetase polypeptides in Phaseolus root nodules. In: Verma D.P.S. y N. Brisson (eds.) *Molecular genetics of plant-microbe interactions*, 142-144. Nijhoff, Dordrecht.

Lara M., J.L. Ortega, B.E. Olguín y F. Sánchez (1988). Nodulins expression and nitrogen metabolism in Phaseolus vulgaris root nodules. In: *Proceedings of the VIIth international congress on nitrogen fixation*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart (en prensa).

REFERENCIAS.

- Appleby CA (1984). Leghemoglobin and Rhizobium respiration. Ann Rev Plant Physiol 35: 442-478.
- Atkins CA (1982). Ureide metabolism and the significance of ureides in legumes. In: Advances in agricultural microbiology. Oxford. Nueva Delhi, 22-51
- Awonaike KO, PJ Lea y BJ Miflin (1981). The localization of the enzymes of ammonia assimilation in root nodules of Phaseolus vulgaris L. Plant Sci Lett 23: 189-195.
- Barlow PW (1975). The root cap. In: Torrey JG y Clarkson DT (eds). The development and function of roots, 21-54. Academic press. New York.
- Barratt DHP (1980). Method for the detection of glutamine synthetase activity on starch gels. Plant Sci Lett 18: 249-254
- Bhuvanewari TV, GB Turgeon, WD Bauer (1980). Early events in the infection of soybean (Glycine max L. Merr). Plant Physiol 66:1027-1031.
- Boland MJ, KJF Farnden y JG Robertson (1980). Ammonia assimilation in nitrogen-fixing legume nodules. In: WE Newton y WH Orme-Johnson (eds). Nitrogen fixation, vol II, 33-52. University Park Press, Baltimore.
- Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 72: 248-254.
- Brewin NJ, JG Robertson, EA Wood, B Wells, AP Larkins, G Galfre y GW Butcher (1985). Monoclonal antibodies to antigens in the peribacteroid membrane from Rhizobium-induced root nodules of pea cross-react with plasma membranes and Golgi bodies. EMBO J 4: 605-611.
- Campos F, J Padilla, M Vázquez, JL Ortega, C Enriquez y F Sánchez (1987). Expression of nodule-specific genes in Phaseolus vulgaris L. Plant Mol Biol 9: 512.
- Christoferson RE y GG Laties (1982). Ethylene regulation of gene expression in carrots. Proc Natl Acad Sci USA 79: 4060-4063.
- Clowes, FAL (1975). The quiescent center. In: Torrey JG, Clarkson DT (eds). The development and function of roots, 21-54. Academic press. New York.

Cullimore JV, M Lara, PJ Lea y BJ Miflin (1983). Purification and properties of two formas of glutamine sinthetase from the plant fraction of Phaseolus root nodules. *Planta* 157: 245-253

Cullimore JV, Lara M, Lea PJ, Miflin BJ (1983) Purification and properties of two forms of glutamine synthetase from the plant fraction of Phaseolus root nodules. *Planta* 157: 245-253.

Cullimore JV, C Gebhardt, R Saarelainen, BJ Miflin, KD Idler y RF Barker (1984). Glutamine synthetase of Phaseolus vulgaris L.: organ-specific expression of a multigene family. *J Mol Appl Genet* 2: 589-599

Dazzo FB, GL Truchet (1983) Interaction of lectins and their saccharide receptors in the Rhizobium-legume symbiosis. *J Membr Biol* 73:1-16.

Djordjevic MA, DW Gabriel, BG Rolfe (1987). Rhizobium-The refined parasite of Legumes. *Ann Rev Phytopatol* 25:145-168.

Dudley ME, TW Jacobs, SR Long (1987). Microscopic estudies of cell divisions induced in alfalfa roots by Rhizobium meliloti. *Planta* 171:289-301.

Firmin JL, KE Willson, L Rossen y AWB Johnston (1986) Flavonoid activation of nodulation genes in Rhizobium reversed by other compounds present in plants

Feldman LJ (1984) Regulation of root development. *Ann Rev Plant Physiol.* 1984 35:223-242

Ferguson AR y AP Sims (1974). The regulation of glutamine metabolism in Candida utilis: the role of glutamine in the control of glutamine synthetase. *J Gen Microbiol* 80: 159-171.

Fortin MG, M Zelechowska y DPS Verma (1985). Specific targeting of membrane nodulins to the bacteroid-enclosing compartment in soybean nodules. *EMBO J* 4:3041-3046

Fortin MG, NA Morrison y DPS Verma (1985). Nodulin 26, a peribacteroid membrane nodulin is expressed independently of the development of the peribacteroid compartment. *Nucl Acids Res* 15: 813-824

Gebhardt C, JE Oliver, BG Forde, R Saarelainen y BJ Miflin (1986). Primary structure and differential expression of glutamine synthetase genes in nodules roots and leaves of Phaseolus vulgaris. *EMBO* 5: 1429-1435

Govers F, T Gloudemans, M Moerman, A van Kammen y T Bisseling (1985). Expression of plant genes during the development of pea root nodules *EMBO J* 4: 861-867.

Graham P (1980). Characteristics of selected strains of Rhizobium phaseoli from CIAT collection. In: CIAT Rhizobium phaseoli collection, 29-30. Cali.

Halverston LJ y Stacey G (1985) Signal Exchange in plant-microbe interactions. *Microbiol rev* 50: 193-225

Higgins TJV (1984) Synthesis and regulation of major proteins in seeds. *Ann Rev Plant Physiol* 35:191-221

Hirel B, C Bouet, B King, D Layzell, F Jacobs y DPS Verma (1987) Glutamine synthetase genes are regulated by ammonia provided externally or by symbiotic nitrogen fixation. *EMBO J* 6:1167-1171

Hirel B, S McNally, P Gadai, N Sumar y GR Stewart (1984). Cytosolic glutamine synthetase in higher plants. *Eur J. Biochem* 138: 63-66

Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685

Lang-Unnasch Naomi y FA Ausubel (1985) Nodule-specific polypeptides from alfalfa root nodules and from ineffective nodules lacking nitrogenase. *Plant Physiol* 77:833-839

Lara M, Cullimore JV, Lea PJ, Mifflin BJ, Johnston AWB, Lamb JW (1983). Appearance of a novel form of plant glutamine synthetase during nodule development in Phaseolus vulgaris L. *Planta* 157: 254-258

Lara M, Porta H, Padilla J, Folch J, Sánchez F (1984). Heterogeneity of glutamine synthetase polypeptides in Phaseolus vulgaris L. *Plant Physiol* 76: 1019-1023.

Larsen K y BU Jochimsen (1987). Appearance of purine catabolizing enzymes in Fix⁺ and Fix⁻ root nodules on soybean and effect of oxygen on the expression of the enzymes in callus tissue. *Plant Physiol* 85: 452-456.

Lea PJ y Mifflin BJ (1980). Transport and metabolism of asparagine and other nitrogen compounds within the plant. In: BJ Mifflin (ed) *The biochemistry of plants* vol. 5, 569-607. Academic press. New York

Legocki RP y DPS Verma (1980). Identification of nodule-specific host proteins (nodulins) involved in the development of Rhizobium-legume symbiosis. *Cell* 20: 153-163.

Lowry OH, NJ Rosebrough, AL Farr, RJ Randall (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275.

- Maniatis T, EF Fritsch y J Sambrook (1982). Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor, NY.
- Mifflin BJ y PJ Lea (1980). Ammonia assimilation. In: BJ Mifflin (ed) The biochemistry of plants vol. 5, 169-202. Academic press. New York
- McNally SF, B Hirel, P Gadai AF Mann y GR Stewart (1983) Glutamine synthetases of higher plants. Plant Physiol 72: 22-25
- Newcomb EH y SR Tandon (1981). Uninfected cells of soybean root nodules: ultrastructure suggests key role in ureide production. Science 21: 1394-1396.
- Nguyen T, M Zelechowska, V Foster, H Bergman y DPS Verma (1985). Primary structure of the soybean nodulin-35 gene encoding uricase II localized in the peroxisomes of uninfected cells of nodules. Proc Natl Acad Sci USA 82: 5040-5044.
- Oaks a y B Hirel (1985). Nitrogen metabolism in roots. Ann Rev Plant Physiol 36: 345-365.
- O'Farrell PH (1975). High resolution two dimensional electrophoresis of proteins. J Biol Chem 250: 4007-4021.
- Pelham HRB y RJ Jackson (1976) An efficient mRNA dependent translation system from reticulocyte lysates. Eur J Biochem 67: 247-256.
- Peters NK, JW Frost y SR Long (1986). A plant flavone, luteolin, induces expression of Rhizobium meliloti nodulation genes. Science 233: 977-980
- Redmond JR, M Batley, MA Djordjevic, RW Innes, PL Kuempel, BG Rolfe (1986). Flavones induce the expression of the nodulation genes in Rhizobium. Nature 323:632-635.
- Robert FM y Wong PP (1986). Isozymes of glutamine synthetase in Phaseolus vulgaris L. and Phaseolus lunatus L. root nodules. Plant Physiol 81: 142-148.
- Robertson JG y Farnden KJF (1980). Ultrastructure and metabolism of the developing legume root nodule. In: BJ Mifflin (ed) The biochemistry of plants vol. 5, 65-103. Academic press. New York
- Robertson JG y P Lyttleton (1982). Coated and smooth vesicles in the biogenesis of cell walls, plasma membranes, infection threads and peribacteroid membranes in root hairs and nodules of white clovers. J Cell Sci 58:63-78.
- Sánchez F, F Campos, J Padilla y JM Bonneville (1987). Purification, cDNA cloning, and developmental expression of the

nodule-specific uricase from Phaseolus vulgaris L. Plant Physiol 84: 1143-1147.

Sandal NN, Bojsen K y KA Marcker (1987) A small family of nodule specific glutamine synthetase during nodule development in soybeans. Plant Mol Biol 7: 189-199.

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

Sengupta-Gopalan C y JW Pitas (1986). Expression of nodule-specific glutamine synthetase genes during nodule development in soybeans. Plant Mol Biol 7: 189-199.

Spurr AR (1969). A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. J Ultrastr Res 26: 31-43.

Stewart GR, AF Mann y PA Fentem (1980). Enzymes of glutamate formation. In: BJ Mifflin (ed) The biochemistry of plants vol. 5, 271-327.

Thummlert F y DPS Verma (1987). Nodulin-100 of soybean is the subunit of sucrose synthetase regulated by the availability of free heme in nodules. J Biol Chem 262: 14730-14736.

Tingey SV, EL Walker y GM Coruzzi (1987). Glutamine synthetase genes of pea encode distinct polypeptides wich are differentially expressed in leaves, roots and nodules. EMBO J 6: 1-9.

Towbin H, Staehelin T y Gordon J (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci USA 76; 4350-4354.

Verma DPS, MG Fortin, J Stanley, V Mauro, S Purohit y N Morrison (1986). Nodulins and nodulin genes in Glycine max. Plant Mol Biol 7: 51-61.

Vézina LP, HJ Hope y KW Joy (1987). Isoenzymes of glutamine synthetase in roots of pea (Pisum sativum L. cv little marvel) and alfalfa (Mendicago media Pers. cv saranac) Plant Physiol 83: 58-62.

Wallsgrave RM, JC Turner, NP Hall, AC Kendall y SWJ Bright (1987). Barley mutants lacking chloroplast glutamine synthetase. Biochemical and genetic analysis. Plant Physiol 83: 155-158

Webb MA y Newcomb EH (1987). Cellular compartmentation of ureide biogenesis in root nodules of cowpea (Vigna unguiculata (L.) Walp.). Planta 172: 162-175.

Short Communication

Expression of Two Different Glutamine Synthetase Polypeptides during Root Development in *Phaseolus vulgaris* L.¹

Received for publication October 16, 1985 and in revised form December 15, 1985

JOSÉ LUIS ORTEGA, FRANCISCO CAMPOS, FEDERICO SÁNCHEZ, AND MIGUEL LARA*
Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno, U.N.A.M., Cuernavaca, Mor. Apartado Postal 565-A, México

ABSTRACT

Immunoprecipitation and two-dimensional gel electrophoresis analysis of the glutamine synthetase (GS) polypeptides (α and β) during *Phaseolus vulgaris* root development shows that the α polypeptide is the main component of the enzyme in the embryo and in up to 5 day old roots. From 5 days on, the β polypeptide becomes the root predominant GS monomer. The α/β ratio of the *in vitro* translated GS polypeptides from the total polysomal RNA isolated at different root ages correlates with the α/β ratio observed in the root extracts. These results suggest that the two root GS polypeptides are encoded by different mRNA species in *Phaseolus vulgaris*.

Glutamine synthetase (GS²) (EC 6.3.1.2) is a key enzyme for the assimilation of ammonium in higher plants (15). In root tissue the ammonium derives mainly from the uptake and reduction of inorganic nitrogen as nitrate (16). Multiple forms of this enzyme have been described. Some of them are tissue specific as the nodule form, GS_n-1, (10) and the leaf form, GS₂, which is found in the chloroplast (7). Only one form has been described in the roots of different plants (4, 7, 14), this root form co-migrates with the GS₁ leaf form when both are analyzed by ion exchange chromatography (7, 10, 14). However, the root form in barley and rice are different from the two forms of GS in leaves (7, 8). Recently it has been established that the multiple forms of GS in *Phaseolus vulgaris* are the result of their different polypeptide composition (11). In bean, the root form as well as the GS₁ leaf form are composed by the same two α and β polypeptides of 43,000 D (11).

In this paper, the GS polypeptide composition during the root development was analyzed by immunoprecipitation and two-dimensional gel electrophoresis of the enzyme from crude extracts and from the *in vitro* translation products using total polysomal RNA.

MATERIALS AND METHODS

Plant Material. *Phaseolus vulgaris* L. cv negro jamapa was germinated in Petri dishes for 2 d and then transferred to 30 cm

diameter plots and grown in a glasshouse under natural daylight (14 h) (mean day temperature 25 to 30°C; RH 45%). The plants were watered every other day with nutrient solution (1) and with water alternately. Roots were harvested at different times during plant development. The root embryos were obtained from the dry seed by removal of the cotyledons and the embryo leaves. The root tissue was stored at -70°C prior to utilization.

Polypeptide Analysis of the GS in Root Extracts. Root extracts were prepared by grinding the frozen root tissue in a mortar with 2% (w/w) polyclar AT and two volumes of extraction buffer (10 mM Tris-HCl [pH 8.4], 10 mM Mg-acetate, 10 mM-mercaptoethanol). The brei was filtered through cheesecloth, and the extract was obtained after centrifugation at 20,000g for 20 min. For root tissue older than 2 d the extract was brought to 70% (NH₄)₂SO₄, centrifuged at 15,000g for 15 min, the pellet resuspended on the same buffer, and desalted on a Sephadex G25 column. All procedures were carried out at 4°C. GS activity was determined by the transferase assay of Ferguson and Sims (6).

A volume equivalent to 0.5 transferase unit was immunoprecipitated as previously described (5) using anti-GS serum raised against purified GS from root nodules. The immune complexes were analyzed by two-dimensional gel electrophoresis according to O'Farrell (17) with the modifications described (11).

Polypeptide Analysis of the Root GS Translated *In Vitro* from Total Polysomal RNA. Polyribosomes were isolated from 5 to 8 d old roots as reported by Christoffersen and Laties (2). Total ribosomal RNA was extracted following the hot phenol procedure described by Maniatis *et al.* (13). The rabbit reticulocyte lysate system of Pelham and Jackson (18) was used for *in vitro* translation of total polysomal RNA. The reticulocyte lysate reaction mixture was immunoprecipitated using anti-GS serum and fixed *Staphylococcus aureus* cells basically as described by Kraus *et al.* (9). The immune complex obtained was processed for two-dimensional gel electrophoresis (17) followed by fluorography.

RESULTS AND DISCUSSION

The polypeptide composition of the *Phaseolus vulgaris* root GS during plant development was obtained by analysis on two-dimensional gel electrophoresis of the immunoprecipitated GS from crude extracts of embryonic and 2, 5, 8, 10, and 14 d old roots.

We previously reported (11) that the GS in roots of *P. vulgaris* is composed by two different polypeptides, denominated α and β . Figure 1 shows the α and β GS polypeptides during root development. The α polypeptide in the embryo and in 2 d old roots is the main GS component (Fig. 1, A and B). By the 5th d of development both polypeptides are present in almost the same

¹ Supported in part by grants from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) and from Fondo de Estudios e Investigaciones Ricardo J. Zevada.

² Abbreviations: GS, glutamine synthetase; GS₁, cytosolic glutamine synthetase; GS₂, chloroplastic glutamine synthetase; GS_n-1, nodule glutamine synthetase.

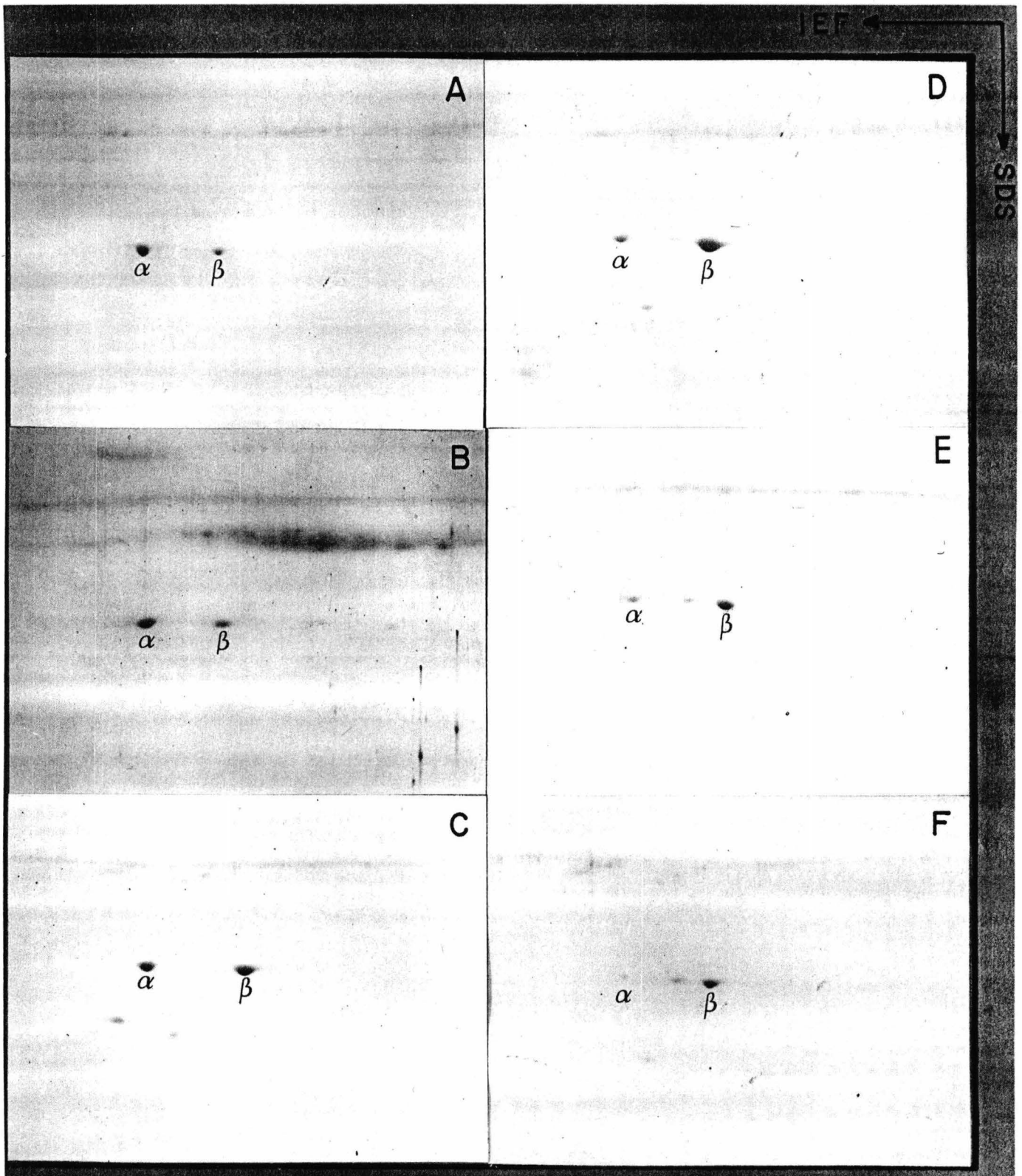


FIG. 1. Two-dimensional gel electrophoresis analysis of GS during root development. Two-dimensional gel electrophoresis of the immunoprecipitated GS from crude extracts of A, root embryo; B, C, D, E, and F: 2, 5, 8, 10, and 14 d old roots, respectively; α and β are GS polypeptides.

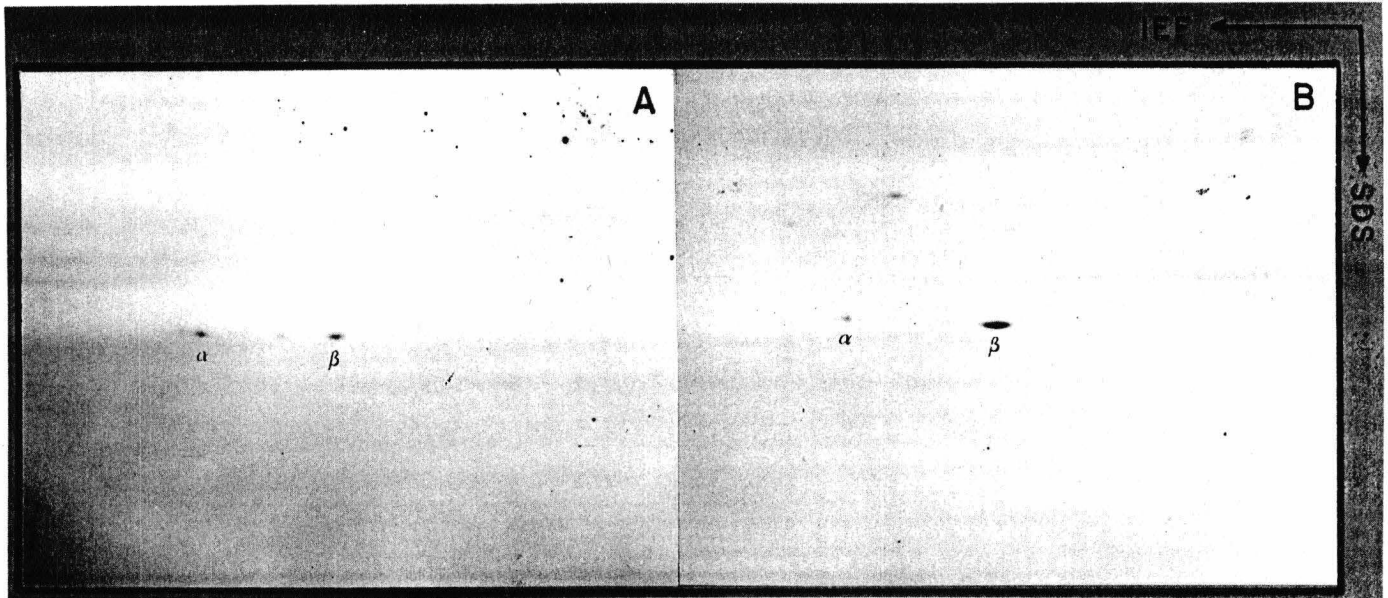


FIG. 2. Fluorographs of GS synthesized *in vitro* using polysomal-RNA extracted from different root developmental stages. A, 5 d old roots; B, 8 d old roots; α and β are GS polypeptides.

proportion (Fig. 1C). The concentration of the β polypeptide increases gradually from embryo to 8 d old roots, becoming the main component from the 5th d of development on. The presence of two GS polypeptides in roots of *P. vulgaris* could indicate the occurrence of two forms of this enzyme, as reported for soybean hypocotyls (20); however, the polypeptide composition of soybean GS is not known. The fact that just one form of GS has been described in bean roots, could be explained considering that from the 5th d on, the α polypeptide tends to disappear. A minor component is observed between the α and β monomers in the extracts of 10 and 14 d old roots. The relation of this component with GS is still unclear.

To elucidate whether the change observed in the α/β ratio is the result of a posttranslational modification or a differential expression of two proteins, α and β GS polypeptides were synthesized *in vitro* from total polysomal RNA isolated from 5 to 8 d old roots (Fig. 2). In polysomal RNA isolated from 5 d old roots the α and β polypeptides are translated in almost the same proportion (Fig. 2A), and in the 8 d polysomal RNA the β polypeptide is translated at higher extent (Fig. 2B).

The data presented in this paper show that the α polypeptide is the main component of the root GS in early stages of development and that the β polypeptide is the predominant GS monomer in mature roots. The *in vitro* translation of the polysomal RNAs isolated at different root developmental stages suggest that these two GS components are encoded by two different mRNA molecules and indicates that the changes in the α/β ratio observed in the crude extracts are the result of a differential concentration of these two messengers. The higher proportion of the α polypeptide in the embryo tissue could indicate that the mRNA specific for this polypeptide is transcribed and translated during seed formation. Previous reports show that in *Neurospora crassa* there are two GS polypeptides with different oligomeric forms (5, 19). Two nonidentical mRNAs are responsible for the synthesis of these two monomers, and their expression depends on the nitrogen condition (12). By analogy, the changes in the α/β ratio during root development in bean, could indicate that the expression of these GS polypeptides also responds to the different nitrogen conditions. However, the functional significance of the root GS polypeptides remains

unknown. Finally, the presence of two mRNA molecules for the root GS polypeptides supports the existence of a multigene family for the glutamine synthetase in *P. vulgaris* (3).

Acknowledgments—We are grateful to Drs. Jaime Mora, Rafael Palacios, Guadalupe Espín, Alejandra Covarrubias and Lorenzo Segovia for the critical reading of the manuscript and Patricia Vázquez for the secretarial assistance. José Luis Ortega would like to acknowledge the receipt of a fellowship from CONACyT.

LITERATURE CITED

- BROUGHTON WJ, MJ DILWORTH 1971 Control of leghaemoglobin synthesis in beans. *Biochem J* 125: 1075–1080
- CHRISTOFFERSON RE, GG LATIES 1982 Ethylene regulation of gene expression in carrots. *Proc Natl Acad Sci USA* 79: 4060–4063
- CULLIMORE J, C GEBHARDT, R SAARELAINEN, BJ MIFLIN, KB IDLER, RF BARKER 1984 Glutamine synthetase of *Phaseolus vulgaris* L. organ-specific expression of a multigene family. *J Mol Appl Genet* 2: 589–599
- CULLIMORE JV, M LARA, PJ LEA, BJ MIFLIN 1983 Purification and properties of two forms of glutamine synthetase from the plant fraction of *Phaseolus* root nodules. *Planta* 157: 245–253
- DÁVILA G, M LARA, J GUZMÁN, J MORA 1980 Relation between structure and function of *Neurospora crassa* glutamine synthetase. *Biochem Biophys Res Commun* 92: 134–140
- FERGUSON AR, AP SIMS 1974 The regulation of glutamine metabolism in *Candida utilis*: the role of glutamine in the control of glutamine synthetase. *J Gen Microbiol* 80: 159–171
- HIREL B, P GADAL 1980 Glutamine synthetase in rice. A comparative study of the enzyme from roots and leaves. *Plant Physiol* 66: 619–623
- HIREL B, SF MCNALLY, P GADAL, N SUMAR, GR STEWART 1984 Cytosolic glutamine synthetase in higher plants. A comparative immunological study. *Eur J Biochem* 138: 63–66
- KRAUS JP, JG CONBOY, LE ROSENBERG 1981 Pre-ornithine transcarbamylase: Properties of the cytoplasmic precursor of a mitochondrial matrix enzyme. *J Biol Chem* 256: 10739–10742
- LARA M, JV CULLIMORE, PJ LEA, BJ MIFLIN, AWB JOHNSTON, JW LAMB 1983 Appearance of a novel form of plant glutamine synthetase during nodule development in *Phaseolus vulgaris* L. *Planta* 157: 254–258
- LARA M, H PORTA, J PADILLA, J FOLCH, F SÁNCHEZ 1984 Heterogeneity of glutamine synthetase polypeptides in *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Physiol* 76: 1019–1023
- LARA M, L BLANCO, M CAMPOMANES, E CALVA, R PALACIOS, J MORA 1982 Physiology of ammonium assimilation in *Neurospora crassa*. *J Bacteriol* 150: 105–112
- MANIATIS T, EF FRITSCH, J SAMBROOK 1982 Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY
- MANN AF, PA FENTEM, GR STEWART 1979 Identification of two forms of glutamine synthetase in barley (*Hordeum vulgare*). *Biochem Biophys Res Commun* 88: 515–521
- MIFLIN BJ, PJ LEA 1980 Ammonia assimilation. In BJ Miflin, ed, The

- Biochemistry of Plants, Vol 5. Academic Press, New York, pp 169-202
16. MIFLIN BJ, PJ LEA 1982 Ammonia assimilation and aminoacid metabolism. In D Baulter, B Parthier, eds, Encyclopedia of Plant Physiology, Vol 14A. Springer-Verlag, Berlin, pp 5-64
 17. O'FARRELL PH 1975 High resolution two dimensional electrophoresis of proteins. J Biol Chem 250: 4007-4021
 18. PELHAM HRB, RJ JACKSON 1976 An efficient mRNA dependent translation system from reticulocyte lysates. Eur J Biochem 67: 247-256
 19. SÁNCHEZ F, E CALVA, M CAMPOMANES, L BLANCO, J GUZMÁN, JL SABORÍO, R PALACIOS 1980 Heterogeneity of glutamine synthetase polypeptides in *Neurospora crassa*. J Biol Chem 255: 2231-2234
 20. STASIEWICZ S, VL DUNHAM 1979 Isolation and characterization of two forms of glutamine synthetase from soybean hypocotyl. Biochem Biophys Res Commun 87: 627-634

Molecular genetics of plant-microbe interactions

*Proceedings of the Third International Symposium on the Molecular Genetics
of Plant-Microbe Associations, Montréal, Québec, Canada, July 27-31, 1986*

edited by

DESH PAL S. VERMA

*McGill University, Montréal
Québec, Canada*

NORMAND BRISSON

*Université de Montréal, Montréal
Québec, Canada*

SEPT. 1986
LIBRARY
UNIVERSITY OF TORONTO
LIBRARY

1987 **MARTINUS NIJHOFF PUBLISHERS**
a member of the KLUWER ACADEMIC PUBLISHERS GROUP
DORDRECHT / BOSTON / LANCASTER



LOCALIZATION OF THE GLUTAMINE SYNTHETASE POLYPEPTIDES IN Phaseolus ROOT NODULES

M. LARA, J.L. ORTEGA AND B. VALDERRAMA. CENTRO DE INVESTIGACION SOBRE FIJACION DE NITROGENO. UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO. APDO. POSTAL 565-A. CUERNAVACA, MOR. MEXICO.

INTRODUCTION

Recently it has been established that Phaseolus vulgaris nodules produce a specific, physically separable glutamine synthetase (GS) during nodule development (called GS_n-1) (1,2). This enzyme is probably the major route of ammonia assimilation during nitrogen fixation. The mature nodule contains two separable forms termed GS_n-1 and GS_n-2. In a previous work we describe that the GS form is composed mainly by one polypeptide denominated which is specific of the nodule tissue, and that the GS_n-2 form is composed by one polypeptide called , also present in the root tissue (3).

The GS_n-1 form which appears simultaneously with the nitrogenase activity during nodule development, and is not present in Fix⁻ nodules, has been proposed as the GS form responsible for the ammonia assimilation in the nodule tissue (1). In order to elucidate if one or both of the nodule GS forms participate in the ammonia assimilation during nitrogen fixation, we analyzed the intracellular localization of these isoenzymes.

PROCEDURE

Materials and methods

Plant material. Phaseolus vulgaris L. cv. negro jamapa was inoculated with the wild type Rhizobium phaseoli strain CIAT-899 and grown as previously described (3). Nodules were harvested after 3 weeks and used immediately for fractionation.

Nodule fractionation. Peribacteroidal membranes (PBM), nodule soluble proteins and bacteroids were isolated as described by Fortin et al (4).

Electrophoresis. SDS-PAGE and two dimensional gel electrophoresis were done as described by Laemli (5) and O'Farrell (6) respectively.

The GS polypeptides were identified from the gels by immunoblot analysis using rabbit antiserum raised against nodule GS. Proteins were stained with Coomassie blue R.

RESULTS AND DISCUSSION

The localization of the GS was done by polyacrylamide electrophoresis of the total protein and immunoblot detection of the GS from the PBM, bacteroids and nodule soluble protein. In figure 1 is presented the protein profile of these fractions (A) and the immunoblot detection of GS (B). As is shown in figure 1-B lane 1 GS is present in the PBM and seems to be one

of the principal proteins of the PBM fractions. (Fig. 1-A lane 1). In the soluble fraction which includes the cytoplasmic GS from the uninfected and the infected cells, the enzyme is present also in high amount. We are trying to determine the percentage of PBM recovery in the purification procedure and define the real proportion of the GS which is located in these membranes. We discard the possibility that the presence of GS in the PBM is an artefact or an unspecific association since leghemoglobin is not found in this fraction. The immunoblot analysis did not reveal any cross react material in the bacteroid fraction (Fig. 1-B lane 2). Cullimore et al report that the anti-GS serum raised against nodule GS did not cross react with the Rhizobium GS (7).

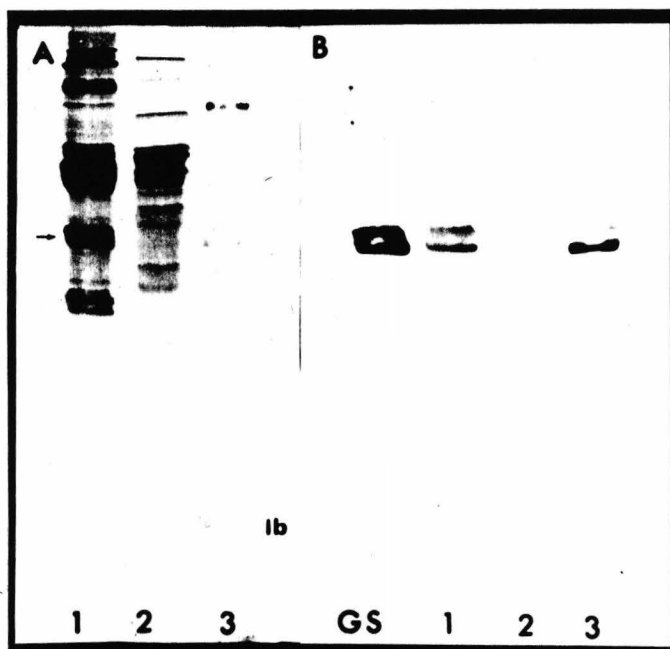


FIGURE 1. A) SDS-Polyacrilamide gel electrophoresis of nodule fractions: (1) PBM, (2) bacteroidal fraction, (3) nodule soluble proteins. Gel was stained with Coomassie blue after electrophoresis. lb; leghemoglobin arrow indicates GS position. B) Immunoblot of the different nodule fractions using anti-GS serum raised against nodule GS: lanes (1), (2) and (3) as in panel A. (GS) 3 μ g of purified nodule GS.

In order to know the polypeptide composition of the GS present in the PBM, two-dimensional gel electrophoresis of this fraction were performed and the GS monomers revealed by the immunoblot analysis. The result shows that the GS from PBM is composed by the β and the γ polypeptides (Fig. 2), with a higher proportion of the last one resembling the composition of the GS_n-1 form (3). The presence of both polypeptides arise the question if the two nodule GS forms (GS_n-1 and GS_n-2) or if only one form of GS composed by the two type of monomers is associated to this fraction. At present is not possible to

establish the significance of a specific nodule GS polypeptide.

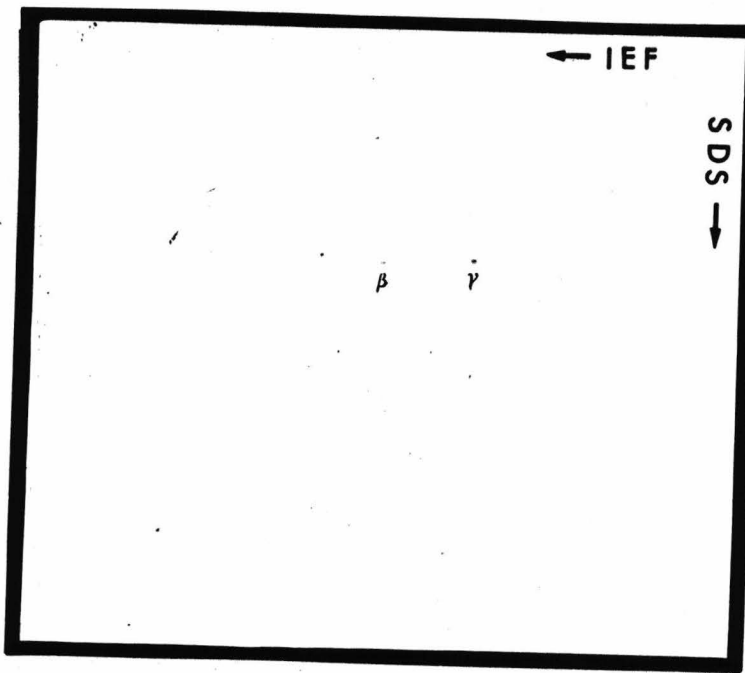


FIGURE 2. Immunoblot of the PBM after two-dimensional gel electrophoresis. GS polypeptides were immunodetected using rabbit antiserum against nodule GS.

The results presented here indicate that some proportion of the GS is associated to the PBM. The abundance and the strategic localization of this enzyme in the PBM makes this result significant suggesting that the ammonia assimilation could take place in this compartment of the infected cells.

REFERENCES

1. Lara M, JV Cullimore, PJ Lea, BJ Mifflin, AWB Johnston and JW Lamb. 1983. *Planta* 157: 254-258.
2. Cullimore JV, M Lara, PJ Lea and BJ Mifflin. 1983. *Planta* 157: 245-253.
3. Lara M, H Porta, J Padilla, J Folch and F Sánchez. 1984. *Plant Physiol* 76: 1019-1023.
4. Fortin MG, M Zelechowska and DPS Verma. 1985. *EMBO J* 4: 3041-3046.
5. Laemli UK. 1970. *Nature* 227: 680-685.
6. O'Farrell PH. 1975. *J Biol Chem* 250: 4007-4021.
7. Cullimore JV and BJ Mifflin. 1984. *J Exp Bot* 35: 581-587.

Nodulins Expression and Nitrogen Metabolism in *Phaseolus vulgaris* Root Nodules.

M.Lara, J.L.Ortega, B.E.Olguin and F.Sánchez.

Plant Molecular Biology Department, Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno, U.N.A.M. Apartado Postal 565-A Cuernavaca, Mor. México.

INTRODUCTION

The Rhizobium - legume symbiosis results in the formation of nitrogen fixing nodules. The ontogeny and the maintenance of nodules involve the specific expression of a number of host encoded proteins (nodulins). Some functions have been assigned to several nodulins, among which are leghemoglobin (1), uricase (2,3), glutamine synthetase (4-6) and sucrose synthetase (7,8). Other nodulins have also been described in a number of legumes (9-12). Some of these nodulins have been shown to be located into the peribacteroid compartment enclosing the microsymbiont (13-16).

The primary assimilation of fixed nitrogen is catalyzed by the glutamine synthetase (GS) in the so called GS-GOGAT pathway (17). GS is composed of distinct polypeptides in the nodules of the legumes where this enzyme has been studied (6,18,19). In beans and peas, it has been demonstrated that the heterogeneity of the GS polypeptides is related to the expression of a multigene family (4,5,18). In Phaseolus vulgaris the GS activity increases during nodule development (20). This increase is correlated with the expression of a novel GS isoform (GSn-1), which is mainly composed of a nodule specific polypeptide called gamma (6). This polypeptide has been shown to be expressed before the onset of nitrogenase activity (21). The differential expression of the GS monomers in bean nodules sets up the question of their functional significance in the assimilation of the ammonia derived from the bacteroids.

Here we present experiments on the subcellular localization of GS searching for the role that the different GS polypeptides play in the ammonia assimilation during symbiosis.

MATERIAL AND METHODS

Plant material. Nodules were obtained from bean (Phaseolus vulgaris) plants cv. negro jamapa (PRONASE, México) grown under the conditions previously described (6), 24 days after infection with Rhizobium phaseoli CIAT 899.

Cell fractionation. Nodule subcellular components were isolated by differential centrifugation in discontinuous sucrose gradients following the procedure described by Fortin et al. (13). Crude extract was obtained by grinding nodules

in a buffer containing 50mM Tris-Cl pH 8, 5mM EDTA, 1mM DTT, and 5% w/v PVPP, the homogenate was sonicated and centrifugated at 15 000x g.

Electrophoresis and western blotting. Proteins from different nodule fractions were separated in SDS polyacrylamide gels (22) and in two dimensional polyacrylamide gels (23). Gels were stained with coomassie blue or electroblotted to nitrocellulose papers (24) and reacted with GS and uricase antibodies followed by immunoperoxidase staining.

Electron microscopy and immunogold staining. Nodules were fixed in 2% glutaraldehyde, post-fixed with osmium tetroxide and embedded in Spurr's epoxy resin (25). Thin sections were processed by immunogold staining after treatment with sodium metaperiodate. Preimmune serum or anti-GS was added as the first antibody. Goat anti-rabbit-gold complex was used in the second reaction step.

RESULTS

To localize GS at different nodule compartments, total nodule proteins and proteins from purified bacteroids, peribacteroidal membranes (PBM) peribacteroidal fluid (PBF) and soluble fraction were run on an SDS polyacrylamide gel, blotted onto a nitrocellulose paper and the presence of GS

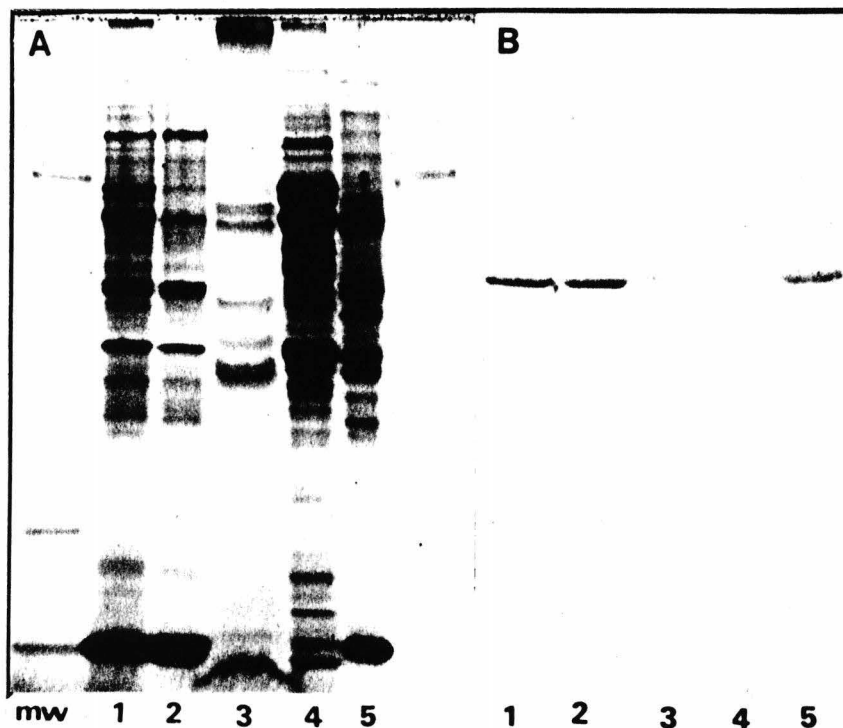


Fig. 1: Immunodetection of GS in different nodule compartments. A) Coomassie blue stained proteins. B) Immunoblot of nodule fractions reacted with GS specific antiserum. 100ug of protein from crude extract (1), soluble fraction (2), peribacteroidal membranes (3), bacteroids (4) and peribacteroidal fluid (5) were run in 12% SDS polyacrylamide gels.

was detected with specific antiserum against nodule GS. As figure 1B shows, the highest proportion of GS was observed in the crude extract and in the soluble fraction of the nodules. GS is also present in the PBM and the PBF. As expected, the bacteroids fraction does not contain any antigen reacting with the anti-serum raised against the plant GS. The presence of leghemoglobin in the PBF (fig. 1A) suggested that this fraction could have been contaminated with cytoplasmic proteins during the purification procedure and that the presence of GS in the peribacteroidal fraction was due to a contamination. To assess this possibility we analyzed these fractions for the presence of uricase, which is an abundant nodule protein (3) and has been described to be located in the peroxisomes of the uninfected cells (26,27; F. Sánchez, unpublished results).

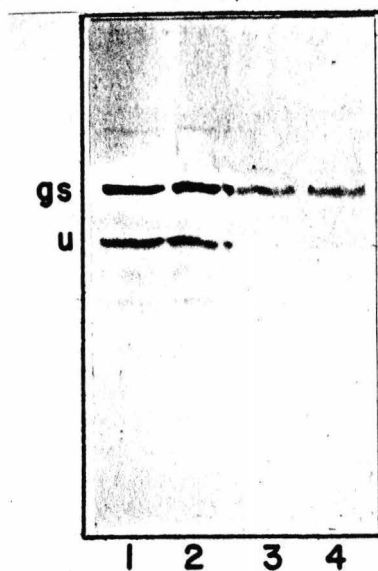


Fig. 2: Immunodetection of GS and uricase in different fractions of nodules: crude extract (1), soluble fraction (2) and peribacteroidal fraction (pbm plus pbf)(3 and 4).

Western blot analysis of the nodule crude extract, soluble proteins and peribacteroidal fraction (PBM plus PBF) using both GS and uricase antibodies (fig. 2) shows that only GS is found in the peribacteroidal fraction and that uricase is detected in the crude extract and in the soluble protein fraction. This result suggests that the presence of GS in the PBM and the PBF is not an artifact. To confirm this result, we carried out immunogold localization of this enzyme. As is shown in figure 3B, GS can be detected in the PBF surrounding the bacteroids, indicating that the ammonia assimilation could take place in this compartment. If a preimmune serum is used instead of the GS antibody, immunostaining with gold is not observed (fig. 3A). To identify the composition of the GS found in the peribacteroidal compartment, two dimensional gels from different nodule fractions were electroblotted and the relative proportion of GS monomers was detected with GS

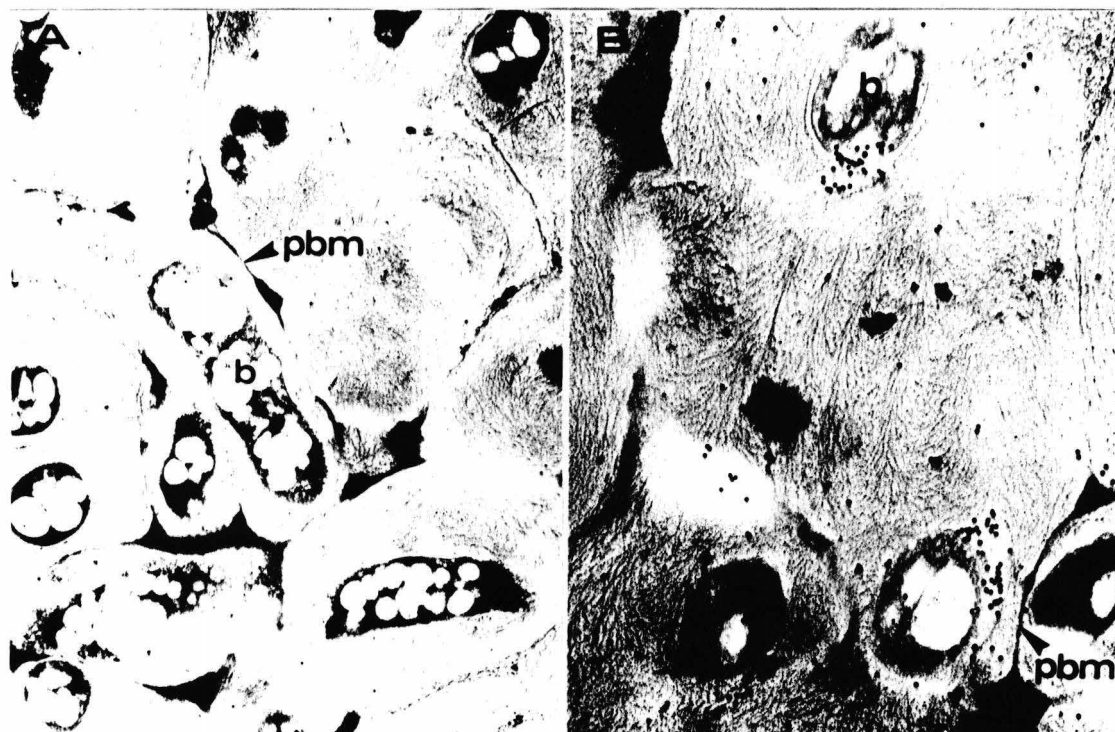


Fig. 3: Immunogold staining of GS. Thin nodule sections were reacted with preimmune serum (A) or GS antibody (B) and stained with gold particles complexed to a goat-anti-rabbit antiserum. Sections show bacteroids (b) enclosed by peribacteroidal membranes (pbm).

antibody. The composition of the GS found in the PBM has been reported elsewhere (28). As observed in figure 4A, the crude extract presents almost the same proportion of both polypeptides (beta and gamma). The soluble fraction is characterized by a higher proportion of the beta monomer (fig 4B) and on the other hand, the PBF presents a higher amount of the nodule specific polypeptide (fig. 4C). According to these results, we propose that the cytoplasmic GS is mainly composed of beta polypeptides and that the gamma monomer could be responsible for the assimilation of ammonia derived from the bacteroids.

DISCUSSION

The results presented here indicate that GS is distributed in different subcellular compartments of the nodule. The amount of GS in the peribacteroidal fluid can not be defined by the immunoblot or immunogold localization; however, the presence of high amounts of uricase in the soluble fraction (fig. 2) indicate that the compartmentalized enzymes can be liberated even with gentle conditions of extraction. For this reason, it is possible that the amount of GS in the PBF could be higher.

On the other hand, the predominance of the nodule specific GS polypeptide in the PBF (fig. 4C) suggests that this polypeptide is essential for the ammonia assimilation during symbiosis and opens the question of the role of this

component in the transport of GS across the peribacteroidal membrane.

In fig 1A some amount of leghemoglobin in the PBF can be observed. This result is in agreement with other reports (29). Experiments are in progress in order to define the presence of this protein in the PBF and to elucidate if there are different isoforms of leghemoglobin in this compartment versus the cytoplasm.

The presence of GS in the PBF supports the idea that ammonia assimilation takes place in this compartment in Phaseolus vulgaris. In addition, this result highlights the metabolic significance of the peribacteroidal compartment in the symbiosis.

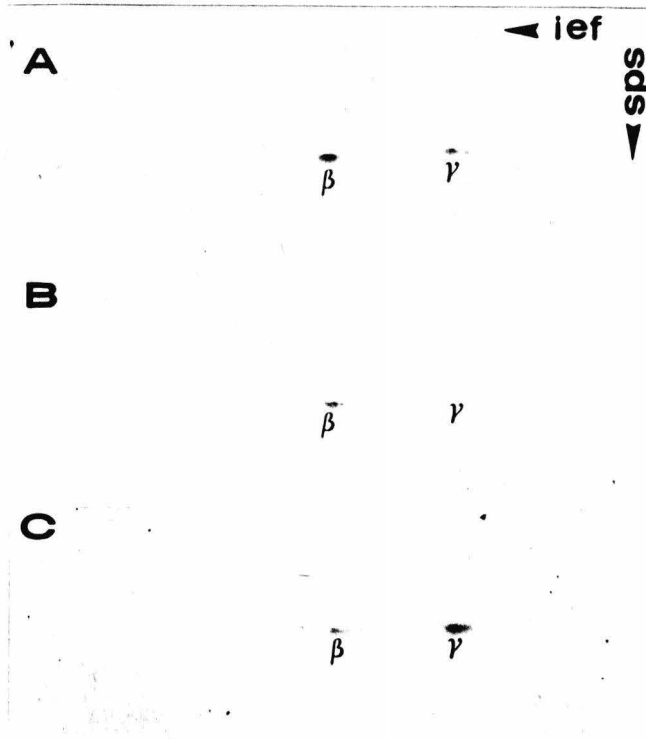


Fig. 4: Western blot of two dimensional gel electrophoresis from different nodule fractions, using GS antibody: Crude extract (A), soluble fraction (B) and peribacteroidal fluid (C). beta and gamma are GS polypeptides.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported in part by grants from the EEC (contract # C11-0104-MEX) and from the NAS (grant # BNF-MX-6-87-77). J.L.O. was the receipt of a fellowship from CONACYT.

REFERENCES

1. Appleby, C.A., Nicola, N.A., Hurrell, J.G.R. and Leach, D.J. (1975) *Biochem. J.* **14**, 4444-4450
2. Bergmann, H., Preddie, E. and Verma, D.P.S. (1983) *EMBO J.* **2**, 2333-2339
3. Sánchez, F., Campos, F., Padilla, J., Bonneville, J.M.,

- Enriquez, C. and Caput D. (1987) *Plant Physiol.* 84, 1143-1147
4. Cullimore, J.V., Gebhardt, C., Saarelainen, R., Mifflin, B.J., Ider, K.B. and Barker, R.F. (1984). *J. Mol. Appl. Gen.* 2, 589-599.
 5. Gebhardt, C., Oliver, J.E., Forde, B.G., Saarelainen, R. and Mifflin, B.J. (1986) *EMBO J.* 5, 1429-1435.
 6. Lara, M., Porta, H., Padilla, J., Folch, J. and Sánchez, F. (1984). *Plant Physiol.* 76, 1019-1023.
 7. Morell, M. and Copeland, L. (1985) *Plant Physiol.* 72, 634-640
 8. Thummler, F. and Verma D.P.S. (1987) *J. Biol. Chem.* 262, 14730-14736
 9. Legocki, R.P. and Verma, D.P.S. (1980). *Cell* 20, 153-163.
 10. Govers, S., Gloudemans, T., Moerman, M., van Kammen, A. and Bisseling, T. (1985) *EMBO J.* 4, 861-867
 11. Lang Unnash, N. and Ausubel, F.M. (1985) *Plant Physiol.* 77, 833-839
 12. Campos, F., Padilla, J., Vázquez, M., Ortega, J.L., Enriquez, C. and Sánchez, F. (1987) *Plant. Mol. Biol.* 9, 512
 13. Fortin, M.G., Zelechowska, M. and Verma, D.P.S. (1985) *EMBO J.* 4, 3041-3046
 14. Sandal, N.N., Bojsen, K. and Marcker, K.A. (1987) *Nucleic Acids Research* 15, 1507-1519
 15. Fortin, M.G., Morrison, N.A. and Verma, D.P.S. (1987) *Nucleic Acids Research* 15, 813-824
 16. Jacobs, F.A., Zhang, M., Fortin, M.G. and Verma, D.P.S. (1987) *Nucleic Acids Research* 15, 1271-1280
 17. Mifflin, B.J. and Lea, P.J. (1977) *Annu. Rev. Plant Physiol.* 28, 299-329
 18. Tingey, S.V., Walker E.L. and Coruzzi, G.M. (1987). *EMBO J.* 6, 1-9.
 19. Sengupta-Gopalan, C. and Pitas, J.W. (1986) *Plant Mol. Biol.* 7, 189-199
 20. Lara, M., Cullimore, J.V., Lea, P.J., Mifflin, B.J., Johnston, A.W.B. and Lamb, J.W. (1983) *Planta* 157, 254-258
 21. Padilla, J.E., Campos, F., Conde, V., Lara, M. and Sánchez, F. (1987) *Plant Mol. Biol.* 9, 65-74
 22. Laemmli, U.K. (1970). *Nature* 227, 680-685
 23. O'Farrell, P.H. (1975) *J. Biol. Chem.* 250, 4007-4021.
 24. Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 4350-4354.
 25. Spurr, A.R. (1969) *J. Ultrastruct. Res.* 26, 31-43
 26. Nguyen, T., Zelechowska, M., Foster, V., Bergmann, H. and Verma, D.P.S. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 5040-5044
 27. Webb, M.A. and Newcomb, E.H. (1987) *Planta* 172, 162-175
 28. Lara, M., Ortega, J.L. and Valderrama, B. (1987) In Verma D.P.S. and Brisson, N. (eds.) *Molecular genetics of plant-microbe interactions*, 142-144. Nijhoff, Dordrecht.
 29. Appleby, C.A. (1984) *Ann. Rev. Plant Physiol.* 35, 443-478

- ▷ EVIDENCIA DE LA ASIMILACION DE NH_4^+ POR GDH NO IMPORTANTE -
- ▷ CONDICIONES DE ASIMILACION DE NH_4 EN LOS DIF. TEJIDOS -
- ▷ QUE SIGNIFICADO TIENE EL HECHO DE TENER 9 ISOFORMAS EN RAR O X N. ISOFORMAS EN OTROS TEJIDOS
- ▷ Dos variedades de fujol en patón dif en las isoformas de GS
- ▷ Por qué las β son las subunidades presentes en todos los tejidos. Explicación relacionada a α/Km o V_{max}
- ▷ Fusiones β -gal a 3' GS -

