

03072

12
4.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

**UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y DE
POSGRADO DEL COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES.**

**Estudio de la familia génica de la profilina de
Phaseolus vulgaris L.**

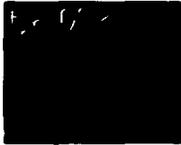
T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO
EN BIOTECNOLOGIA**

P R E S E N T A:

BIOL. RAUL NOGUEZ MORENO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA-UNAM.



CUERNAVACA, MOR. 1997

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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.

RESUMEN

Las bacterias del suelo que incluyen a los géneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* y *Azorhizobium*, conocidas colectivamente como rhizobia, inducen en leguminosas la deformación de pelos radiculares y el consecuente desarrollo del nódulo, (órgano especializado en asimilar y fijar nitrógeno). Durante diversos eventos morfogenéticos, el citoesqueleto tiene un papel muy importante ya que participa en la fagocitosis, transporte intracitoplásmico, transducción de señales y división celular, por lo que en nuestro grupo de investigación estamos interesados en estudiar su papel durante la organogénesis del nódulo (1). En este contexto, la profilina es una proteína de 14 kDa que se encuentra distribuída ampliamente en células eucarióticas, y que se une reversiblemente a los monómero de actina. Este complejo se disocia *in vitro* cuando se le agrega fosfoinositol (PIP y PIP2), lo que sugiere que esta proteína puede ser importante entre el citoesqueleto y la transducción de señales. Se ha propuesto que la actividad de secuestro de actina es requerida para el almacenamiento de actina monomérica; también se ha sugerido que el complejo profilina-actina se une al extremo "+" del MF donde la profilina se libera, y es disponible para un nuevo ciclo. Por lo tanto la profilina también es importante para el recambio controlado de los microfilamentos. En otras plantas, como *Zea mays* y *Arabidopsis*, ha sido descrito que la profilina esta codificada por una familia multigénica (2 y 3). En un trabajo previo, se reportó la purificación y caracterización de un cDNA y de una profilina de nódulo de *P. vulgaris* (4). Sin embargo, estudios posteriores han demostrado que hay varias isoformas de profilina en raíces y nódulos (5). En este mismo trabajo, experimentos de traducción *in vitro*, de RT-PCR y PCR genómico sugieren la presencia de un solo tipo de mRNA. En el presente trabajo, mediante la búsqueda y el análisis de 70 clonas de cDNA y experimentos de hibridación utilizando un probador específico, no se pudieron detectar otras clonas diferentes a la reportada. Además, el análisis tipo Southern genómico de DNA de *P. vulgaris* con dos diferentes sondas y con diferentes condiciones de hibridación, indican la presencia de una familia génica reducida, de un máximo de dos miembros. Por lo anterior, nuestro grupo de investigación ha propuesto que en *P. vulgaris* la mayoría de las diferentes formas de profilina observadas son el producto de modificaciones postraduccionales.

- 1.- Sánchez F., *et al* (1991). Annu. Rev. of Plant Physiol. Plant Mol.Biol. 42:502-528.
- 2.- Staiger C., *et al* (1993). Plant J. 4:631-641.
- 3.- Huang S., *et al* (1996). Plant Physiol. 111:115-126.
- 4.- Vidali L., *et al* (1995). Plant Physiol. 108:115-123.
- 5.- Gufflen G., *et al* (1997). Artículo en preparación.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Federico Sánchez Rodríguez, por darme la oportunidad de trabajar en su grupo de investigación y por su contribución en mi formación académica.

Al Dr. Víctor Valdés López, por su participación, que fue verdaderamente importante en el desarrollo de este trabajo y en mi formación académica, pero también por su amistad.

A Luis Vidali, por su participación en el desarrollo de este trabajo.

Al Dr. Roberto Meza, por su asesoría en el manejo de la computadora y el diseño de los oligonucleótidos, pero sobre todo por su amistad.

Al Dr. Gabriel del Río, por su colaboración desinteresada en el modelaje de la estructura tridimensional de la profilina.

A Mónica Prud'homme Sánchez, por su colaboración en la búsqueda de otras clones de cDNA de profilina.

A los miembros de mi comité tutorial de maestría, que fue constituido por los Drs: Gladys Cassab, Mario Zurita, Federico Sánchez y Marco Antonio Villanueva.

A los miembros de mi comité revisor de tesis, que fue constituido por los Drs: Alejandra Covarrubias, Yvonne Rosenstein, Federico Sánchez, Víctor Valdés y Gabriel Iturriaga.

A mis padres, Guadalupe Moreno y Antonio Noguez, por todo su apoyo, cariño y comprensión.

Al Dr. Gabriel Iturriaga por su amistad y por facilitarme el equipo de cómputo de su laboratorio.

A Guadalupe Negrete, Dolores Cuéllar y al Sr. José Luis Ramírez, por que con su trabajo en el laboratorio, contribuyen de manera muy importante al desarrollo de los proyectos de investigación.

A mis compañeros del laboratorio, a todos los miembros del Departamento de Biol. Mol. de Plantas y del Instituto de Biotecnología, por que hay miles de maneras en las cuales han contribuido.

A mis amigos de siempre, Claudia Díaz, Miguel Ángel Villalobos, Nelson Avonce, Roberto Meza y Gerard van der Krogt, por su apoyo incondicional.

A mis amigos: Chanthal, Sandra, Belén, Karin y Paco, por ser finisimas personas para conmigo.

A mis amigos los deportistas: a los del fútbol, a los ciclistas, a los corredores, a los del equipo de levantamiento de tarro y lanzamiento de jabalina, por los campeonatos, los kilómetros recorridos y las marcas registradas.

jiek, jiek, jiek, jiek!!!!!!

Dedicatoria.

*A las personas que con rostro o si el, morían mientras
este trabajo daba lugar.*

Índice

I.- Introducción.....	1
I.1.- Generalidades del citoesqueleto.....	1
I.1.1.- Importancia del citoesqueleto.....	1
I.1.2.- Componentes del citoesqueleto.....	3
1.1.2.1.- Microtúbulos.....	3
1.1.2.2.- Filamentos Intermedios.....	4
1.1.2.3.- Microfilamentos.....	6
I.1.2.3.1.- Actina.....	9
I.1.2.3.2.- Proteínas de unión a actina.....	12
I.1.2.3.3.- Profilina, transducción de señales y arreglos del citoesqueleto.....	12
I.1.2.3.3.1.- Características estructurales de la profilina.....	15
I.1.2.3.3.2.- Contactos de profilina con actina.....	16
I.1.2.3.3.3.- Genética y regulación de la profilina.....	18
I.2.- Organización del citoesqueleto de actina en células vegetales.....	20
I.2.3.1.- En células vegetales en interfase.....	20
I.2.3.2.- En células vegetales en división.....	23
I.3.- La ontogénesis del nódulo simbiótico entre <i>Rhizobium</i> y leguminosas como un modelo para estudiar desarrollo en plantas.....	27
I.4.- Estadios del desarrollo del nódulo.....	27
I.5.- Arreglos del citoesqueleto durante la organogénesis del nódulo de leguminosas.....	32
I.6.- Factores de nodulación y transducción de señales.....	37
II.- Antecedentes.....	40
III.- Objetivos.....	41
IV.- Material y Métodos.....	42
IV.1.- Búsqueda de la profilina en la librería de cDNA de nódulo.....	42
IV.2.- Aislamiento de plásmidos.....	43
IV.3.- Electroforesis en geles de agarosa.....	45
IV.4.- Purificación de Fragmentos de DNA de interés por congelación-centrifugación ("freeze squeeze").....	46
IV.5.- Marcaje radioactivo de sondas de DNA.....	47
IV.6.- Marcaje de DNA por PCR.....	47
IV.7.- Purificación de sondas de DNA radioactivas.....	48
IV.8.- Experimento tipo "Southern genómico".....	49
IV.9.- Condiciones de prehibridación e hibridación.....	50
V.- Resultados.....	51
V.1.- Clonación y caracterización del cDNA de profilina de nódulo.....	51
V.2.- Identidad a otras secuencias de profilina.....	54

V.3.- Análisis de la estructura tridimensional de la profilina de <i>P. vulgaris</i> y la localización de los posibles sitios de modificación postraducciona.....	58
V.4.- Búsqueda de otros cDNAs de profilina de <i>P. vulgaris</i>	62
V.5.- Evaluación del número probable de genes de <i>P. vulgaris</i>	65
V.5.1.- Hibridación utilizando el cDNA de laprofilina de nódulo con el DNA genómico de <i>P. vulgaris</i>	67
V.5.2.- Hibridación del DNA genómico de <i>P. Vulgaris</i> contra una sonda general producida por PCR.....	67
VI.- Discusión.....	72
VII.- Conclusiones.....	76
VIII.- Literatura citada.....	77

Figuras y Tablas

Tabla 1.- Proteínas asociadas a actina.....	8
Fig. 1.- Características estructurales de la actina y la profilina de bovino.....	11
Fig.2.- Modelo de acción de la profilina.....	12
Fig.3.- La reorientación de los cloroplastos es mediada por los filamentos de actina.....	22
Fig.4.- La célula vegetal en división.....	25
Fig.5.- La banda preprofásica.....	26
Fig.6.- Organogénesis del nódulo simbiótico de leguminosas.....	31
Fig.7.- Formación del hilo de infección.....	35
Fig.8.- El hilo de infección.....	36
Fig.9.- El factor de nodulación.....	39
Tabla 2.- Oligonucleótidos para PCR.....	47
Fig.10.- Búsqueda del cDNA de la profilina con el anticuerpo.....	52
Fig.11.- El cDNA de nódulo de <i>P. vulgaris</i>.....	53
Fig.12.- Alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos de la profilina de plantas.....	55
Fig.13.- Dendograma del los alineamientos de aminoácidos de las profilinas de plantas.....	56
Tabla 3.- Identidad a nivel de aminoácidos de la secuencias de profilina deducida de la secuencia del cDNA de <i>P. vulgaris</i> con las secuencias de otros eucariontes.....	57
Fig.14.- Características de la estructura tridimensional de la profilina de <i>P. vulgaris</i>.....	60
Fig.15.- Posibles residuos de aminoácido blanco de modificación postraduccional y su localización espacial en la estructura tridimensional de la profilina de <i>P. vulgaris</i>.....	63
Fig.16.- La búsqueda de otras secuencias de cDNA de profilina utilizando el cDNA de nódulo como sonda.....	64
Fig.17.- Hibridación específica y no específica de las clonas de cDNA de profilina.....	64
Fig.18.- Hibridación tipo "Southern genómico", utilizando el cDNA como sonda.....	66
Fig.19.-Alineamiento de DNA de los ORFs de dos profilinas de <i>A. thaliana</i>.....	69
Fig.20.-Amplificación por PCR del exón II del DNA genómico y del cDNA de <i>P. vulgaris</i>.....	70
Fig.21.- Hibridación tipo Southern genómico de <i>P. vulgaris</i> utilizando el exón II como sonda.....	71

I.-Introducción.

I.1.- Generalidades del citoesqueleto.

I.1.1.- Importancia del citoesqueleto

El desarrollo del citoesqueleto fue sin duda una etapa crucial en la evolución de la célula eucarionte. La adquisición de este organelo le permitió conquistar nuevos nichos al poder desplazarse en su entorno para obtener sus nutrientes, movilizarlos internamente y ejecutar el tráfico intracelular. Actualmente se sabe que el citoesqueleto participa en diversos mecanismos tales como el posicionamiento de receptores y organelos, la transducción de señales, la fecundación en plantas y animales, la formación de los planos de división y la polaridad celular, la formación y el mantenimiento de diversas formas celulares y de fenómenos tan interesantes como la contracción muscular y la migración celular durante la embriogénesis en vertebrados. En organismos multicelulares, el citoesqueleto además de dar forma y sostén a la célula, participa en la formación de los tejidos al interactuar con las placas de adhesión celular o al anclarse con proteínas del plasmalema.

El citoesqueleto es una red dinámica de fibras citosólicas, que puede adoptar una gran variedad de estructuras y experimenta constantes rearrreglos que producen movimiento. Este organelo celular esta formado por tres diferentes elementos, los microtúbulos, los filamentos intermedios y los microfilamentos. Los microtubúlos y los microfilamentos se constituyen de subunidades de tubulina y de actina, respectivamente. Los filamentos intermedios son polímeros mas complejos que forman una α -hélice común, estos dan fuerza de tensión a la célula y forman parte de la lámina nuclear. El ensamble de estructuras complicadas, a partir de

componentes simples, se lleva al cabo por la reacción cruzada de fibras del citoesqueleto, tales como cables y redes. Estos sirven como vías de tráfico a lo largo de los cuales los organelos y otros elementos se mueven en el citosol. Los tres elementos del citoesqueleto forman una red integradora que da forma a la célula, controla y coordina el movimientos de células y tejidos y participa en la transducción e integración de señales (Alberts *et al.*, 1998; Lodish *et al.*, 1995; Lloyd, 1991).

Se sabe que el citoesqueleto juega un papel en cada tipo de motilidad celular desde su migración hasta el transporte de moléculas en el citosol. Las células tienen dos mecanismos básicos para generar movimiento. El primero que involucra una clase de enzimas especiales llamadas proteínas motoras. Este tipo de proteínas utilizan la energía proporcionada por la hidrólisis del ATP y se desplazan a lo largo del microtúbulo o del microfilamento. Algunas proteínas motoras se unen a la membrana de organelos y de vesículas, permitiendo de esta manera el tráfico intracelular. Otro tipo de proteínas motoras causan que las fibras se desplacen unas sobre otras. El segundo mecanismo involucra la despolimerización y polimerización de tubulina y actina y su ensamble en cables y redes, lo que provoca cambios en la forma de la célula y el establecimiento del flujo citoplásmico, entre otros. Sin embargo, pocos movimientos celulares involucran a ambos mecanismos simultáneamente (Alberts *et al.*, 1998; Lodish *et al.*, 1995; Lloyd, 1991).

I.1.2.-Componentes del citoesqueleto.

I.1.2.1.-Los microtúbulos.

Los microtúbulos (MTs) son filamentos de 24 nm de diámetro y cuyo componente básico de polimerización es la tubulina. Cada tubulina es un heterodímero compuesto por dos isoformas, α y β ; donde cada isoforma tiene un peso molecular aproximado de 50 kDa. El monómero de tubulina es una proteína globular de 4 nm de diámetro; el heterodímero tiene 8 nm de largo y se une a dos moléculas de GTP. El GTP se une de manera irreversible a un sitio específico en la α -tubulina y no se hidroliza. Un segundo GTP se une reversiblemente a otro sitio específico localizado en la β -tubulina y es hidrolizado a GDP. La hidrólisis de GTP en la α -tubulina está asociada con la formación del heterodímero. El heterodímero se arregla con una periodicidad de 13 subunidades por vuelta; sin embargo en ciertos casos otros microtúbulos presentan de 11 a 15 protofilamentos, como es el caso en cilios y flagelos. La tubulina tiene la capacidad de polimerizarse y despolimerizarse en tubos que presentan polaridad. Esto, junto con la capacidad de interactuar con una gran variedad de proteínas llamadas MAPs (Microtubules Associated Proteins) le permiten participar en una gran variedad de procesos celulares (Gelfand y Barshadsky, 1986). Un mecanismo para regular la longitud de los microtúbulos, es la unión de ciertas MAPs a los microtúbulos. En la mayoría de los casos, este proceso se acompaña por la fosforilación o la defosforilación de dominios expuestos que se proyectan de las MAPs. Una de las principales cinasas involucradas es la llamada MAP cinasa (mitogen-activated protein). Hay múltiples MAPcs que son blanco de diferentes vías de señalización. Las MAPcs a su vez son también blanco de

una segunda cinasa, cdc2 cinasa, la cual juega un papel muy importante en controlar las actividades de varias proteínas durante el ciclo celular. Por otro lado, se sabe que múltiples genes de tubulina y modificaciones postraduccionales de ésta, aumentan su diversidad y complejidad en la regulación genética, su ensamble y función específica en diferentes tipos celulares, o durante el desarrollo en diferentes especies. Durante la interfase, los microtúbulos se encuentran concentrados alrededor del núcleo y organizados en uno o más sitios llamados centros organizadores de los microtúbulos (MTOC). Los microtúbulos se distribuyen en forma radial hacia la membrana plasmática. Durante la mitosis, los MTOCs forman los polos del huso mitótico, los cuales son sumamente importantes durante la segregación de los cromosomas (Alberts *et al.*, 1989; Lodish *et al.*, 1995; Globerd *et al.*, 1993). Los microtúbulos ayudan a mantener la forma de la célula y dependiendo del tipo celular u organismo del que se trate, pueden participar en procesos tales como la deposición de la pared celular en vegetales (Lloyd, 1991), el movimiento celular al formar parte de cilios y flagelos en ciertos tipos celulares, o durante el transporte de vesículas y cuerpos protéicos en neuronas (Alberts *et al.*, 1989; Lodish *et al.*, 1995; Grain, 1986; Lynn, 1981).

I.1.2.2.-Filamentos intermedios.

Los filamentos intermedios (FIs), son un grupo de filamentos citoplásmicos de 11 nm de diámetro que comprenden varios tipos de proteínas filamentosas, cuyo peso molecular varía de 40-70 kDa. Estas se pueden agrupar en cinco tipos diferentes: 1) queratinas ácidas; 2) queratinas básicas; 3) vimentinas; proteínas fibrilares de las células gliales;

periferina y desminas; 4) neurofilamentos; y 5) láminas. Los filamentos son extraordinariamente insolubles, una propiedad que sugiere su papel estructural, ya que las fibras se unen a la membrana nuclear, a los desmosomas o a las placas de adhesión de la membrana plasmática. Los componentes protéicos de los FIs son específicos para los diferentes tipos celulares. Todas las subunidades de los FIs tienen una organización estructural común, en donde se distinguen tres distintos dominios: un núcleo central α -hélice flanqueado por dos dominios globulares N- y C-terminal. El núcleo central en todas las proteínas de los filamentos intermedios está conservado y consiste de cuatro α -hélices separado por cuatro regiones no helicoidales. Las posiciones de estos "espaciadores" están muy conservadas en todas las proteínas de los filamentos intermedios. Los segmentos α -hélice se aparean por enrollamiento. Se ha observado por microscopía electrónica, que los dímeros son moléculas de forma alargada con dominios globulares en los extremos. En teoría, los dos polipéptidos en el FI pueden aparearse en forma paralela o antiparalela. Usando desnaturalizantes protéicos y técnicas inmunológicas, se ha visto que los dímeros se asocian lateralmente en tetrámeros de cerca de 70 nm de largo. También hay algunas otras evidencias que sugieren que el tetrámero y no el dímero es la subunidad de los FIs. Se propone que los tetrámeros se unen extremo con extremo, formando protofilamentos de 2 nm de diámetro, un par de éstos se une para formar protofibrillas de 4 nm de amplitud. Finalmente, cuatro protofibrillas forman un FI simple de 10 a 11 nm de diámetro. Debido a que los tetrámeros son simétricos, los FIs no tienen polaridad como en los MFs y MTs. Comparando también con éstos elementos del citoesqueleto, se

entiende muy poco a cerca del ensamble de los FIs. La estabilidad que presentan los FI es un problema especial para las células en mitosis. Estas deben desensamblarse y reorganizar las redes de FIs durante la citocinesis y el ciclo celular. Por ejemplo, se sabe que las láminas se desensamblan antes de la mitosis y se reensamblan después de la división celular. La lámina A y la vimentina son fosforiladas por la cinasa cdc2 cinasa en un residuo específico de serina del extremo N-terminal, promoviendo el desensamblable. No todos los FIs son desensamblados vía cinasas; por ejemplo, los neurofilamentos aunque son fosforilados, no son desensamblados.

La interacción de los FIs con otras estructuras celulares son mediadas por proteínas asociadas a filamentos intermedios (PAFIs), las cuales entrecruzan a los FIs en cables (llamados tonofilamentos), en redes o en membrana plasmática. Se han encontrado pocas PAFIs y a diferencia de las los MFs y MTs no se han descubierto proteínas que sirvan como protectoras de extremos, secuestradoras de FIs ó proteínas motoras (Alberts *et al.*,1989; Lodish *et al.*, 1995).

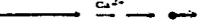
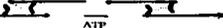
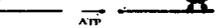
I.2.2.3.-Microfilamentos.

Estas estructuras son polímeros de 7 nm de diámetro compuestos de monómeros de actina. Los microfilamentos se encuentran tanto en el citosol como en el núcleo (Nishida *et al.*, 1987). A los microfilamentos se les involucra en el posicionamiento de receptores (Cantley *et al.*, 1991; Drubin *et al* ; Hartwing *et al.*, 1992; Payraastre *et al.*, 1991; Shariff y Luna 1992), en el tráfico vesicular (Young *et al.*, 1992), en la cariocinesis al formar parte de la banda contractil que separa a las células hijas, y en la contractibilidad

celular (Theriot *et al.*, 1992).

Los microfilamentos son la estructura básica del citoesqueleto de actina. La localización, extensión, polaridad y coordinación del ensamble y desensamble es regulado por un gran número de proteínas de unión a actina, por la transducción de señales que son iniciadas en la superficie de la célula, inducidas por hormonas, factores de crecimiento y receptores de la matriz extracelular. A ésto, se suman diferentes señales internas que son moduladoras de la arquitectura del citoesqueleto: el Ca^{2+} , el inositol trifosfato (IP_3), la fosforilación y defosforilación (Alberts *et al.*, 1989; Lodish *et al.*, 1995; Sparrow y Sheterline 1994). Para entender la extraordinaria versatilidad de los microfilamentos, es necesario describir las características de la actina y de algunas de sus proteínas asociadas (Tabla 1)(Alberts *et al.*,1989; Lodish *et al.*, 1995).

Tabla 1.- Algunas de las principales clases de proteínas de unión a actina

Función de la proteína	Ejemplo de proteína	Comparación de tamaño, forma y peso molecular.	Esquema de la interacción con actina
Forma filamentos	actina		
Estabiliza filamentos	tropomiosina		
Formación de cables	fimbrina		
	α-actinina		
Entrecruzamiento de filamentos (Formación de gels)	filamina		
Fragmentación de filamentos	gelsolina		
Desplazamiento de filamentos	miosina		
Movimiento de vesículas	minimiosina		
Cobertura del extremo más y unión a la membrana plasmática	cap100		
Unión de los filamentos a la membrana plasmática	espectrina		
Secuestrador de monómeros de actina	timosina β1.4		
Polimerizador y secuestrador de actina	profilina		

Algunas de las principales clases de proteínas de unión a actina. Modificado de Alberts *et al.*, 1989; Shterline y Saprow, 1994.

I.1.2.3.1.-Actina.

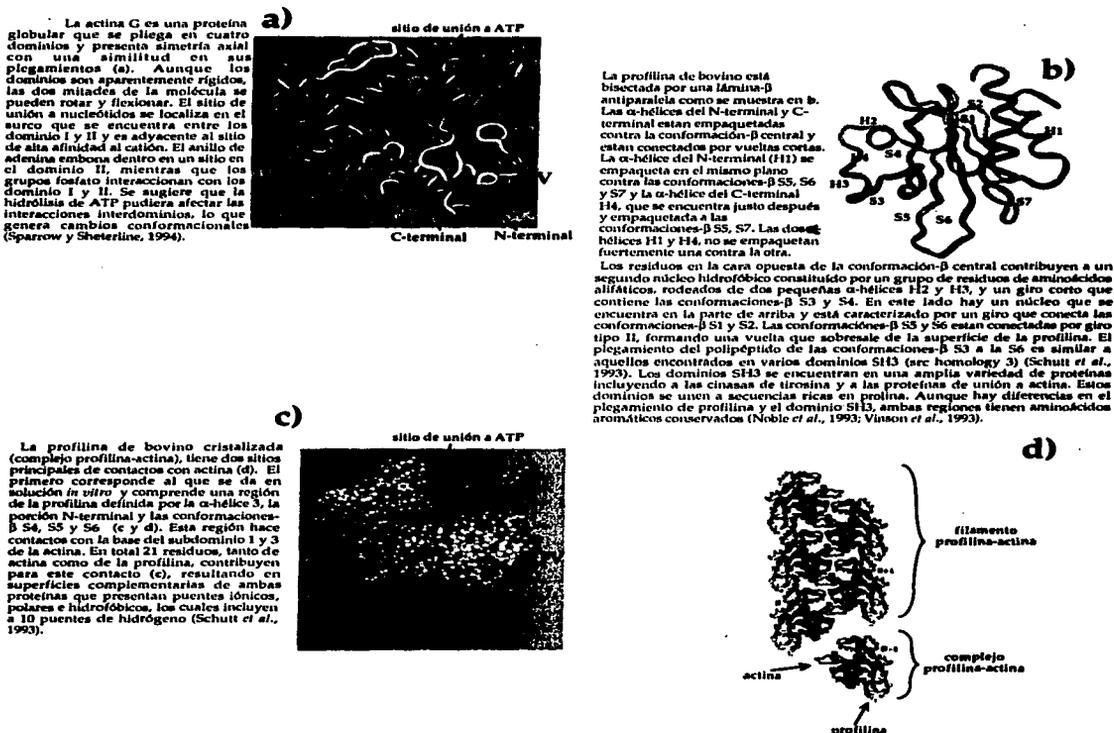
La actina G es una proteína globular de 375 residuos de aminoácidos y un peso molecular aproximado de 43 kDa. Esta proteína se pliega en cuatro dominios y presenta simetría axial con una similitud en sus plegamientos (Fig. 1a). Aunque los dominios son aparentemente rígidos, las dos mitades de la molécula se pueden rotar y flexionar. El sitio de unión a nucleótidos se localiza en el surco que se encuentra entre los dominio I y II y es adyacente al sitio de alta afinidad al catión. El anillo de adenina embona dentro en un sitio en el dominio II, mientras que los grupos fosfato interaccionan con los dominio I y II. Se sugiere que la hidrólisis de ATP pudiera afectar las interacciones interdominios, lo que genera cambios conformacionales (Sparrow y Sheterline, 1994).

Se han descrito diferentes modificaciones postraduccionales en la actina. Entre éstas se encuentran el procesamiento de la región amino terminal, en la cual se le remueve de uno a dos aminoácidos anteriores al aminoácido que va a ser acetilado. La metilación de la histidina 73 que se presenta en la mayoría de las actinas; y la fosforilación del residuo 203 de la actina de *Physarum policephalum* que inhibe la nucleación; la fosforilación de actina en *Dyctiostelium* que regula el ensamblaje de actina y el comportamiento de células; la ribosilación de ADP del residuo de arginina 177, que impide la polimerización de actina G en actina F. En este caso se propone que la ribosilación bloquea los extremos "+" del filamento (Sparrow y Sheterline, 1994).

En experimentos *in vitro*, la adición de iones Mg^{2+} , K^+ , Na^+ a la proteína purificada, inducen la polimerización de actina G en actina filamentosa (actina F), siendo este proceso reversible. Estos filamentos son

idénticos a los microfilamentos aislados de las células. El ensamble de actina G en actina F es acompañada por la hidrólisis de ATP a ADP y Pi. La hidrólisis de este nucleótido no es necesaria para que la polimerización ocurra; sin embargo, si afecta su cinética de manera positiva. El filamento de actina no solo tiene polaridad estructural sino también una polaridad en la cinética de polimerización. El extremo "+" se elonga de 5 a 10 veces más rápido el extremo "-". Experimentos *in vitro* de protección de uno u otro extremo han demostrado que la diferencia en las velocidades se deben a la diferencia en las concentraciones críticas (C_{cs}) de ambos extremos. Estas a su vez llevan a un fenómeno conocido como "migración del filamento", en el cual cuando las C_{cs} son intermedias entre ambos extremos "+" y "-", las unidades se disocian en el extremo "-" pero se adicionan en el extremo "+" con la misma velocidad. En las células probablemente no ocurre migración del filamento, ya que las proteínas bloqueadoras protegen a los extremos del filamento, además de aquellas que secuestran monómeros de actina, disminuyendo su concentración (Tabla 1) (Alberts *et al.*, 1989; Lodish *et al.*, 1995).

Fig. 1.- Características estructurales de la actina y la profilina de Bovino.



1.1.2.3.2.-Proteínas de unión a actina

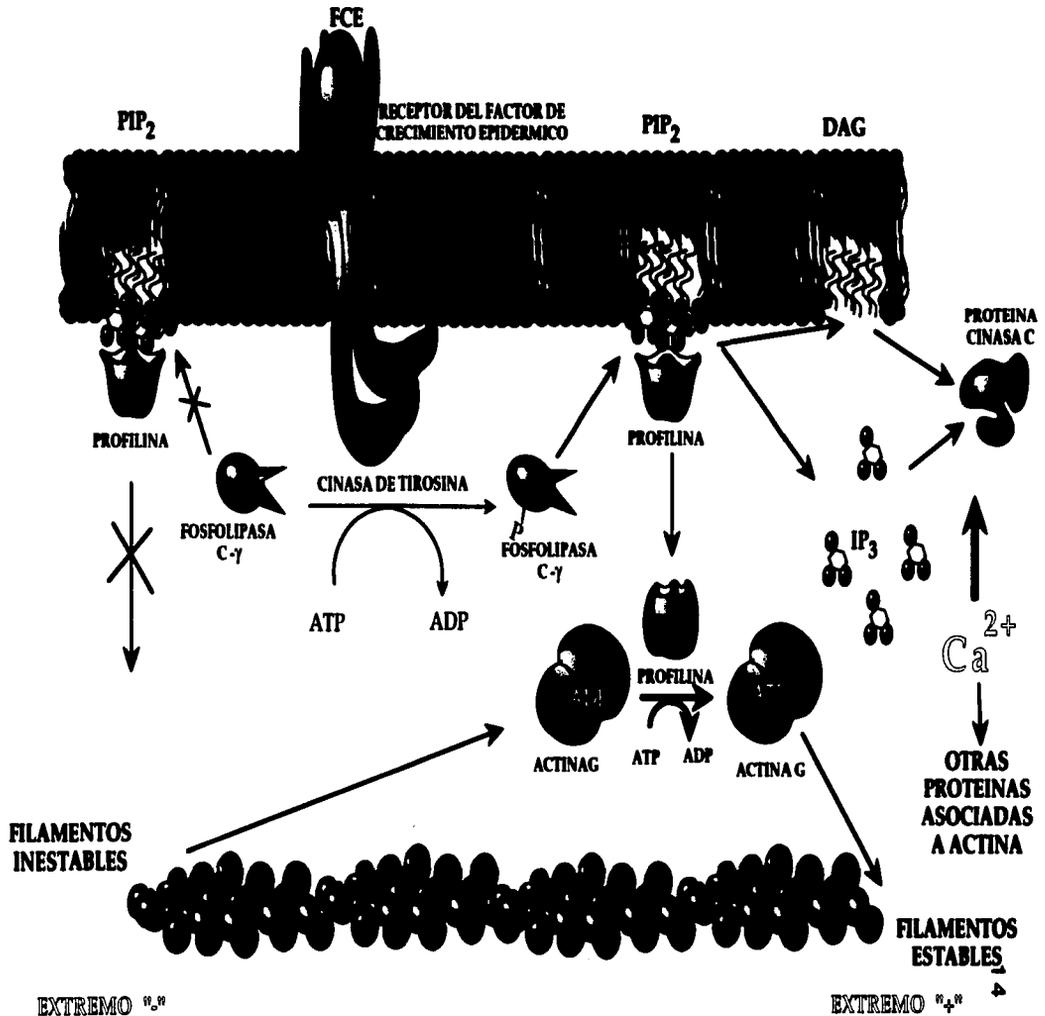
Existen más de 100 proteínas de unión a actina reportadas. Las principales categorías en cuanto a la función de este tipo de proteínas incluyen proteínas motoras (miosinas); proteínas que estabilizan el filamento (tropomiosinas); proteínas que desestabilizan el filamento (cofilinas); proteínas que entrecruzan el filamento, ya sea en paralelo (villina); en antiparalelo (α -actinina); ó desordenadamente (filamina); proteínas que rompen con la estructura del filamento (gelsolina); ó que protegen el extremo "+" del filamento impidiendo su crecimiento (cap 100) y proteínas que se unen al monómero secuestrándolo (timosinas) o regulando la cinética de crecimiento (profilina) (Alberts *et al.*, 1989; Lodish *et al.*, 1995; Sparrow y Sheterline, 1994).

1.1.2.3.3.- La profilina, la transducción de señales y rearrreglos del citoesqueleto.

La profilina es una proteína de bajo peso molecular (12-15 kDa), que se une a actina y a poli-L-prolina. Se encuentra ampliamente distribuida en eucariontes (Haarer y Brown, 1990; Valenta *et al.*, 1991; Machesky y Pollard, 1993). Los altos niveles de profilina *in vitro*, pueden inhibir la nucleación y la polimerización de actina (Reichstein y Korn, 1979; Tseng *et al.*, 1984; Lindberg *et al.*, 1988). A baja concentración de profilina, aumenta la velocidad de intercambio de ADP por ATP a la actina-G. (Mocrin y Korn, 1991; Goldchmidt-Clermont *et al.*, 1991a). La polimerización de actina es en gran parte mediada por un recambio fino entre timosina β 4 y profilina las cuales compiten por actina (Goldchmidt-Clermont *et al.*, 1991c). La timosina β 4 secuestra monómeros de actina y bloquea la

repolimerización de los monómeros de actina (Cassimeris *et al.*, 1992), mientras que la profilina promueve su repolimerización (Pantaloni y Carlier, 1993) al catalizar el cambio de actina-ADP por actina-ATP (Glodschmidt-Clermont *et al.*, 1991a; Pantaloni y Carlier, 1993). Los cambios en la concentración de profilina son afectados por el inositol trifosfato (IP₃). La profilina se une a fosfatidilinositol (4,5)-bifosfato (PIP₂) y bloquea la actividad hidrolítica de fosfolipasa Cγ1 (PLCγ1) (Goldschmidt-Clermont *et al.*, 1991b; Staiger *et al.*, 1994; Drøback B. *et al.*, 1994). Todos estos datos experimentales sugieren un modo de participación de la profilina en la transducción de señales y en rearrreglos del citoesqueleto. Cuando las células reciben una señal por un receptor transmembranal, transducen la señal induciendo la actividad de cinasa, la cual fosforila a la PLCγ1. La fosfolipasa PLCγ1 desplaza a profilina de PIP₂. Por un lado, esto induce un incremento localizado de profilina que potencia la velocidad intercambio de ADP-actina-G en ATP-actina-G y la polimerización de actina. Por otro lado, la PLCγ1-P rompe al PIP₂ en inositol trifosfato (IP₃) y diacilglicerol (DAG), lo que a su vez aumenta los niveles de Ca²⁺ intracelular y activa a ciertas proteínas cinasas promoviendo rearrreglos del citoesqueleto por medio de otras proteínas de unión a actina (Fig. 2) (Goldschmidt-Clermont *et al.*, 1991b; Sharriff, 1992; Aderem A, 1992).

Fig. 2.- MODELO DE ACCION DE LA PROFILINA



1.1.2.3.3.1.-Características estructurales de la profilina.

La profilina de bovino está bisectada por una lamina- β antiparalela como se muestra en la Figura 1b. Las α -hélices del N-terminal y C-terminal están empaquetadas contra la conformación- β central y están conectados por vueltas cortas. La α -hélice del N-terminal (H1) se empaqueta en el mismo plano contra las láminas- β S5, S6 y S7 y la α -hélice del C-terminal H4, que se encuentra justo después y empaquetada a las conformaciones- β S5, S7. Las dos α -hélices H1 y H4, no se empaquetan fuertemente una contra la otra; sin embargo contribuyen junto con la conformación- β central (S6) a la formación de una superficie hidrofóbica, así como la formación de un puente salino entre un residuo de ácido aspártico (Asp⁸) y lisina (Lys¹²⁶). Los residuos en la cara opuesta de la conformación- β central contribuyen a un segundo núcleo hidrofóbico constituido por un grupo de residuos de aminoácidos alifáticos, rodeados de dos pequeñas α -hélices H2 y H3, y un giro corto que contiene las conformaciones- β S3 y S4. En este lado hay un núcleo que se encuentra en la parte de arriba y está caracterizado por un giro que conecta las conformaciones- β S1 y S2. Las conformaciones- β S5 y S6 están conectadas por giro tipo II, formando una vuelta que sobresale de la superficie de la profilina. El plegamiento del polipéptido de las conformaciones- β S3 a la S6 es similar a aquellos encontrados en varios dominios SH3 (src homology 3) (Schutt *et al.*, 1993). Los dominios SH3 se encuentran en una amplia variedad de proteínas incluyendo a las cinasas de tirosina y a las proteínas de unión a actina. Estos dominios se unen a secuencias ricas en prolina. Aunque hay diferencias en el plegamiento de profilina y el dominio SH3, ambas regiones tienen aminoácidos aromáticos conservados (Noble

et al., 1993; Vinson *et al.*, 1993). El alineamiento de 16 secuencias de profilina en el banco de datos Swiss Protein, demostraron que hay residuos de aminoácidos hidrofóbicos conservados en las secuencias de profilinas, estos son Trp³, Tyr⁶, Trp³¹, His¹³³, Leu¹³⁴ y Tyr¹³⁹ los cuales forman una superficie hidrofóbica (Schutt *et al.*, 1993; Archer *et al.*, 1994). Experimentos de especificidad de profilinas a las cuales se les han cambiado los residuos Trp³ ó His¹³³, pierden la afinidad por poli-L-prolina. Una segunda función de esta superficie hidrofóbica puede ser el pegado a PIP₂ (Schutt *et al.*, 1993). Esto es apoyado por experimentos de enmascaramiento de fluorescencia de los residuos Trp³ y Trp³¹ en presencia de PIP₂ (Raghuwatanan *et al.*, 1992).

1.1.2.3.3.2.-Contactos de la profilina con actina.

La profilina de bovino cristalizada (complejo profilina-actina), tiene dos sitios principales de contactos con actina (Fig. 1c) (Schutt *et al.*, 1993). El primero corresponde al que se da en solución *in vitro* y comprende una región de la profilina definida por la α -hélice 3, la porción N-terminal y las conformaciones- β S4, S5 y S6. Esta región hace contactos con la base del subdominio 1 y 3 de la actina. En total 21 residuos, tanto de actina como de la profilina, contribuyen para este contacto (Fig. 1 c y d), resultando en superficies complementarias de ambas proteínas que presentan puentes iónicos, polares e hidrofóbicos, los cuales incluyen a 10 puentes de hidrógeno (Schutt *et al.*, 1993). Datos de estudios bioquímicos sugieren que el residuo Phe³⁷⁵ de la actina es importante en este sitio de contacto con la profilina y estudios de cristalográficos, sugieren que este residuo

interacciona con los residuos Ile⁷³, His¹¹⁹, Gly¹²¹ y Asn¹²⁴ de la profilina. Además, se propone una interacción electrostática de Lys¹²⁵ de profilina de bovino (equivalente al residuo Lys¹¹⁵ de *Acanthamoeba castellani*) con Glu³⁶⁴ de la actina (Malm B, *et al.*, 1983; Schutt *et al.*, 1993).

El segundo sitio de contacto de la profilina con una segunda molécula de actina en el cristal, se da a través de las simetrías relacionadas con el complejo profilina-actina en el filamento (Fig. 1 d). En esta interacción participa la mitad del α -helice del amino terminal (H1) de la profilina con el surco formado por 3 de las 4 α -helices del subdominio 4 de la actina. Esta área de contacto comprende 14 residuos de actina y 11 de profilina. Sólo un puente de hidrógeno se encuentra en este sitio y la mayoría comprende enlaces hidrofóbicos. Este segundo sitio de contacto entre actina y profilina es más parecido a los sitios de contacto de actina-actina en el filamento, que a los contactos primarios de actina-profilina. La profilina actúa como "cuña" entre las dos moléculas de actina adyacentes, estabilizando el contacto de actina-ATP en el filamento, aparentemente a través de la unión a dos sitios complementarios de actina, no obstante que la formación del filamento de actina en los cristales es una característica independiente de la presencia de profilina (Schutt *et al.*, 1993). La habilidad de profilina para unirse simultáneamente a dos sitios con actina y a la secuencia rica en prolinas, puede tener una importante función biológica (Schutt *et al.*, 1991).

I.1.2.3.3.3.- Genética y regulación de la profilina.

La profilina fue aislada primero de bazo de ternera (Carlsson *et al.*, 1977) y en la actualidad se han identificado en una amplia variedad de organismos eucariontes. Por ejemplo, las levaduras tienen un sólo gen (Magdolen *et al.*, 1988); la disrupción génica de éste no es letal para las células sin embargo, presentan un fenotipo de sensibilidad incrementada a la temperatura, con alteraciones en el citoesqueleto de actina y cambios en su morfología (Haarer *et al.*, 1990). Algunos organismos tales como *Acanthamoeba* (Machesky *et al.*, 1990), *Dictyostelium discoideum* (Haugwitz M., *et al.*, 1991), (Machesky y Pollard, 1993), *Zea mays* (Staiger *et al.*, 1993), tienen secuencias múltiples de profilina en su genoma. En humanos se han encontrado múltiples secuencias de profilina, pero tan sólo dos isoformas han sido identificadas, por lo que se piensa que la mayoría pueden ser pseudogenes (Kwiatowski y Bruns, 1988). Por otro lado *Dictyostelium* (Haugwitz *et al.*, 1991), *Physarum* (Binette *et al.*, 1990), *Drosophila* (Cooley *et al.*, 1992) y en ciertos mamíferos, se ha visto una expresión diferencial durante el desarrollo.

En plantas se ha detectado la presencia de familias multigénicas de profilina. Por ejemplo *Z. mays*, presenta de tres a seis genes de profilina. De estos, tres cDNAs se han clonado y caracterizado: ZmPro1, ZmPro2 y ZmPro3, los cuales presentan una expresión preferencial en las anteras y el polen (Staiger *et al.*, 1993). En *Arabidopsis thaliana*, la familia génica de la profilina presenta aproximadamente ocho miembros de los cuales se han caracterizado cuatro secuencias, tres cDNAs PRF1, PRF2, PRF3 y dos clonas genómicas, las cuales codifican para cuatro diferentes profilinas. El mensajero correspondiente a PRF1 se expresa en los principales órganos

de la planta, mientras que PRF4 se expresa específicamente en el polen maduro (Hung *et al.*, 1996) Otros cDNAs de profilina del polen y tejidos vegetativos de mono- y dicotiledoneas han sido aislados y secuenciados (Valeta *et al.*, 1991; Ebner *et al.*, 1991). Sin embargo no se sabe cual es su patrón de expresión y su función. El análisis filogenético de las secuencias de aminoácidos de profilina de plantas, ha llevado a proponer la existencia de dos grupos separados en cuanto a su expresión y su función: un grupo de expresión constitutiva y otro grupo de expresión específico de polen (Hung *et al.*, 1996).

I.2.- Organización del citoesqueleto de actina en células vegetales.

I.2.1.- En células vegetales en interfase.

El citoesqueleto de actina en vegetales tiene las dos estructuras generales de organización: cables y redes. Estas dependen predominantemente de la forma de la célula (Parthasaratly, 1985). Las células elongadas como del tejido vascular de la raíz, de las capas epidérmicas de las hojas y de los coleóptilos, presentan una gran actividad de flujo citoplásmico; allí, el citoesqueleto de actina se presenta en grandes cables subcorticales conectados a ciertos elementos periféricos más finos, ambos con una orientación longitudinal. En células esféricas como las de los cultivos en suspensión, el endospermo (Abe *et al.*, 1991) o el tejido de fruta tienen redes tridimensionales de actina (Parthasaratly, 1985). Parece ser que la función principal de los grandes haces subcorticales es producir el flujo citoplásmico o de organelos (Parthasaratly, 1985). No se sabe con exactitud la función de los elementos periféricos del citoesqueleto de actina, pero se piensa que éstos podrían estar participando en la organización espacial de los componentes del ectoplasma. Por medio de observaciones de microscopía electrónica se muestran asociaciones muy cercanas entre el córtex y el retículo endoplásmico (RE), sugiriendo la influencia de los microfilamentos del citoplasma perietal en la organización del RE periférico. En células vivas, delgadas y transparentes como los tricomas de las plantas, el movimiento citoplásmico puede ser observado. Estas contienen una vacuola grande, a través de las cuales cruzan tubos transvacuolares de citoplasma de 1 μM de diámetro. Se puede observar partículas individuales, tales como las mitocondrias, que pueden moverse rápidamente a través del citoplasma transvacuolar. El

citoplásma contiene cables de actina filamentosos que parecen surgir de una región cercana al núcleo, se observa que los tubos transvacuolares, cambian de forma y posición continuamente, emergiendo, ramificándose y formando nuevos tubos (Alberts *et al.*, 1989). En el alga del género *Moungieta* cada célula cilíndrica contiene un solo cloroplasto en forma aplanada y alargada. Los microfilamentos median un giro de los cloroplastos para orientarlos en una posición vertical u horizontal de acuerdo a la incidencia e intensidad de la luz, optimizando de esta manera su absorción (Fig. 3) (Cox *et al.*, 1987).

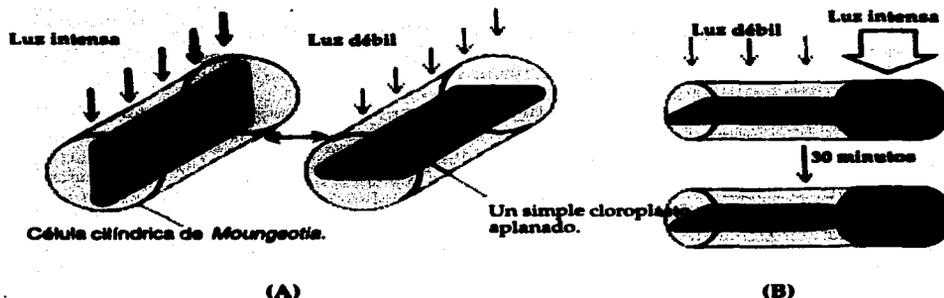
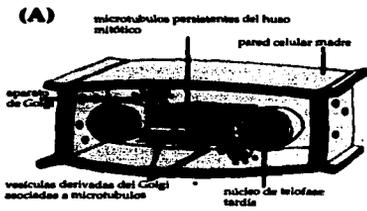


Fig. 3.- El movimiento del cloroplasto del alga verde *Mougeotia*. Esta célula cilíndrica contiene un solo cloroplasto alargado y aplanado, cuya orientación se regula de acuerdo a la cantidad de luz que es absorbida (A). Cuando una porción de la célula es expuesta a la luz intensa, esta región se reorienta de manera independiente al resto del cloroplasto (B). El citoesqueleto de actina unido a la membrana externa del cloroplasto media su orientación. Las moléculas foto-receptoras son el fitocromo y un receptor de luz azul localizados muy cerca de la membrana plasmática. La iluminación de estos receptores con un microhaz de luz causa un influjo de Ca^{2+} , este segundo mensajero unido a calmodulina, dispara un giro de la red de actina la cual esta unida a la membrana externa del cloroplasto (Alberts *et al.*, 1989).

I.2.2.- En células vegetales en división.

Debido a que las células vegetales están encerradas en una pared rígida, el mecanismo de división celular es muy diferente al de los animales. Más que por un estrangulamiento por medio de un anillo contráctil de microfilamentos de actina, las células vegetales se dividen al formar una nueva pared que se organiza dentro de la célula (plato de división). El plato de división se forma en un plano entre los núcleos hijos y en asociación con los residuos polares de los microtúbulos del huso mitótico, los cuales forman una estructura cilíndrica, llamada fragmoplasto (Figs. 4 y 5). Los microtúbulos probablemente son nucleados en la superficie de la membrana nuclear y embebidos en el plato de división. Las pequeñas vesículas derivadas del aparato de Golgi llevan precursores de la pared celular, las vesículas parecen estar conectadas con los microtúbulos a cada lado del fragmoplasto y pueden ser transportadas a lo largo de éstos para fusionarse al plano ecuatorial. El huso mitótico no es suficiente para determinar la posición exacta ni la forma del plato de división. El futuro plano de división parece estar definido de manera muy temprana, antes de que inicie la mitosis por un cable grueso de microtúbulos llamado banda preprofásica, la cual está situada justo por debajo de la membrana plasmática (Alberts *et al.*, 1989). La banda preprofásica contiene numerosos MFs además de los MTs. Aunque los MTs desaparecen cuando las células entran en mitosis, los MTs definen la región en el cortex para la unión de una red radial de filamentos de actina que cruzan la vacuola y soportan al núcleo central en división (Kikamoto y Shabaoka, 1987; Traas *et al.*, 1987; Loyd y Traas, 1988). Estos microfilamentos persisten a lo largo de la fase mitótica y proporcionan

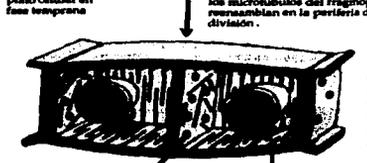
una "memoria" que determina el plano de división (Fig. 5). Durante la citocinesis, el fragmoplasto crece centrifugamente, y el plato en crecimiento está conectado al sitio de la banda preprofásica por filamentos de actina, por lo que se ha propuesto que estos elementos del citoesqueleto de actina juegan un papel estructural esencial en el alineamiento del plano de división de las células vegetales (Kakimoto y Shibaoka, 1987; Traas *et al.*, 1987; Loyd y Traas, 1988). En las células meristemáticas de trigo, el citoesqueleto de actina es completamente desensamblado y reorganizado durante la preprofase (Clayton y Loyd, 1985; McCurdy y Gunning, 1990). Los MFs se reorganizan paralelamente entre ellos pero de manera transversal a la célula (McCurdy y Gunning, 1990). Estos se desorganizan nuevamente antes de la metafase y no se detectan MFs durante la mitosis sino hasta el inicio de la citocinesis, donde la actina organiza al fragmoplasto (Clayton y Loyd, 1985; Kakimoto y Shibaoka, 1987). Los filamentos de actina de las dos mitades del fragmoplasto tienen una direccionalidad que determina el transporte de vesículas hacia la placa de división (Kakimoto y Shibaoka, 1988). Los filamentos de actina se encuentran asociados de alguna manera al huso mitótico en algunas células, pero hay evidencias que indican que no participan en generar la fuerza que separa a los cromosomas (Baskin y Conde, 1990). Los MFs deben participar más bien en la orientación e integridad estructural del huso acromático y del fragmoplasto (Cho y Wick, 1990; Schmit y Lambert, 1987; Traas *et al.*, 1989; Wick *et al.*, 1981; 1983).



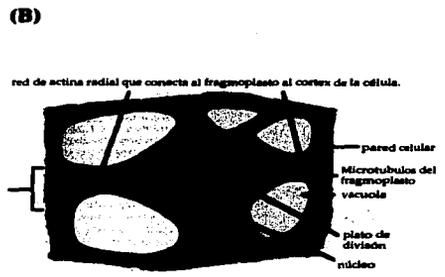
Las vesículas llevan precursores de pared celular que se acumulan en la región ecuatorial dónde los microtubulos se sobrelapan y se fusionan al plato de división de fase temprana.



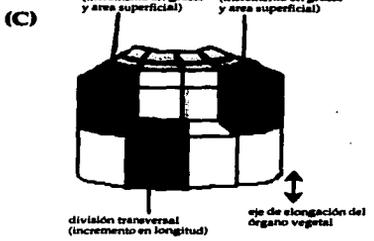
A medida que más material es incorporado la pared crece, la cual se desarrolla en el interior de la membrana unido al plato de división



plasmodemesmo en células adyacentes. se reestablece el arreglo cortical de los microtubulos



(B)



(C)

Fig. 4.- El proceso de citoquinesis de la célula vegetal de plantas superiores con una pared rígida (A). La organización de los filamentos de actina en la célula vegetal durante la citocinesis (B). Los tres planos de división encontrados en un órgano vegetal típico. Las variaciones en las proporciones relativas de cada uno de éstos, combinado con un cambio en la dirección de la expansión celular, pueden ser la causa de los patrones morfogénicos en plantas (C).

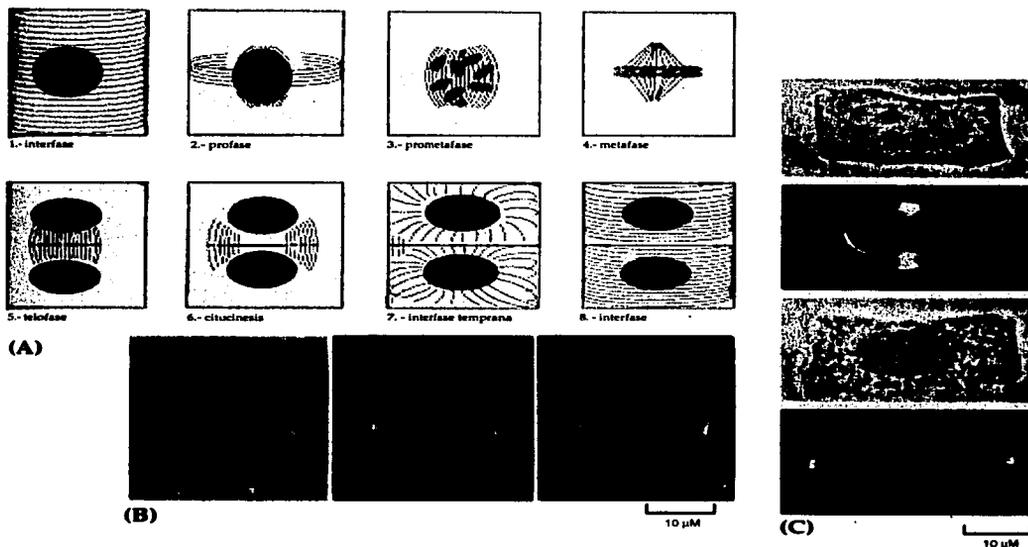


Fig. 5- La banda preprofásica de microtúbulos en células vegetales de plantas superiores. (A) Un esquema que simplifica el cambio de distribución de microtúbulos durante el ciclo celular en células vegetales superiores, enfatizando los cuatro tipos de arreglo. En células que están en interfase los microtúbulos se organizan en forma transversal a lo largo de la célula (A-1), cuando entran a la profase se agrupan en una banda gruesa de más de un ciento de microtúbulos, llamada banda preprofásica, la cual tiene 1-3 μM de grosor. (A-2). La banda preprofásica predice el futuro plano de división. El huso mitótico se forma (A-3) y alinea a los cromosomas en el ecuador (A-4). Finalmente los microtúbulos se organizan durante la citocinesis en el fragmaplasto (A-5), los cuales se colocan por debajo de la nueva pared celular. El arreglo es reestablecido (A-8), en las células hijas, los microtúbulos polimerizados se organizan de un material centrosomal amorfo que se encuentra en la superficie del núcleo. (B) Microtúbulos teñidos por inmunofluorescencia en la banda preprofásica de una célula de raíz de cebolla, a la izquierda se muestra la célula, a la derecha dos planos dónde se relaciona la banda preprofásica alrededor del núcleo. (C) Aunque las dos células demuestran una forma similar, en la célula de arriba la banda preprofásica predice que la célula se dividirá transversalmente, mientras que la de abajo lo hará de manera longitudinal (Alberts *et al.*, 1989).

I.3.- La ontogénia del nódulo simbiótico entre *Rhizobium* y leguminosas como un modelo para estudiar el desarrollo en las plantas.

La organogénesis del nódulo simbiótico entre *Rhizobium* y *Leguminosae* es un sistema alternativo para estudiar el desarrollo en plantas, ya que ofrece la posibilidad de plantearse preguntas interesantes en la interacción célula-célula, el papel de la transducción de señales, el disparo de la morfogénesis y la regulación genética diferencial de ambos genomas (procarionte y eucarionte). Otros tópicos que geman del estudio del desarrollo del nódulo como un modelo son: ligandos y receptores, vías de señalización e identificación de activadores transcripcionales, el papel del citoesqueleto en la forma célula y el control del ciclo celular vegetal (Hirsch A. M. ,1992.; Sánchez *et al.*, 1991; Mylona *et al.*, 1995).

I.4.- Estadíos del desarrollo del nódulo

El resultado de una simbiosis exitosa entre las plantas de la familia *leguminosae* con bacterias del suelo de los género *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* y *Azorhizobium* (colectivamente conocidos como rhizobia), es la formación de nódulos fijadores de nitrógeno. (Elkan, 1994; Martínez *et al.*, 1990, 1992). En general, los rhizobia tienen la habilidad para interaccionar con un número restringido de plantas huésped. La especificidad en las interrelaciones entre los simbiosites involucra mecanismos de reconocimiento y una señalización a distancia que regula la expresión espacio temporal tanto del genoma procarionte como del eucarionte (Fig. 6). Dentro de estas señales la planta secreta flavonoides, entre otras moléculas orgánicas, ante los cuales la bacteria presenta quimiotáxis. Se ha propuesto que estos flavonoides se unen al producto del

gen *nod* D de la bacteria que es expresado constitutivamente e inducen de manera específica la expresión de los genes de nodulación (genes *nod*) los cuales participan en la síntesis del factor de nodulación (Peters y Verma, 1990; Hungria *et al.*, 1992). La entrada de la bacteria puede ocurrir a través de diferentes mecanismos: por heridas, fisuras producidas por brotes de raíces laterales y por pelos radiculares, en todos estos casos se ha visto la presencia de hilos de infección. A continuación se describirá el proceso de infección vía pelos radiculares (Rolfe y Gresshoff, 1988).

Brevemente, después del anclaje de los rhizobia a la punta de los pelos radiculares en desarrollo (Fig. 6), éstos se curvan en una estructura llamada "cayado del pastor" (Fahraeus, 1967), donde se atrapa un grupo de bacterias y justo por debajo del sitio de anclaje se forma una estructura tubular llamado hilo de infección (Dart, 1974). Al mismo tiempo, en el cortex de la raíz se organiza un meristemo que formará parte del nódulo; durante este proceso algunas células quedan en un estado tetraploide (Calvert *et al.*, 1984). El curvamiento del pelo radicular es seguido por la infección de los pelos radiculares por la bacteria, a través de una invaginación de la pared celular cuyo crecimiento continuo lleva a la formación del hilo de infección (Brewin, 1991). Estos tubos penetran a través de las paredes dirigiéndose al primordio del nódulo por crecimiento y ramificación, siendo éste el medio de transporte y donde la bacteria se multiplica. Al mismo tiempo que el primordio nodular se agranda para incluir las células adyacentes del periciclo y la endodermis; se inicia el crecimiento hacia fuera del nódulo. Posteriormente, las células bacterianas llegan a las células poliploides vía hilos de infección, éstas atrapan a los rhizobia en membranas peribacteroidales de origen vegetal. En este punto,

la bacteria se diferencia en bacteroide y empieza a fijar nitrógeno (Rolfe y Greshof, 1988; Sánchez *et al.*, 1991). Para que ocurra una invasión exitosa, los rhizobia requieren además de los genes *nod*, los genes *exo* y los genes *lps*, que contribuyen a la especificidad al interactuar con las lectinas del huésped y otros eventos que impiden que se disparen la respuesta de defensa de la planta (Noel, 1992). Sin embargo la infección es un evento muy raro; solo una pequeña porción de los pelos radiculares son infectados y no todas las infecciones darán origen a los nódulos (Dart, 1974). Muchos hilos de infección abortan en la base del pelo radicular o en el córtex. El aborto del hilo de infección es acompañado por la reacción hipersensible que puede ser parte del mecanismo por el cual la planta controla la infección y regula la nodulación (Vasse *et al.*, 1993). Se ha propuesto que la planta tiene todo el potencial para controlar el número y la forma de los nódulos. Una evidencia que apoya este hecho es que ciertos cultivares de *Medicago sativa*, bajo condiciones de limitación de nitrógeno, tienen la capacidad de formar nódulos espontáneamente en ausencia de los rhizobia (Truchet *et al.*, 1989).

El tipo de nódulo así como su forma y tamaño son determinados por la planta. Basado en la presencia o ausencia de un meristemo persistente, el nódulo es clasificado en dos grupos principales: nódulos indeterminados y nódulos determinados. Los nódulos indeterminados son característicos de leguminosas de clima templado tales como chícharo y alfalfa, los cuales mantienen un meristemo, en el cual un grupo de células se divide en el extremo distal del nódulo, cuyos derivados se diferencian en otros tipos celulares o forman parte del meristemo. La producción continua de nuevas células en el extremo distal resulta en la formación de nódulos elongados.

Además los nódulos indeterminados, contienen diferentes zonas que representan todos los estadios del desarrollo del nódulo: (1) el meristemo; (2) la zona de invasión, que consiste en numerosos hilos de infección y células recientemente infectadas; (3) la interzona, que se encuentra entre la zona recién infectada y la primera zona simbiótica; (4) la primera zona simbiótica donde la diferenciación final de los bacteroides toma lugar y la cual contiene células infectadas con bacteroides altamente empaquetados (que fijan nitrógeno); (5) la zona simbiótica posterior, que presenta un decremento en el nivel de fijación de nitrógeno, (6) y la zona de senescencia (Fig. 6) (Vasse *et al.*, 1990). Por otro lado, en nódulos determinados, la actividad mitótica cesa durante la etapa temprana del desarrollo del nódulo. El crecimiento del nódulo se debe principalmente al alargamiento de las células, del cual resulta un nódulo de forma esférica. El tejido central consiste de una zona fijadora de nitrógeno y en el centro la región de senescencia. Los nódulos determinados son característicos de leguminosas de climas tropicales, entre estas podemos ejemplificar a *Glycine max*, *Phaseolus vulgaris*, *Vigna unguiculata* y *Leucaena leucocephala* (Vasse *et al.*, 1990; Sánchez *et al.*, 1991). Un caso muy especial se presenta en *Sesbania rostrata*; una leguminosa de clima tropical, que no solo es nodulada en las raíces, sino también en los tallos. Los nódulos de las raíces parecen ser intermediarios entre los nódulos determinados e indeterminados (Ndoye *et al.*, 1994).

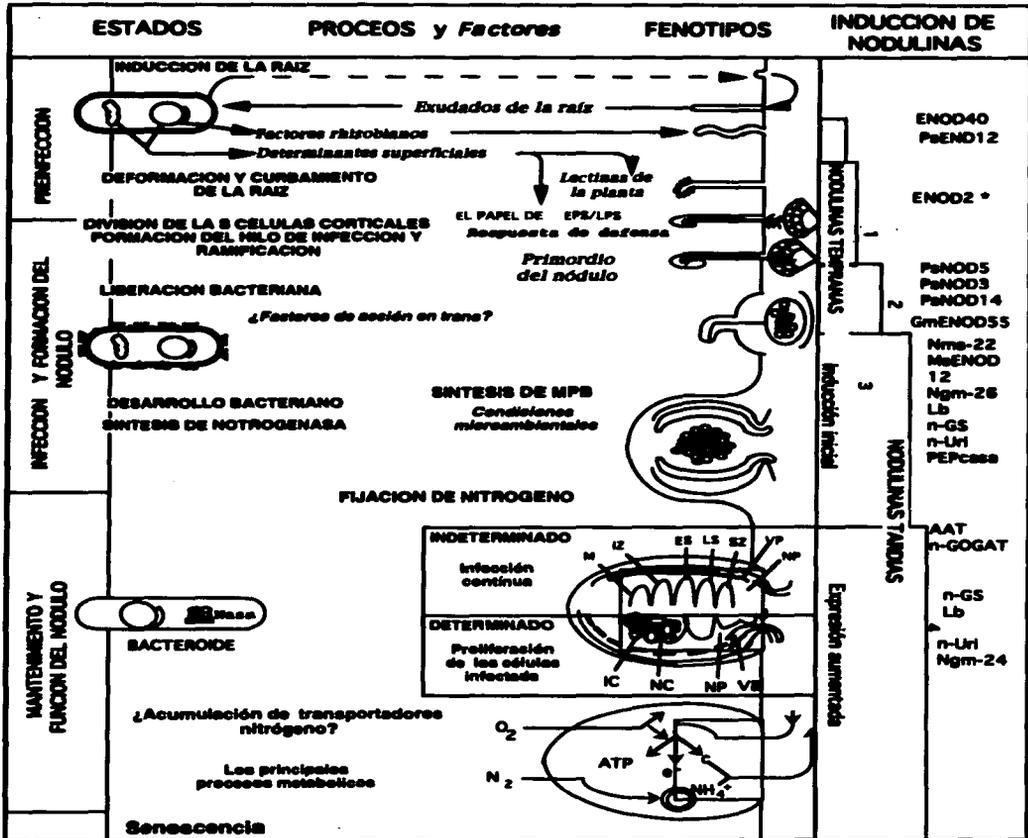


Fig. 6.- El proceso simbiótico. **Nódulo indeterminado** : EPS = exopolisacárido, MPB = membrana perobacteroidal, M = meristemo, ES = primeras células infectadas, ES = células posteriormente infectadas, ZS = zona de senescencia, VP = tejido vascular, NP = parénquima del nódulo. **Nódulo determinado** : IC = células infectadas, NC = células no infectadas, NP = parénquima del nódulo/cortex interno, VB = tejido vascular (Sánchez *et al.*, 1991).

I.5.- Rearreglos del citoesqueleto durante la organogénesis del nódulo simbiótico de leguminosas.

Se ha sugerido que en el crecimiento del hilo de infección hacia el interior del cortex de la raíz que produce *Rhizobium*, la planta debe utilizar los procesos normales de crecimiento y división celular. El hilo de infección crece hacia el interior formando un túnel que sigue al núcleo hacia la base de la célula del pelo radicular. En el caso de leguminosas de nódulos indeterminados, se han observado conexiones del citoesqueleto entre la punta y el núcleo del pelo radicales en crecimiento (Lloyd *et al.*, 1987). Se ha sugerido que el inicio del crecimiento hacia el interior del hilo de infección se lleva al cabo por un rearrreglo del citoesqueleto (Brewin, 1991). Después de 48 horas de la inoculación con *Rhizobium*, hay importantes cambios en las áreas alrededor del cortex radicular subyacentes a los pelos radicales infectados. En estos cambios se puede observar que los núcleos de las células corticales migran hacia el centro de la célula y a los 4 días después las primeras divisiones son visibles en el cortex interno, mientras que el hilo de infección invade a la célula en la capa mas externa del cortex. Sin embargo, las células corticales externas aparentemente son detenidas en estado preprofásico del ciclo celular, donde se observan adelgazamientos en las paredes por donde pasará el hilo de infección (hilo de preinfección). Este se presenta, en las subsecuentes capas celulares como una sucesión de células desdiferenciadas con núcleos centrales grandes y alineados de manera anticlinal (Fig. 7). Cada célula tiene una tira citoplásmica anticlinal (como un fragmosoma) que se alinea a las células inmediatamente arriba y por debajo en las capas celulares del cortex llamado puente intracitoplásmico. En la subsecuente etapa, existe

un crecimiento del hilo de infección por la acumulación de vesículas derivadas del aparato de Golgi, formando una estructura cilíndrica que ramifica ocasionalmente (Bakhuizen, 1988) El hilo de infección debe fusionarse a la pared celular de sí misma y de la célula proximal en dirección de la posición del puente intracitoplásmico, lo cual dará origen a la prolongación del hilo de infección. En ausencia de una relación posicional cercana entre la fusión del hilo de infección con el puente intracitoplásmico de la célula subyacente, los rhizobia migran intracelularmente de manera periclinal a la pared celular de la célula infectada hasta localizar el sitio donde se ancla el puente intracitoplásmico. En este lugar se forma un poro resultado de la degradación localizada de ambas paredes adyacentes, los rhizobia salen de la célula infectada y subsecuentemente penetran en la célula no infectada (Bakhuizen, 1988).

Durante los procesos morfogénicos antes mencionados, se ha visto que la pared celular de las células no diferenciadas, de las raíces corticales de chícharo, consisten de una pared primaria y secundaria; cada una con un patrón de orientación de la red fibrilar. El citoesqueleto microtubular que se encuentra por debajo de la membrana plasmática de estas células se orienta circunferencial y perpendicularmente con respecto a la orientación de la elongación de la célula. Cuando se aproxima un hilo de infección, la orientación de los microtúbulos se reorganiza a una posición que coincide usualmente con la envoltura nuclear asociada a otros microtúbulos. Estos, parecen estar involucrados en la migración del núcleo al centro de la célula, con la consecuente formación del puente intracitoplásmico requerido para el futuro crecimiento del hilo de infección (Fig. 7 y 8). Una

estructura radial similar de la envoltura nuclear, esta involucrada en el alineamiento premitótico del núcleo en células de *Fraxinus* (Bakhuizen, 1988). Por tal motivo, se considera que el puente intracitoplásmico es un homólogo del fragmoplasto (Bakhuizen, 1985). Al mismo tiempo que ocurre la formación del hilo de infección, las células corticales son mitóticamente activadas formando un primordio nodular, el hilo de infección crece hasta este primordio y una vez allí las bacterias son atrapadas en membranas peribacteroidales de origen vegetal. Las células que tienen hilos de preinfección nunca se dividen; sin embargo, ocurren cambios que se asemejan a los de las células que entran en mitosis (Yang *et al.*, 1994). Las células que forman parte del hilo de preinfección, parecen estar interrumpidas en la fase G₂ del ciclo celular, mientras que las células del cortex interno, prosiguen a través del ciclo celular formando un primordio (Mylona *et al.*, 1995).

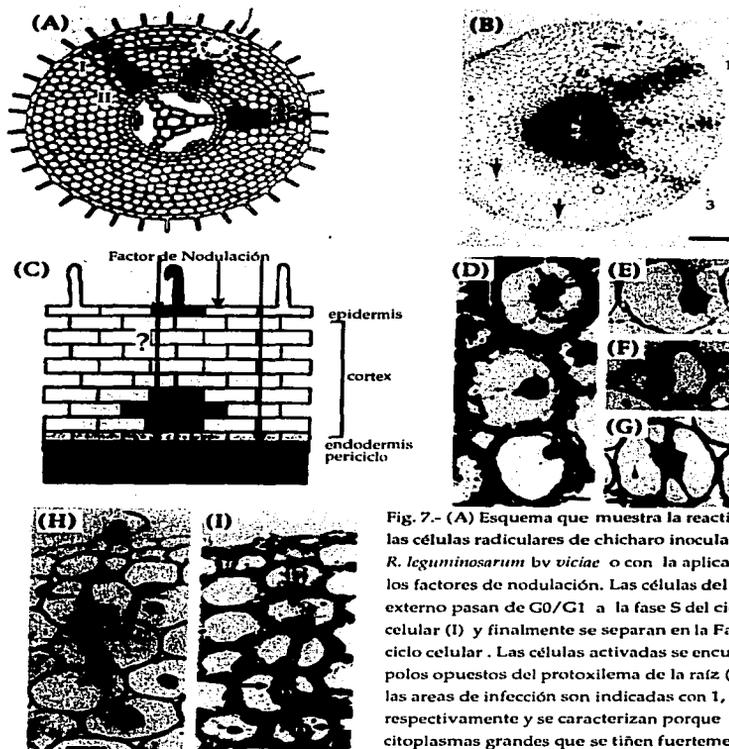


Fig. 7.- (A) Esquema que muestra la reactivación de las células radiculares de chícharo inoculados con *R. leguminosarum* bv *viciae* o con la aplicación de los factores de nodulación. Las células del cortex externo pasan de G0/G1 a la fase S del ciclo celular (I) y finalmente se separan en la Fase G2 del ciclo celular. Las células activadas se encuentran en polos opuestos del protoxilema de la raíz (II). En (B) las áreas de infección son indicadas con 1, 2 y 3 respectivamente y se caracterizan porque tienen citoplasmas grandes que se tiñen fuertemente, estas células tienen núcleos posicionados centralmente (ver D-I). M = meristemo del nódulo, la iniciación ocurre preferencialmente en los polos opuestos del xilema (X). En (C), representación esquemática del modo de acción de los factores Nod; se ha sugerido que los factores Nod son reconocidos por un receptor de la planta huésped. Sin embargo no está claro si los factores Nod interactúan directa o indirectamente con los tres tejidos ó si sólo la interacción es con la epidérmis, la cual resulta en la generación de segundos mensajeros que después de la difusión o transporte disparan una respuesta en el tejido interno. En (E-I), se muestra una serie de ampliaciones del área de infección demostrando los estados sucesivos de la migración del núcleo en células vacuoladas donde avanza el hilo de infección. (E-I) la formación del puente citoplásmico es acompañada por una migración del núcleo hacia el centro de la célula. (E, F y G) Ilustración del rearrreglo espacial de las tiras citoplásmicas que radian al núcleo justo antes de la infección. (G) El puente citoplásmico resultante. (H-I) Sección semifina de una área de infección que donde se observaba un pelo radical curvado, un hilo de infección y un puente intracitoplásmico (flechas) (Mylona *et al.*, 1995).

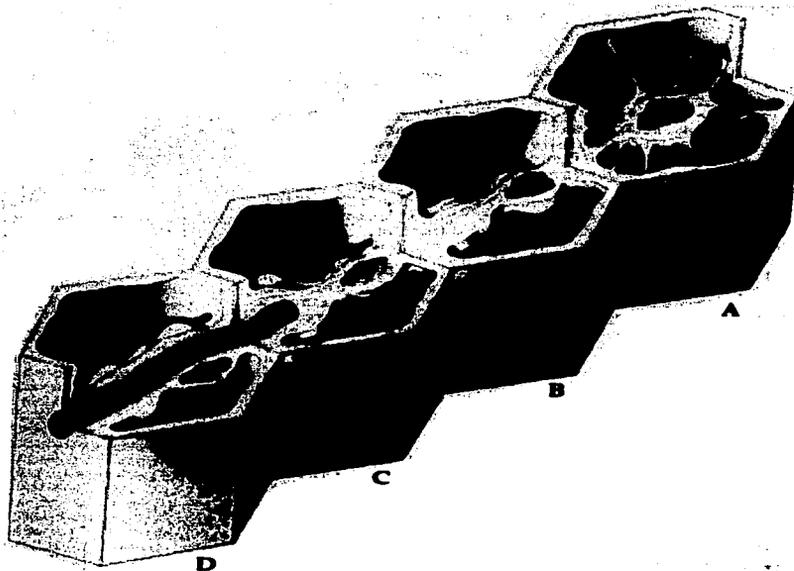


Fig. 8.- Representación tridimensional de los rearrreglos de los microtubulos y del citoplasma antes, durante y después de la infección de las células corticales por *Rhizobium*. En la célula **A**, varias tiras citoplasmicas radian del citoplasma perinuclear al citoplasma periférico. En la célula **B**, la orientación del citoplasma radial se fusionan con el puente citoplásmico, mientras que las tiras radiales tienden a desaparecer. En la célula **C** se representa el estado de infección. En la célula **D**, se ilustra un hilo de infección después de que pasó por una célula cortical (Bakhuizen *et al.*, 1988).

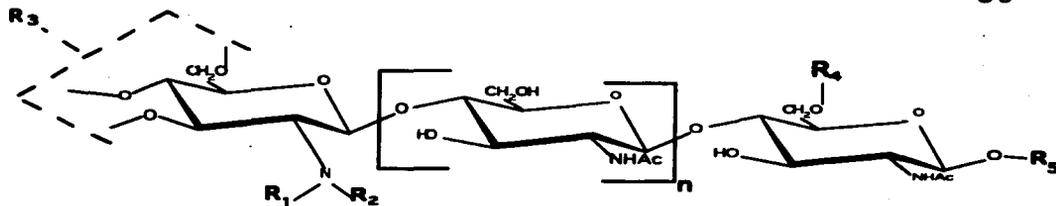
I.6.- Factores de nodulación y transducción de señales.

La estructura molecular de muchos factores de nodulación (Nod) ya ha sido determinada. En general, los factores Nod consisten de un esqueleto de tres a cinco *N*-acetilglucosaminas unidas por enlaces β -1,4, variando el ácido graso que se encuentra unido al azúcar no reductor (Fig. 9). Adicionalmente, los factores pueden tener varias sustituciones tanto en el extremo reductor como en el extremo no reducido (Leuroge *et al.*, 1990; Fisher y Long, 1992; Spaink, 1992; Denrie y Cullimore, 1993; Carlson *et al.*, 1995; Cárdenas *et al.*, 1995). La mayor parte de los rhizobia producen una variedad limitada de factores Nod, siendo ésta una de las barreras para nodular a un mayor número de leguminosas. Por ejemplo *Rhizobium* NGR234, puede nodular hasta 70 leguminosa tropicales ya que puede producir hasta 18 tipos diferentes de factores Nod (Price *et al.*, 1992).

Los factores Nod inducen la deformación de los pelos radiculares y la formación de un primordio con haces vasculares bien formados a concentraciones tan bajas como 1×10^{-9} -M- 1×10^{-12} M , (Leurage *et al.*, 1990; Price *et al.*, Spaink *et al.*, 1991; Price *et al.*, 1992; Cárdenas *et al.*, 1995). Los factores Nod purificados, también pueden inducir la expresión de ciertos genes vegetales (Horvath *et al.*, 1993; Cook *et al.*, 1995). La deformación se inicia con el hinchamiento de la punta del pelo radicular, el cual se puede observar después de una hora de haber adicionado el factor Nod. Posteriormente, a las tres horas se observa una deformación clara del pelo radicular. Se requieren aproximadamente 10 minutos de incubación con el factor Nod para que ocurra el proceso de deformación (Heidstra *et al.*, 1994). Si después de este tiempo los factores Nod son removidos, el proceso de deformación continúa. Estos cambios

morfológicos son precedidos por una depolarización de la membrana plasmática (Ehrhardt *et al.*, 1992), cambios en el flujo de Ca^{2+} , salida de protones, rearrreglos de los filamentos de actina (Allen *et al.*, 1994) y un incremento en el flujo citoplásmico (Heidstra *et al.*, 1994). Estos cambios ocurren entre los cinco y treinta minutos después de que los factores Nod han sido adicionados y pueden ser parte de una serie de eventos que lleva eventualmente a la deformación del pelo radicular (Cárdenas *et al.*, 1997).

Los factores Nod inducen respuestas en tres diferentes tejidos de la raíz: epidérmis, cortex y periciclo. Debido a que los factores Nod juegan un papel muy importante en las primeras etapas de la nodulación, se están haciendo muchos esfuerzos para conocer su modo de acción. Como se ha mencionado, estos factores son activos a baja concentración 1×10^{-9} - 10^{-12} M y su actividad biológica en un huésped en particular es controlada por la presencia de ciertas sustituciones químicas en el factor (Fig. 9). Estos datos sugieren que los factores Nod son reconocidos por un receptor de la planta huésped. Sin embargo, no está claro si los factores Nod interactúan directamente o indirectamente en los tres tejidos antes mencionados, o si sólo la interacción con la epidérmis, resulta en la generación de segundos mensajeros que después de su difusión o transporte, disparan una respuesta en los tejidos internos de la raíz (Fig. 7) (Maylona *et al.*, 1995).



Especies	R1	R2	R3	R4	R5	n	Ref
<i>R. melloti</i>	H	C16:2	Ac(O-6) H	Sulfato	H	1,2,3	Lerouge et al. 1990 Roche et al. 1991 Schultze et al. 1992
<i>R. leg. bv. viciae</i>	H	C16:3 C18:4 C18:1	Ac(O-6)	H Ac(O-6)	H	2,3	Spaink et al. 1991
<i>B. japonicum</i>	H	C18:1 C16:0 C16:1	Ac(O-6) H	MeFuc	H	3	Carlson et al. 1993 Sanjuan et al. 1992
<i>B. elkanii</i>	H Me	C18:1	Ac(O-6) H Cb	MeFuc Fuc	H Gro	2,3	Carlson et al. 1993
NGR 234	Me	C18:1 C16:0	Ac(O-6) H Cb (1,2)	MeFuc AcMeFuc MeFucS	H	3	Price et al. 1992
<i>A. caulinodans</i>	Me	C18:1 C18:0	Ac(O-6) Cb	D-Ara H	H	2,3	Mergaert et al. 1993
<i>R. tropici</i>	Me	C18:1	H	Sulfato	H	3	Poupot et al. 1993
<i>R. fredii</i>	H	C18:1	H	MeFuc Fuc	H	1,2,3	Bec-Ferte et al. 1993

Fig. 9.- Los tipos de grupos sustituyentes han sido reportados en varios Factores Nod, en diferentes especies. Me= metil, C16:0 = ácido palmítico, C18:1 = ácido vaccénico, etc.; Ac = acetil; Fuc = fucosa; MeFu = 2-O -metilfucosa; Ara = Arabinosa; Gro = glicerol; Cb = carbamil; S = sulfato.

II.- Antecedentes.

El grupo de investigación donde se realizó este proyecto, ha estado interesado en conocer el papel del citoesqueleto de actina y la transducción de señales durante el desarrollo del nódulo simbiótico de *P. vulgaris*. El enfoque global ha sido la purificación de actina y proteínas asociadas, con el objeto de desarrollar anticuerpos que permitan conocer la dinámica de los MFs; así como la clonación y la expresión de sus genes durante la ontogénia del nódulo. En este contexto, la profilina puede ser importante para el enlace entre el citoesqueleto y la transducción de señales (Sánchez *et al.*, 1997).

En un trabajo previo, se purificó y caracterizó la profilina de nódulos simbióticos. Esta proteína es un monómero de 14.4 kDa de peso molecular y con un punto isoeléctrico de 5.3. Por microsecuenciación de 30 residuos de aminoácidos de una región central de esta proteína, se determinó que presenta una gran similitud (80 %) con la profilina de *Betula*. La proteína purificada se utilizó para generar anticuerpos policlonales en conejo (Vidali, 1993). La inmunolocalización de la proteína en *P. vulgaris* demostró una distribución difusa en citoplasma de hipocotilos y nódulos, pero con una tinción aumentada en los haces vasculares (Vidali *et al.*, 1995). Este anticuerpo reconoce una sola isoforma en hojas y nódulos con el mismo peso molecular. Más tarde, durante el desarrollo de este trabajo se encontró en experimentos de electroforesis en dos dimensiones e inmuno-transferencia, que en realidad no era una, sino cinco isoformas de profilina con el mismo peso molecular pero con diferente punto isoeléctrico (Guillen *et al.*, 1997).

III.- Objetivos.

Objetivo general:

Conocer el papel de la profilina en el desarrollo del nódulo. Para éste proposito es importante clonar la secuencia de cDNA que codifica para profilina. El cDNA de profilina o la información generada de esta secuencia, pueden ser utilizadas para conocer su patrón de su expresión y su regulación durante la morfogénesis del nódulo de *P. vulgaris*.

Objetivos específicos:

- 1.- Clonar y caracterizar la secuencia de cDNA de la profilina de nódulo.**
- 2.- Determinar algunas características estructurales de la profilina de *P. vulgaris*.**
- 3.- Estimar el número de genes de profilina en el genóma de *P. vulgaris*.**

V.- Materiales y Métodos.

V.1.- Búsqueda de profilina en la librería de cDNA de nódulo.

Para la búsqueda del cDNA de profilina se utilizó una genoteca de λ Zap de cDNA que fue construida con mRNA de nódulos simbióticos de 20 días de edad (Stratagene). Para la primera ronda de selección se plaqueron a una densidad de aproximadamente 20 000 unidades formadoras de placas (ufp) por caja de Petri de 150 mm. Para la selección del cDNA de profilina, se utilizó el anticuerpo antiprofilina purificado por Vidali (1993), utilizando el procedimiento reportado por Sambrook *et al* (1989). Por último, con el fin de determinar el tamaño de los insertos los plásmido aislados se digirieron con las enzimas de resticción *Eco* RI y *Xho* I, seleccionando el inserto más grande para secuenciarlo.

Para buscar otras clonas diferentes a p4 (la ya secuenciada), se utilizó la misma librería de λ Zap de cDNA. En esta ocasión se plaquearon aproximadamente 100 000 fagos; los cuales fueron monitoreados usando el cDNA completo y la región 3' no traducida como sonda general y específica respectivamente.

V.2.- Aislamiento de plásmidos.

Se aislaron colonias individuales para inocular 2 ml de LB que contenían 100 µg/ml de ampicilina como marcador de selección. Posteriormente se incubaron a 37 °C con agitación durante toda la noche (de 14 a 16 hrs). Transcurrido este tiempo y habiendo crecimiento visible, se tomaron 1.5 ml del cultivo en tubos de microcentrifugación (Eppendorf). Estos se centrifugaron a 10 000 rpm durante 30 segundos. Después se les decantó el sobrenadante y la pastillas se resuspendieron en 1ml de una solución que contenía 10 mM de Tris-HCl pH 7.4, 5mM de EDTA (TE) y 100 mM de NaCl (TE NaCl). Nuevamente se centrifugaron a 10 000 rpm durante 20 a 30 segundos, se les decantó el sobrenadante procurando dejar de 50 a 100 µl de la solución en cada tubo. Se resuspendieron las pastillas vigorosamente, evitando que quedaran grumos y se les adicionó a cada tubo, 450 µl de una solución que contenía 10 mM de Tris-HCl pH 7.4, 5 mM de EDTA, 100 mM de NaOH y 0.5 % SDS (TENS), se les agitó suavemente y se dejaron en hielo durante 5 minutos. Transcurrido este tiempo se les agregó 225 µl de 3 M de acetato de sodio (pH 4.8) y se agitaron levemente por inversión, (tratando de que se formaran agregados). Posteriormente fueron incubados en hielo durante 5 minutos, se agitaron nuevamente por inversión y se centrifugaron durante 7 minutos a 10 000 rpm. En esta etapa, se observó un precipitado que se encontró pegado a la superficie del tubo, éste correspondía a los restos celulares. El sobrenadante de cada una de las muestras se tomaron y se pasaron a un tubo nuevo, los cuales se les adicionó un volumen igual de etanol al 100 % (aproximadamente 700 µl). Estos, se agitaron brevemente en el vortex, e inmediatamente después, se centrifugaron a 10 000 rpm

durante 5 minutos. Posteriormente, se les tiró el sobrenadante y las pastillas se lavaron con 1 ml de etanol al 70 %. A continuación se centrifugaron a 10 000 rpm por dos minutos. Se repitió el paso anterior de lavado, se decantaron los sobrenadantes, se les dió un pulso en la microfuga, se les aspiró los restos de etanol y se secaron a temperatura ambiente durante 5 minutos. Por último se le adicionó a cada tubo, de 20 a 50 μ l de (TE) dependiendo del tamaño de la pastilla observada (Birnboim, 1983; modificado por Valdés, comunicación personal). Para calcular la concentración de los plásmidos purificados, se tomaron 1 μ l de cada una de las muestra en cuestión para correr una electroforésis en un gel de agarosa (Sambrook *et al.*, 1989)

V.3.- Electroforesis en geles de agarosa.

La electroforesis en de geles de agarosa o de poliacrilamida, es el método estandar usado para separar, identificar, y purificar fragmentos de DNA (Sambrook *et al.*, 1987). La técnica es capaz de resolver fragmentos de DNA que no pueden ser separados adecuadamente por otros procedimientos, tales como la centrifugación por gradiente de densidad. Después del corrimiento, se puede determinar la localización del DNA dentro del gel, tiñéndolo con 0.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de bromuro de etidio, el cual es un colorante intercalante y fluorescente; incluso pueden ser detectadas bandas conteniendo tan poco DNA como 5-10 ng por observación directa del gel en luz ultravioleta. Se pueden separar DNAs con longitudes desde 200 pb hasta 50 kb en geles de agarosa de diferentes concentraciones, los cuales son corridos generalmente en una posición horizontal en un campo eléctrico de intensidad y dirección constantes.

Para este trabajo se usaron geles de agarosa disueltos en buffer TBE 0.5X, a concentraciones que variaron desde 1%, 1.5% y 2%. Los geles se corrieron a 140 volts en cámaras de electroforesis horizontales con buffer TBE 0.5X. De esta manera fueron analizados tanto los ácidos desoxiribonucleicos obtenidos de las extracciones, así como también los productos de las digestiones (Sambrook *et al.*, 1987).

V.4.- Purificación de fragmentos de DNA de interés por congelación-centrifugación ("freeze-squeeze").

A un tubo Eppendorf de 0.5 mL, al cual previamente se le hizo una perforación en el fondo utilizando una aguja insulínica caliente, se le puso una pequeña cantidad de fibra de vidrio solo para cubrir el orificio. Se recortó la banda del gel de agarosa, procurando que el gel se expusiera a la luz ultravioleta el menor tiempo posible para no dañar el DNA y se puso dentro del tubo previamente preparado. Se colocó el tubo con la banda dentro de un tubo eppendorf de 1.5 mL, al cual se había cortado la tapa. Seguido de esto, se centrifugó durante 10 minutos a 7000 rpm. Se Colectó la solución que resultó del centrifugado en un tubo Eppendorf de 1.5 mL. Para recuperar la mayor cantidad posible de DNA, los tubos que contenían a los fragmentos de agarosa fueron centrifugadas otra vez. Se colectó la solución del centrifugado y se juntó con la anterior. Con el objeto de quitarle los restos de bromuro y agarosa el DNA se extrajo una vez, con un volumen de fenol y luego con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (24:2), y después se precipitó con 3.5 volúmenes de una solución de etanol-acetato de amonio (7.5M pH7). y se centrifugó por 20 minutos a 14000 rpm a 4 °C. Posteriormente se lavó cuidadosamente la pastilla tres veces con etanol al 70%. se dejó secando a temperatura ambiente. Y por último, se resuspendió en un volumen de 20 a 50 ml de agua, (dependiendo de como se observe el tamaño de la pastilla).

IV.7.- Purificación de sondas de DNA radioactivas.

Las sondas radioactivas fueron purificadas por el método de columna de exclusión molecular. Se prepara una emulsión de sephadex G50 (10 g/160 ml) en buffer de TE que contiene 100 mM de NaCl, 0.01 % de SDS y 1 mM de azida de sodio (solución TENSA). Se empaqueta aproximadamente 900 μ l de la emulsión en una jeringa insulínica. Se lava con 300 μ l de solución TENSA. Posteriormente se pasa por la columna la sonda marcada (que esta en un volumen de 300 μ l), se esperó hasta que callera la última gota. La fracción se colectó en un tubo Eppendorff y se midió la radioactividad; en estas fracciones no hubo detección de radioactividad. El tubo donde originalmente se tenía la marca radioactiva se utilizó para recolectar la sonda marcada; ésto se logró eluyendo dos veces con 300 μ l de solución TENSA. De tal manera que la sonda la obtuvimos en un volumen final de 600 μ l. Para medir el porcentaje de incorporación se tomaron 10 μ l de 300 μ l de la solución de la sonda no purificada y 10 μ l de 600 μ l de la solución final de la sonda marcada (Sambroock *et al.*, 1989).

Para probar que el producto de PCR estuviera marcado se purificó por columna de exclusión molecular (Sambroock *et al.*, 1989), además se determinó que éste hibridara con el cDNA de profilina.

IV.8.-Experimentos tipo "Southern genómico".

Se aisló DNA genómico de hojas de *Phaseolus vulgaris* que fueron cultivadas en condiciones normales de invernadero. Para evitar el posible polimorfismo en el gen de profilina, el DNA se obtuvo de un solo individuo. Para aislar el DNA se utilizó una combinación de métodos que proporcionaron una alto rendimiento y calidad en cuanto a su capacidad de ser restringido, transferido y que proporcionara buenos resultados en la hibridización.

Para la primera fase de purificación se utilizó el método de CTAB (Doyle *et al.*, 1990). En la segunda etapa se precipitó con 5 M de acetato de potasio (Dellaporta *et al.*, 1983). Al final el DNA fue restringido con la enzima seleccionada para los ensayos de hibridación. Se utilizaron aproximadamente 2.5-5 µg de DNA por carril. El DNA se transfirió a membranas de Hybond N+ de nylon, usando 0.4 N de NaOH como solución de transferencia. La transferencia se dejó por un periodo aproximado de 12 a 14 horas, y después los filtros fueron lavados con una solución 5XSSC, se secaron a temperatura ambiente y se guardaron envueltos en papel estaño a 4 °C hasta utilizarlos en la hibridación (Southern *E.*, 1975; Sambrook *et al.*, 1989).

IV.9.- Condiciones de prehibridación e hibridación.

Los filtros se prehibridaron durante 2 hrs en una solución que contenía 5XSSC, 0.5% de SDS y 200 mg/ml de heparina (agente bloqueador), la temperatura a la cual se prehibridó dependió de las condiciones a las cuales se haría la hibridación. Las hibridaciones a alta severidad se hicieron a 65 °C, utilizando las mismas condiciones de la solución de prehibridación. Para las condiciones de moderada y baja severidad se empleó una solución que contenía 40 % de formamida, 5XSSC, 0.2% de SDS y 200 mg/ml de heparina a una temperatura de 45 °C y 38 °C respectivamente. En ambos casos la sonda marcada fue diluida a una concentración entre $5-7 \times 10^6$ cuentas por mililitro (cpm/ml) de ^{32}P . (Feingber and Volgelstein, 1983). Los lavados se hicieron tres veces a diferentes concentraciones de SSC/0.5% SDS (de 2X SSC/0.5% hasta 0.1X SSC/0.5 de SDS) dependiendo de la emisión radioactiva del fondo del filtro.

V.- Resultados.

V.1.- Clonación y caracterización del cDNA de profilina de nódulo de *P. vulgaris*.

A partir 80×10^3 ufp, después del tercer tamizado 16 clonas fueron rescatadas (Fig. 10). Con el objeto de escoger la clona más grande para ser secuenciada, éstas se restringieron con *EcoR* I y *Xho* I para que liberaran los insertos, los cuales tenían un tamaño un poco mayor de 700 pares de bases. El inserto más grande se secuenció. La secuencia de nucleótidos (Fig.11), indicó que había un fragmento de lectura abierta (ORF) de 131 amino ácidos, iniciando por un ATG en la posición +51 y un codón de término TAA, en la posición +446. La secuencia de cDNA presentó un líder no traducido de 50 pb y una región 3' no traducida de 294 pb de longitud. En este último se encontraron un par de sitios posibles de poliadenilación pero con ciertas desviaciones, con respecto a la secuencia concenso reportadas para plantas, en las posiciones 490-496 y 699-704 (Heidecker y Messing, 1986). El análisis por computadora de las secuencias nucleotídicas de las regiones 5' no traducida y el 3' no traducida, no indica la posibilidad de que se formen estructuras secundarias. La región líder presentó dos secuencias repetidas (GAA), que previamente se habían observado en las secuencias reportadas para las profilinas de *Arabidopsis* (Huang *et al.*, 1996). El ORF indica que el producto corresponde a un polipéptido de 14.1 kDa, el cual tiene un tamaño similar a la proteína reconocida por el anticuerpo antiprofilina de *P. vulgaris* y al de otras profilinas reportadas. La microsecuenciación de un péptido de la proteína, presentó estricta identidad con la secuencia de aminoácidos correspondiente a la secuencia deducida del cDNA (Vidali *et al.*, 1995).

Clonación del cDNA de nódulo de *Phaseolus vulgaris* L.

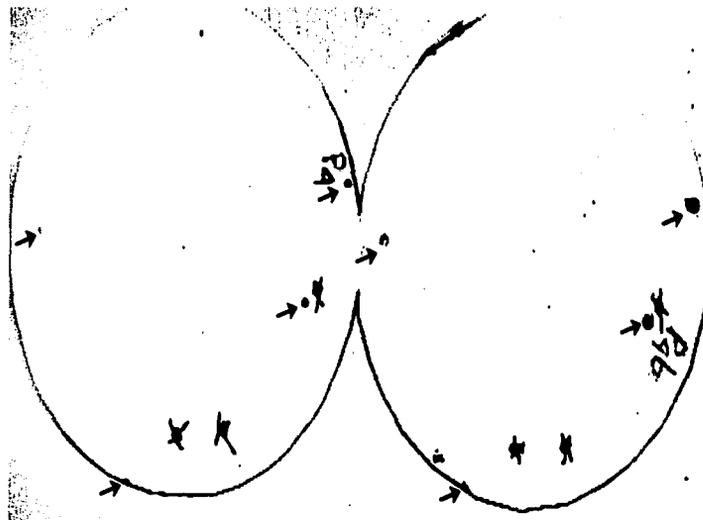


Fig. 10.- Con el objeto de seleccionar el cDNA que codifica para profilina se hizo un tamizado de la librería de cDNA de nódulos de *P. vulgaris*. Para la búsqueda, 80, 000 pfu fueron probadas con el anticuerpo usando el procedimiento "estandar" (Sambrook *et al*, 1989; Vidali *et al.*, 1995). Después del tercer tamizado, 16 clonas fueron aisladas. Aquí se muestran un par de filtros donde las flechas indican las señales positivas; a) Original, b) Duplicado.

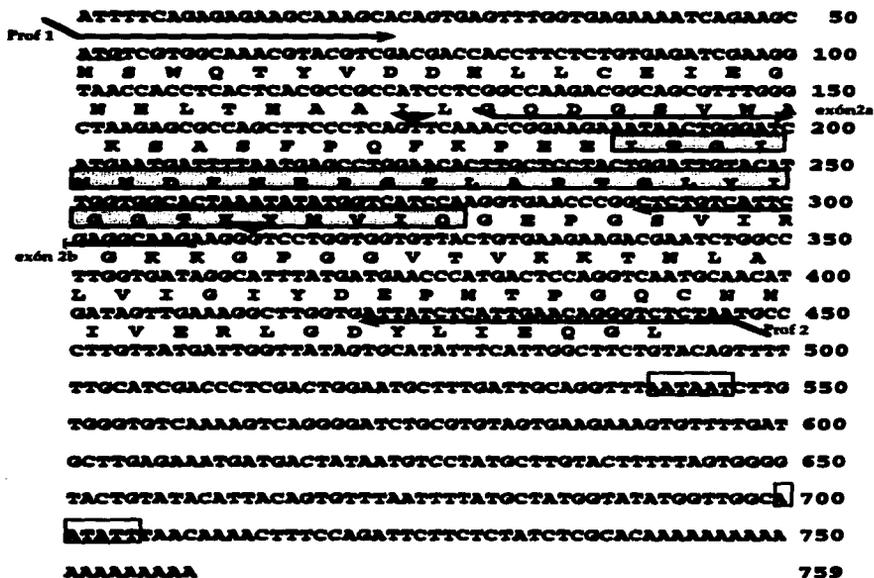


Fig. 11.- Secuencia nucleotídica del cDNA de profilina de nódulo de *Phaseolus vulgaris* y su secuencia de aminácidos derivada corresponde a 131 residuos. Los codones de inicio y término se encuentran subrayados. Los posibles sitios de poliadenilación se encuentra encerrados en cajas. La región sombreada corresponde al péptido secuenciado de la proteína purificada. Los sitios posibles donde se encuentran los intrones en el DNA genómico se representan por triángulos negros. Las flechas representan las regiones que se utilizaron para diseñar los oligonucleótidos para los experimentos de PCR y RT-PCR (Vidali *et al.*, 1995; Huang *et al.*, 1996).

V.2.- Identidad a otras secuencias de profilina.

El análisis del alineamiento de la secuencia de aminoácidos, deducida de la secuencia de nucleótidos del cDNA de profilina de *P. vulgaris*, presentó de 75-80 % de identidad con profilinas reportadas de otras plantas. A nivel de la secuencia de la proteína, se encontró que los 20 aminoácidos son usados en proporciones normales a excepción de Gly que tiene un elevada proporción (13.7 %). La Figura (12) muestra que las profilinas de planta tienen una colinearidad en un rango entre los 131-141 amino ácidos. Sin embargo, la profilina presentan una conservación moderada en algunos grupos de organismos y una pobre conservación a través de los diferentes grupos (Tabla 3). El dendograma de los alineamientos de las secuencias de aminoácidos de las profilinas de plantas ha sugerido la presencia de dos grupos o clases: una de expresión polen-específica y otra de expresión constitutiva (Fig 13). La profilina de *P. vulgaris* (*Pvu*) presentó mayor similitud con PRF1, PRF2 y PRF3 de *Arabidopsis thaliana*, las cuales han sido clonadas a partir de una genoteca de cDNA de hoja. Solo PRF1 se ha demostrado ser constitutivamente expresada en la mayoría de los órganos, mientras que PRF4 se agrupa con las profilinas de otras plantas monocotiledóneas; *Zma* (*Zea mays*), *Ppr* (*Thymoti grass*) y una dicotiledónea *Bve* (abedul blanco) que se expresan específicamente en el polen. Se ha sugerido que la profilina de *P. vulgaris* (*Pvu*), junto con las profilinas PRF1, PRF2, y PRF3 de *A. thaliana*, pertenece a una nueva clase de profilinas de expresión constitutiva, que parece ejecutar funciones generales en la regulación del citoesqueleto de actina (Huang *et al.*, 1996).

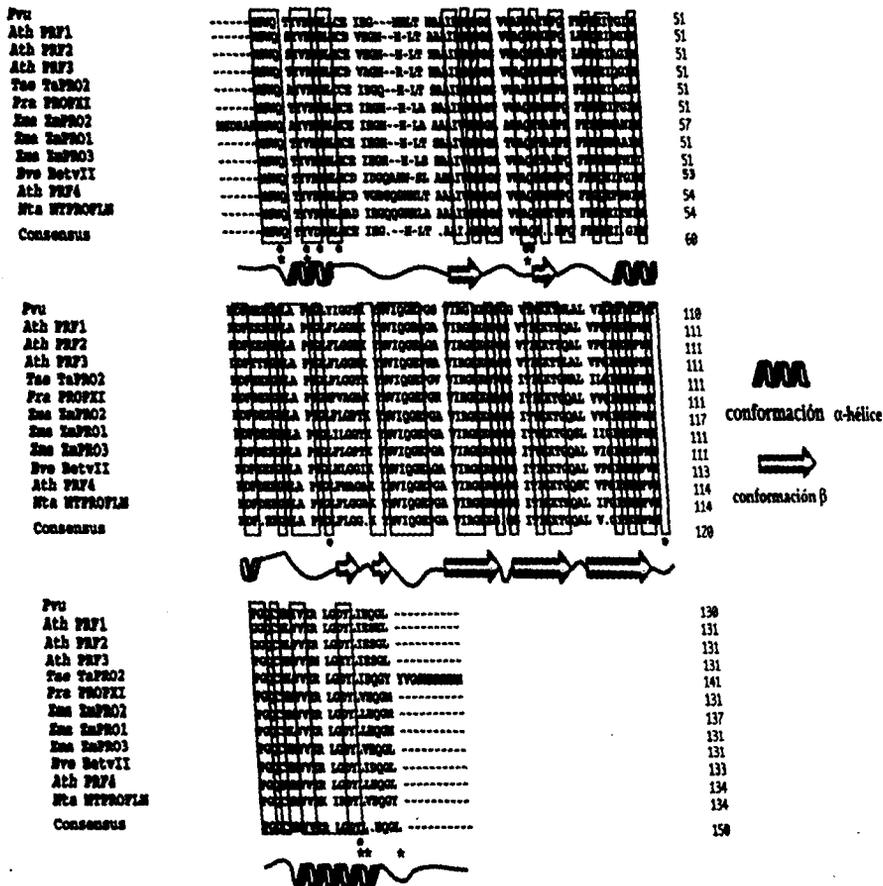


Fig. 12. - Alineamiento de la secuencia de aminoácidos profilina derivada del cDNA de *P. vulgaris* con las secuencia homólogas de plantas. La secuencia consenso se encuentra en la parte inferior indicando el 90 % de los residuos conservados. Los círculos cerrados indican los aminoácidos conservados en todas las profilinas eucarióticas (Staiger et al., 1993). Los asteriscos indican los residuos hidrofóbicos puestos al solvente (Schutt et al., 1993). En la parte inferior del alineamiento se muestran las posibles regiones de conformación- β y α -hélice (Staiger et al., 1993; Schutt et al., 1993). El posible sitio de unión a actina se contrasta con letras subrayadas (Staiger et al., 1993). *Phaseolus vulgaris* (Pvu), *Arabidopsis thaliana* (Ath), *Triticum aestivum* (Tae), *Zea mays* (Zma), *Betula verrucosa* (Bve), *Nicotiana tabacum* (Nta).

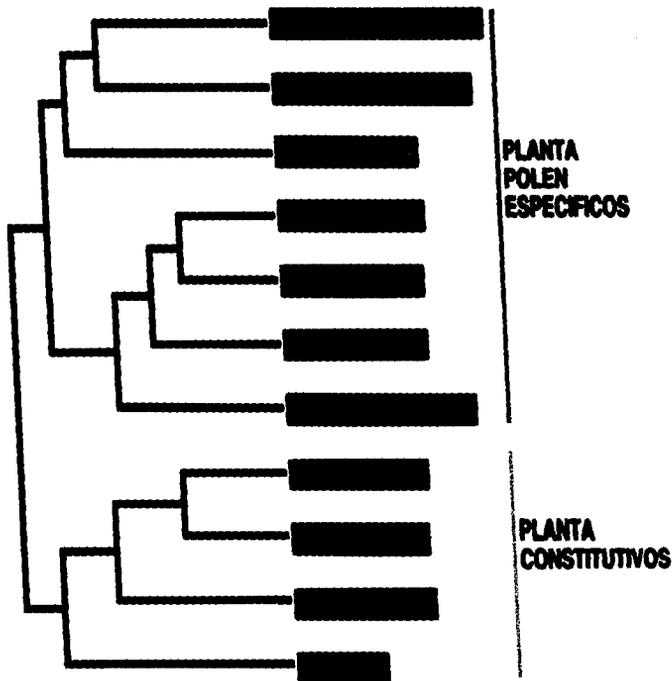


Fig. 13.- Dendograma del alineamiento múltiple a nivel de aminoácidos de las secuencias seleccionadas de profilinas de plantas (modificada de Huang *et al.*, 1996).

Tabla 3 .- Porcentaje de identidad y similitud a nivel de aminoácidos (respectivamente) de las profilinas de los diferentes eucariotas. Los alineamientos aparareados fueron realizados con el programa GenWorks 2. 4 (Intelegentics, 1994).

	Pvu	Ppr	Bve	Zma ProfI	Ddi ProfI	Ppo ProfI	Dme	Aca	Scce	Hsa
Pvu	—	77.7(11.5)	73.8(13.8)	72.3(15.4)	40.3(16.9)	38.7(19.4)	38.1(18.3)	36.0(16.0)	33.3(11.9)	32.3(13.0)
Ppr		—	78.6(12.2)	83.2(10.7)	42.7(15.3)	45.2(17.7)	42.1(18.3)	40.0(14.4)	31.7(16.7)	32.1(14.5)
Bve			—	75.2(12.8)	37.1(19.4)	38.7(21.8)	43.7(16.7)	34.4(20.8)	31.0(19.0)	33.1(11.3)
Zma ProfI				—	33.9(18.5)	41.1(20.2)	40.5(17.5)	32.8(19.2)	25.4(19.8)	30.7(10.9)
Ddi ProfI					—	43.5(15.3)	41.1(18.5)	48.4(18.5)	41.1(16.1)	27.4(16.1)
Ppo ProfI						—	41.1(18.5)	50.8(19.4)	48.4(12.9)	30.6(13.7)
Dme							—	43.2(16.0)	38.9(17.5)	22.2(19.0)
Aca								—	38.4(19.2)	28.0(13.6)
Scce									—	31.7(12.7)
Hsa										—

Pvu, *Phaseolus vulgaris* (frijol); *Ppr*, *Phleum pratense* (zacate); *Bve*, *Betula verrucosa* (roble blanco); *Zma*, *Zea mays* (maíz); *Ddi*, *Dictyostelium discoideum* (protista); *Physarum polycepalum* (protista); *Dme*, *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta); *Aca*, *Acanthamoeba castellani* (protista); *Scce*, *Saccharomices cerevise* (levadura), *Hsa*, *Homo sapiens* (humano).

V.3.- Análisis de la estructura tridimensional de la profilina de *P. vulgaris*, y localización de los posibles motivos de modificación postraduccional.

Las estructuras secundaria (Vidali *et al.*, 1995) y tridimensional de la profilina de *P. vulgaris* fue determinada por su alineamiento estructural equivalente utilizando las estructuras de *Acanthamoeba* (Archer *et al.*, 1993), bovino (Schutt *et al.*, 1993), humano (Meztler *et al.*, 1993) y *Betula verrucosa* (Fedorov *et al.*, 1987) (Fig 12, 14 y 15). Donde destacan dos grupos de residuos: (a) nueve aminoácidos que son altamente conservados en todas las profilinas (Staiger *et al.*, 1993) y (b) seis aminoácidos hidrofóbicos expuestos al solvente (Schutt *et al.*, 1993). Estos dos grupos parcialmente sobrelapan y pueden estar presentes en todas las secuencias de plantas, incluyendo a la profilina de frijol (Figs 12 y 14). Muy cerca del caboxilo terminal de la profilina de *P. vulgaris*, se localizó un posible sitio de unión a actina (VERLGDYL) (Staiger *et al.*, 1993). No obstante, el alineamiento de la equivalencia estructural con las regiones de contacto de actina y profilina (Scutt *et al.*, 1993) sugiere que en plantas esta región de unión a actina puede iniciar en el residuo 109, el cual está localizado después de la conformación- β y se extiende de la mitad de la última α -hélice, incluyendo la secuencia mencionada. En la posición 89 de la secuencia de la profilina de *P. vulgaris* se presenta un residuo Pro; el cual no esta presente en ninguna de las otras secuencias de las profilinas reportadas, sin embargo este residuo parece estar presente entre las dos conformaciones- β (posiciones 6 y 7). De manera similar, dos residuos de aminoácido, Asn⁹⁸ y Leu⁹⁹ fueron localizados entre la región propuesta de las conformaciones- β S6 y S7. Se ha propuesto que la región altamente

conservada que interacciona con PIP₂ es rica en aminoácidos básicos (Machesky *et al.*, 1990; Vinson *et al.*, 1993). Un equivalente a esta región fué localizada entre los aminoácidos 83 y 97 en la secuencia de profilina *P. vulgaris*.

Modelaje de la estructura tridimensional de la profilina de *P. vulgaris* L.

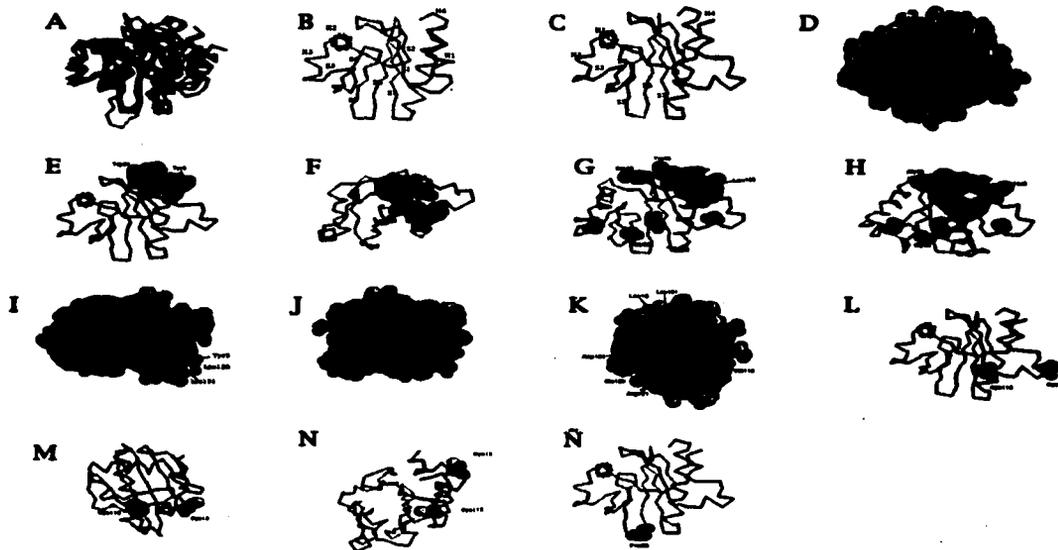


Fig. 14 - Características estructurales de la profilina de *P. vulgaris*. En A se muestra el modelaje de la estructura tridimensional de la profilina de *P. vulgaris*, realizado por alineamiento estructural contra las estructuras de profilina de *Acantamoeba castellanii* (Archer *et al.*, 1993), *Bos taurus* (Schutt *et al.*, 1993), *Betula verrucosa* (Thorn *et al.*, 1997), usando Swiss-Model Automated Protein Modeling Service y por manipulación utilizando el programa Rasmol 2.1. En B se muestra la estructura tridimensional (3D) de la profilina de *A. castellanii* y en C 3D la profilina de *P. vulgaris* en ambos casos se enfatiza el esqueleto de carbono-nitrógeno y las estructuras α -hélice (H) y conformación- β (S). En E a P se muestra el modelo espacial en 3D de la profilina de *P. vulgaris*. En D, los átomos de carbono se representan color gris, los de nitrógeno en azul y los de oxígeno en rojo. En E se presenta una vista lateral y en F una vista superior del arreglo espacial de los aminoácidos hidrofóbicos expuestos al solvente. En G y H se muestran la distribución espacial tanto de los residuos expuestos al solvente como los aminoácidos que pueden ser posibles blancos de modificación. En I y J se muestran los aminoácidos hidrofóbicos expuestos al solvente. En K se muestran la distribución de la secuencia del posible contacto con actina (VERLGDLY) y los aminoácidos hidrofóbicos expuestos al solvente. L, M y N se muestran la distribución espacial de los residuos Cys 13 y Cys 115. En N se muestra el residuo Pro89, que no se encuentra en las otras profilinas de plantas.

Predicción de blancos de modificación y su distribución espacial en la estructura de la profilina de *P. vulgaris* L.

61

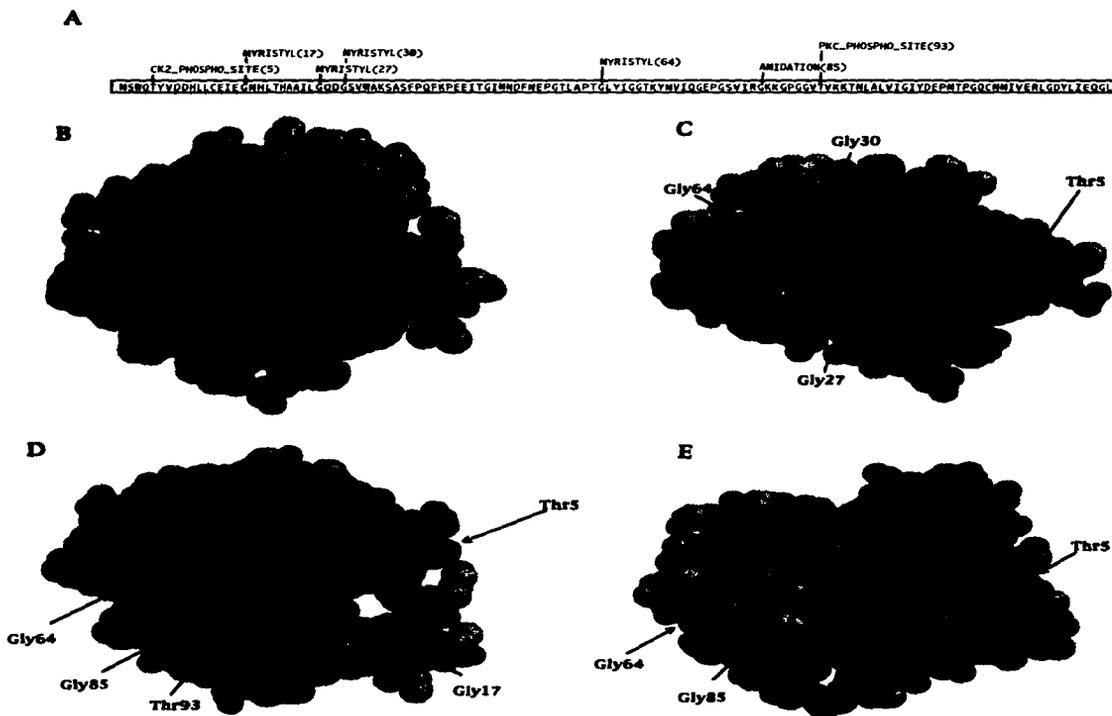


Fig. 15 .- En A se muestran los posibles residuos blancos de modificación, estos sitios fueron predcidos utilizando el programa GenWorks versión 2.4 (Intelegentics, 1994) En B se muestra el modelaje de la estructura tridimensional de la profilina de *P. vulgaris*, realizado por alineamiento estructural contra las profilinas de *Acantamoeba castellani* (Archer *et al.*, 1993), *Bos taurus* (Schutt *et al.*, 1993), *Betula verrucosa* (Thorn *et al.*, 1997), usando Swiss-Model Automated Protein Modeling Service y utilizando el programa Rasmol 2.1. En B se enfatiza en relieve el esqueleto de carbono-nitrógeno. En C, D y E, se muestra la distribución espacial de los residuos de aminoácido que son probables blancos de modificación.

V.4.- Búsqueda de otros cDNAs de profilina de *Phaseolus vulgaris*.

Como ya se mencionó en los antecedentes, durante el desarrollo de este trabajo se reportó la presencia de familias multigénicas de profilina en plantas. Por otro lado, en nuestro grupo de investigación, mediante un análisis bioquímico más exhaustivo, se detectaron la presencia de isoformas de profilina en nódulo (Guillén *et al.*, 1997). Lo que nos hizo emprender la tarea de clonar las otras secuencias de cDNA del nódulo. Para lograr este objetivo se hizo nuevamente un tamizado del banco de cDNA, un total de 1×10^5 ufp fueron plaqueadas. Después de la tercera ronda de selección, 54 clonas fueron rescatadas en plásmidos (Fig. 16). Con el objeto de poder aislar otras clonas diferentes a la secuenciada se hicieron hibridaciones de las 54 clonas aisladas con la sonda de cDNA de profilina y las 16 clonas que provenían del "inmunoscreening" utilizando el cDNA como probador general y la región 3' no traducida como probador específico. Todas las clonas hibridaron con ambos tipos de sondas, lo que sugiere que son la misma secuencia de cDNA (Fig. 17).

Búsqueda de otras clonas de profilina en una librería de cDNA λ Zap de *Phaseolus vulgaris* L

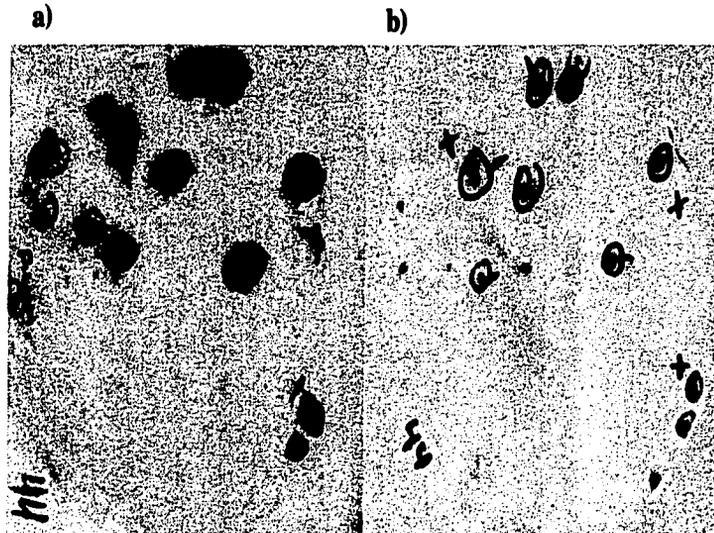


Fig. 16.- Con el objeto de encontrar otras clonas de profilina se hizo un tamizado de la librería de cDNA de nódulos de *P. vulgaris*. Para la búsqueda, 100, 000 pfu fueron hibridadas utilizando el cDNA como sonda (Vidali *et al.*, 1995). Después del tercer tamizado, 70 clonas fueron aisladas. a) Original, b) Duplicado.

Hibridación con sondas específica y no específica de profilina

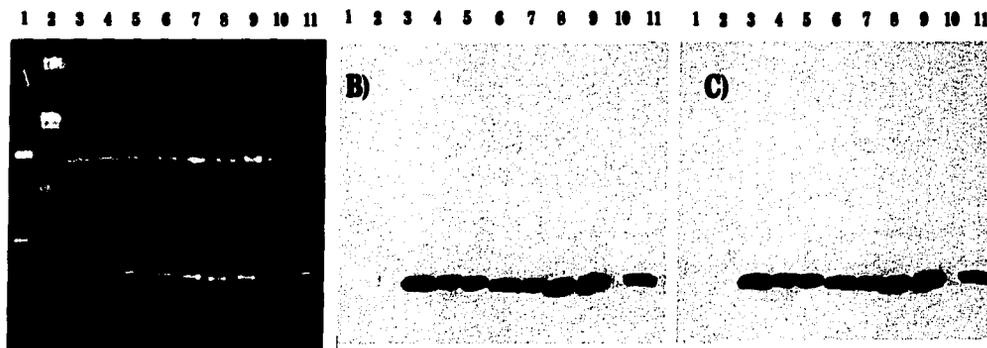


Fig. 17.- (Panel A) Diferentes aislados de cDNA, restringidos con *EcoR* I y *Xho* I e hibridados con el cDNA de profilina completo como sonda general (panel B) y la región 3' no traducida como sonda específica (panel C), Carril 1; cDNA de Chaperonina (control negativo) y carril 11 cDNA de profilina purificado (Vidali *et al* 1995).

V.5.- Evaluación del número probable de genes de profilina de *P. vulgaris*.

V.5.1.-Hibridación utilizando el cDNA competo como sonda

Con el fin de establecer el posible número de genes de profilina presentes en el genoma *Phaseolus vulgaris*, el DNA de *P. vulgaris* fué digerido con diferentes enzimas de restricción y corrido en electroforesis en geles de agarosa al 1% y se transfirió a membranas de nitrocelulosa las cuales se hibridaron en diferentes condiciones. En la Fig 18 sólo se muestran los resultados de dos condiciones de hibridación utilizadas; alta y moderada severidad. Estos resultados sugieren la existencia de uno, ó máximo dos genes en *P. vulgaris*. Resultados similares fueron encontrados cuando se utilizaron condiciones de hibridación más severas o más relajadas.

Experimento tipo "Southern genómico" de *Phaseolus vulgaris* L.
 hibridizado con el cDNA de profilina como sonda.

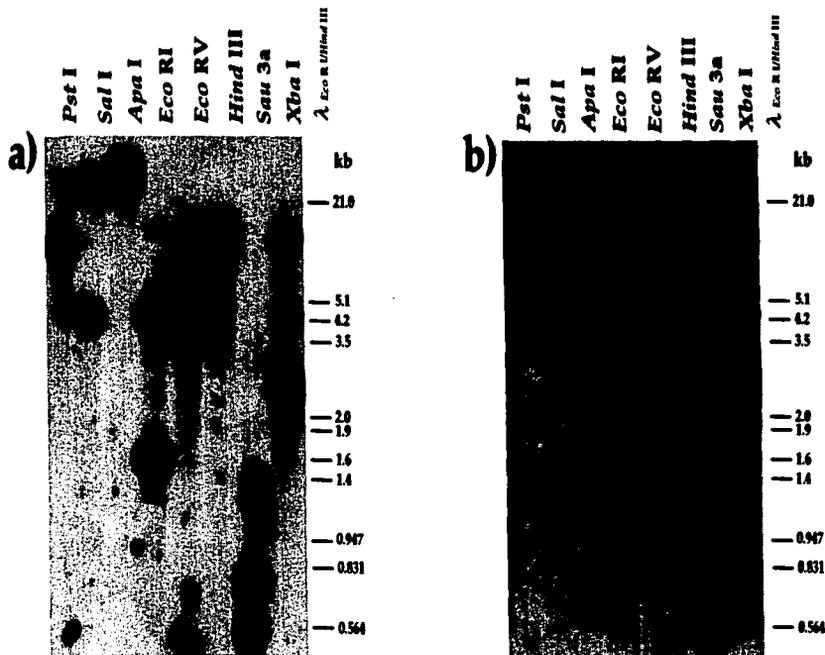


Fig. 18.- El DNA genómico de *P. vulgaris*, fue restringido con *Pst* I, *Sal* I, *Apa* I, *Eco* RI, *Eco* RV, *Hind* III, *Sau* 3a, *Xba* I, respectivamente e hibridizada con cDNA como sonda. Las condiciones de hibridación fueron 16 hrs a) en 6XSSC, 200 mg de heparina, 0.5 % SDS a 65 °C (alta severidad), y lavados tres veces a 0.1 XSSC/ 0.1 % SDS a 65 °C; b) en 6XSSC, 200 mg de heparina, 0.2 % SDS y 40% formamida a 38 °C, lavados tres veces en 1 XSSC/ 0.2 % SDS a 55 °C y expuestos a películas X-Omat durante 7 días a -70 °C (severidad moderada). Los mismos resultados fueron obtenidos usando condiciones de baja severidad (hibridación en 6XSSC, 200 mg de heparina, 0.5 % SDS a 42 °C, y lavados tres veces en 1 XSSC/ 0.1 % SDS a 42 °C ; datos no mostrados).

V.5.2.- Hibridación del DNA genómico de *P. vulgaris* contra una sonda general producida por PCR.

En *Arhabidopsis thaliana* las secuencias genómicas presentan dos intrones en posiciones conservadas (Huang *et al.*, 1996). El alineamiento múltiple a nivel de nucleótidos del cDNA, de la profilina de *P. vulgaris* con las regiones codificantes alrededor de los dos intrones de las clonas genómicas de profilina de *A. thaliana* mostraron una alta identidad en éstas (Fig. 19). Esto nos hizo suponer que posiblemente el gen de profilina presenta dos intrones en posiciones similares. Con el objeto de producir una sonda que nos diera mayor resolución en los análisis de tipo Southern genómicos, decidimos utilizar dos oligos que nos amplificaran la región correspondiente al "exón II", (oligos exón 2a y exón 2b, ver Tabla 2, Fig. 19). Cabe señalar que ninguna de las enzimas utilizadas para cortar el DNA genómico de *P. vulgaris*, cortan a la secuencia del cDNA en esta zona. Esto nos hizo suponer que si tuvieramos uno o dos genes deberíamos de observar también uno o dos bandas de hibridación respectivamente. Previo a esto se utilizó el cDNA de profilina caracterizado de *P. vulgaris* (plásmido p4), para la amplificación de la sonda "exón II". El producto de PCR obtenido corresponde a un fragmento de 133 pares de bases (Fig. 20 panel a). Para probar la especificidad el producto de PCR exón II fue corrido en electroforesis, transferido a membranas de Haybon-N+ (Amersham) y fueron hibridadas con la clona de cDNA caracterizada (p4) (Fig. 20 panel b). Para saber si el gen de profilina no contiene intrones en la región que correspondería al "exón II" se hizo un PCR genómico de *P. vulgaris* utilizando dos oligos que amplifican esta región. Como control se utilizó la clona de cDNA de profilina secuenciada. Ambas reacciones de

PCR dan un producto similar, lo que sugiere que esta región no contiene ningún intrón en la secuencia genómica de la profilina de frijol (Fig. 20).

Con el objeto de saber de manera más exacta cuantos copias del gen de profilina hay en *P. vulgaris*. Se amplificó, purificó y marcó por PCR la región correspondiente al "exón II" (Figs. 19 y 20). Este producto se utilizó para hacer una hibridación con el DNA genómico de *P. vulgaris*. Este resultado nos indica la presencia de un máximo de dos genes de profilina en *P. vulgaris* (fig. 21).

Alineamientos de DNA de los ORF's de dos profilinas de *A. thaliana* y el ORF del cDNA de la profilina de módulo de *P. vulgaris* .

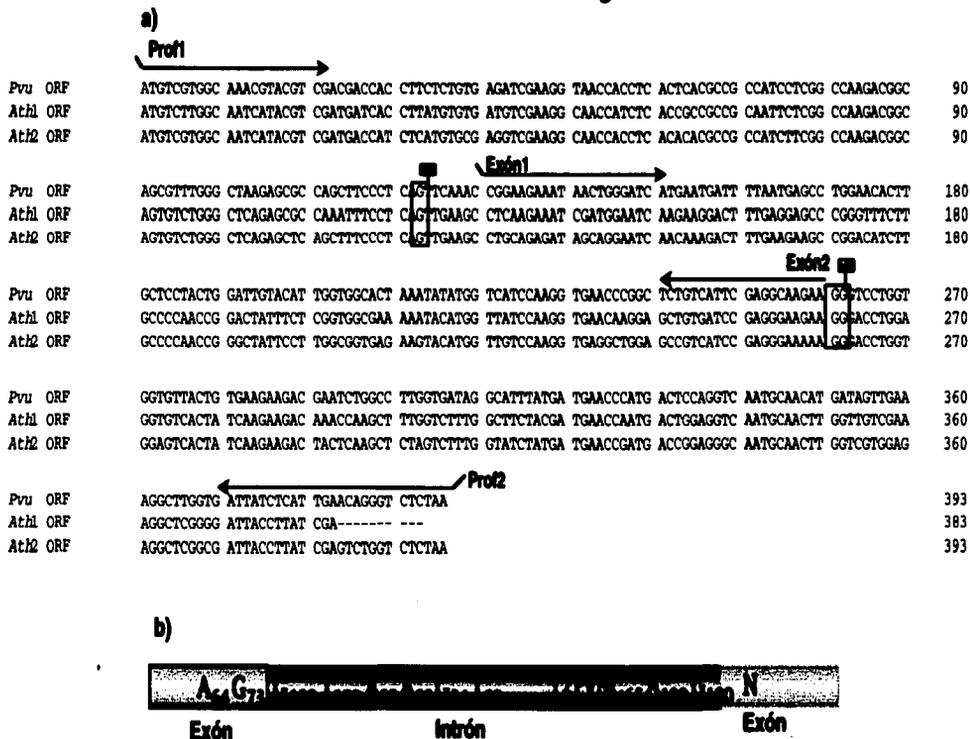


Fig. 19.- a) Alineamiento de las secuencia codificadora de la profilina de *P. vulgaris* con las secuencias codificadoras de dos profilinas de *A. Thaliana* . Debido a que la posición de los intrones de las secuencias de *A. thaliana* ha sido determinada (Huang et al., 1996), el alineamiento de estas secuencias de profilina sigue la posibilidad de que la posición de los intrones estén conservados en estas plantas. Con líneas se representa la dirección del PCR y RT-PCR, en cajas se encierran los nucleótidos AG, que se ha sugerido están altamente conservados y se encuentran localizados justo antes de las regiones donde se localizan los intrones. **b)** Por comparación de la secuencia del mRNA con el gen estructural, las uniones entre el intrón-exón pueden ser asignadas. Hay dos características en los genes nucleares: primero no hay una extensa homología en los extremos del exón-intrón. Las uniones tienen una bien conservada secuencia corta consenso, definida como la regla de GT-AG (Lewin, 1997)

**Amplificación por PCR del exón II del DNA
genómico de *P. vulgaris*.**

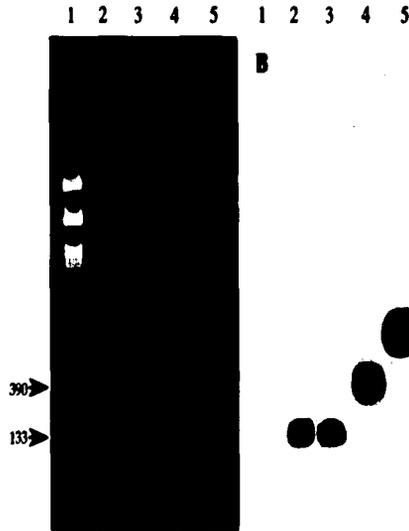


Fig. 20.- Con el objeto de probar si el DNA genómico de *Phaseolus vulgaris* no contenía algún intrón dentro de la región designada como exón II. Se hicieron experimentos de PCR: en (A) se muestra la electroforesis de DNA en agarosa al 1.3 % : en (1) se muestra el marcador de peso molecular λ cortado *EcoR* I y *Hind* III (1); en (2) la amplificación del DNA genómico de *P. vulgaris* con los oligos exón 2a y exón 2b; como control se utilizó el cDNA que se amplificó con los mismos oligos (3); en el carril (4) el ORF de profilina amplificado con los oligos Prof1 y Prof2; en el carril (5) el cDNA de profilina digerido con *EcoR*I y *Hind* III, (plásmido P4) y en (B), la hibridación utilizando el cDNA como sonda.

Experimento tipo "Southern genómico" de *Phaseolus vulgaris* L. hibridizado con el producto de PCR correspondiente al "exón II" de profilina como probador.

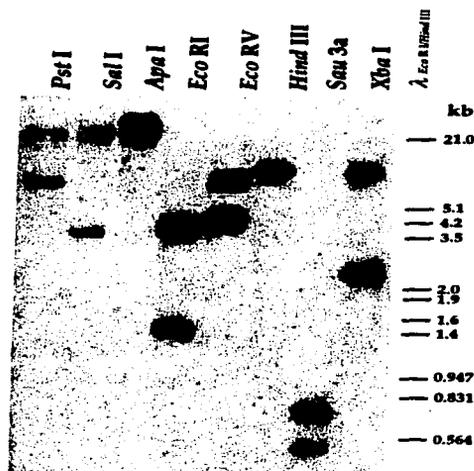


Fig. 21.- El DNA genómico de *P. vulgaris* fue restringido con *Pst* I, *Sal* I, *Apa* I, *Eco* RI, *Eco* RV, *Hind* III, *Sau* 3a, y *Xba* I respectivamente e hibridizadas con el producto de PCR de la región equivalente al exón II del cDNA como sonda, ver Figs. 18 y 19. (Huang *et al.*, 1995). Las condiciones de hibridación fueron 16 hrs: en 6XSSC, 200 mg de heparina, 0.5 % SDS at 55 °C y fue lavado tres veces a 0.5 XSSC/ 0.1 % SDS at 55 °C (moderada severidad), se expuso en película radiográfica de rayos X (X-Omat) durante 15 días a -70 °C.

VI.- Discusión.

VI.- La familia génica de profilina en *P. vulgaris*.

En *P. vulgaris* en un primer estudio se reportó la clonación de un cDNA de nódulo y la purificación y caracterización de una sola isoforma de profilina de extractos de diferentes órganos vegetativos (nódulos, raíces e hipocotilos); a través de usar cromatografía de afinidad en columnas de poli-L-prolina (Vidali *et al.*, 1995). Posteriormente en un análisis más extenso se detectaron isoformas que pudieron escapar del primero; ésto fué posible utilizando numerosas estrategias en las cuales incluyeron tiempos mas largo de incubación con el anticuerpo, el uso de extractos crudos y una mayor concentración en los gels de proteína. Como resultado se pudieron detectar cinco isoformas en extractos de nódulo y dos en raíces (Guillén *et al.*, 1997). Sin embargo las 70 clonas aisladas en este trabajo, al parecer fueron la misma clona ya que todas hibridaron con la el cDNA completo y con la región UTR 3' (como sondas general y específica respectivamente). Además los experimentos tipo Southern blot de DNA de *P. vulgaris* con diferentes condiciones de hibridación, indican la presencia de uno a dos genes de profilina (Fig. 15). Las enzimas que se utilizaron para digerir el DNA genómico de *P. vulgaris* no cortan la secuencia del cDNA de profilina lo que sugiere tres posibilidades a) la presencia de un gen y que estos sitios de restricción se encuentran dentro de los intrones y fuera de la secuencia representada en el cDNA; b) la presencia de dos genes o alelos, con polimorfismo para un sitio el restricción XbaI, ó C) o la presencia de más de dos genes. Para apoyar algunas de estas posibilidades se diseñaron oligos equivalente al exon II de *A. thaliana* (Fig. 12) con el fin de amplificar el DNA genómico de

P. vulgaris. En este caso solo una banda de amplificación de DNA de 133 pb fué obtenida, (al igual que el control: el cDNA de profilina como templado) (fig. 18). Este resultado sugiere que el gene de profilina no contiene intrones en esta región. Con esto generamos una sonda por PCR correspondiente al "exon II" (ver material y métodos) e hicimos una hibridación con el DNA genómico de frijol. Estos resultados sugieren la presencia de dos alelos o de dos genes de profilina en *P. vulgaris*. Así mismo estos datos son apoyados por análisis de PCR genómico y RT-PCR (no mostrados), donde una sola banda amplificación de DNA fué obtenida. Adicionalmente en ensayos de traducción *in vitro* solo una isoforma pudo ser detectada (Guillén *et al.*, 1997). Todos estos resultado sugieren que a diferencia de otras plantas estudiadas, en *P. vulgaris* existe una reducida familia génica de máximo dos miembros y que las diferentes isoformas observadas en los diferentes tejidos de esta planta son el producto de modificaciones postraduccionales.

VI.- Estructura de profilina de *P. vulgaris*.

A nivel de nucleótidos un fragmento de lectura abierta de 131 aminoácidos fué detectado. Los 20 aminoácidos estuvieron presentes en proporción normal exceptuando a Gly, el cual se encontró en una elevada proporción (13.7 %). Alineamientos de la secuencia de aminoácidos deducida de la secuencia del cDNA de la profilina de *P. vulgaris*, indican que la proteína codificada presenta una identidad arriba del 54 % con las secuencias de otras profilinas de plantas. El dendograma de alineamientos muestra que la profilina de *P. vulgaris* se agrupa con las profilinas de expresión constitutiva de plantas (Fig. 13). Como se ha discutido anteriormente, es posible entonces que en el nódulo simbiótico de *P. vulgaris*, un solo tipo de mensajero constitutivo que sea modificado postraduccionalmente y quizás también exista un gen especializado en una expresión polen específica en *P. vulgaris*. Esto apoya la idea de la existencia de dos genes en esta planta. Con el objeto de hacer algunas predicciones se buscó la presencia de motivos blancos de modificación postraduccional en la secuencia de aminoácidos de la profilina de *P. vulgaris* (Fig. 15). El modelaje de la estructura tridimensional de la profilina de *P. vulgaris* indica que sólo el residuo Thr⁵ se encuentra claramente expuesto, y quizás entonces, sea un posible blanco de modificación postraduccional. También es posible que no hayamos sido capaces de encontrar todos los motivos blancos de modificación postraduccional ya que muchos de estos todavía no están caracterizados (Bork *et al.*, 1996). No obstante, los resultados que se presentan en este trabajo junto con los resultados de Guillen *et al.*, (1997), sugieren un mecanismo fino de regulación, en el cual la profilina puede ser modificada

postraduccionalmente a través de una señalización celular en respuesta a las condiciones particulares que son requeridas durante el desarrollo o en los diferentes tipos celulares de esta planta.

VII.- Conclusiones.

Se clonó y caracterizó la secuencia de un cDNA de nódulo que codifica para la profilina de *P. vulgaris*.

El dendograma del alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la profilina de *P. vulgaris* con las secuencias homólogas de otras plantas sugiere que esta secuencia presenta una relación más estrecha con las profilinas de expresión constitutiva.

El análisis a nivel de aminoácidos indica una buena correlación estructural de la profilina de *P. vulgaris* con las profilinas reportadas; donde se pudieron localizar algunos sitios importantes, tales como el de pegado a PIP₂, poli-L-prolina y de unión a actina.

La predicción de la localización de los sitios blancos de modificación postraduccional sugieren que Thr⁵ puede estar expuesto en la estructura tridimensional.

En el genoma de *P. vulgaris* hay una familia génica reducida de profilina, con un máximo de dos miembros. Por lo que la mayoría de las diferentes isoformas observadas podrían ser el producto de modificaciones postraduccionales.

VIII.- Literatura Citada

- Abe S., You W., Davies E.** (1991). Protein bodies in corn endosperm are enclosed by and enmeshed in F-actin. *Protoplasm*. 161:139-149.
- Aderem A.** (1992) Signal Transduction and the cytoskeleton: the roles of MARCKS and profilin. *TIBS*. 17:438-443.
- Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J. D.** (1989). *Molecular Biology of the Cell*. Garland Publishing Inc. p613-680,1218.
- Allen N. S., Bennett M. N., Cox D. N., Shipley A., Ehrhardt D. W., Long S. R.** (1994). Effects of nod factors on alfalfa root hairs Ca²⁺ + H⁺ currents and cytoskeleton behavior. In *Avances in Molecular Genetics of Plant Microbe Interactions*. Vol. M.G. Danels J. A. Downie and Osbourne, eds (Dordrecht: Kluwer Academic Publishers), pp. 107-114.
- Archer J S., Vinsk V. K., Pollard T. D., Torchia D. A.** (1994). Elucidation of the poly-L-proline binding site in *Acanthamoeba* profilin I by NMR spectroscopy. *FEBS Lett*. 357:145-151.
- Bakhuizen R.**(1988). The Plant Cytoskeleton in the *Rhizobium*-Legume Symbiosis. Thesis of Ph D. Departament of Plant Molecular Biology Botanisch Laboratorium Rijksuniversiteit Leiden. The Netherlands.
- Barry G. F., Gresshoff P. M.** (1990). Genetic Analysis of Legume Nodule Initiation. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 1988. 39:297-319.
- Baskin T. I. Cande W. Z.** (1990). The structure and function of the mitotic spindle in flowering plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 41:277-315.
- Bec-Ferté, M.P., Krishnan, H.B., Promé, D., Savagnac, A., Pueppke, S., & Promé, J.C.** 1994. Structures of nodulation factors from the nitrogen-fixing soybean symbiont *Rhizobium fredii* USDA257. *Biochemistry*. 33: 11782-11788.
- Birnboim H. C.** (1983). A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. *Methods Enzymol.* 100:243-254.
- Bork P., Koonin E. V.** (1996). Protein sequence motifs. *Current Opinion in Structural Biology*. 6 (3):366-376.
- Brewin N. J.** (1991). Development of the legume root nodule. *Ann. Rev. Cell Biol.* 7:191-226.
- Calvert H. E., Pence M. K., Pierc M., Malik N. S. A. Bauer W. D.** (1984). Anatomical Analysis of developmen and distribution of the *Rhizobium* infections in soybean roots. *Can. J. Bot.* 62:2375-2384.
- Cantley L. C., Auger R. K., Carpenter C., Duckwort B., Graziani A., Kapeller R., Soltoff S.** (1991). Oncogenes and signal transduction. *Cell* 64:281-302.
- Cárdenas L., Domínguez J., Quinto C., López-Lara I. M., Lugtenberg B. J. J., Spaink H. P., Rademaker G. J., Haverkam J., y Thomas-Oates J. E.** (1995). Isolation, chemical structures and biological activity of the lipo-chitin oligosaccharide nodulation signal from *Rhizobium etli*. *Plant Mol. Biol.* 29:453-464.
- Cárdenas L., Vidali L., Domínguez J., Pérez H., Sánchez F. Peter H., Quinto C.** (1997). Rearrangement of actin microfilaments in plant roots hairs responding to *Rhizobium* nodulation signals. *Plant Molecular Biology*. Sometido.
- Carlson, R.W., San Juan, J., Bhat, U.R., Glushka, J., Spaink, H.P., Wijffes, A.H.M., van Brussel, A.A.N., Stokkermans, T.J.W., Peters, N.K., & Stacey, G.** 1993. The structures and biological activities of the lipo-oligosaccharide nodulation signals produced by type I and II strains of *Bradyrhizobium japonicum*. *J. Biol. Chem.* 268: 18372-18381.
- Carlsson L., Nyström L-E., Sundkvist I., Markey F., Lindberg U.** (1977). Actin polymerizability is

influenced by profilin a low molecular weight protein in non-muscle cells. *J. Mol. Biol.* 115:465-483.

Carlson R. W., Price N. P. J. Stacey G. (1995). The biosynthesis of rhizobial lipo-oligosaccharide nodulation signal molecules. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 7:684-695.

Cassimieris L., Safer D., Nachmias V. T. Zygmund S.H. (1992). Thymosin β_4 sequesters the majority of actin G in resting human polymorphonuclear leukocytes. *J. Cell Biol.* 119: 1261-1270.

Cho S. O., Wick S. M. (1990) Distribution and function of actin in the developing stomatal complex of the winter rye (*Secale cereale* cv. Puma). *Protoplasma.* 157:154-164.

Clayton L., Lloyd C.W. (1985). Actin organization during the cell cycle in meristematic plant cells. *Exp. Cell Res.* 156:231-238.

Cooley L. E. Verheyen E., Ayers K. (1992) Chickadee encodes a profilin required for intercellular cytoplasm transport during *Drosophila* oogenesis. *Cell.* 69:173-184.

Cook D., Dreyer D., Bonnet D., Howell M., Nony E., VandeBosch K. (1995). Transient induction of a peroxidase gene in *Medicago truncatula* precedes infection by *Rhizobium meliloti*. *Plant Cell.* 7:43-55.

Cox C., Hawes C. R. van der Lubbe L., Juniper B. E. (1987). High-voltage electron microscopy of whole, critical-point dried plant cells. 2 Cytoskeletal structures and plastid motility in *Sellaginella*. *Protoplasma.* 140:173-186.

Dart P. J. (1974). Development of root nodule symbiosis. In: *The biology of nitrogen fixation.* (Qhispel, A ed.) pp. 381-429. North Holland. Publishing Company, Amsterdam Oxford.

Dellaporta S. L. Wood J., Hicks J. B. (1983). A plant DNA. miniprep: Version II. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1: 19-21.

Dénarié J., Cullimore J. (1993). Lipo-oligosaccharide nodulation factor: A new class of signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Cell.* 74: 951-954.

Doyle J. J., Doyle L., Hortoria L. B. H. (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus.* 12:13-15.

Droback B. K. Watkinson P. A. C., Valenta R., Dove S. K. Lloyd C. W., Staiger C. J. (1994). Inhibition of plant plasma membrane phosphoinositide phospholipase C by the actin-binding protein, profilin. *The Plant Journal.* 6(3):389-400.

Drubin D. G., Mulholland J. Zhu Z., Bostein D. (1990). Homology of yeast actin-binding protein to signal Transduction Proteins and Myosin I. *Nature.* 388-290.

Ebener C., Birkner T., Valenta R., Rumpold H., Breitenbach M., Scheiner O., Kraft D. (1991). Common epitopes of birch pollen and apples: studies by western and northern blot. *J. Allergy Clin. Immunol.* 88:588-594.

Ehrhardt D. W. Atkinson E. M., Long S. R. (1992). Depolarization of alfalfa root hair membrane potential by *Rhizobium* Nod factor. *Science.* 256:998-1000.

Elkan H. G. (1984). Taxonomy and Metabolism of the *Rhizobium* and its Genetic Relationship. In *Biological nitrogen Fixation (Ecology, Technology and Physiology)*. Martin Alexander (ed) Plenum Publication Corporation pp 1-38.

Fahraeus G., Ljunggeren K. P. V. (1967). The possible significance of pectic enzymes in root hair infection by nodule bacteria. *Physiol. Plant.* 12:145-154.

Feinberg A. P. Volgenstein B. (1983). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* 132:6-13.

Fisher R. F. y Long S. (1992). *Rhizobium*-plant signal exchange. *Nature.* 357:655-660.

Giesselmann R., Kwiatkowski D. J; Janney P. A;

- Witke, W. (1995) Distinct biochemical characteristics of the human profilins isoforms. *Eur. J. Biochem.* 2295:621-628).
- Goldschmidt-Clermont P.J., Furman M. I., Wachstock D., Safer D., Nachmias V.T., Pollard T.D.** (1991 a). The control of actin nucleotide exchange by thymosin β 4 and profilin. A potential regulatory mechanism for actin polymerization in cells. *Mol. Biol. Cell.* 3:1015-1024.
- Goldschmidt-Clermont P.J., Kim J. W., Macheslky L.M., Rhee S.G., Pollard T.D.** (1991 b). Regulation of phospholipase C gamma 1. by profilin and Tyrosine phosphorylation. *Science.* 251:1231-1233.
- Goldschmidt-Clermont P.J., Macheslky L.M., Doberstien S.K., Pollard T.D.** (1991 c). Mechanism of interaction of human platelet profilin with actin. *J. Cell Biol.* 113:1081-1089.
- Grain J.** (1986). The Cytoskeleton in Protists: Nature, Structure and Functions. *Int. Rev. of Cytol.* 104:153-249.
- Gufflen G., Valdés-López V., Noguez R., Gerard van der Krogh, Sánchez F., Villanueva M. A.** (1997). Reduced genetic diversity but multiple profilin isoforms exist in *Phaseolus vulgaris*. Artículo en preparación
- Haarer B. K., Brown S. S.** (1990). Structure and function of profilin. *Cell Motil. Cytoskeleton.* 17:71-74.
- Harwing J. J., Chambers K.A., Hopcia K.L., Kwiatkowski D. J.** (1989). Association of profilin with filament-free regions of human leukocyte an platelet membranes and reversible membrane binding during platelet activation. *J. Cell.* 109:1551-1579.
- Heidecker G., Messing J.** (1986). Structural analysis of plants genes. *Annu Rev. Plant Physiol.* 37:439-466. **Hirsch A. M.**, 1992. Developmental biology of legume nodulation. *New Phytol.* 122: 211-237
- Heidstra R., Geurts R., Franssen H., Spaink H. P.** van Kammen A. Bisseling T. (1994). Root hair deformation activity of nodulation factors and their fate on *Vicia Sativa*. *Plant Physiol.* 105:787-797.
- Hirsch A. M.** (1992). Developmental biology of legume nodulation. *New Phytol.* 122: 211-237.
- Horvath B., Heidstra R., Lados M., Moerman M., Spaink H. P., Promé J.-C., van Kammen A., Bisseling T.** (1993). Lipo-oligosaccharide of *Rhizobium* induce infection-related early nodulin gene expression in pea roots hairs. *Plant J.* 4:727-733.
- Huang S., McDowell J. M., Weise M. J. Meagher R.** (1996). The *Arabidopsis* Profilin Gene Family. Evidence for an Ancient Split between Constitutive and Pollen-Specific Profilin Genes. *Plant Physiol.* 111:115-126.
- Haugwitz M., Noegel A. A. Rieger D.** (1991). *Dictyostelium discoideum* contains two profilin isoforms that differ in structure and function. *J. Cell Sci.* 100:481-89.
- Hungria M., Johnston A. W. B., Phillips D. A.** (1992). Effects of flavonoids released naturally from bean (*Phaseolus vulgaris*) on nodD-regulated gene transcription in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. *Mol. Plant-Microbe Interactions* 5:119-203.
- Journet E. P., Pichon M., Dedieu A., de Billy F., Truchet G., Baker D. G.** (1994). The *Rhizobium* Nod factors elicit cell-specific transcription of the ENOD12 gene in transgenic alfalfa. *Plant J.* 6 241-249.
- Kakimoto T., Shabaokoa H.** (1987). Actin filaments and microtubules in the preprophase band and phragmoplast of tobacco cells. *Protoplasma.* 140:151-156.
- Kakimoto T. Shabaoka H.** (1988). Cytoskeletal ultrastructure of phragmoplast-nucleic complex isolated from cultured tobacco cells. *Protoplasm Suppl.* 2:95-103.
- Kwiatowski D. J. Bruns G. A. P.** (1988). Human profilin, *J. Biol. Chem.* 263:5910-5915.

- Leuroge P., Roche P., Faucher C., Mallet F., Truchet G., Promé J. C., Dénarié J.** (1990). Symbiotic host-specificity of the *Rhizobium meliloti* is determined by sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signal. *Nature*. 334:781-784.
- Lerouge, P., Roche, P., Faucher, C., Maillet, F., Truchet, G., Promé, J. C., and Dénarié, J.** 1990. Symbiotic host-specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by a sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signal. *Nature*. 344: 781-784.
- Lewin B.** (1997). *Genes VI*. Oxford University Press and Cell Press. USA. pp 635.
- Lindberg U. Schutt C.E. Hellsten E., Tjader A. C. Hult T.** (1988). The use of poly (L-proline)-Sepahrose in the isolation of profilin and profilactin complexes. *Biochem. Biophys. Acta*. 957:391-400.
- Lodish H., Baltimore D., Berk A., Zipursky L. S. Matsudaira P., Darnell J.** (1995). *Molecular Cell Biology*. Scientific American Books. An Imprint W. H. Freeman and Company, New Yoork. Third Edition.
- Lloyd C. W.** (1987). The plant cytoskeleton. The impact of fluorescence microscopy. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 38:119-139.
- Lloyd C W.** (1991). The Cytoskeletal basis of plant growth and form. Academic Press. NY. (1987).
- Lloyd C. W., Traas J. A.** (1988). The role of F-actin in determining the division plane of carrot suspension cells. *Drug studies. Development*. 102:211-221.
- Machesky L., Goldschmidt-Clermont P. J. Pollard T. D.** (1990). The affinities of human platelet and *Acanthamoeba* profilin isoforms for polyphosphoinositides account for their relative abilities to inhibit phospholipase C. *Cell Reg.* 1:937-950.
- Machesky L., Pollard T. D.** (1993). Actin associated proteins: profilin. In T Kreis, R Vale, eds, *Guidebook to the Cytoskeletal and Motor Proteins*. Oxford Univesity Press, New York, pp 66-68.
- Magdolen V., Oechsner G., Muller G., Bandlow W.** (1988). The intron-containing gene for yeast profilin (PFY) encodes a vital function. *Mol. Cell Biol.* 8:5108-5115.
- Malm B, Larsson H., Lindberg U. J.** (1983). The profilin-actin complex: further characterization of profilin and studies on the stability of the complex. *Muscle Res. Cell Motil.* 4:569-588
- Mergaet, P., van Montagu, M., Promé, J.C. & Holsters, M.** 1993. Three unusual modifications, a D-arabinosyl, an N-methyl, and a carbomoyl group, are present on the Nod factors of *Azorhizobium caulinodans*. *Procc. Nat. Acad. Sci. USA*. 90: 1551-1555.
- Martínez R., Romero D., Palacios R.** (1990). The *Rhizobium* genome. *Plant Science*. 9:59-93.
- Martínez-Romero E., Segovia L., Martinus F., Franco A., Graham P. Pardo M. A.** (1990). *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L., Beans and *Leucaena* spp. *Tress International Journal of Systematic Bacteriology*. 41:417-426.
- McCurdy D. W., Gunnig B. E. S.** (1990). Reorganization of cortical actin microfilaments and microtubules at preprophase and mitosis in wheat root-tip cells: a double labeled immunofluorescence study. *Cell Motil. Cytoskeleton*. 15:76-87.
- McCurdy D. W., Sammut M., Gunnig B. E. S.** (1988). Immunofluorescence visualization of arrays of transverse cortical actin microfilaments in wheat root-tip cells. *Protoplasm*.147:204206.
- McCurdy D. W., Willianson R. E.** (1991). Actin and actin-associated proteins. in *The cytoskeletal basis of plant growth and form*. 3-14. Lloyd C.W. Editor. Academic Press. NY.
- McCurdy D. W., Willianson R. E.** (1987). Actin-related proteins inside pea chloroplasts. *J.Cell Scie*.87:449-456

- Mytona P., Pawlowski K., Bisselg T.** (1995). Symbiotic Nitrogen Fixation. *The Plant Cell*. 7: 869-885.
- Nishida E., Lida K., Yonezawa N., Koyasu S., Yahara I., Sakai H.** (1987). Cofilin is a component of intracellular and cytoplasmic actin rods in cultured cells. *PNAS*. 84:5262-52-66.
- Ndoye I., De Billy F., Vasse J., Dreyfus B., Truchet G.** (1994). Root nodulation of *Sesbania rostrata*. *J. Bacteriol.* 176:1060-1068.
- Noble M. E. M., Mussacchio A., Saraste M., M., Courtheidge S.A., Wierenge R. K.** (1993). Crystal structure of the SH3 domain in human *Fyn*; comparison of the three-dimensional structures of SH3 tyrosine kinases and spectrin *EMBO J.* 12:1227-1283.
- Pantaloni. D. T. Carlier M. F.** (1993). How profilin promotes actin filament assembly in the presence of thymosine β_4 cell 75:1007-1014.
- Parthasarathy M.V.** (1985). F-actin architecture in coleoptile epidermal cells. *Eur. J. Cell Biol.* 39:1-12.
- Payraastre B., van Bergen E. N., Henegouwen P.M.P. BretonM., den Hartingh J. C., Plantavid M., Verkleij A. J. Boonstra J.** (1991). Phosphoinositide kinase, diacylglycerol kinase, and phospholipase C activities associated to the cytoskeleton: Effect of epidermal growth factor. *J. Cell Biol.* 115:121-128.
- Peters N. K., Verma D. P. S.** (1990). Phenolic compounds as regulators of gene expression in plant-microbe interactions. *Molecular Plant-Microbe Interact.* 3:4-8.
- Poupot, R., Martínez-Romero, E., Maillet, F., Promé, J.C.** 1995. *Rhizobium tropici* nodulation factor sulfation is limited by the quantity os activated form of sulfate. *FEBS Letters*. 368: 536-540.
- Price N. P. J., Relic B., Talmont F., Lewin A., Promé D., Pueppke S.G., Mallet F., Dénarié J., Promé J.-C., Broughton W. J.** (1992). Broad-host-range *Rhizobium* Species strain NGR234 secretes a family of carbamoylated, and fucosylated, nodulation signal that are O-acetylated or sulphated. *Mol. Microbiol.* 6:3575-3584.
- Raghunath V., Mowery P., Roszycki M., Lindberg U., Schutt C.** (1992). Structural changes in profilin accompany its binding to phosphatidylinositol, 4, 5-biphosphate. *FEBS Letters* 297:46-50.
- Reichstein E., Korn E. D.** (1979). *Acanthamoeba* profilin. *J. Biol. Chem.* 254: 6174-6179.
- Roche, P., Debelle, F., Maillet, F., Lerouge, P., Faucher, C., Truchet, G., Denarié, J. & Promé, J.C.** 1991. Molecular basis of symbiotic host specificity in *Rhizobium meliloti nodH* and *nodPQ* genes encode the sulfation of lipooligosaccharide signals. *Cell.* 67:1131-1143.
- Rolfe B. G., Gresshoff P. M.** (1988). Genetic analysis of nodule initiation. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 39:297-319.
- Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T.** (1989). *Molecular Cloning. A laboratory manual.* Second Edition. Cold Spring Harbor, NY.
- Sánchez F., Padilla J., Pérez H., Lara M.** (1991). Control in Root-Nodule Development and Metabolism. *Annual Review of Plant Physiol. and Plant Mol. Biol.* 42:502-528.
- San Juan, J., Carlson, R.W., Spink, H.P., Bhat, U.R., Barbour, W.M., Glushka, J. Stacey, G.** 1992. A 2-O-methylfucose moiety is present in the lipooligosaccharide nodulation signal of *Bradyrhizobium japonicum*. *Procc. Nat. Acad. Sci. USA.* 89: 8789-8793.
- Schmit A. C., Lambert A. M.** (1987). Characterization and Dynamics of cytoplasmic F-actin higher plant endosperm cells during interphase, mitosis and cytokinesis. *J. Cell Biol.* 105:2157-2166.
- Schutt C. E. Linderberg U., Mylisk.** (1991a). Actin in ribbons. *Nature.* 353:508.

Schutt C. E., Myslík J. C., Rozycki M. D., Goonesekere N. C. W., Lindberg U. (1993b). The structure of crystalline profilin- β -actin. *Nature*. 365:810-816.

Schultze, M., Quiclet-Sire, B., Kondorosi, E., Virilizier, H., Glushka, J.N., Gero, S.D. & Kondorosi, A. 1992. *Rhizobium meliloti* produces a family of sulphated lipo-oligosaccharides exhibiting different degrees of plant host specificity. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 89: 192-196.

Sharriff A., Luna E. (1992). Diacylglycerol-Stimulated formation of actin nucleation sites at plasma membranes. *Science*. 256:245-247.

Spaink H. P. (1992). Rhizobial lipo-oligosaccharides: Answers and questions. *Plant Mol. Biol.* 20:977-986.

Spaink H. P., Sheely D. M., vanBrussel A. A. N., Glushka J., York W. S., Tak T., Geiger O., Kennedy E. P., Reinhold V. N., Lugtenberg B. J. (1991). A novel highly unsaturated fatty acid moiety of lipo-oligosaccharide signal determines host specificity of *Rhizobium*. *Nature*. 354:125-130.

Sparrow J.C. y Sheterline P. (1994). Actin Protein Profile. 1:1-62.

Staiger C. J., Goodbody K. C., Hussey P. J., Valenta R., Drobak B. K., Lloyd C. W. (1993). The profilin multigene family of maize: differential expression of three isoforms. *Plant J.* 4:631-641.

Theriot J.A., Michinson T.J. (1993) The three faces of profilin. *Cell*. 75:835-838.

Theriot J.A., Mitchison T.J., Tilney L. G., Portnoy D. A. (1992). The rate of actin-based motility of intracellular *Listeria monocytogenes* equals the rate of actin polymerization. *Nature*. 357:257-260.

Traas J. A., Burgain S., De Vaulx R. (1989). The organization of the cytoskeleton during meiosis in

eggplant (*Solanum melongena* L.) microtubule and F-actin are both necessary for coordinated meiotic division. *J. Cell Sci.* 92:541

Truchet G., Barker D. G., Camut. S., De Billy F., Vasse J., Huguet T. (1989). Alfalfa nodulation in absence of *Rhizobium*. *Mol Gen Genet.* 219:65-68.

Valenta R., Duchene M., Pottenburger K., Sillaber C., Valenta P., Bettelheim F., Breitenbach M., Rumpold H., Kraft D., Scheiner O. (1991). Identification of the profilin as a novel pollen allergen: IgE autoreactivity in sensitized individuals. *Science*. 253:557-560.

Valenta R., Ferreira F., Grote M., Swoboda I., Vrtala S., Duchene M., Deviller P., Meagher R., McKinney E., Heberle-Bores E., Kraft D., Scheiner O. (1993). Identification of profilin as an actin binding protein in higher plants. *J. Biol Chem.* 268:22777-22781.

Vasse J., De Billy F., Truchet G. (1993). Abortion of infection during the *Rhizobium meliloti*-alfalfa symbiotic interactions is accompanied by hypersensitive reaction. *Plant J.* 4:555-566.

Vidali L. (1993). Purificación y caracterización de una profilina de *Phaseolus vulgaris*. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma de México. UACPyCCH. Instituto de Biotecnología. UNAM. Cuernavaca Mor. México.

Vidali L., Pérez H. E., Valdés López V., Noguez R., Zamudio F., Sánchez F. (1995). Purification and characterization, and cDNA cloning of profilin from *Phaseolus vulgaris*. *Plant Physiol.* 108:115-123.

Vinson V. K., Archer S. J., Lattman E.E. Pollard T. D. y Toria D. A. (1993). Three-dimensional solution structure of *Acanthamoeba* profilin-I. *J Cell Biol.* 122:1277-1283.

Wick S. M., Duniec J. (1983). Immunofluorescence microscopy of tubulin and microtubule arrays in plant cells. I: Preprophase band development and concomitant appearance of nuclear envelope associated tubulin. *J. Cell Biol.* 97:235-243.

Wick S. M., Seagull R. W., Osborn M., Weber K.,

Gunnig B. E. S. (1981). Immunofluorescence microscopy of organized microtubule arrays in structurally stabilized meristematic plant cells. J. Cell Biol. 89:685-690.

Yang W. , deBlank C., Meskiene I., Hirt H., Bakker J., vanKammen A., Frassen H., Bisseling T. (1994). *Rhizobium* Nod factor reactivate the cell cycle during infection and nodule primordium formation, but the cycle is only completed in the primordium formation. Plant Cell 6:1415-1426.

Young V. B., Falkow S., Schoolnik G. K. (1992). The invasin protein of *Yersinia enterocolitica*: Internalization of invasin-bearing bacteria by eucaryotic cells is associated with reorganization of cytoskeleton. J. Cell Biol. 116:197-207.