

03072 13
24.

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

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

**CARACTERIZACION BIOQUIMICA PARCIAL DE LA
NODULINA 30 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 :

Juan Elías Olivares Grajales

**Departamento de Biología Molecular de Plantas
Instituto de Biotecnología**

Cuernavaca, Mor.

1997

**TESIS CON
FALSA DE CORTEN**



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.

PAGINACION VARIA

COMPLETA LA INFORMACION

A mi madre

A mis hermanos

A la memoria del Dr. Héctor Pérez

AGRADECIMIENTOS

A mi madre y mis hermanos, porque sin su apoyo no habría podido llevar a cabo mis estudios de maestría.

Al Dr. Héctor Pérez, por haber dirigido mi trabajo de tesis, el cual, por desgracia, no pudo ver concluido.

Al Dr. Federico Sánchez, por haberme recibido en su grupo de trabajo y dirigir también el trabajo experimental.

A los demás integrantes del comité tutorial, Dr. Alejandro Alagón, Dr. Roberto Gaxiola y Dr. Francisco Campos, por sus valiosas contribuciones durante el desarrollo de este trabajo.

A los integrantes del jurado, Dr. David Romero, Dr. Jaime Padilla, Dr. Marco Villanueva y Dra. Patricia León, por sus excelentes críticas que redundaron en una mejor calidad de la tesis.

A Xóchitl Alvarado y Nayeli Sánchez, por haber realizado el trabajo de microscopía.

A Gabriel Guillén, por su ayuda con los geles bidimensionales.

A la Dra. Rosario Vera-Estrella, por su ayuda en la cuantificación de proteínas.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por la beca otorgada (registro 90290).

El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Biología Molecular de Plantas del Instituto de Biotecnología de la U.N.A.M. bajo la dirección del Dr. Héctor Enrique Pérez Reyes

INDICE

RESUMEN.....	1
INTRODUCCION.....	2
I. IMPORTANCIA DEL NITROGENO.....	2
II. SIMBIOSIS <i>RHIZOBIUM</i> -LEGUMINOSA.....	3
1) Genes de nodulación.....	4
a) Genes de nodulación comunes.....	4
b) Genes de nodulación "especie-específicos".....	7
c) Otros genes involucrados en la simbiosis.....	8
2) Eventos iniciales en la simbiosis.....	9
3) Hipótesis sobre el inicio de la formación del nódulo.....	9
4) Infección.....	11
5) Tipos de nódulos.....	12
6) Nodulinas.....	14
a) Nodulinas tempranas.....	14
b) Nodulinas tardías.....	16
ANTECEDENTES.....	21
a) Detección de nodulina 30.....	21
b) Clonación y secuenciación.....	21
c) Secuencia de aminoácidos de N30 y comparación con otras proteínas.....	23
d) Cinética de expresión.....	23
e) La nodulina 30 forma parte de una pequeña familia multigénica.....	23
f) Expresión nódulo-específica de N30.....	25
g) Caracterización inmunológica.....	25
h) Expresión de N30 en levadura.....	26
JUSTIFICACION.....	27
OBJETIVOS.....	29
a) Objetivo general.....	29
b) Objetivos específicos.....	30
ESTRATEGIA GENERAL.....	31
a) Consideraciones generales para la purificación y caracterización de proteínas.....	31
b) Purificación de nodulina 30.....	32
MATERIALES Y METODOS.....	35
1. Características de la cepa de levadura y del vehículo para expresión.....	35
2. Condiciones de crecimiento de levadura.....	35

3. Extracción de proteínas de levadura.....	35
4. SDS-PAGE y 2D SDS-PAGE.....	36
5. Electrotransferencia e inmunodetección.....	36
6. Obtención de nódulos de frijol.....	37
7. Extracción de proteínas totales de nódulo.....	37
8. Extracción de proteínas solubles de nódulo.....	37
9. Fraccionamiento con etanol.....	37
10. Cromatografía en azul de sefarosa.....	38
11. Cromatografía en hidroxilapatita.....	38
12. Cromatografía en adsorbente de zinc.....	38
13. Fraccionamiento de proteínas por precipitación con etanol y cromatografía en adsorbente de zinc e hidroxilapatita.....	38
14. Protocolo final para enriquecer la nodulina 30.....	39
15. Cuantificación de proteínas.....	40
16. Detección de actividad proteolítica en geles con sustrato.....	40
17. Ensayo para ver la degradación de la banda de 60 kDa que es reconocida por el anticuerpo contra N30.....	40
18. Extracción de proteínas con ácido tricloroacético al 10% y fraccionamiento con etanol.....	41
19. Inmunolocalización de la nodulina 30 en cortes de nódulo.....	41
RESULTADOS.....	42
I. EXPRESION DE NODULINA 30 EN LEVADURA.....	42
1) La N30 se excreta al medio extracelular cuando se expresa en levadura.....	42
2) La N30 expresada en levadura no se enfoca bien en el gradiente isoeléctrico de un gel de dos dimensiones.....	42
II. ENRIQUECIMIENTO DE LA NODULINA 30 A PARTIR DE NODULOS DE FRIJOL.....	45
1) Fraccionamiento de proteínas mediante precipitaciones con etanol.....	45
2) Cromatografía en azul de sefarosa e hidroxilapatita.....	47
3) Cromatografía en azul de sefarosa y precipitaciones con acetona.....	48
4) Fraccionamiento de proteínas mediante precipitaciones con etanol y detección de actividad proteolítica en geles con sustrato para proteasas.....	51
5) Cromatografía en adsorbente de zinc.....	51
6) Fraccionamiento de proteínas por precipitación con etanol y cromatografía en adsorbente de zinc e hidroxilapatita.....	53

7) Enriquecimiento de nodulina 30 y estimación de su concentración.....	56
8) Ensayo para ver degradación de la banda de 60 kDa que reconoce el anticuerpo contra N30.....	56
9) Inmunolocalización de la nodulina 30 en cortes de nódulos de frijol.....	62
DISCUSION.....	65
I. EXPRESION DE NODULINA 30 EN LEVADURA.....	65
1. Detección de nodulina 30 expresada en levadura.....	66
2. Comportamiento en 2D SDS-PAGE de la nodulina 30 expresada en levadura.....	66
II. ENRIQUECIMIENTO DE LA NODULINA 30 A PARTIR DE NODULOS DE FRIJOL.....	67
1) Ensayo con azul de sefarosa e hidroxilapatita.....	67
2) Precipitaciones con etanol.....	69
3) Cromatografía en adsorbente de zinc.....	71
4) Protocolo para enriquecer la nodulina 30.....	72
5) Estimación de la concentración de nodulina 30.....	72
6) Banda de 60 kDa que reconoce el anticuerpo.....	73
7) Ensayo de degradación de la banda de 60 kDa.....	75
8) Inmunolocalización de la nodulina 30.....	77
9) Posibilidad de la N30 para interactuar con otras proteínas.....	78
CONCLUSIONES.....	80
PERSPECTIVAS.....	81
LITERATURA CITADA.....	83

RESUMEN

Las bacterias del suelo de la familia Rhizobiaceae son capaces de establecer una asociación simbiótica con plantas leguminosas, lo cual da como resultado la formación de nódulos radiculares que son órganos especializados en la fijación de nitrógeno. La nodulina 30 es una proteína de la planta de frijol (*Phaseolus vulgaris*) cuyo gene se expresa abundantemente en etapas tardías del proceso simbiótico, por lo que se le clasifica como nodulina tardía.

Con la finalidad de obtener datos acerca de su posible función y localización, se expresó la nodulina 30 en levadura. Este organismo excretó la nodulina 30 hacia el medio de cultivo, donde fue detectada como un par de bandas parecidas a las de nódulo pero con un peso mayor al esperado (34 y 32 kDa aproximadamente). Estas bandas, al ser analizadas en 2D SDS-PAGE, se enfocaron en varios puntos en el gradiente isoeléctrico.

Por otro lado, con la intención de purificar la nodulina 30, se desarrolló un protocolo para enriquecerla a partir de nódulos, el cual consistió en fraccionamiento por precipitación con etanol, cromatografía en adsorbente de zinc y cromatografía en hidroxilapatita. La nodulina 30 presentó dos picos de enriquecimiento en las precipitaciones con etanol, uno a baja concentración (20%) y otro a concentración alta (80%). Esto sugiere que la nodulina 30 puede estar formando complejos macromoleculares. También se observó que esta proteína es muy susceptible a la degradación, y que el par de bandas presentes en extractos de nódulo se comportan de manera similar en electroforesis bidimensional a la N30 expresada en levadura. Durante los ensayos de fraccionamiento se detectaron una banda de aproximadamente 34 kDa y otra de 60 kDa que fueron reconocidas con alta afinidad por el anticuerpo contra N30, y que se comportaron de manera diferente al doblete en la cromatografía con hidroxilapatita y en el fraccionamiento con etanol. Tomando en cuenta que hay datos que sugieren que la banda de 60 kDa puede dar origen al doblete de aproximadamente 30 kDa, es posible que la banda de 60 kDa sea una forma glucosilada de N30 que al ser degradada origina el doblete, o que se trate de un dímero estable de N30 que se disgrega lentamente en condiciones desnaturizantes. Otra posibilidad es que las bandas de 60 y 34 kDa sean proteínas relacionadas antigénicamente con N30.

Para determinar la localización de la nodulina 30 en el tejido del nódulo, se llevó a cabo la inmunolocalización de ésta en cortes de nódulos de frijol. La N30 fue detectada solamente en las células infectadas del nódulo, al parecer dispersa en el citoplasma, pero aún cabe la posibilidad de que se encuentre en el espacio peribacteroidal, lo cual podría verificarse por técnicas de microscopía electrónica.

INTRODUCCION

I. IMPORTANCIA DEL NITROGENO

El nitrógeno es el cuarto elemento más abundante en la composición de los seres vivos (después del carbono, el hidrógeno y el oxígeno), pues forma parte esencial de proteínas, ácidos nucleicos, y muchas otras sustancias orgánicas fundamentales. Los animales obtienen el nitrógeno que necesitan alimentándose de plantas u otros animales, mientras que las plantas lo absorben del suelo generalmente en forma de amonio (NH_4^+) y nitrato (NO_3^-). El nitrógeno es muy escaso en la roca madre de la cual se forman los suelos, por lo que su contenido resulta de la acción biológica, abono artificial, o fenómenos ionizantes tales como la radiación cósmica, meteoritos y rayos, que momentáneamente proporcionan la energía necesaria para que el nitrógeno reaccione con el oxígeno o el hidrógeno del agua. El nitrógeno molecular (N_2) ocupa un 79% de la atmósfera, pero a pesar de su abundancia la mayoría de los seres vivos no pueden utilizarlo de una manera directa, sino sólo después de haber sido "fijado" en compuestos asimilables. El hombre logra reducir el nitrógeno molecular a amonio mediante un proceso químico denominado "Haber-Bosch," el cual requiere de presión y temperatura elevadas, por lo que resulta altamente costoso y contaminante (Delwiche, 1981).

Algunas especies de bacterias tienen la capacidad de utilizar el nitrógeno atmosférico y reducirlo a compuestos asimilables, lo cual se conoce como fijación biológica del nitrógeno, proceso en el que el dinitrógeno atmosférico libre es convertido en amonio gracias a la acción de la enzima nitrogenasa. Esta enzima está formada por dos componentes: una proteína que contiene hierro (Fe-proteína) y otra que contiene hierro y molibdeno (Mo-Fe-proteína), las cuales se inactivan irreversiblemente por exposición a O_2 . La reacción general catalizada por esta enzima es:



Muchas bacterias fijadoras de nitrógeno, tales como *Azotobacter vinelandii* y *Klebsiella pneumoniae*, fijan nitrógeno en condiciones de vida libre; otras, por el contrario, necesitan establecer una asociación simbiótica

con determinado tipo de plantas para llevar a cabo esta función. Tal es el caso de la actinobacteria filamentosa *Frankia*, la cual se asocia simbióticamente con plantas de diversos géneros como *Casuarina*, *Alnus*, *Ceanothus*, *Myrica*, *Elaeagnus*, etc. (Hirsch, 1992), induciendo en ellas la formación de nódulos radiculares donde se lleva a cabo la fijación biológica del nitrógeno. La cianobacteria *Nostoc* también se asocia simbióticamente con la planta *Gunnera* (Bergman et al., 1992), pero a diferencia de *Frankia*, *Nostoc* no induce la formación de nódulos radiculares, sino que reside en unas glándulas que se encuentran en el tallo de la planta huésped. Otra asociación simbiótica es la que se da entre el helecho acuático *Azolla* y la cianobacteria *Anabaena* (Eskew et al., 1993), en la que el procarionte se establece en las cavidades de las hojas de dicha planta. Esta asociación simbiótica tiene mucha importancia en el cultivo del arroz, ya que enriquece el suelo con nitrógeno que posteriormente puede ser aprovechado por la gramínea.

La asociación simbiótica más importante y mejor estudiada es la que se da entre algunas bacterias de la familia Rhizobiaceae y plantas de la familia Leguminosae, ya que la mayoría del nitrógeno fijado biológicamente disponible para la agricultura proviene de ella (Bauer, 1981). En esta relación la planta proporciona a la bacteria un nicho adecuado y la energía requerida para llevar a cabo la fijación de nitrógeno, mientras que la bacteria aporta a la planta el nitrógeno reducido (en forma de NH_4^+).

II. SIMBIOSIS RHIZOBIUM-LEGUMINOSA

Las bacterias del suelo de la familia Rhizobiaceae que son capaces de inducir la formación de nódulos radiculares en plantas leguminosas se dividen en cuatro géneros: *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium* y *Sinorhizobium*, denominados colectivamente rhizobia (Dénarié et al., 1996). La capacidad de establecer una asociación simbiótica con los rhizobia es exclusiva de las plantas de la familia Leguminosae, con excepción del género *Parasponia* de la familia Ulmaceae que puede ser nodulada por la bacteria *Rhizobium* sp. cepa NGR234 (Dénarié et al., 1992).

En la etapa inicial de la simbiosis se lleva a cabo un intercambio de señales químicas entre ambas partes: la planta secreta compuestos

fenólicos, flavonas e isoflavonas (Peters y Verma, 1990), que atraen a las bacterias hacia las raíces e inducen la expresión de los genes de nodulación, los cuales se requieren para la infección, la formación del nódulo y el control de la especificidad de hospedero (Dénarié et al., 1996). Como consecuencia de la inducción de los genes de nodulación, la bacteria libera unos compuestos de bajo peso molecular (oligómeros de quitina mono-*N*-acilados) que causan la deformación y enroscamiento de los pelos radiculares, así mismo, inducen a las células corticales a dividirse repetidamente, dando origen al primordio del nódulo (Fig. 1) (Nap y Bisseling, 1990; Verma, 1992; Dénarié y Cullimore, 1993).

1) Genes de nodulación

Los genes de nodulación (genes *nod*) no se expresan en bacterias de vida libre, a excepción del gen *nodD* que codifica para un activador transcripcional que se expresa constitutivamente (Fisher y Long, 1992; Vijn et al., 1993). Algunas especies como *R. leguminosarum* y *R. trifolii* tienen sólo un gen *nodD*, mientras que *R. meliloti*, *R. fredii* y *B. japonicum*, poseen dos o tres copias (Dénarié et al., 1992). Hay otros genes cuyos productos también son reguladores de la expresión de los genes de nodulación: los genes *nodV* y *nodW* identificados en *B. japonicum* (Dénarié et al., 1996); el gen *nolA*, reportado en *B. japonicum*, (Sadowsky et al., 1991); y los genes de *R. meliloti* denominados *nolR* (Cren et al., 1995) y *syrM* (Mulligan y Long, 1989).

Los compuestos flavonoides secretados por la planta interactúan con la proteína NodD de *Rhizobium*, la cual entonces activa la transcripción de los genes *nod* y lleva a la bacteria a sintetizar y liberar los factores de nodulación (Fig. 2) (Dénarié y Cullimore, 1993; Dénarié et al., 1996). Por su distribución taxonómica se ha dividido a los genes *nod* en "comunes" y "especie-específicos".

a) Genes de nodulación comunes

Estos genes se denominan *nodABC*, se encuentran en todas las especies y están involucrados en la síntesis del "esqueleto" del factor Nod (el oligómero de quitina mono-*N*-acilado).

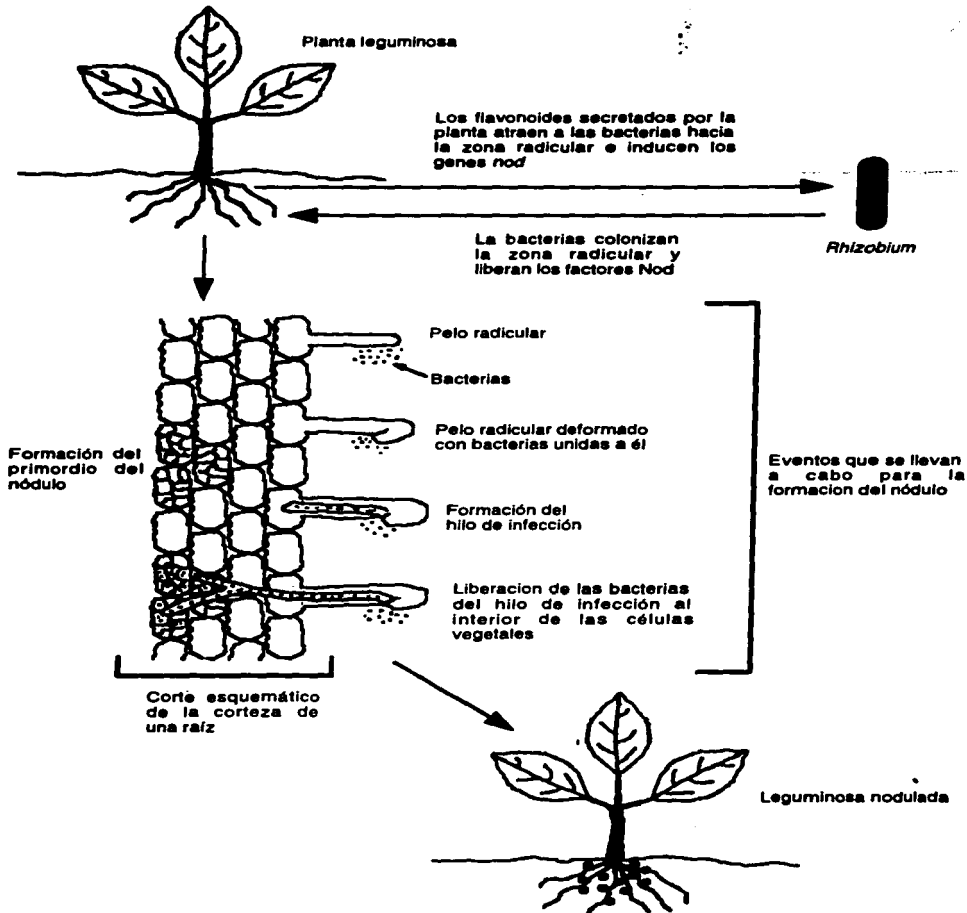


Figura 1. Establecimiento de la simbiosis entre una planta leguminosa de clima templado y *Rhizobium*.

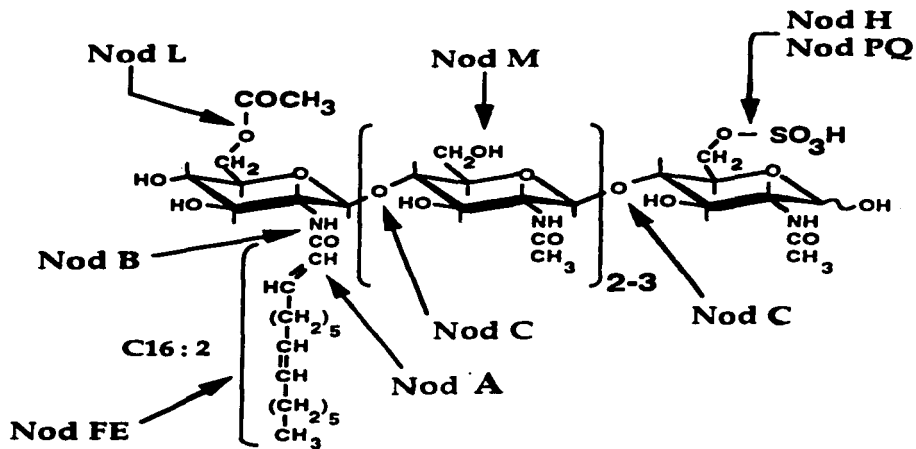


Figura 2. Estructura de los factores de nodulación mayoritarios de *R. meliloti* y los productos de los genes *nod* involucrados en su biosíntesis (Tomado de Dénarié y Cullimore, 1993).

nodC: codifica para una UDP-GlcNAc transferasa involucrada en la síntesis de oligómeros de N-acetil-D-glucosamina con un tamaño máximo de cinco residuos (Carlson et al., 1994; Dénarié et al., 1996).

nodB: el producto de este gen es una N-desacetilasa específica que se encarga de remover el grupo acetil del residuo terminal en el extremo no reductor del quitooligosacárido (Pueppke, 1996; Spaink et al., 1994).

nodA: codifica para una N-acil transferasa que cataliza la adición de un ácido graso de cadena larga al extremo no reductor del quitooligosacárido (Atkinson et al., 1994).

b) Genes de nodulación “especie-específicos”

Los productos de estos genes tienen que ver con la “decoración” (sustituciones) del factor Nod (Fig. 2), lo cual es importante para que una determinada especie de *Rhizobium* sea reconocida por su hospedero específico, y se encuentran presentes en diferentes combinaciones en las distintas especies.

nodS: codifica para una proteína que cataliza la N-metilación en el extremo no reductor del esqueleto del factor Nod (Mergaert et al., 1995), y ha sido reportado en *R. sp* NGR234, *R. tropici*, *A. caulinodans*, *B. japonicum*, *R. fredii* y *R. etli*.

nodFE: los productos de estos genes se encargan de la síntesis de grupos acil poli-insaturados que eventualmente serán adheridos al factor Nod por la acción de NodA (Demont et al., 1993; Bloemberg et al., 1995), siendo NodF una proteína acarreadora de grupos acil que se ha reportado en *R. meliloti*, *R. leguminosarum* bv *viciae* y *R. loti*, mientras que NodE es una-cetoacil sintasa que se ha reportado en *R. meliloti*, *R. leguminosarum* bv *viciae* y *R. l. bv trifolii*.

nodL: codifica para una proteína que cataliza la 6-O-acetilación en el extremo no reductor del factor Nod (Ardourel et al., 1995) y se ha reportado en *R. meliloti*, *R. leguminosarum* bv *viciae* y *R. l. bv trifolii*.

nodU: el producto de este gen se encarga de la 6-O-carbamilación en el extremo no reductor del factor (Jabbouri et al., 1995) y ha sido reportado en *R. sp* NGR234, *R. tropici*, *A. caulinodans*, *B. japonicum* y *R. fredii*.

nodPQ y **nodH:** han sido reportados en *R. meliloti* y *R. tropici*, y sus productos están involucrados en la 6-O-sulfatación en el extremo reductor del factor Nod (Schwedock y Long, 1990; Schwedock et al., 1994; Ehrhardt et al., 1995), siendo NodP una ATP sulfurilasa, NodQ una ATP sulfurilasa-APS cinasa, y NodH una sulfotransferasa.

nodX: este gen codifica para una enzima que cataliza la O-acetilación en el extremo reductor del factor y se ha reportado sólo en *R. leguminosarum* bv *viciae* cepa TOM (Firmin et al., 1993).

nodZ y **nolK:** son dos genes cuyos productos están involucrados en la O-glucosilación en el extremo reductor del factor Nod (Dénarié et al., 1996; Goethals et al., 1992), siendo NodZ una fucosil transferasa en *B. japonicum* y *R. sp* NGR234, y posiblemente una glucosil transferasa en *A. caulinodans*, mientras que NolK es una azucar-epimerasa en *A. caulinodans*.

c) Otros genes involucrados en la simbiosis

nodM: se ha reportado en *R. meliloti*, *R. l.* bv. *viciae* y *R.l.* bv *trifolii*, y codifica para una glucosamina sintasa (Baev et al., 1991) que pudiera estar incrementando la concentración de GlcNAc para la producción de los factores Nod (Dénarié et al., 1996; Marie et al., 1992).

nodI y **nodJ:** son genes comunes que codifican respectivamente para una proteína de unión a ATP y una proteína de membrana, y tienen homología con proteínas bacterianas involucradas en la secreción de polisacáridos (Vázquez et al., 1993). Se ha comprobado que en *R. l.* bv *trifolii* la secreción de los factores de nodulación depende de *nodI* y *nodJ* (McKay y Djordjevic, 1993), mientras que en *Rhizobium etli* al mutar estos genes la secreción es menor (Cárdenas et al., 1996).

nodT: es un gen que se ha reportado en *R. leguminosarum* bv *viciae* y bv *trifolii* el cual codifica para una proteína de membrana externa, y se ha propuesto que NodT junto con NodI y NodJ forman un sistema para la secreción de los factores de nodulación (Downie, 1994).

nodFGHI: son genes reportados en *R. meliloti* que codifican para proteínas de membrana las cuales se supone permiten el transporte, en conjunto con la proteína NodF, de los factores de nodulación a través de las membranas interna y externa (Saier, 1994).

2) Eventos iniciales en la simbiosis

Como consecuencia de la inducción de los genes *nod*, la bacteria sintetiza y libera los factores de nodulación (Fig. 2) que provocan la deformación de los pelos radiculares e inducen la formación de un nuevo meristemo en la corteza de la raíz (Fig. 1) (Brewin, 1991). El primer signo visible en la interacción planta-*Rhizobium* es precisamente la deformación y encurvamiento de los pelos radiculares (Dénarié et al., 1996). Se han hecho ensayos con factores Nod purificados y se ha encontrado que éstos causan una depolarización de la membrana plasmática de los pelos radiculares y otras células epidérmicas (Ehrhardt et al., 1992; Felle, 1994; Kurkdjian, 1995), así como cambios en el flujo de calcio (Ehrhardt et al., 1996). Se ha observado también un mayor flujo citoplásmico (Heidstra et al., 1994) y el rearreglo de los filamentos de actina, indicando que hay reorganización del citoesqueleto (Cárdenas et al., en prensa).

3) Hipótesis sobre el inicio de la formación del nódulo

No se sabe con certeza cómo es que los factores Nod inducen la formación del nódulo, pero las bajas concentraciones de factor (10^{-10} - 10^{-12} M) que se requieren para provocar las respuestas en la epidermis de la raíz sugieren que debe haber receptores de alta afinidad. Puede ser que los factores Nod se difundan por vía apoplástica o simplástica hasta alcanzar las células de la corteza induciéndolas a dividirse, o que éstos no alcancen dichas células directamente, sino que el estímulo se lleve a cabo a través

de una cadena de segundos mensajeros. Una hipótesis para la iniciación del nódulo es que los factores Nod regulan el mecanismo endógeno que normalmente controla la división celular en la corteza de la raíz, y el descubrimiento de que ciertas líneas de alfalfa forman nódulos espontáneamente (Truchet et al., 1989) indica que el nódulo se puede formar sin la necesidad de compuestos exógenos, tal vez porque estas líneas producen altos niveles de compuestos similares a los factores Nod o tienen un sistema de segundos mensajeros que se activa de forma espontánea.

Se propone que los factores Nod pudieran estar mimetizando alguna molécula señal propia de la planta, y el hecho de que éstos sean quitooligosacáridos modificados apoya esta idea, ya que ciertos oligosacáridos específicos (designados oligosacarinas) pueden actuar como moléculas regulatorias en las plantas, afectando el crecimiento y desarrollo (Schmidt et al., 1993). Tales oligosacáridos pueden ser liberados de la pared celular por la acción de hidrolasas y actuar en concentraciones muy bajas (Eberhard et al., 1989; Marfà et al., 1991). Un dato interesante es que los genes *nodA* y *nodB* de *R. meliloti*, al ser expresados en plantas transgénicas de tabaco, producen anomalías morfológicas, indicando que las moléculas sustrato (quitooligosacáridos) para las enzimas NodA y NodB probablemente están presentes en tabaco, y debido a la acción de éstas se sintetizan factores que controlan el crecimiento y desarrollo de la planta (Schmidt et al., 1993). También se ha observado que en sistemas animales los oligosacáridos juegan un papel importante en la embriogénesis, ya que en *Xenopus*, pez cebra y ratón, se han detectado proteínas similares a Nod C de *Rhizobium* que están involucradas en la síntesis de quitooligosacáridos durante la embriogénesis temprana (Semino et al., 1996); y se ha observado que al microinyectar anticuerpos contra esta proteína (denominada DG42) en huevos fertilizados de pez cebra se producen defectos en la formación del tronco y de la cola (Bakkers et al., 1997).

Se ha sugerido también que las hormonas propias de la planta controlan el desarrollo del nódulo, y hay evidencias que sugieren fuertemente que los factores Nod causan un cambio en el balance de auxinas/citocininas. Así, tanto las citocininas (Cooper y Long, 1994) como los compuestos que bloquean el transporte polar de auxinas (Hirsch et al., 1989) inducen la formación de estructuras parecidas a nódulos en las cuales hay expresión de nodulinas tempranas.

En otro experimento, el gen *ENOD40* de soya (Yang et al., 1993) fue expresado en protoplastos de tabaco bajo el promotor 35S; estos protoplastos fueron capaces de dividirse eficientemente a concentraciones altas de auxina, mientras que para los protoplastos control esta cantidad de auxina fue suficiente para suprimir su capacidad de dividirse (van de Sande et al., 1996). La aplicación de factores Nod en las raíces de leguminosas provoca la activación del periciclo induciéndolo a expresar la nodulina *ENOD40* (Crespi et al., 1994; Vijn et al., 1993), la cual podría estar causando un cambio en la relación citocinina/auxina que resulta en la división de las células corticales, o tal vez podría estar volviendo más susceptibles a estas células, las cuales entonces se dividen debido a la acción de los factores Nod o de los segundos mensajeros generados en la epidermis. Otra evidencia es la que se obtuvo cuando el gen *tzs* de *A. tumefaciens* que codifica para una isopentenil transferasa, la cual cataliza la reacción limitante en la biosíntesis de las citocininas isopentenil-adenina y zeatina (Akiyoshi et al., 1985), fue introducido en bacterias *E. coli* y *R. meliloti* GMI255 (cepa que carece de la región de los genes *nod* con una delección de 250 kb en el plásmido pSymA), y al inocular las raíces de alfalfa con estas bacterias pTZS⁺ se indujo la división de las células corticales (Cooper y Long, 1994), lo cual se parece, al menos en parte, a los eventos morfológicos y moleculares de la iniciación del nódulo. En este sentido, pTZS complementa parcialmente las funciones morfogenéticas de los genes *nod* de *Rhizobium*.

4) Infección

La infección es el proceso mediante el cual las bacterias logran establecerse dentro del tejido del nódulo en una forma intracelular. Este proceso involucra la adhesión de las bacterias al pelo radicular, la formación de un hilo de infección, y la liberación de las bacterias dentro de las células vegetales. Como primer evento las bacterias se adhieren al pelo radicular, éste se encurva y las bacterias quedan atrapadas, entonces hay una hidrólisis de la pared celular en este punto (Van Spronsen et al., 1994), la membrana plasmática se invagina y se deposita material (de origen vegetal) para la formación de nueva pared celular. Esto resulta en la formación de una estructura tubular, el hilo de infección, mediante el cual las bacterias infectan a las células vegetales.

En leguminosas de clima templado (ej. chícharo y alfalfa), antes de que se forme el hilo de infección, algunas células de la corteza externa sufren cambios morfológicos: el núcleo se mueve al centro de las células y los microtúbulos y el citoplasma se reorganizan para formar una estructura cónica orientada radialmente, denominada puente citoplásmico (van Brussel et al., 1992). El hilo de infección atraviesa las células corticales mediante estos puentes citoplásmicos alineados radialmente, por lo cual se les denomina "hilos de preinfección". Las células que forman los hilos de preinfección entran en ciclo celular y muy probablemente quedan detenidas en la fase G2, mientras que las células de la corteza interna sí llegan a completar el ciclo celular y dan origen al primordio del nódulo (Mylona et al., 1995). En leguminosas de clima tropical (ej. frijol y soya), a diferencia de las de clima templado, el primordio del nódulo se forma en la corteza externa y no existe la formación de hilos de preinfección.

En el hilo de infección las bacterias se reproducen y posteriormente son liberadas de éste a través de las "gotas de infección" (extremos de los hilos de infección que carecen de pared celular) a través de un mecanismo de endocitosis (Rae et al., 1992; Verma, 1992), después de lo cual quedan rodeadas por la membrana peribacteroidal dentro de las células vegetales. En leguminosas de clima templado los hilos de infección se ramifican y llegan hasta las células que ya se han dividido liberando en ellas las bacterias, mientras que en leguminosas de clima tropical los hilos de infección liberan las bacterias en las células del meristemo antes de que éstas se dividan, por lo que la generación de más células infectadas ocurre por división de las que fueron infectadas primero (Rae et al., 1992). Ya en el estado intracelular las bacterias continúan multiplicándose, crecen, y eventualmente ocupan mucho del volumen de la célula infectada. Posteriormente, estas bacterias se diferencian a bacteroides, los cuales son capaces de asimilar el nitrógeno atmosférico y reducirlo a amonio (Dilworth y Glenn, 1984).

5) Tipos de nódulos

Los nódulos que se forman al establecerse la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa pueden ser de dos tipos, dependiendo de la especie de esta última: nódulos de tipo indeterminado o nódulos de tipo determinado (Fig. 3). Los nódulos de tipo indeterminado se caracterizan por presentar un

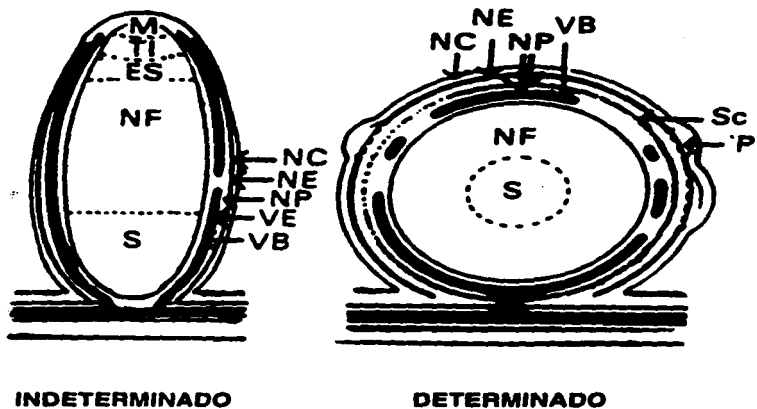


Figura 3. Comparación entre nódulos determinados e indeterminados
 Se muestran las diferencias más significativas entre los nódulos determinados e indeterminados. Abreviaciones: M, meristemo; TI, zona de hilos de infección; ES, zona simbiótica temprana; NF, zona de fijación de nitrógeno; S, zona senescente; NC, corteza del nódulo; NE, endodermis del nódulo; NP, parénquima del nódulo; VE, endodermis vascular; VB, haces vasculares; Sc, esclerénquima; P, peridermo. (Tomado de Hirsch , 1992).

meristemo persistente, y son de forma un poco alargada debido a que constantemente se adicionan células al extremo distal del nódulo. Todas las etapas del desarrollo del nódulo se representan en uno de ellos, ya que ocurre un gradiente de edad del meristemo distal al punto proximal (donde emerge el nódulo de la raíz). Dentro de las plantas que presentan este tipo de nódulos están el trébol, alfalfa y chícharo. Los nódulos determinados son de forma esférica, pues carecen de un meristemo persistente (Hirsch, 1992). Las divisiones celulares cesan tempranamente durante el desarrollo del nódulo y la forma final de éste resulta del crecimiento celular y no de la división celular. Ejemplos de nódulos determinados son aquellos formados por soya y frijol. Tanto en los nódulos determinados como en los indeterminados hay células infectadas y no infectadas en el tejido central; en nódulos determinados las células no infectadas tienen una función específica: la asimilación de amonio en ureidos (Newcomb and Tandon, 1981), mientras que en los nódulos indeterminados no se sabe si las células no infectadas desempeñan una función similar.

6) Nodulinas

Durante la reactivación mitótica de las células corticales de la raíz se inducen genes que controlan la progresión a través del ciclo celular, tales como *cdc2* y ciclinas mitóticas (Yang et al., 1994). Así mismo, durante las etapas tempranas de la simbiosis, la infección y la formación del nódulo, se induce la expresión de los denominados genes de nodulinas tempranas. En etapas más avanzadas de la simbiosis, cuando los nódulos ya se han formado, se inducen los genes de nodulinas tardías, cuyos productos están implicados en el funcionamiento del nódulo.

a) Nodulinas tempranas

Muchos genes de la planta se inducen secuencialmente en las etapas iniciales del proceso simbiótico y durante la diferenciación del nódulo. Al producto de dichos genes se le denomina nodulinas tempranas, y se ha sugerido que algunas de ellas están involucradas en los procesos tempranos de infección, mientras que otras participan en la morfogénesis del nódulo (Verma, 1992). Algunas de estas nodulinas son proteínas ricas

en prolina, tales como *ENOD2*, *ENOD5* y *ENOD12*. También una peroxidasa de alfalfa (*rip1*) se induce rápidamente y de forma transitoria (Cook et al., 1995) poco antes de la infección por *Rhizobium*.

***ENOD2*:** se caracterizó primero en soya, y codifica para una proteína con un posible péptido señal en el extremo amino-terminal seguido por una secuencia que contiene motivos repetidos de cinco aminoácidos ricos en prolina, características por las cuales se ha propuesto que puede ser una proteína de la pared celular (van de Wiel et al., 1990). Este gen se expresa en el parénquima del nódulo (corteza interna) de nódulos determinados e indeterminados, por lo cual se propone que la función de la proteína *ENOD2* es contribuir a la morfología especial del parénquima del nódulo que sirve como una barrera para evitar la difusión del oxígeno hacia el tejido central (van de Wiel et al., 1990).

***ENOD5*:** este gen codifica para una proteína con un posible péptido señal en su extremo amino-terminal, por lo tanto, podría estar siendo transportada a través de alguna membrana. Además de ser rica en prolina, es relativamente rica en alanina, glicina y serina, sugiriendo que podría ser una proteína arabinogalactana (Scheres et al., 1990). El gen *PsENOD5* se expresa solamente en células que contienen hilos de infección (Scheres et al., 1990), y puesto que las proteínas arabinogalactanas pueden ser componentes de la membrana plasmática, *ENOD5* podría ser parte de la membrana plasmática del hilo de infección (Nap y Bisseling, 1990) y podría jugar un papel en el proceso de infección (Scheres et al., 1990).

***ENOD12*:** codifica para una proteína que se compone en su mayoría por dos pentapéptidos repetidos, cada uno de los cuales contiene dos prolinas (Scheres et al., 1990). Esta estructura sugiere que dicha nodulina es una proteína de la pared celular rica en hidroxiprolina. La expresión del gen *ENOD12* de *Pisum sativum* se induce en las células por las que el hilo de infección está migrando y en las células que aún no contienen hilos de infección, por lo que se ha sugerido que *ENOD12* es una proteína de la pared celular involucrada en el proceso de infección, aunque también se detectaron dos transcritos de *PsENOD12* que se expresan a un nivel bajo en tallos y flores (Scheres et al., 1990). También en alfalfa se encontró que *ENOD12* se expresa rápidamente en células epidérmicas antes y durante la emergencia de los pelos radiculares (Pichon et al., 1992).

ENOD40: se expresa muy temprano durante la iniciación del nódulo. Por medio del análisis de hibridación *in situ* se demostró que el ARNm de **ENOD40** se acumula primero en el periciclo y después en las células corticales que se están dividiendo (Yang et al., 1994; Cooper y Long, 1994). Mylona et al. (1995), proponen que la expresión de **ENOD40** en el periciclo de las raíces de leguminosas puede causar el cambio en la relación de citocinina/auxina de las células corticales, llevándolas a dividirse. De los cDNAs de **ENOD40** que se han aislado de diferentes leguminosas, solamente los de soya (Kouchi y Hata, 1993; Yang et al., 1993) podrían tener un marco de lectura suficientemente grande, por lo que se ha postulado que este gen es activo a nivel de ARN (Crespi et al., 1994; Matvienko et al., 1994). Sin embargo, van de Sande et al. (1996), han demostrado que **ENOD40** codifica para un péptido que modula la acción de auxinas, y debido a su naturaleza proteica y a la baja concentración a la que es activo, proponen que **ENOD40** podría ser considerado como un regulador del crecimiento de la planta que altera las respuestas a fitohormonas y se encuentra tanto en leguminosas como en no-leguminosas. También se propone que **ENOD40** está involucrado en procesos generales de organogénesis, pues se ha observado su expresión en tejidos meristemáticos de *Medicago* diferentes al nódulo, como son los márgenes de hojas jóvenes y primordios de raíces laterales (Asad et al., 1994). En *Phaseolus vulgaris* también se localizaron transcritos de **ENOD40** en primordios de raíces laterales (Papadopoulos et al., 1996).

b) Nodulinas tardías

En etapas más avanzadas del proceso simbiótico, concomitante con la liberación de las bacterias del hilo de infección o después de ésta, pero antes del inicio de la fijación de nitrógeno, se induce otro grupo de nodulinas: las denominadas nodulinas tardías. Muchas de estas nodulinas tienen que ver con el funcionamiento del nódulo (Sánchez et al., 1991), y algunas poseen actividad enzimática, como uricasa II, leghemoglobina, glutamina sintetasa, sacarosa sintasa, etc.

Leghemoglobina: es una hemoproteína con alta afinidad por oxígeno que constituye más del 25% del total de la proteína soluble en un nódulo maduro. Su función es la de controlar la concentración de oxígeno libre en

el nódulo (lo cual protege a la nitrogenasa contra el daño por oxígeno) y al mismo tiempo proporcionar un flujo de oxígeno hacia los bacteroides para hacer posible su respiración (Nap y Bisseling, 1990).

Glutamina sintetasa (GS): es una enzima octamérica cuya función es la de asimilar rápidamente el amonio que es excretado por los bacteroides dentro del citosol de las células infectadas del nódulo (Schubert, 1986). En los nódulos se pueden distinguir dos tipos de glutamina sintetasa: aquellas que se expresan como proteínas nódulo-específicas (GS-n) y aquellas cuya expresión se incrementa significativamente en la simbiosis (Sánchez et al., 1991). En ambos casos, la expresión de los genes de GS se inicia o se aumenta antes de que comience la actividad de la nitrogenasa (Padilla et al., 1987). Esta enzima se expresa tanto en células infectadas como en no infectadas (Miao et al., 1991).

Glutamato sintasa (GOGAT): también es responsable de la asimilación del amonio derivado de la reducción de N_2 en los bacteroides (Schubert, 1986). Se han caracterizado dos tipos de ella en nódulos de leguminosas y en otros tejidos de la planta; una de estas enzimas es dependiente de ferredoxina (Fd-GOGAT), mientras que la otra utiliza NADH como reductor (Suzuki et al., 1984; Anderson et al., 1989).

Fosfoenolpiruvato (PEP) carboxilasa: está involucrada en los procesos de flujo de carbono hacia los nódulos, donde es necesario para sustentar la respiración del nódulo y de la bacteria, hacer posible la síntesis de ATP y reductores para la actividad de la nitrogenasa, y proveer una fuente de esqueletos de carbono para la asimilación y transporte del nitrógeno (Dilworth y Glenn, 1984). Mediante el análisis por electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones no desnaturizantes, se ha detectado una banda de actividad de PEP carboxilasa en raíces de alfalfa, chícharo y soya, mientras que en los nódulos de estas mismas plantas se detectaron dos bandas. De manera similar, en frijol se detectaron dos bandas en raíces y tres en nódulo; estas bandas adicionales de actividad PEP carboxilasa se consideran específicas de nódulo (Deroche y Carrayol, 1989).

Sacarosa sintasa: la sacarosa es la fuente de carbono que se transporta de las hojas a los nódulos, y es degradada por la enzima sacarosa sintasa para ser introducida al metabolismo del nódulo. La nodulina 100 identificada en

soya es la subunidad de la sacarosa sintasa, la cual es una proteína homotetramérica. Esta enzima se disocia rápidamente en presencia de hemo, sugiriendo que la presencia de hemo libre puede regular su actividad (Thummler y Verma, 1987). Se ha propuesto que esta enzima juega un papel clave en el mantenimiento de la economía del carbono de los nódulos, y que el hemo libre podría estar involucrado en el flujo de carbono hacia los bacteroides (Thummler y Verma, 1987).

Aspartato aminotransferasa (AAT): es una enzima que participa en la vía de síntesis de los compuestos nitrogenados que son transportados de los nódulos a las partes aéreas de la planta. Se han caracterizado aspartato aminotransferasas de nódulos de varias plantas, y una de éstas se considera como específica de nódulos en alfalfa (Griffith y Vance, 1989).

Uricasa: Las leguminosas de clima templado (ej. chícharo, alfalfa, etc.) transportan principalmente amidas, mientras que las de clima tropical (ej. soya, frijol, etc.) transportan preferencialmente ureidos (Atkins, 1987). En frijol y soya se ha detectado una uricasa en nódulos (uricasa II), la cual se localiza en los peroxisomas de las células no infectadas del tejido central del nódulo (Nguyen et al., 1985) y se ha demostrado que la baja concentración de oxígeno induce su síntesis y actividad (Larsen y Jochimsen, 1986). Recientemente se detectó la expresión de uricasa II en cotiledones de frijol (*Phaseolus vulgaris*), donde probablemente participe en la movilización de los nutrientes de reserva; también se observó que hay expresión de esta enzima en raíces e hipocotilos durante el establecimiento de la plántula de frijol, lo cual sugiere que estos órganos son capaces de sintetizar ureidos. Además, mediante experimentos de hibridaciones *in situ* en raíces de plántulas de frijol, se encontró que los transcritos de uricasa II están presentes en las células del metaxilema-parénquima que rodean a los vasos del xilema y en las fibras del floema en el sistema vascular (Capote-Mañez y Sánchez, 1997).

Nodulina 26: la membrana peribacteroidal es la interfase entre la bacteria y la célula de la planta, y sirve para controlar el flujo de metabolitos y nutrientes entre la planta hospedero y el simbionte (Day y Udvardy, 1993), así como para proteger a la bacteria de las respuestas de defensa de la planta (Djordjevic et al., 1987). Esta membrana se deriva originalmente de la membrana plasmática, pero además tiene ciertas características que la

hacen única, como son las diferentes nodulinas específicas que posee. La nodulina 26 es una proteína integrante de la membrana peribacteroidal y pertenece a la familia de la proteína intrínseca mayor (MIP, por sus siglas en inglés) de la membrana de fibras del cristalino de bovino (Sandal y Marcker, 1988). Se ha demostrado que la nodulina 26 forma canales iónicos después de la reconstitución en bicapas lipídicas planas (Weaver et al., 1994), y que la fosforilación en la serina 262 afecta su actividad de canal sensible a voltaje (Lee et al., 1995). En otro estudio se estableció que la nodulina 26 funciona como una acuaporina, mediando el flujo de agua cuando se expresó en oocitos de *Xenopus* y en su membrana nativa, el simbiosoma (Rivers et al., 1997). Un ADNc de nodulina 26 de soja se expresó en plantas transgénicas de tabaco bajo el control del promotor 35S (Zhang y Roberts, 1995), y se encontró que su expresión fue alta en meristemas apicales, flores y tallos, bajo en hojas maduras, y ausente en raíces; estudios de fraccionamiento celular indicaron que la nodulina 26 se localizó en la membrana de la vacuola. La expresión de la nodulina 26 no pareció afectar el crecimiento vegetativo de la planta, pero afectó la producción de semillas, el tamaño de las cápsulas de las semillas, y la abscisión de las flores, las cuales poseían anteras más cortas que las flores de plantas control.

Nodulina 24: esta proteína posee un péptido señal en su extremo amino terminal, del cual se ha determinado que el sitio de corte es entre los residuos alanina-25 y arginina-26, y que se requiere toda la secuencia de la nodulina 24 para que el péptido señal sea removido (Cheon et al., 1994). Se ha sugerido que esta proteína está asociada a la membrana peribacteroidal del lado que da hacia los bacteroides (Fortin et al., 1987), por lo tanto no puede tener una función como proteína de transporte transmembranal. La nodulina 24 no tiene ninguna región transmembranal, y Cheon et al. (1994) han obtenido datos experimentales que sugieren que esta proteína se sintetiza como una proteína luminal en el retículo endoplásmico y se adhiere covalentemente a los lípidos durante la ruta que sigue hasta la membrana peribacteroidal. El papel que juega esta proteína es todavía desconocido.

Familia de nodulinas tardías de soya: se ha reportado una familia de nodulinas tardías en soya cuyos miembros presentan distinto peso molecular y aparentemente tienen distinta localización dentro del nódulo (Sandal et al., 1987; Jacobs et al., 1987). Este grupo de nodulinas, donde se encuentran la N-20, N-22, N-23, N-26b, N-27 y N-44, tienen las siguientes características: poseen dos dominios muy conservados entre ellas (70-90% homología) que están separados por una región la cual es única para cada nodulina. Las dos regiones conservadas se centran alrededor de cuatro residuos de cisteínas distribuidos de manera semejante a los dominios que unen metales conocidos como "dedos de zinc" (Berg, 1990; Coleman, 1992; Struhl, 1989). Todas estas nodulinas tienen un posible péptido señal que podría servirles para atravesar alguna membrana o asociarse a ella, pero esta asociación sólo se ha demostrado para N-23 y N-20 (Richter et al., 1991), mientras que N-27 se ha localizado en la fracción citoplásmica (Jacobs et al., 1987). En frijol (*Phaseolus vulgaris*) se detectó una nodulina homóloga a éstas, denominada nodulina 30, la cual es el objeto de estudio del presente trabajo (ver antecedentes).

ANTECEDENTES

a) Detección de nodulina 30

La nodulina 30 fue detectada como el producto de la traducción *in vitro* de un transcrito muy abundante específico de nódulos de *Phaseolus vulgaris*. En un gel de dos dimensiones esta proteína no se enfoca en el gradiente isoeléctrico, por lo que en vez de resolverse en un punto discreto se aprecia como un barrido de un peso aproximado de 30 kDa (Fig. 4) (Campos et al., 1987). En el patrón de bandas que se obtiene al correr un extracto de proteínas totales de nódulo en un gel con SDS, no se observa ninguna banda de proteína tan abundante que pudiera corresponder al producto de los ARNm de N30. Esto podría deberse a (1) que el ARN mensajero se encuentre bajo una regulación parecida a la que se ha reportado para los ARNm de ferritina en células de mamíferos y del gen *GCN4* en levadura, donde hay elementos que actúan en cis dentro de la secuencia líder (5') que controlan la velocidad del inicio de la traducción (ver Gallie, 1993) ó (2) que la proteína tenga un tiempo de vida media muy corto, es decir, que sea degradada rápidamente por alguna vía proteolítica (ver Vierstra, 1993 y Hershko y Ciechanover, 1992).

b) Clonación y secuenciación

A partir de una genoteca de ADNc de nódulos de frijol (variedad Negro Jamapa) se aislaron varias clonas específicas de este órgano, lo cual se consiguió mediante hibridación diferencial usando como sondas ADNc de nódulo y de raíz no infectada. Las clonas obtenidas se utilizaron para seleccionar ARNs mensajeros por hibridación, y una de éstas (pNF-N30-1, con un inserto de 700 pb) hibridó con un ARNm que al ser traducido *in vitro* produjo una proteína con la migración característica del grupo de N-30 (Campos et al., 1987). Tanto esta clona de ADNc (pN311) como otra genómica (npv30-1) que se obtuvo posteriormente de la variedad 'Saxa' (Carsolio et al., 1994) fueron secuenciadas. Al comparar la secuencia deducida de aminoácidos de ambas clonas se encontró que la de ADNc codifica para una proteína con 19 aminoácidos más que la genómica y con más residuos de prolina en el extremo carboxilo-terminal (Campos et al., 1995).

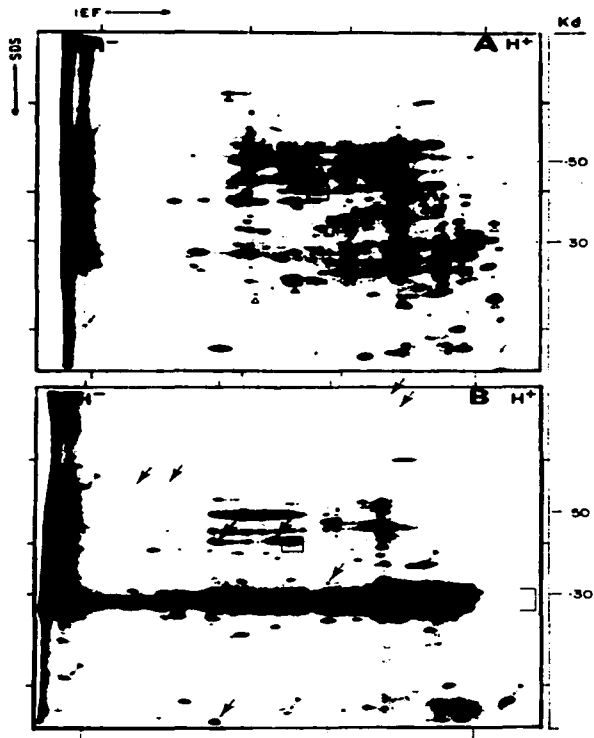


Figura 4. Patrón bidimensional de productos de traducción *in vitro* de ARN polisomal de raíz de frijol no inoculada (A) y nódulos de frijol de 18 días después de la inoculación (B). El grupo de nodulina 30 se aprecia como un barrido (J) (Tomado de Campos et al., 1987).

c) Secuencia de aminoácidos de N30 y comparación con otras proteínas

La nodulina 30 presenta las siguientes características en su secuencia deducida de aminoácidos: posee dos dominios muy conservados que presentan pares de cisteínas espaciadas regularmente (Cys-X7-Cys), parecidos a los dominios que unen metales conocidos como dedos de zinc (Berg, 1990; Coleman, 1992; Struhl, 1989), un posible péptido señal en su extremo amino terminal, y una región rica en prolina (18 prolina en 24 residuos) en su extremo carboxilo terminal. Al comparar la secuencia de N-30 (Fig. 5) con otras secuencias de proteínas, se encontró que ésta se asemeja a la familia de nodulinas tardías de soya descrita por Sandal et al. (1987) y Jacobs et al. (1987).

d) Cinética de expresión

Mediante hibridaciones tipo northern se observó que la cinética de expresión de N-30 se asemeja a la de otras nodulinas tardías de frijol, como uricasa II y leghemoglobina, apareciendo alrededor del día 11 después de la infección y aumentando gradualmente. A diferencia de estas últimas, cuya expresión disminuye hacia el día 28, la de la N-30 se mantiene alta (Campos et al., 1987). Además, los transcritos de N30 son aproximadamente 6 veces más abundantes que los de leghemoglobina, como quedó demostrado al hibridar diferentes diluciones de ARNm total de nódulos de 21 días con sondas radioactivas de nodulina 30 y de leghemoglobina (Campos et al., 1995). Por otra parte, se sabe que la expresión de N-30 requiere la presencia de *Rhizobium* dentro del nódulo, ya que en nódulos vacíos (sin células infectadas) generados con tres diferentes mutantes de *Rhizobium* no se expresa N-30 (Padilla et al., 1991).

e) La nodulina 30 forma parte de una pequeña familia multigénica

La clona de ADNc (pN311) se usó para hibridar contra ARNm polisomal y se observó que daba señal con varios transcritos; además, se empleó como sonda en una hibridación de ADN genómico de frijol en el que hibridó con al menos tres bandas (Campos et al., 1995). Estos datos, junto con la migración aberrante de la N-30 en un gel de dos dimensiones y su aparente separación en distintas zonas de éste (cuya intensidad cambia

MRALLITLLELILSVVAEEAEDAAIIVETIDPAKEAGISVTTNPAKDHGIGGTGEI
NDLAKDAGVGIKAIYQTLSGQPEAYESPRFKRFVTH**CSSHVAETCSDPMHYEGG**
IRNPTGLSH**C**I**FDSMEAC**LANHKASFYDSARSKILNLKPTKVEYLPVIIQTVK
FQTVLK**TCSOVS**A**OSCLSDSDVDASTLGACLLPSLNOC**VYHT**OMPP**IP**PPPP**
PLRPPQ**RPP**PT**PP**ADKTRR

Figura 5. Secuencia deducida de aminoácidos de la clona de nodulina 30 pN30T

Los dominios que conforman los posibles "dedos de zinc" se encuentran subrayados, resaltándose las cisteínas en negritas. El péptido señal está indicado con doble subrayado y la región rica en prolina con letra sombreada.

durante el desarrollo del nódulo), sugieren que los polipéptidos observados como el grupo de N-30 podrían estar codificados por una familia multigénica (Campos et al., 1987 y 1995).

f) Expresión nódulo-específica de N30

Para estudiar la expresión de nodulina 30 en el tejido vegetal, se construyó un gen quimérico fusionando el promotor de ésta a la secuencia codificadora de la enzima β -Glucuronidasa (GUS). Esta construcción fue introducida a plantas de la especie *Lotus corniculatus* (usando como vector *Agrobacterium rhizogenes*) que fueron posteriormente noduladas con *Rhizobium loti*. Al analizar los tejidos de las plantas transgénicas se observó que la actividad de GUS dirigida por el promotor de nodulina 30 es específica de nódulos, y en éstos sólo se observó expresión en las células infectadas (Carsolio et al., 1994). Un resultado similar se obtuvo al hacer la localización *in situ* de los transcritos de N30 en cortes de nódulos de 21 días; para ello se empleó una sonda antisentido de N30 marcada radioactivamente la cual hibridó sólo con transcritos en las células infectadas del nódulo (Campos et al., 1995).

g) Caracterización inmunológica

Se obtuvo un anticuerpo generado en conejo contra una proteína de fusión β -Gal/Npv30 (expresada en *E. coli*) que en un extracto de proteínas de nódulo de la fracción total y soluble detecta dos bandas de 28 y 30 kDa aproximadamente (Campos et al., 1992 y 1995). Sin embargo, al llevar a cabo la inmunodetección con oro coloidal en secciones de nódulo este anticuerpo fue incapaz de reconocer antígeno alguno, por lo que no se logró determinar la localización específica de la N-30 dentro de las células (Campos et al., 1992).

h) Expresión de N30 en levadura

Una estrategia para obtener suficiente nodulina 30 a fin de caracterizarla fue expresarla en levadura (*Saccharomyces cerevisiae*), además de precisar si era dirigida a algún organelo en especial. Para conseguir lo anterior, previamente se hizo una construcción introduciendo el inserto de la clona pN30T en el plásmido para expresión en levadura pYES2, y se obtuvo la clona pESN30 (Olivares, 1994) que nos permite expresar la nodulina 30 en este organismo bajo el control de un promotor inducible con galactosa (Gal 1). Después que el ARNm de nodulina 30 fue detectado en levadura por análisis tipo northern, se procedió a analizar las proteínas a diferentes tiempos de inducción. Sin embargo, a pesar de que el ARNm de nodulina 30 se detectó en las levaduras transformadas con la construcción pESN30 después de 3 h de inducción, no fue posible encontrar la proteína en extractos de levadura a ningún tiempo de inducción (Olivares, 1994) aun usando urea para solubilizar las proteínas.

JUSTIFICACION

El hecho de que el ARNm de nodulina 30 sea más abundante que el de leghemoglobina (la cual es a su vez la proteína más abundante del nódulo) y que la proteína sea apenas detectable por inmunodetección en un extracto de proteínas totales de nódulo (Campos et al., 1995), hacen de la nodulina 30 una proteína interesante, ya que ésta debe ser regulada fuertemente a nivel postranscripcional o postraduccionnal.

Debido a que la secuencia de N30 sólo se parece a la familia de nodulinas tardías de soya cuya función se desconoce, no se ha podido inferir aún el papel que esté llevando a cabo esta proteína en el nódulo. En base a la secuencia deducida de aminoácidos se sabe que la N30 posee un posible péptido señal, pero se desconoce hacia qué parte de la célula está siendo dirigida. También se propone que la nodulina 30 puede ser una metaloproteína que está ligando algún ion metálico a través de sus residuos de cisteína (Sánchez et al., 1991), y que pudiera interactuar con otras proteínas mediante su región rica en prolina (por ejemplo con profilina, que *in vitro* se une a secuencias de poli-L-prolina). Además, la nodulina 30 presenta similitud con proteínas arabinogalactanas (proteínas glucosiladas) y podría estar glucosilada.

En el presente trabajo se aborda la purificación de la nodulina 30 como punto inicial para caracterizar bioquímicamente esta proteína, lo cual podría conducirnos a determinar su función. Al poder obtener una preparación pura de la nodulina 30 se podría determinar si las dos bandas que detecta el anticuerpo son proteínas diferentes relacionadas antigénicamente o se trata de la misma proteína que ha sido procesada; si presenta glucosilaciones; si está ligando algún metal; si es capaz de unirse a profilina o a dominios SH3; conocer sus características como punto isoelectrónico, solubilidad, peso molecular en condiciones no desnaturalizantes, etc. También se aborda el estudio de esta proteína en un sistema heterólogo (levadura), y el análisis mediante microscopía confocal en cortes de nódulo para determinar si la N30 tiene una localización intracelular o se excreta hacia la pared celular.

Consideramos que el estudio de la nodulina 30 a nivel de proteína es algo que contribuirá a entender el papel de ésta y de las proteínas homólogas de soya, puesto que aunque a algunas de ellas se les ha asignado una localización dentro de la célula mediante experimentos de inmunoprecipitación de los productos de traducción *in vitro* de los ADNc (Jacobs et al., 1987), ninguna ha sido objeto de un estudio bioquímico más detallado, por lo que se desconocen sus características tales como punto isoeléctrico, solubilidad, estabilidad, abundancia, modificaciones postraduccionales, etc.

OBJETIVOS

a) Objetivo general:

Para que se lleve a cabo la asociación simbiótica entre bacterias del suelo de la familia Rhizobiaceae y plantas de la familia Leguminosae, es necesaria la inducción de muchos genes, tanto de la planta como de la bacteria, que tienen funciones específicas en el establecimiento de la simbiosis y en el funcionamiento del nódulo, el órgano de la planta especializado en la fijación biológica del nitrógeno. En la planta de frijol (*Phaseolus vulgaris*) uno de estos genes que se inducen durante la simbiosis es el de nodulina 30, una nodulina tardía cuyo transcrito es muy abundante y la proteína muy escasa, sugiriendo que debe tener una regulación a nivel postranscripcional o postraducciona1.

El objetivo del presente trabajo fue el de conocer las propiedades bioquímicas de la nodulina 30, así como su localización dentro del tejido del nódulo, lo cual podrá ayudar a entender el papel que desempeña esta proteína en el funcionamiento de dicho órgano.

b) Objetivos específicos:

1. Establecer las condiciones óptimas de crecimiento e inducción de la cepa de levadura transformada con la clona pESN30 que permita obtener la mayor cantidad posible de N30.
2. Analizar la nodulina 30 obtenida de levadura mediante SDS-PAGE, 2D-SDS-PAGE y electrotransferencia e inmunodetección con el fin de conocer su peso molecular y punto isoelectrico.
3. Purificar la nodulina 30 a partir de nódulos de frijol mediante métodos convencionales, haciendo fraccionamientos con sulfato de amonio y solventes orgánicos, así como empleando diferentes resinas que separen las proteínas por sus diferencias en afinidad, carga o hidrofobicidad.
4. Hacer el análisis de la nodulina 30 de nódulos de frijol por SDS-PAGE, 2D-SDS-PAGE y electrotransferencia e inmunodetección.
5. Llevar a cabo la inmunodetección de esta proteína en cortes de nódulos de frijol empleando el anticuerpo contra N30 y un segundo anticuerpo acoplado a un fluoróforo (CY3, Amersham).

ESTRATEGIA GENERAL

a) Consideraciones generales para la purificación y caracterización de proteínas

Para determinar las características y propiedades de una proteína es necesario contar con una preparación pura de ella. Frecuentemente la purificación de una proteína no es el objetivo final, sino que es el medio para obtener dicha proteína pura para estudios posteriores. Estos estudios podrían ser sobre la actividad de la proteína, sobre su estructura, o sobre la relación entre su estructura y función.

Los métodos para separar proteínas se basan en la diferencia de propiedades tales como carga, tamaño y solubilidad, las cuales varían de una proteína a otra. Algunas proteínas tienen la capacidad de unirse a otras biomoléculas, por lo que pueden ser separadas en base a esta propiedad. La fuente de una proteína es generalmente un tejido o células microbianas. Las células deben ser rotas y la proteína liberada en una solución llamada extracto crudo. Si es necesario, se pueden preparar fracciones subcelulares o aislar organelos mediante centrifugación diferencial. Una vez que el extracto o la preparación del organelo está lista, se puede continuar con la purificación empleando algunos de los muchos métodos de separación de proteínas que existen. La cromatografía de intercambio iónico se puede usar para separar proteínas con diferentes cargas. Otros métodos cromatográficos se basan en la diferencia de tamaño, afinidad de unión a otras moléculas, y solubilidad. Los métodos no cromatográficos incluyen la precipitación selectiva de proteínas con sal, solventes orgánicos, ácidos, o altas temperaturas.

En muchos casos es necesario usar secuencialmente varios métodos diferentes para purificar una proteína por completo. La elección del método es algo un poco empírico, y se deben probar muchos protocolos antes de que se determine cuál es el más efectivo. Si existe un procedimiento para purificar una proteína similar a la que se desea purificar, éste se puede usar como guía. Conforme se completa cada paso de purificación, el tamaño de la muestra se torna más pequeño y se pueden aplicar procedimientos cromatográficos más sofisticados.

Con el fin de purificar una proteína, es esencial tener un método para detectar y cuantificar aquella proteína en presencia de muchas otras. Con

frecuencia la purificación debe proceder en ausencia de información acerca del tamaño y propiedades físicas de la proteína, o la fracción de la masa de proteína total que ésta representa en el extracto.

En el caso de enzimas, la cantidad de enzima en una solución dada o extracto puede ser conocida en términos del efecto catalítico que produce, ya que es proporcional a la velocidad a la cual su sustrato es convertido a productos de reacción. Para este propósito es necesario conocer: (1) la ecuación total de la reacción catalizada, (2) un procedimiento analítico para determinar la desaparición del sustrato o la aparición de los productos de la reacción, (3) si la enzima requiere cofactores tales como iones metálicos o coenzimas, (4) la dependencia de la actividad enzimática sobre la concentración de sustrato, (5) el pH óptimo, y (6) una zona de temperatura en la cual la enzima es estable y tiene alta actividad.

Para proteínas que no son enzimas se requieren otros métodos de cuantificación. Las proteínas de transporte se pueden analizar por su unión a la molécula que transportan, y las hormonas y toxinas por el efecto biológico que producen. Algunas proteínas estructurales representan una fracción tan grande de la masa de un tejido, que pueden ser fácilmente extraídas y purificadas sin un análisis.

b) Purificación de nodulina 30

Inicialmente se propuso la expresión de nodulina 30 en levadura como una fuente para purificarla y caracterizarla, ya que los intentos que se hicieron para enriquecerla a partir de nódulos de frijol no dieron resultados satisfactorios (Olivares, 1994). Se hizo una construcción para expresar la N30 (Olivares, 1994) y con ella se transformó levadura. Se hicieron cinéticas para determinar las condiciones más adecuadas para la expresión de N30 y se procedió a analizar las proteínas (Fig. 6).

Debido a que la expresión de nodulina 30 en levadura no fue consistente, se intentó de nuevo purificarla a partir de nódulos de frijol. Se probaron métodos de fraccionamiento con sulfato de amonio y con solventes orgánicos, además de varias resinas como hidroxilapatita, fenilagarosa, DEAE-sefacel, azul de sefarosa y adsorbente de zinc. Finalmente, la secuencia de purificación que dio mejores resultados fue: (1) fraccionamiento por precipitaciones con etanol, (2) cromatografía en adsorbente de zinc, y (3) cromatografía en hidroxilapatita (Fig. 7).

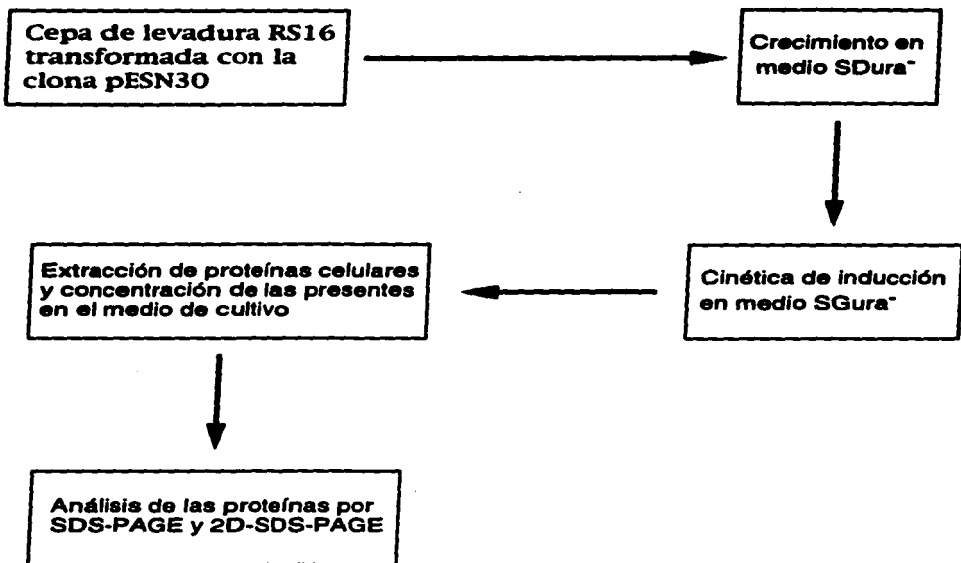


Figura 6. Secuencia seguida para expresar la nodulina 30 en levadura

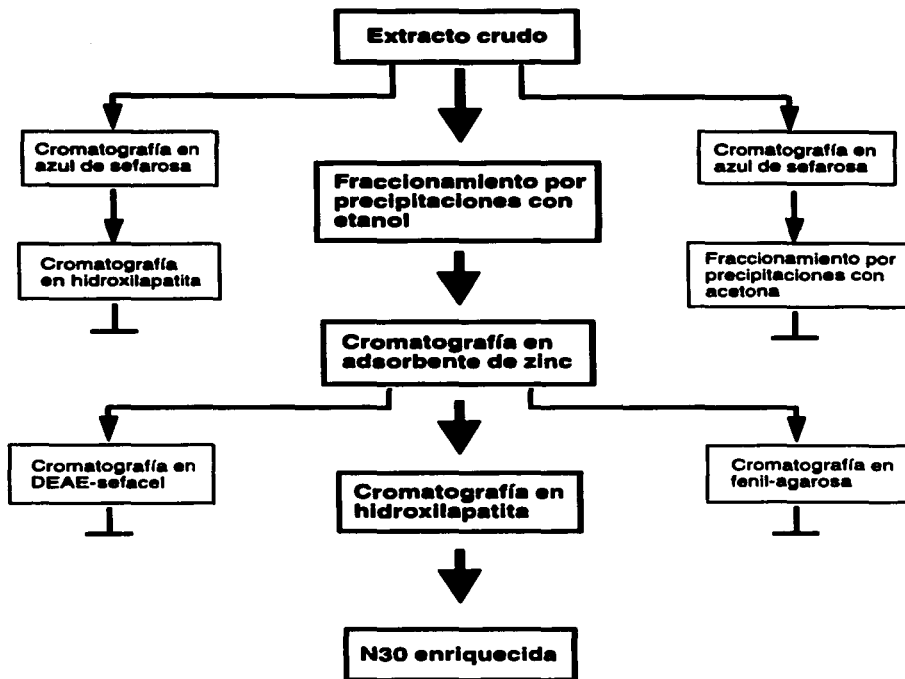


Figura 7. Secuencia seguida para obtener una muestra enriquecida de N30 a partir de nódulos de frijol

MATERIALES Y METODOS

1. Características de la cepa de levadura y del vehículo para expresión

La cepa de levadura empleada fue la RS16, que tiene fenotipo Ura-Leu- (sin capacidad para sintetizar uracilo ni leucina).

El plásmido empleado para expresión en levadura fue el pYES 2, que tiene un tamaño de 6.0 Kb, origen de replicación tanto para *E. coli* como para levadura, un gen *URA3* (que confiere capacidad para sintetizar uracilo) para mantenimiento y selección en cepas hospederas con genotipo *ura3-* de levadura (que no pueden sintetizar uracilo), un gen que confiere resistencia contra el antibiótico ampicilina, una secuencia promotora del gen *GAL1* para transcripción de alto nivel fuertemente regulada (inducible con galactosa), múltiples sitios de clonación para cortar con las enzimas de restricción Xba I, Sph I, Xho I, Not I, Bst X I, Eco RI, Bam HI, Sac I, Kpn I y Hind III, y una señal de terminación de la transcripción del gen *CYC1*.

2. Condiciones de crecimiento de levadura

La cepa transformada con la construcción pESN30 ó con el plásmido pYES2 se creció en medio líquido SDura- (0.7% YNB [DIFCO], 2% glucosa, 50 mM MES pH 6.0, suplementado con 0.1 mg/ml de leucina) a 30°C con agitación constante hasta alcanzar la fase estacionaria. Posteriormente las células fueron colectadas por centrifugación, se lavaron con agua estéril y se transfirieron a medio líquido SGura- (0.7% YNB [DIFCO], 2% galactosa, 50 mM MES pH 6.0, suplementado con 0.1 mg/ml de leucina) en una dilución apropiada para alcanzar una absorbancia inicial de 0.3 a 660 nm ($A_{660}=0.3$), después de lo cual se siguieron incubando por diferentes periodos de tiempo a 30°C con agitación constante para permitir el crecimiento del cultivo.

3. Extracción de proteínas de levadura

Después de inducir los cultivos en medio SGura- por diferentes periodos de tiempo, las células fueron colectadas por centrifugación y se pasaron a tubos eppendorf. A los tubos se les agregó solución de Laemmli (50 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 10% glicerol, 5% 2-mercaptoetanol, 0.1%

azul de bromofenol) y perlas de vidrio de 0.5 mm de diámetro para romper las células por agitación fuerte, después de lo cual se incubaron por 5 min a 95-100°C. Los tubos se dejaron enfriar en hielo, se eliminó el material insoluble por centrifugación, y se colectó el sobrenadante el cual contenía las proteínas listas para analizarse.

Para analizar las proteínas secretadas al medio de cultivo, éstas se concentraron por precipitación con sulfato de amonio al 60% de saturación, incubando en hielo durante 30 min con agitación y centrifugando 20 min a 9000 rpm. La pastilla obtenida se resuspendió en agua y fue precipitada con ácido tricloroacético a una concentración final de 10% para eliminar el exceso de sal. El precipitado se resuspendió en 500 mM Tris-HCl pH 9.5 para neutralizar el pH y se agregó un volumen de solución de Laemmi 2X para preparar la muestra y ser analizada.

4. SDS-PAGE y 2D SDS-PAGE

Tanto la electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE), como la electroforesis en dos dimensiones (2D SDS-PAGE), se hicieron básicamente como se describe en Ausubel et al. (1989).

5. Electrotransferencia e inmunodetección (western)

Después de separar las proteínas por SDS-PAGE, éstas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa utilizando una cámara de transferencia semiseca (OWL). El tiempo de transferencia fue de 40 min con una corriente constante de 200 miliamperios, utilizando una membrana de plástico para aislar la superficie de los electrodos que no se encontraba en contacto con el gel. La membrana fue bloqueada durante 1 h a temperatura ambiente con 5% de leche descremada en polvo (Carnation) en TBST (30 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl y 0.1% Triton X-100), incubada 1 h con el suero crudo anti-N30 diluido 1:5000 en TBST, y lavada 3 veces durante 10 min cada una con TBST. Posteriormente se incubó por otra hora con el segundo anticuerpo (anti-conejo conjugado a fosfatasa alcalina, adquirido de Boehringer) diluido 1:5000 en TBST, se lavó otras 3 veces durante 10 min cada una con TBST, y se reveló con los reactivos para fosfatasa alcalina NBT y BCIP diluidos en solución AP (100 mM Tris-HCl pH 9.5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂) según las recomendaciones del fabricante (Boehringer).

6. Obtención de nódulos de frijol

Las semillas de *Phaseolus vulgaris* L. cv Negro Jamapa se germinaron durante 2 días, se transfirieron a macetas con vermiculita, se inocularon con *Rhizobium tropici* cepa CIAT 899 (Martínez-Romero et al., 1991), y se crecieron en el invernadero como se describe en Lara et al. (1984). Los nódulos se colectaron 21 días después de la inoculación, se congelaron en nitrógeno líquido, y se guardaron a -70°C hasta ser usados.

7. Extracción de proteínas totales de nódulo

Para obtener un extracto de proteínas totales y evitar la proteólisis, fue necesario triturar los nódulos congelados, pasarlos a tubos eppendorf, e incubarlos directamente con 2 volúmenes de la solución de Laemmli (50 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 10% glicerol, 5% 2-mercaptoetanol, 0.1% azul de bromofenol) a 95-100°C durante 5 min. Después de enfriar la solución en hielo y centrifugarla por 3 minutos a 14 000 rpm para quitar material insoluble, se colectó el sobrenadante que estaba listo para analizarse.

8. Extracción de proteínas solubles de nódulo

Los nódulos se trituraron en un mortero o molino para café manteniéndolos congelados con nitrógeno líquido o con hielo seco, se incubaron por 10 min en una solución que contenía 200 mM KCl/100 mM Tris-HCl pH 7.4 ó 100 mM Tris-HCl en una relación de 1:4 (peso/volumen), y la mezcla fue centrifugada por 10 min a 9 000 rpm para eliminar el material insoluble. El sobrenadante obtenido, denominado extracto crudo de proteínas solubles, se usó para continuar la purificación de la N30.

9. Fraccionamiento con etanol

Al extracto de proteínas se le agregó etanol absoluto hasta alcanzar una concentración de 20%, se incubó a -70°C por 5 min y fue centrifugado a 9 000 rpm durante 5 minutos, precipitándose así la fracción de 0-20% de etanol. Al sobrenadante se le agregó más etanol hasta alcanzar una concentración de 40% y se repitió el procedimiento para obtener la fracción de 20-40% de etanol. De igual manera se obtuvieron las fracciones de 40-60% y 60-80% de etanol.

10. Cromatografía en azul de sefarosa

El extracto crudo de proteínas se pasó por una columna de azul de sefarosa (Bio-Rad) equilibrada con 50 mM Tris-HCl pH 7.4, usando una relación de un volumen de extracto por un volumen de resina. La columna se lavó con 20 volúmenes de la misma solución, y las proteínas adsorbidas se eluyeron primero con una solución de 100 mM KCl/50 mM Tris-HCl pH 7.4 y después con 600 mM KCl/50 mM Tris-HCl pH 7.4. Alternativamente (secuencia azul de sefarosa-hidroxiapatita), se hizo la cromatografía adsorbiendo las proteínas en 200 mM KCl/50 mM Tris-HCl pH 7.4 y haciendo una sola elución con 600 mM KCl/50 mM Tris-HCl pH 7.4.

11. Cromatografía en hidroxilapatita

La muestra de proteínas fue pasada por una columna de hidroxilapatita (Bio-Rad), que previamente había sido equilibrada con 600 mM KCl/50 mM Tris-HCl pH 7.4, usando una relación de un volumen de muestra proteica por un volumen de resina. La columna se lavó con 20 volúmenes de la misma solución y las proteínas que quedaron adsorbidas se eluyeron con distintas concentraciones (10, 25, y 50 mM) de fosfato de potasio pH 7.4.

12. Cromatografía en adsorbente de zinc

La columna de adsorbente de zinc (*Zinc Chelate Affinity Adsorbent*, de Boehringer) se equilibró con 500 mM NaCl/100 mM Tris-HCl pH 7.4, se pasó la muestra de proteínas usando una relación de 3 volúmenes de muestra proteica por 1 volumen de resina. La columna se lavó extensivamente con la misma solución con que se equilibró, y las proteínas adsorbidas fueron eluidas con 500 mM NaCl/100 mM acetato de sodio pH 5.0 ó con 500 mM NaCl/100 mM Tris-HCl pH 7.4/70 mM imidazol.

13. Fraccionamiento de proteínas por precipitación con etanol y cromatografía en adsorbente de zinc e hidroxilapatita

30 g de nódulos congelados se pulverizaron en un molino para café y se incubaron en 150 ml de 200 mM NaCl/100 mM Tris-HCl pH 7.4 durante 10 minutos a 4°C, después de lo cual fue centrifugado a 9000 rpm por 10 min. El sobrenadante se precipitó con etanol para obtener la fracción de

70-80%, y las pastillas obtenidas se dejaron secar 10 min a temperatura ambiente. Las pastillas se resuspendieron en 20 ml de 500 mM NaCl/100 mM Tris-HCl pH 7.4, y esta fracción se pasó por una columna con 2 ml de resina de zinc previamente equilibrada con la misma solución. Después de lavar la columna con 20 volúmenes de esta última solución, las proteínas adsorbidas se eluyeron con 500 mM NaCl/100 mM Tris-HCl pH 7.4/70 mM imidazol, recuperando 4 ml los cuales se pasaron por una columna con 500 μ l de hidroxilapatita equilibrada con 500 mM NaCl/100 mM Tris-HCl pH 7.4. Se lavó la columna con la misma solución y la elución se hizo con 50 mM fosfato de potasio pH 7.4, recuperándose 800 μ l. La muestra obtenida se precipitó con ácido tricloroacético (10% conc. final) para concentrar las proteínas y prepararlas con solución de Laemmli.

14. Protocolo final para enriquecer la nodulina 30

Se pulverizaron 20 g de nódulos y se incubaron en 100 ml de 200 mM NaCl/50 mM Tris-HCl pH 7.4 durante 10 min sobre hielo y con agitación, después de lo cual fue centrifugado a 9 000 rpm durante 10 min. El sobrenadante se precipitó con etanol para obtener la fracción de 70-80%, y las pastillas obtenidas fueron secadas al vacío durante 5 min. Estas pastillas se resuspendieron en 20 ml de 500 mM NaCl/20 mM Tris-HCl pH 7.4/4 mM fosfatos pH 7.4 durante 20 min en hielo con agitación. Después de remover el material insoluble por centrifugación, el sobrenadante se pasó por una columna de adsorbente de zinc (3 ml) equilibrada con 500 mM NaCl/20 mM Tris-HCl pH 7.4/4 mM fosfatos pH 7.4. La columna se lavó con 20 volúmenes de la misma solución y las proteínas adsorbidas se eluyeron con 500 mM NaCl/20 mM Tris-HCl pH 7.4/4 mM fosfatos pH 7.4/70 mM imidazol, recuperando 6 ml. Esta elución se pasó por una columna de hidroxilapatita (1 ml) equilibrada con 500 mM NaCl/20 mM Tris-HCl pH 7.4/4 mM fosfatos pH 7.4, se lavó con 20 volúmenes de la misma solución y se hizo la elución con 50 mM fosfatos pH 7.4, recuperándose 2 ml. La muestra obtenida se precipitó con ácido tricloroacético (10% conc. final) para concentrar las proteínas y prepararlas con solución de Laemmli.

15. Cuantificación de proteínas

La concentración de proteínas totales se determinó por el método descrito por Bradford (1976). La concentración relativa de nodulina 30 se estimó por densidad a partir de las imágenes del gel teñido con Azul de Coomassie y de la inmunodetección (western), mediante el programa de computadora "Image".

16. Detección de actividad proteolítica en geles con sustrato

Los geles para detectar actividad proteolítica se hicieron como los geles normales para SDS-PAGE, con la única diferencia de que se adicionó gelatina (Knox) como sustrato para proteasas a una concentración final de 0.3% (Heussen y Dowdle, 1980). La muestra de proteínas a ser analizada se mezcló con la solución de Laemmli pero no se incubó a 95-100°C. Una vez que las proteínas fueron separadas por electroforesis, los geles se incubaron tres veces durante media hora cada una en solución de reactivación (20 mM Tris-HCl pH 6.8, 0.5% Triton X-100), se decantó la solución, y los geles fueron incubados 12 h a 37°C. Después de teñir los geles con Azul de Coomassie (de acuerdo a Sambrook et al., 1989), las regiones del gel donde hubo actividad proteolítica se apreciaron como bandas claras.

17. Ensayo para ver la degradación de la banda de 60 kDa que es reconocida por el anticuerpo contra N30

Se obtuvo una fracción de 60-80% de etanol, se dejó secar la pastilla 10 minutos a temperatura ambiente, y se resuspendió en 50 mM Tris-HCl pH 7.4. La muestra de proteínas se dividió en tres partes iguales, agregándole SDS a una (concentración final de 0.2%) y urea a otra (concentración final de 4 M). Las muestras con SDS y urea se incubaron a 37°C, mientras que la que no se le agregó nada se incubó a 4°C. Se tomaron alícuotas de cada una de las muestras a 0, 4, 10 y 23 h, para ser analizadas por inmunodetección. En este experimento también se incluyó la fracción de 60-80% de etanol incubada a 37°C para ver la degradación del doblete de aproximadamente 30 kDa que es reconocido por el anticuerpo contra N30.

18. Extracción de proteínas con ácido tricloroacético al 10% y fraccionamiento con etanol

Los nódulos congelados se trituraron en mortero y posteriormente se incubaron en ácido tricloroacético al 10% durante 10 minutos a 4°C. El homogeneizado se filtró a través de "miracloth" y después fue centrifugado 5 minutos a 14 000 rpm. La pastilla resultante se lavó una vez con ácido tricloroacético al 5% y dos veces con acetona fría (-20°C) al 90%, después de lo cual fue secada por vacío durante 5 minutos a temperatura ambiente. Esta pastilla se resuspendió durante 10 minutos con agitación en 100 mM Tris-HCl pH 7.4, y el material insoluble se eliminó por centrifugación. El sobrenadante fue precipitado secuencialmente con 40, 60 y 80% de etanol, y las fracciones resultantes se analizaron por SDS-PAGE e inmunodetección.

19. Inmunolocalización de la nodulina 30 en cortes de nódulo

Nódulos frescos de 21 días se fijaron con una solución de 0.25% glutaraldehído/4% formaldehído y se lavaron con PBS (130 mM NaCl, 5 mM Na₂HPO₄, 5 mM NaH₂PO₄, pH 7.2); posteriormente el tejido fue deshidratado gradualmente usando concentraciones de 10, 30, 50, 70, 90 y 100% de etanol, finalizando con xilol al 100%. El tejido deshidratado se trató con diferentes mezclas de xilol-parafina en proporciones de 75%-25%, 50%-50% y 25%-75%, dejándolo 1 hora a 55°C en cada una. Después de la última mezcla xilol-parafina, el tejido se impregnó con parafina sola y se transfirió a moldes de plástico para almacenarlos. Del tejido almacenado se obtuvieron cortes de 8 µm, se expandieron en H₂O a 42°C, se recuperaron en portaobjetos previamente tratados con "subbing solution" o poli-L-lisina (Sigma) y fueron secados a 42°C toda la noche. Después de eliminar la parafina con xilol, el tejido se rehidrató gradualmente usando alcoholes de 100, 90, 80, 70, 50, 30 y 10%, y se lavó con TBS. Para llevar a cabo la inmunolocalización, el tejido se bloqueó con 5% de albúmina en TBST (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20) durante 1 hora a 42°C, se incubó toda la noche en cámara húmeda con el primer anticuerpo (suero anti-N30) diluido 1:500 en TBST y se lavó 3 veces con TBST durante 15 minutos cada una. Posteriormente se incubó por 3 horas con el segundo anticuerpo acoplado al fluoróforo CY3 (Cy3™-Affinity Pure Goat Anti-Rabbit IgG, de Amersham), se lavó 3 veces durante 30 minutos cada una con TBST y se montó con Paramount. Las muestras fueron analizadas en un Microscopio Confocal de Laser Krypton-Argon MRC-600 de Bio-Rad y se

RESULTADOS

I. EXPRESION DE NODULINA 30 EN LEVADURA

Con el fin de expresar la nodulina 30 en levadura, se transformó la cepa RS16 con el plásmido pESN30, se creció primero en medio SDura- (con glucosa) y posteriormente se indujo por diferentes periodos de tiempo en medio SGura- (con galactosa). Como control se usó la misma cepa transformada con el vehículo pYES2.

1) La N30 se excreta al medio extracelular cuando se expresa en levadura

La nodulina 30 fue detectada en el medio de cultivo de las levaduras transformadas con el plásmido pESN30 e inducidas por 12 h en medio con galactosa (Fig. 8). En esta fracción el anticuerpo contra N30 reconoció también un par de bandas como ocurre en nódulos, pero el peso molecular de éstas fue de 36 y 32 kDa aproximadamente, a pesar de que la clona pESN30 codifica para una proteína de 25.7 kDa. Además de este par de bandas, el anticuerpo reconoció otra banda de alto peso molecular menos abundante. Muy probablemente el posible péptido señal que posee la nodulina 30 sea el que esté dirigiendo a esta proteína hacia el medio extracelular.

2) La N30 expresada en levadura no se enfoca bien en el gradiente isoeléctrico de un gel de dos dimensiones

En otro experimento independiente se obtuvo la fracción de proteínas extracelulares y se analizó por 2D SDS-PAGE. El anticuerpo contra N30 detectó las bandas de 36 y 32 kDa, mismas que no se enfocaron bien en el gradiente isoeléctrico, sino que presentaron varios puntos de enfoque (Fig. 9). Al analizar una muestra de proteínas de nódulo por 2D SDS-PAGE, se observó que el doblete de aproximadamente 30 kDa se comporta de manera similar a las bandas de levadura (Fig. 9). Un comportamiento parecido se había observado con los productos de traducción *in vitro* de ARNm de nódulos de frijol (Fig. 4) (Campos et al., 1987). Al observar las levaduras al microscopio no se detectaron diferencias morfológicas entre las que expresaban N30 y las levaduras control (transformadas con el vehículo pYES2).

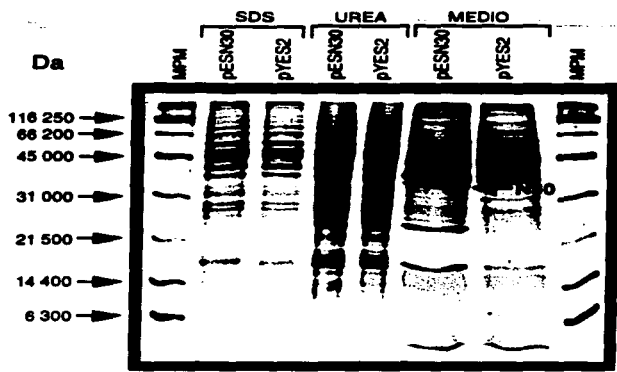
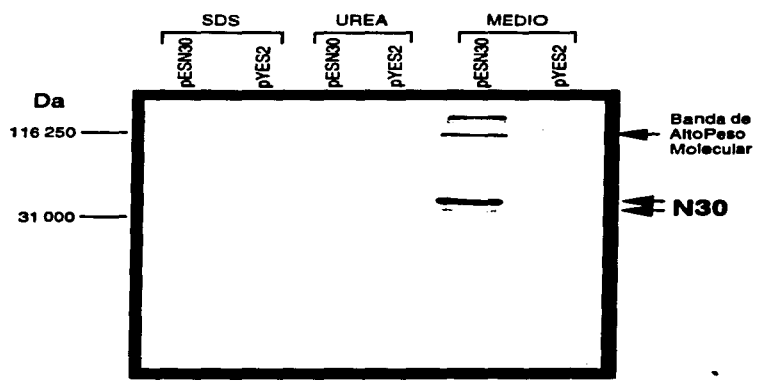
A**B**

Figura 8. Detección de la nodulina 30 expresada en levadura.

La cepa de levadura transformada con el plásmido para expresión de nodulina 30 (pESN30) y la cepa control transformada con el vehículo (pYES2) se crecieron primero en medio con glucosa (SD) y luego fueron inducidas por 12 horas en medio con galactosa (SG). Las células se rompieron con perlas de vidrio y se incubaron a 95-100°C en solución de Laemmli para extraer las proteínas (extracción con SDS). El material insoluble se incubó con 10 M urea para solubilizar más proteínas (extracción con UREA). Las proteínas del medio de cultivo se analizaron después de concentrarlas por precipitación con 60% de sulfato de amonio (proteínas del MEDIO). MPM, marcadores de peso molecular. **A)** Proteínas de levadura separadas por electroforesis en gel de poliacrilamida al 15% y teñidas con Azul de Coomassie. **B)** Inmunodetección empleando el suero anti-N30 contra una membrana de nitrocelulosa electrotransferida con las mismas fracciones del gel A.

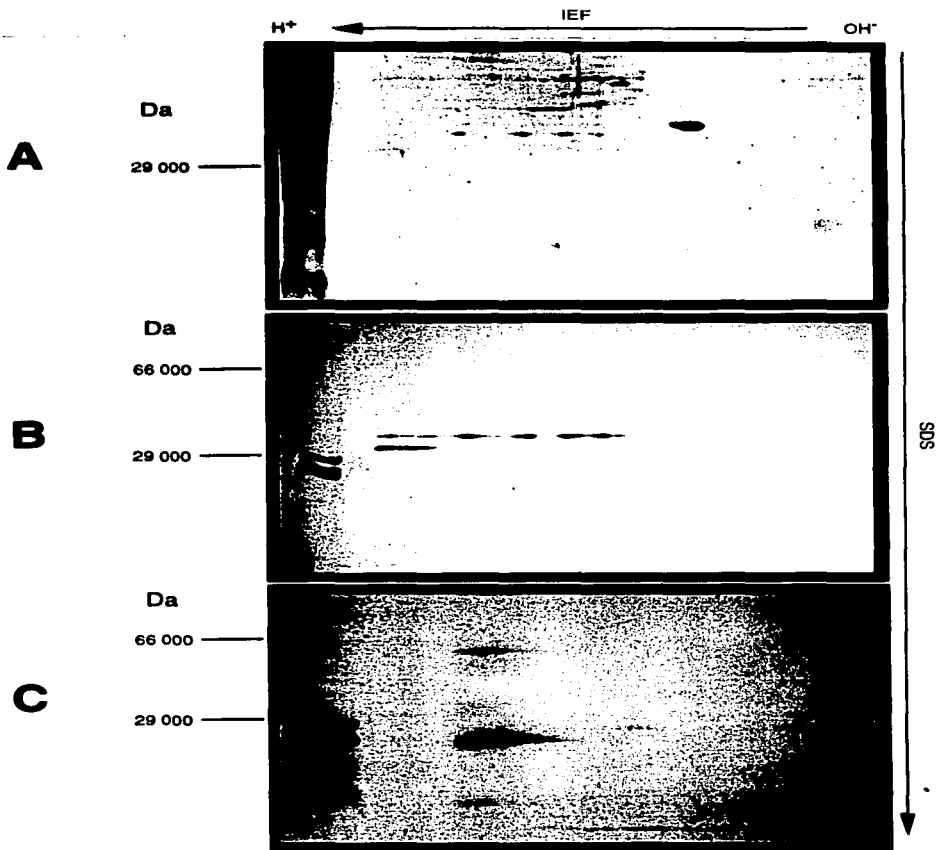


Figura 9. Análisis en gel de dos dimensiones de la N30 de nódulo y de la expresada en levadura

A) Proteínas de levadura presentes en el medio de cultivo separadas por electroforesis en gel de dos dimensiones y teñidas con Azul de Coomassie; en el carril de la izquierda se cargó una muestra de proteínas de nódulo como control positivo. **B)** Inmunodetección empleando el suero anti-N30 contra la electrotransferencia del gel A. **C)** Inmunodetección empleando el suero anti-N30 contra una fracción de proteínas de nódulo separadas por 2D-SDS-PAGE y transferidas a nitrocelulosa.

La expresión de nodulina 30 en levadura fue muy difícil de reproducir, pues aunque se probaron diferentes condiciones de cultivo y tiempos de inducción, así como diferentes métodos para concentrar las proteínas del medio de cultivo, sólo en 3 ocasiones se logró detectar la N30, a pesar de que el ARNm sí se detectaba. Es probable que el ARNm de nodulina 30 tenga algún impedimento para ser traducido por levadura y por ello no sea consistente su expresión; también puede ser que sea difícil detectar la proteína debido a que se esté degradando muy rápidamente.

II. ENRIQUECIMIENTO DE LA NODULINA 30 A PARTIR DE NODULOS DE FRIJOL

Alternativamente se decidió desarrollar un protocolo de purificación que nos permitiera, a partir de nódulos de frijol, obtener una buena cantidad de N30 pura para caracterizarla.

1) Fraccionamiento de proteínas mediante precipitaciones con etanol

Previamente se había observado que la nodulina 30 se encontraba en la fracción de proteínas solubles de nódulos de frijol y que el anticuerpo contra ella reconocía dos bandas de alrededor de 30 y 28 kDa (Campos et al., 1992 y 1995). Se comenzó a diseñar el protocolo de purificación empleando diferentes resinas y métodos de fraccionamiento. Para iniciar, el extracto de proteínas solubles de nódulo se precipitó secuencialmente con 20, 40, 60 y 80% de saturación con sulfato de amonio, pero la nodulina 30 no se enriqueció significativamente en ninguna de ellas (dato no mostrado). Otro método de fraccionamiento empleado fue la precipitación con diferentes concentraciones de etanol (20, 40, 60 y 80%), donde el doblete de nodulina 30 fue detectado en las fracciones precipitadas con 20, 40 y 80%, mientras que en la fracción de 60% no estuvo presente (Fig. 10). Aproximadamente un 60% de la nodulina 30 precipitó en la fracción de 80% de etanol, un 35% en la de 20%, y un 5% en la de 40%. Este comportamiento de la proteína sugiere que una parte de ella está formando agregados macromoleculares y por ello precipita a baja concentración de etanol, mientras que la otra parte requiere más

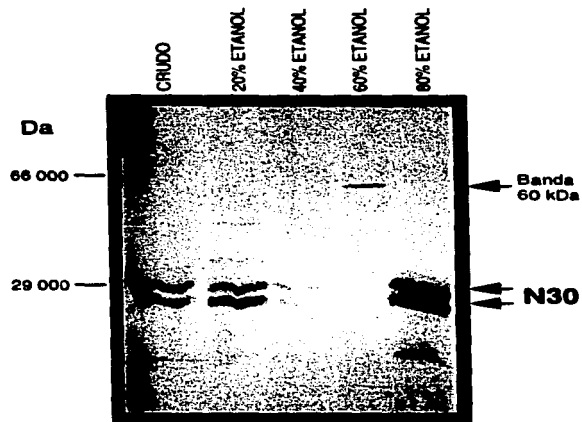


Figura 10. Fraccionamiento de proteínas de nódulo por precipitación con etanol

Inmunodetección empleando el suero anti-N30 contra distintas fracciones de proteínas de nódulo separadas por electroforesis en gel de poliacrilamida al 12%. El extracto crudo se precipitó secuencialmente con 20, 40, 60 y 80% de etanol.

concentración de etanol porque se encuentra en forma monomérica. En la fracción precipitada con 60% de etanol, aunque no apareció el doblete de N30, el anticuerpo reconoció una banda de aproximadamente 60 kDa; también en la fracción precipitada con 20% de etanol el anticuerpo reconoció dos bandas de peso intermedio entre el doblete de N30 y la banda de 60 kDa (Fig. 10). La banda de 60 kDa puede ser otra proteína relacionada antigénicamente con N30, una forma glucosilada de esta proteína, o un dímero muy estable que resiste las condiciones desnaturalizantes de la electroforesis, mientras que las bandas entre 60 y 30 kDa podrían ser otras proteínas relacionadas antigénicamente a N30 ó productos de degradación de la banda de 60 kDa.

2) Cromatografía en azul de sefrosa e hidroxilapatita

Se decidió probar las resinas azul de sefrosa e hidroxilapatita debido a que se sabía, por experimentos anteriores del Dr. Héctor Pérez, que la proteasa mayoritaria presente en nódulos no se adsorbe a estas resinas. Por lo tanto, si la nodulina 30 se adsorbía a dichas resinas éstas podrían usarse como primer paso para separar la N30 de la proteasa y así tener una fracción más estable para continuar con la purificación.

El ligando de la resina azul de sefrosa es un colorante (Cibacron Blue F3GA dye) que funciona como un sitio activo de ligado iónico, hidrofóbico o estérico, por lo tanto, la forma de adsorción de las proteínas a esta resina es compleja; se ha usado para purificar una gran variedad de proteínas como adenilato ciclasa, albúmina, fosfatasa alcalina, ADN polimerasa, etc. En cuanto a la hidroxilapatita, ésta es una forma de fosfato de calcio cristalino, y se cree que el mecanismo de adsorción de las proteínas involucra los grupos Ca^{2+} y PO_4^{3-} en la superficie del cristal. Es probable que entre el adsorbente y la proteína existan interacciones dipolo-dipolo, aunque las interacciones electrostáticas puras no se pueden descartar.

Primero se hicieron ensayos con estas resinas para determinar las condiciones de adsorción y elución más adecuadas. Se encontró que la mayoría de la N30 es capaz de adsorberse a la resina azul de sefrosa equilibrada con 200 mM KCl y se eluye con 600 mM KCl. También se determinó que es posible adsorber la nodulina 30 a la hidroxilapatita en condiciones de alta sal (600 mM KCl) y que se eluye cambiando la solución a una de fosfatos (25 mM). Una vez determinado lo anterior se procedió a hacer un ensayo usando en forma secuencial las dos resinas. Se obtuvo el

extracto crudo y se pasó por una columna de azul de sefarosa, eluyendo posteriormente las proteínas adsorbidas al aumentar la concentración de sal. Este eluido se pasó por una columna de hidroxilapatita y las proteínas adsorbidas se eluyeron en forma secuencial con diferentes concentraciones de fosfato de potasio. Las distintas fracciones se analizaron por inmunodetección, y aunque se encontró que una parte de la nodulina 30 no se adsorbió ni al azul de sefarosa ni a la hidroxilapatita, lo interesante fue encontrar que la N30 resultó degradada durante el ensayo y que el anticuerpo reconoció una banda de aproximadamente 34 kDa que se comportó de manera diferente al doblete de N30, es decir, se adsorbió con más afinidad a la hidroxilapatita (Fig. 11).

3) Cromatografía en azul de sefarosa y precipitaciones con acetona

En esta ocasión se hizo un ensayo mediante cromatografía en azul de sefarosa y precipitaciones con acetona para intentar enriquecer la N30. En base a experimentos anteriores se decidió usar la fracción eluida de la resina azul de sefarosa con 100-600 mM KCl. El extracto crudo se pasó por una columna de azul de sefarosa equilibrada en baja sal y posteriormente se hicieron dos eluciones, una con 100 mM KCl y otra con 600 mM KCl. Esta última elución fue precipitada secuencialmente con 20, 40, 60 y 80% de acetona (Fig. 12). Los datos importantes obtenidos de este ensayo fueron que se detectó nuevamente la banda de 34 kDa que, al igual que en el experimento anterior, se comportó de manera diferente al doblete de N30, ya que precipitó con menor concentración de acetona. También se observó degradación del doblete de N30 durante el ensayo, pues cambió la relación de concentración entre las dos bandas de N30 (se hizo menos abundante la de arriba) y además, apareció otra banda de menor peso molecular (Fig. 12).

Tanto en este ensayo como en el anterior quedó claro que la nodulina 30 sufre degradación durante el proceso de fraccionamiento, por lo tanto, hubo que probar otros métodos para intentar obtener una fracción más estable.

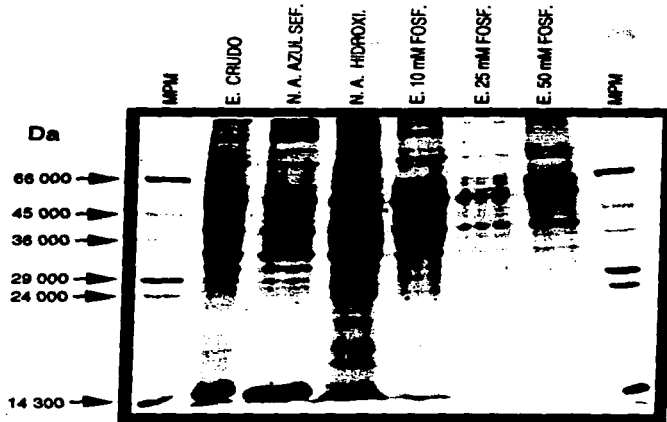
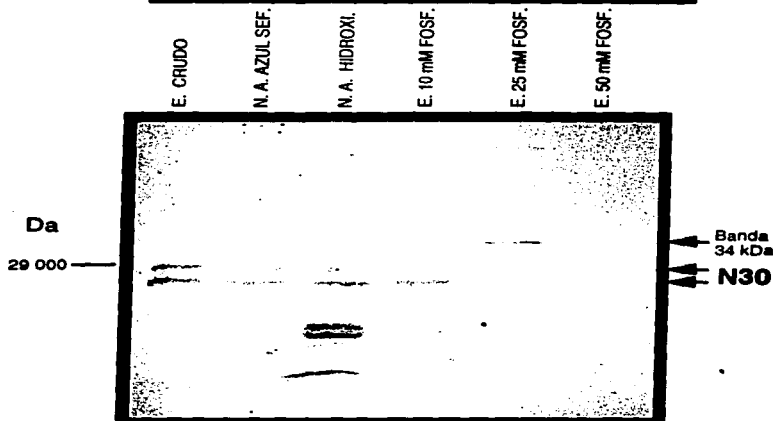
A**B**

Figura 11. Fraccionamiento de proteínas de nódulo por cromatografía en azul de sefarosa e hidroxilapatita

El extracto crudo se adsorbió a azul de sefarosa equilibrada con 200 mM KCl/30 mM Tris pH 7.4 y las proteínas adsorbidas se eluyeron con 600 mM KCl/30 mM Tris pH 7.4; este eluyente se adsorbió a hidroxilapatita equilibrada con 600 mM KCl/30 mM Tris pH 7.4 y se hicieron eluciones secuenciales con 10, 25 y 50 mM fosfatos. A) Fracciones proteicas separadas por electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% y teñidas con Azul de Coomassie. B) Inmunodetección empleando el suero anti-N30 contra una membrana de nitrocelulosa electrotransferida con las mismas fracciones del gel A. MPM, marcadores de peso molecular; E. CRUDO, extracto crudo; N. A. AZUL SEF., fracción no adsorbida al azul de sefarosa; N. A. HIDROXI., fracción no adsorbida a la hidroxilapatita; E. 10, 25 y 50 mM, eluciones de la resina hidroxilapatita

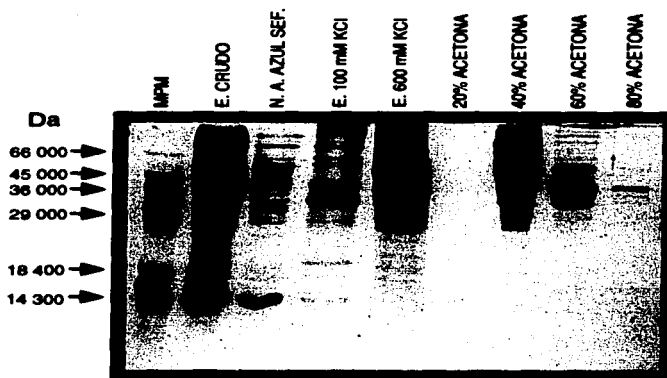
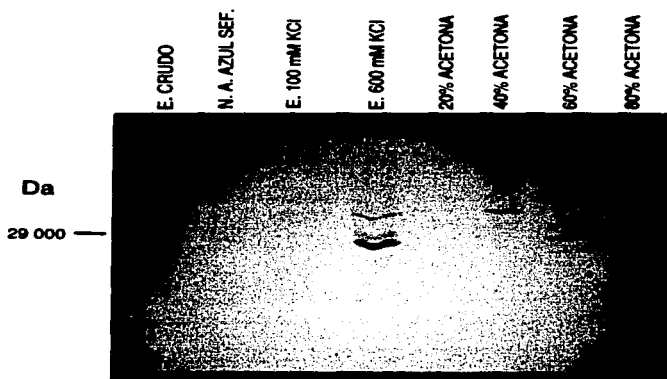
A**B**

Figura 12. Fraccionamiento de proteínas de nódulo por cromatografía en azul de sefarosa y precipitación con acetona

El extracto crudo se incubó con la resina azul de sefarosa equilibrada con 30 mM Tris pH 7.4 y las proteínas adsorbidas se eluyeron primero con 100 mM KCl/30 mM Tris pH 7.4 y luego con 600 mM KCl/30 mM Tris pH 7.4. Este último eluyente se precipitó secuencialmente con 20, 40, 60 y 80% de acetona. **A)** Proteínas de nódulo separadas por electroforesis en gel de poliacrilamida al 15% y teñidas con Azul de Coomassie. **B)** Inmunodetección empleando el suero anti-N30 contra una membrana de nitrocelulosa electrotransferida con las mismas fracciones del gel A. MPM, marcadores de peso molecular; E. CRUDO, extracto crudo; N. A. AZUL SEF., fracción no adsorbida a la resina azul de sefarosa; E. 100 y 600 mM KCl, eluciones de la resina azul de sefarosa.

4) Fraccionamiento de proteínas mediante precipitaciones con etanol y detección de actividad proteolítica en geles con sustrato para proteasas

Mediante electroforesis en geles de poliacrilamida conteniendo gelatina como sustrato para proteasas, se había detectado previamente una actividad proteolítica muy fuerte en nódulos, raíces y hojas de frijol, que se enriquecía en la fracción precipitada con 40-60% de acetona (Héctor Pérez, comunicación personal). Dado que se encontró que el doblete de N30 se enriqueció en la precipitación de 60-80% de etanol, se quiso fraccionar aún más esta muestra y así intentar separar la nodulina 30 de la actividad proteolítica. Para ello se obtuvo la pastilla de 60-80% de etanol, se resuspendió, y se volvió a precipitar secuencialmente con 60, 70 y 80% de etanol (Fig. 13). En la inmunodetección se observa que el doblete de N30 se enriquece en la fracción de 70-80% de etanol, aunque también aparece en las fracciones de 60 y 70% (Fig. 13). Se observan muchas bandas de degradación hacia abajo del doblete, pero algo que llama la atención es que también aparecen algunas bandas hacia arriba de éste, sobre todo en la fracción de 70-80% (Fig. 13). Estas bandas podrían ser agregados de los productos de degradación de N30, degradación de la banda de 60 kDa que es reconocida por el anticuerpo, o simplemente un "barrido" propiciado por el exceso de carga del antígeno.

Al analizar las fracciones en geles con sustrato para proteasas se encontró que la actividad proteolítica mayoritaria precipitó con 60 y 70% de etanol, pero no con 80% que es donde se enriqueció la nodulina 30; es decir, se logró separar esta actividad proteolítica de la N30 (Fig. 13). No obstante, en la fracción precipitada con 80% de etanol se enriqueció otra actividad proteolítica de alto peso molecular que también estuvo presente en la precipitación con 70% (Fig. 13).

5) Cromatografía en adsorbente de zinc

Dado que se logró enriquecer la nodulina 30 y además separarla de la actividad proteolítica mayoritaria en la fracción de 70-80% de etanol, ésta se usó para probar otras resinas y continuar con la purificación. Se llevó a cabo el ensayo con un adsorbente de zinc (*Zinc Chelate Affinity Adsorbent*) porque se esperaba que la nodulina 30 tuviera afinidad por este metal, ya que posee motivos parecidos a "dedos de zinc". Se obtuvo la fracción de 70-80% de etanol y se pasó por una columna de adsorbente de zinc

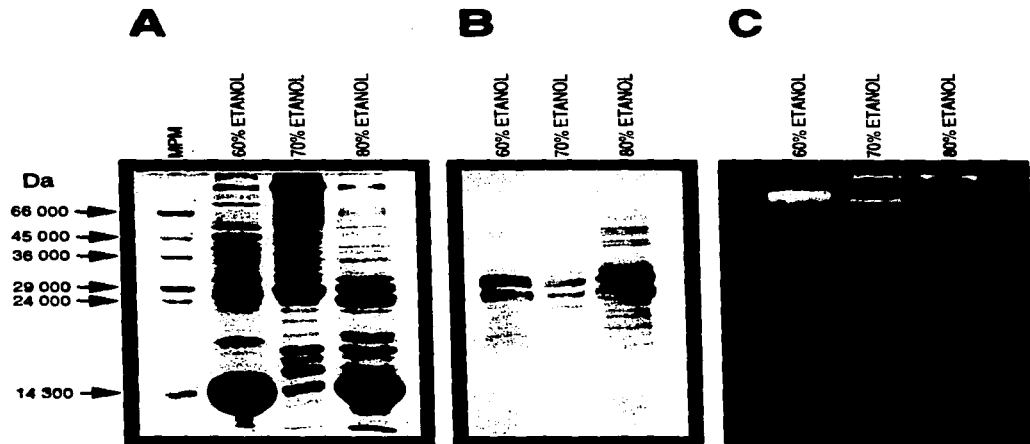


Figura 13. Fraccionamiento de proteínas de nódulo por precipitación con etanol

El extracto crudo se precipitó con etanol para obtener la fracción de 60 a 80%, la cual posteriormente se volvió a precipitar secuencialmente con 60, 70 y 80% de etanol.

A) Gel de poliacrilamida al 15% teñido con Azul de Coomassie. **B)** Inmunodetección empleando el suero anti-N30 contra una membrana de nitrocelulosa electrotransferida con una réplica del gel A. **C)** Detección de la actividad proteolítica presente en las fracciones del gel A. Las proteínas fueron separadas por electroforesis en gel de poliacrilamida con sustrato para proteasas (gelatina), y después de eliminar el SDS con Triton X-100, el gel fue teñido con Azul de Coomassie; la actividad proteolítica se aprecia como bandas claras sobre el fondo obscuro del gel. MPM, marcadores de peso molecular.

equilibrada a pH 7; las proteínas adsorbidas se eluyeron usando una solución con pH más ácido (pH 5). Como se puede observar en la inmunodetección, prácticamente toda la N30 se adsorbió a la resina de zinc (Fig. 14), aunque también muchas otras proteínas tuvieron afinidad por este adsorbente. En el gel teñido con Azul de Coomassie se observan varias bandas enriquecidas en la fracción eluida de la columna de zinc, entre ellas algunas que migran a la misma altura que el doblete de N30 (Fig. 14).

La cromatografía en adsorbente de zinc fue un paso de purificación que sirvió para separar la nodulina 30 de muchas proteínas contaminantes que no se adsorben a esta resina, como se puede observar en el gel teñido con Azul de Coomassie (Fig. 14).

6) Fraccionamiento de proteínas por precipitación con etanol y cromatografía en adsorbente de zinc e hidroxilapatita

De las resinas que se probaron, la hidroxilapatita fue la que mejores resultados dio después del adsorbente de zinc. En base a experimentos previos, la muestra obtenida de la precipitación con etanol y la cromatografía en adsorbente de zinc, se pasó por una columna de hidroxilapatita equilibrada con 500 mM NaCl, y la elución de las proteínas adsorbidas se hizo con 50 mM de fosfato de potasio (Fig. 15). Una parte de la N30 no se adsorbió a la hidroxilapatita, pero la mayoría sí se adsorbió y se eluyó con 50 mM de fosfato de potasio (Fig. 15). Varias proteínas contaminantes, entre ellas la leghemoglobina y una banda que migra justo entre el doblete de N30, se quedaron en la fracción de lo no adsorbido a la hidroxilapatita, mientras que las bandas que corresponden a N30 son de las más abundantes en la fracción eluida de la columna. En esta ocasión también aparecieron algunas bandas que fueron reconocidas por el anticuerpo arriba del doblete de N30 y bandas de degradación hacia abajo de éste (Fig. 15).

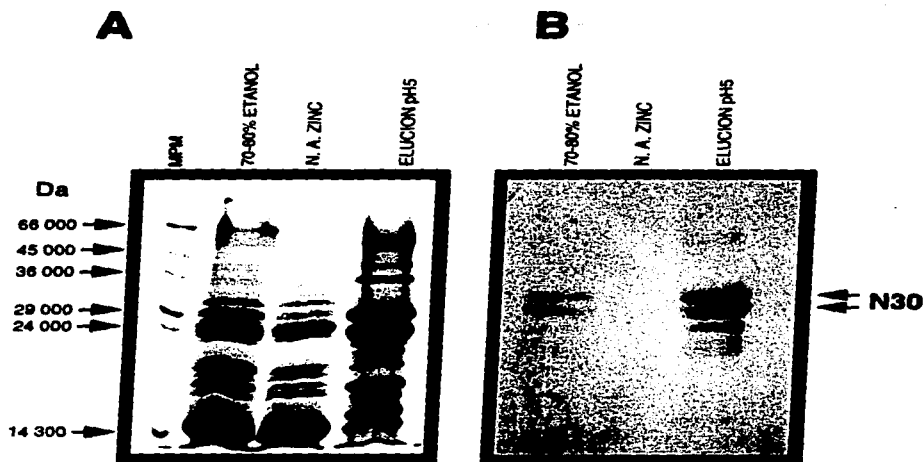


Figura 14. Fraccionamiento de proteínas de nódulo por cromatografía en adsorbente de zinc

El extracto crudo se precipitó con etanol para obtener la fracción de 70-80%, misma que se pasó por una columna de zinc (*Zinc Chelate Affinity Adsorbent*) equilibrada con 500 mM NaCl/20 mM Tris pH 7.4. Las proteínas adsorbidas a la resina fueron eluidas con 500 mM NaCl/ 100 mM acetato de sodio pH 5. **A)** Fracciones proteicas separadas por electroforesis en gel de poliacrilamida al 15% y teñidas con Azul de Coomassie. **B)** Inmunodetección empleando el suero anti-N30 contra una membrana de nitrocelulosa electrotransferida con las mismas fracciones del gel A. MPM, marcadores de peso molecular; N. A. ZINC, fracción no adsorbida a la columna de zinc.

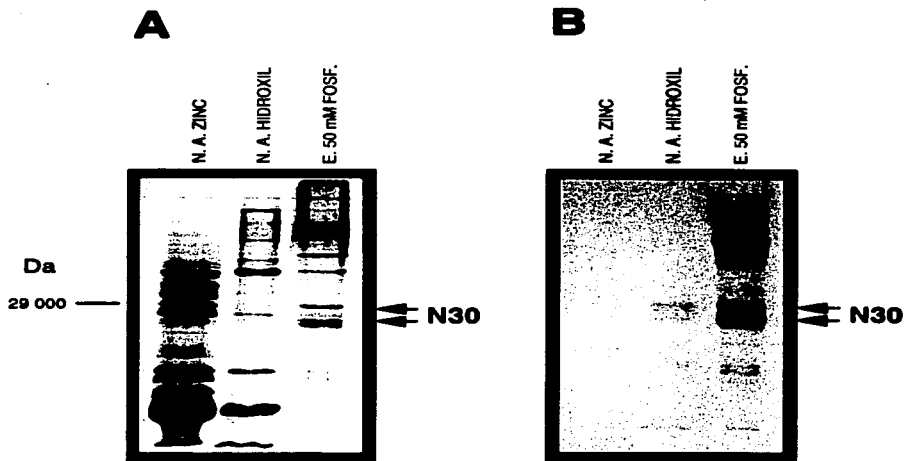


Figura 15. Fraccionamiento de proteínas de nódulo por cromatografía en adsorbente de zinc e hidroxilapatita

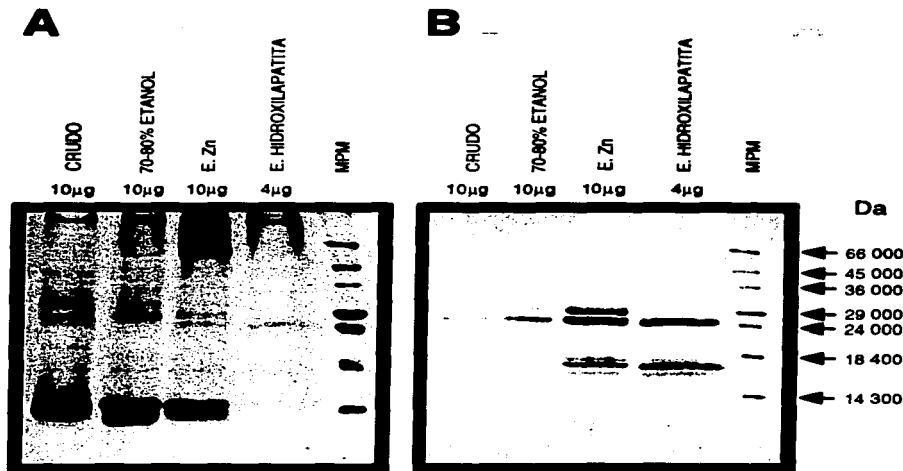
El extracto crudo se precipitó con etanol para obtener la fracción de 70-80%, que posteriormente se pasó por una columna de zinc. La elución de la columna de zinc se pasó por una columna de hidroxilapatita equilibrada con 500 mM NaCl/30 mM Tris pH 7.4 y las proteínas adsorbidas se eluyeron con 50 mM fosfatos. **A)** Fracciones proteicas separadas por electroforesis en gel de poliacrilamida al 15% y teñidas con Azul de Coomassie. **B)** Inmunodetección empleando el suero anti-N30 contra una membrana de nitrocelulosa electrotransferida con una réplica del gel A. N.A. ZINC, fracción no adsorbida a la resina de zinc; N.A. HIDROXIL., fracción no adsorbida a la resina hidroxilapatita.

7) Enriquecimiento de nodulina 30 y estimación de su concentración

Se llevó a cabo la secuencia de purificación consistente en: 1) fraccionamiento por precipitación con etanol, recuperando la fracción de 70-80%; 2) cromatografía en adsorbente de zinc, haciendo la elución con 70 mM imidazol; y 3) cromatografía en hidroxilapatita, haciendo la elución con 50 mM fosfatos. La concentración de proteínas de las diferentes fracciones obtenidas durante el proceso de enriquecimiento se determinó por el método de Bradford (1976). Se analizó el extracto crudo (10 µg), la fracción precipitada con 70-80% de etanol (10 µg), la elución de la columna de zinc (10 µg), y la elución de la columna de hidroxilapatita (4 µg). En el gel teñido con Azul de Coomassie se observa que en la fracción final (elución de la hidroxilapatita) la banda inferior del doblete de nodulina 30 es una de las bandas mayoritarias (Fig. 16). Sólo se observan una o dos bandas contaminantes de más de 50 kDa y otra de menos de 15 kDa. En el análisis por inmunodetección se puede ver que en las fracciones eluidas de las columnas de zinc y de hidroxilapatita hay bandas de degradación de nodulina 30, e incluso en la elución de la hidroxilapatita la banda superior del doblete ya no se encuentra presente (Fig. 16). A pesar de la degradación, se observa claramente como aumenta de concentración la nodulina 30 en cada paso del proceso de enriquecimiento (Fig. 16). De acuerdo a la estimación de la concentración de nodulina 30, obtenida al analizar por computadora (usando el programa "Image") las imágenes del gel teñido con Azul de Coomassie y de la inmunodetección (western), se logró aumentar la concentración de nodulina 30 de 0.32% a 12.62%, es decir, se enriqueció 39.45 veces (Fig. 16). En esta estimación no se tomaron en cuenta las bandas de degradación.

8) Ensayo para ver degradación de la banda de 60 kDa que reconoce el anticuerpo contra N30

Con respecto a la banda de 60 kDa que era reconocida fuertemente por el anticuerpo y que se comportaba de manera distinta al doblete de N30 en las precipitaciones con etanol, se decidió probar si al permitir la degradación de esta banda se generaban otras como las observadas en la fracción de 20% de etanol o incluso el doblete. Para ello se obtuvo la fracción de 40-60% de etanol, la cual contiene la banda de 60 kDa, y se incubó a 37°C con 0.2% de SDS o con 4 M de urea para permitir su



FRACCION	CONCENTRACION DE PROTEINA TOTAL POR CARRIL	CONCENTRACION DE N30 POR CARRIL	CONCENTRACION RELATIVA DE N30	FACTOR DE PURIFICACION
Extracto crudo	10 µg	0.032 µg	0.32%	1.00
Precipitación 70-80% de etanol	10 µg	0.243 µg	2.43%	7.59
Elución columna de Zinc	10 µg	0.965 µg	9.65%	30.16
Elución columna de hidroxilapatita	4 µg	0.505 µg	12.62%	39.45

Figura 16. Proceso de enriquecimiento de nodulina 30 y estimación de su concentración en las diferentes fracciones

El extracto crudo se precipitó con etanol para obtener la fracción de 70-80%, la cual posteriormente se pasó por las columnas de zinc y de hidroxilapatita. **A)** Fracciones proteicas separadas por electroforesis en gel de poliacrilamida al 15% y teñidas con Azul de Coomassie. **B)** Inmunodetección empleando el suero anti-N30 contra una membrana de nitrocelulosa electrotransferida con una réplica del gel **A**. La concentración de proteínas totales se determinó por el método de Bradford (1976), mientras que la concentración de N30 fue estimada por computadora usando el programa "Image". MPM, marcadores de peso molecular.

degradación. Se agregó urea o SDS porque se sabe que algunas proteasas son muy activas en presencia de estos compuestos (Wu y Wang, 1984; Héctor Pérez, comunicación personal). También se incubó la misma fracción de 40-60% de etanol a 4°C y se incluyó como control la de 60-80% de etanol (donde se enriquece el doblete de N30) incubada a 37°C (Fig. 17). El doblete de N30 estuvo presente en la fracción de 40-60% de etanol desde el principio, pero se pudo observar que a 4°C la banda de 60 kDa no se degradó y que el doblete sí disminuyó en intensidad conforme aumentó el tiempo de incubación. Incubando a 37°C la fracción de 40-60% con SDS la banda de 60 kDa fue disminuyendo hasta desaparecer a 23 h de incubación; por el contrario, el doblete se mantuvo con la misma intensidad a todos los tiempos analizados y en ninguno se observaron bandas intermedias entre la banda de 60 kDa y el doblete (Fig. 17). Con 4 M de urea la degradación fue más rápida, pues desde las 4 h de incubación a 37°C casi no se ve la banda de 60 kDa y, aunque el doblete apareció en todas las fracciones, sí se observa que disminuyó su concentración conforme aumentó el tiempo de incubación. En la fracción de 60-80% de etanol se observa claramente que el doblete de N30 se degradó conforme transcurrió el tiempo de incubación a 37°C (Fig. 17).

Un dato que apunta a que el doblete se origina de la banda de 60 kDa es el que se obtuvo cuando se extrajeron las proteínas de nódulos con ácido tricloroacético al 10% para evitar degradación, y posteriormente fueron fraccionadas con etanol. El doblete se detectó solamente en la fracción de 60-80% de etanol (Fig. 18), mientras que la banda de 60 kDa se concentró sólo en la fracción de 40-60% (Fig. 18), como se esperaba; pero cuando esta última fracción se analizó después de unos días de almacenada, se encontró que el doblete, aunque muy tenue, ya estaba presente (Fig. 19). Podría ser en este caso que la proteasa que degrada a la banda de 60 kDa pueda volver a tomar su conformación activa al resuspenderla en una solución con pH neutro después de haber sido desnaturalizada con ácido tricloroacético. De acuerdo con esta proposición, el doblete de N30 sería producto de la degradación de la banda de 60 kDa.

Por otro lado, se obtuvo una muestra de proteínas extraídas de nódulos frescos que se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido, se homogeneizaron en mortero, y se incubaron a 95°C con la solución de Laemmli para extraer las proteínas y evitar al máximo la degradación. Cuando se analizó esta muestra por inmunodetección, se encontró que la banda de 60 kDa era más abundante que el doblete (Fig. 19), y al analizar

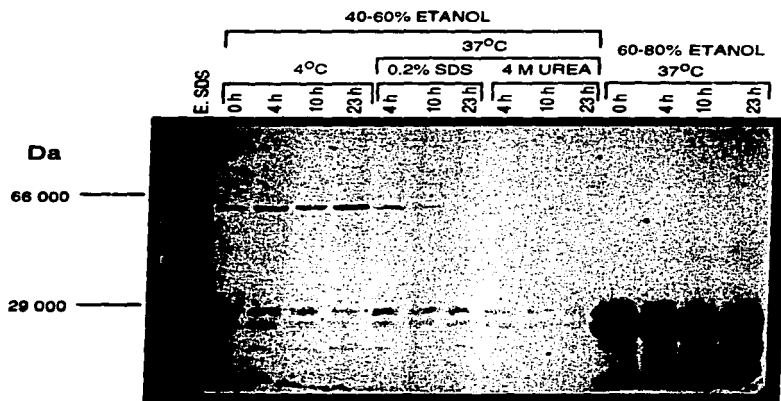


Figura 17. Ensayo para observar degradación proteolítica de la banda de 60 kDa

Se muestra la inmunodetección empleando el suero anti-N30 contra fracciones de proteínas de nódulo separadas por electroforesis en gel de poliacrilamida al 12%. El extracto crudo se precipitó con etanol para obtener las fracciones de 40-60% y 60-80%. La fracción de 40-60% se incubó por diferentes tiempos a 4°C ó a 37°C con 0.12% de SDS ó 4 M de urea, mientras que la fracción de 60-80% sólo se incubó a 37°C.

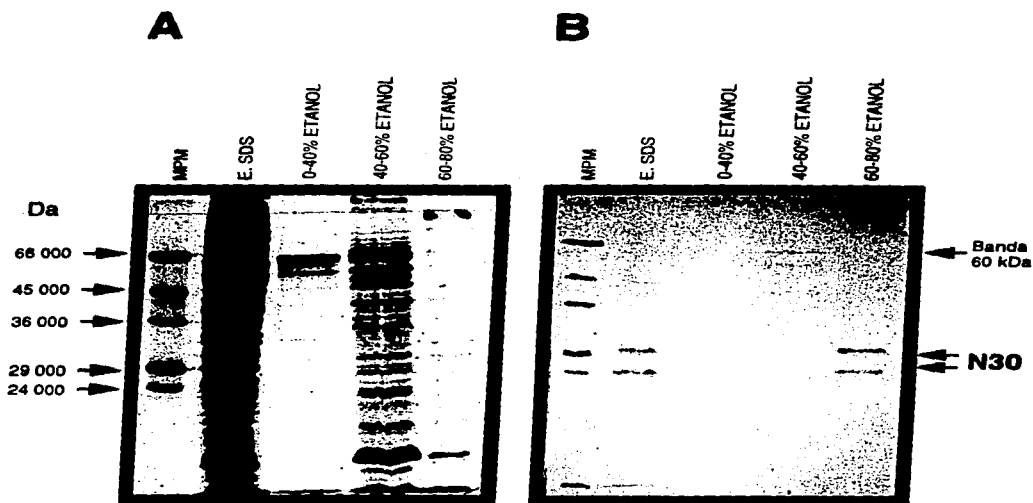


Figura 18. Extracción de proteínas de nódulo con 15% TCA y fraccionamiento con etanol
 Las proteínas de nódulo fueron extraídas con ácido tricloroacético al 10% y precipitadas por centrifugación. El ácido tricloroacético se eliminó lavando la pastilla con acetona al 90%. La pastilla resultante se solubilizó con 100 mM Tris pH 7.4 y se precipitó con etanol para obtener las fracciones de 0-40%, 40-60% y 60-80%. Se incluye también una muestra de proteínas de nódulo extraídas con solución de Laemmli a 95-100°C (E. SDS) como control positivo. **A)** Fracciones de nódulo separadas por electroforesis en gel de poliacrilamida al 15% y teñidas con Azul de Coomassie. **B)** Inmunodetección empleando el suero anti-N30 contra una membrana de nitrocelulosa electrotransferida con una réplica del gel A. MPM, marcadores de peso molecular.

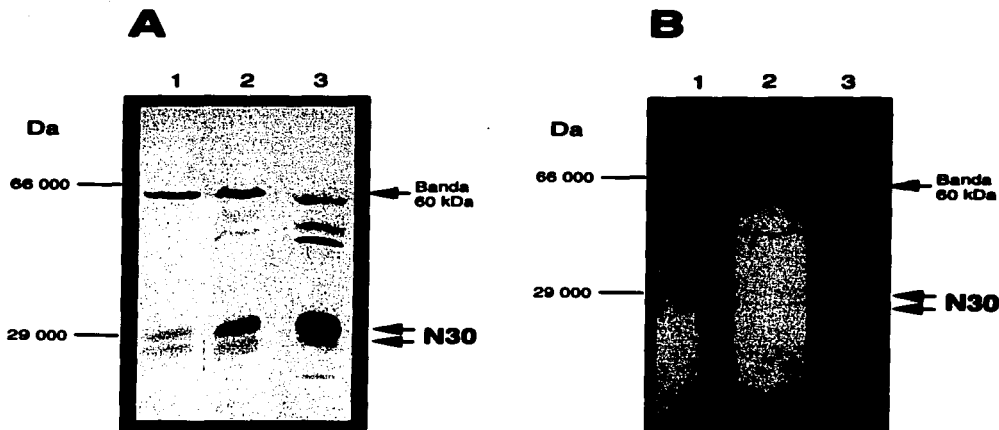


Figura 19. La banda de 60 kDa puede dar origen al doblete de aproximadamente 30 kDa.

Inmunodetección empleando el suero anti-N30 contra algunas muestras de proteínas de nódulo. **A)** Muestra de proteínas totales de nódulo extraídas con solución de Laemmli a 95-100°C. En el carril 1 se observa el perfil de la muestra recién obtenida, mientras que en los carriles 2 y 3 se observa el perfil de la misma muestra después de haber sido almacenada por algunos días. **B)** Muestra de proteínas de nódulo extraídas con ácido tricloroacético al 10% y fraccionadas posteriormente con etanol. Los tres carriles se cargaron con la fracción de 40-60% de etanol. Carril 1, muestra recién obtenida; carriles 2 y 3, la misma muestra del carril 1 después de haber sido almacenada por algunos días.

esta misma muestra posteriormente, se detectaron otras dos bandas hacia abajo de la de 60 kDa, además de que la banda superior del doblete habfa aumentado de concentración (Fig. 19). Una explicación podrfa ser que hubiera en el extracto proteasas que sean activas aún después del tratamiento desnaturalizante al que se somete la muestra (ebullición en presencia de SDS y 2-mercaptoetanol) y puedan posteriormente degradar la banda de 60 kDa.

9) Inmunolocalización de la nodulina 30 en cortes de nódulos de frijol

La nodulina 30 presenta una región rica en prolinas (o tal vez hidroxiprolinas) en su extremo carboxilo terminal, la cual podrfa ser un sitio adecuado para interactuar con otras proteínas (Yu et al., 1994). Por otra parte, no se puede descartar que la nodulina 30 pueda estar interactuando con la pared celular, como sucede con otras proteínas ricas en hidroxiprolina (Showalter, 1993).

Con el fin de determinar si la nodulina 30 se excreta hacia la pared celular o permanece en el interior de la célula, se llevó a cabo la inmunolocalización de la N30 en cortes de nódulos de 21 días incluidos en parafina, los cuales se incubaron con el suero crudo anti-N30 y posteriormente con un segundo anticuerpo acoplado al fluoróforo CY3. Los cortes fueron observados en microscopio confocal y la señal emitida por el fluoróforo se encontró dispersa en las células infectadas del nódulo, mientras que en las células no infectadas no hubo señal (Figs. 20 y 21). Con este resultado se descarta la posibilidad de que la nodulina 30 esté interactuando con la pared celular, pero aún queda la duda si se encuentra localizada en el citoplasma, en el espacio peribacteroidal, o asociada a la membrana peribacteroidal. Para determinar su localización exacta es necesario hacer un estudio más detallado (mediante microscopía electrónica).

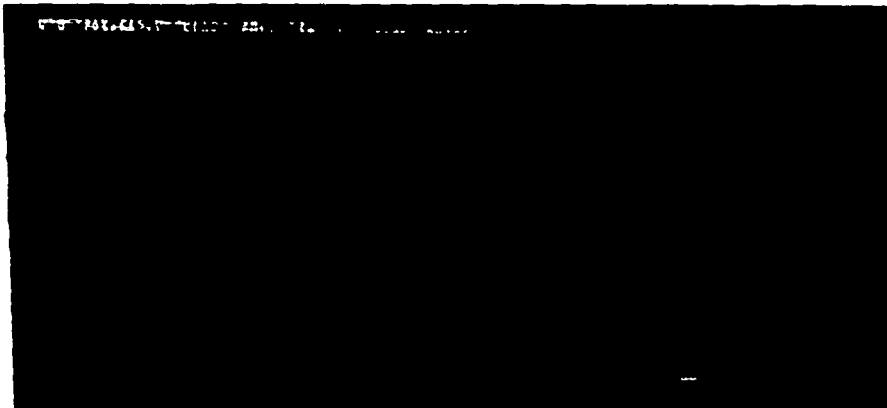
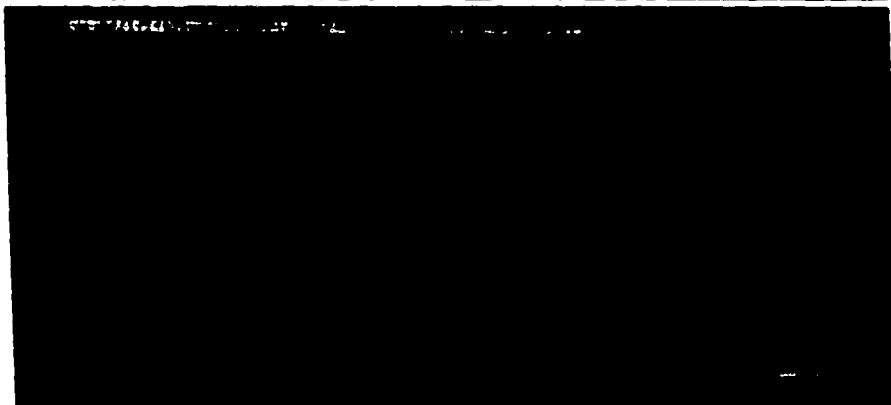
A**B**

Figura 20. Inmunolocalización de la nodulina 30 en cortes de nódulos de frijol

Se empleó el suero anti-N30 y un segundo anticuerpo acoplado al fluoróforo CY3. Los cortes fueron observados por microscopía confocal. La señal en color verde (**A**) es la autofluorescencia del tejido, mientras que la de color naranja es la emitida por el fluoróforo (**B**). La nodulina 30 se encuentra sólo en las células infectadas (**B**).

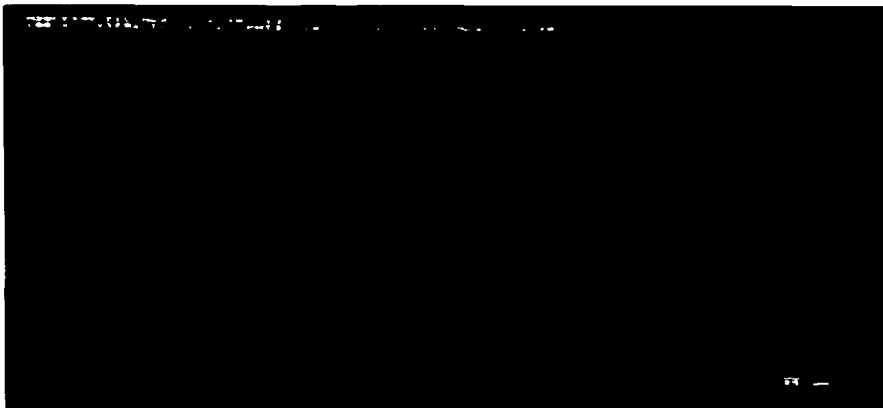
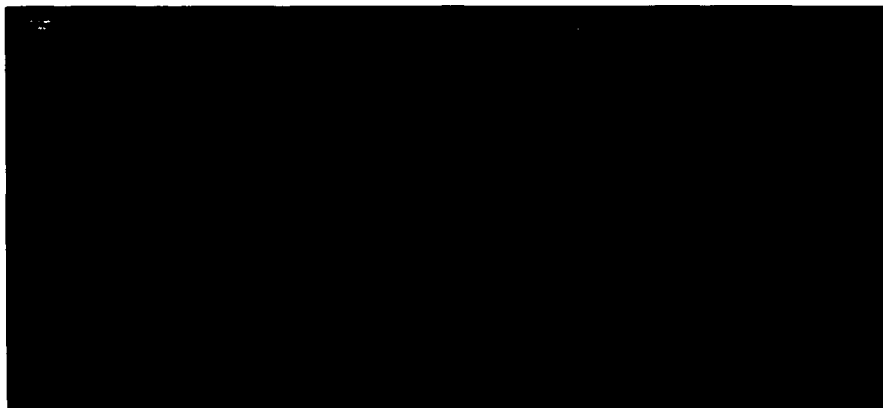
A**B**

Figura 21. Inmunolocalización de la nodulina 30 en cortes de nódulos de frijol

Se empleó el suero anti-N30 y un segundo anticuerpo acoplado al fluoróforo CY3. Los cortes fueron observados por microscopía confocal. Se muestra el detalle de una célula infectada donde se observa la señal del fluoróforo en forma dispersa dentro de ella (**B**). También se muestra la autofluorescencia emitida por el tejido (**A**).

DISCUSION

Previamente se reportó que la nodulina 30 es codificada por abundantes transcritos, los cuales al ser traducidos *in vitro* dan origen a una banda de 30 kDa que no se enfoca en el gradiente isoeléctrico de un gel de dos dimensiones (Campos et al., 1987). Se logró aislar una clona de ADNc de N30 (Campos et al., 1995) y otra genómica (Carsolio et al., 1992), las cuales fueron caracterizadas. La secuencia deducida de aminoácidos reveló que la nodulina 30 posee las siguientes características: (1) un péptido señal en el extremo amino terminal, (2) dos secuencias parecidas a "dedos de zinc" que presentan pares de cisteínas espaciadas regularmente (Cys-X₇-Cys), y (3) una región rica en prolina en su extremo carboxilo terminal (18 prolina en una secuencia de 24 residuos). También se determinó que la nodulina 30 se comporta como nodulina tardía, expresándose a partir del día 11 después de la infección, y que los transcritos que la codifican son incluso más abundantes que los de leghemoglobina (Campos et al., 1987 y 1995). La nodulina 30 se expresa sólo en las células infectadas del nódulo, como quedó demostrado por estudios en plantas transgénicas de *Lotus corniculatus* (Carsolio et al., 1992) y por hibridaciones *in situ* de ARNm en cortes de nódulos (Campos et al., 1995).

En el presente trabajo se abordó el estudio de la nodulina 30 a nivel de proteína, para lo cual previamente se logró obtener un anticuerpo contra una proteína de fusión β -galactosidasa/nodulina 30, y al usarlo contra fracciones proteicas de nódulos de frijol se determinó que la nodulina 30 se encuentra en la fracción soluble (Campos et al., 1992 y 1995).

I. EXPRESION DE NODULINA 30 EN LEVADURA

Como una opción para purificar la nodulina 30 y poder caracterizarla, se propuso su expresión en levadura (*Saccharomyces cerevisiae*). Se logró expresar la N30 en este organismo, pero las condiciones más adecuadas no se determinaron debido a que la expresión fue difícilmente reproducible. A pesar de ello se obtuvieron algunos datos interesantes.

1. Detección de nodulina 30 expresada en levadura

La cepa de levadura transformada con la clona pESN30 (Olivares, 1994) produce y excreta la nodulina 30 hacia el medio de cultivo, lo cual muy probablemente se deba a la presencia del posible péptido señal; aunque para comprobarlo habría que expresar la N30 sin el péptido señal y/o alguna otra proteína (p. ej. β -galactosida) fusionada al péptido señal de N30. Al analizar las proteínas presentes en el medio de cultivo se detectó un par de bandas similares a las observadas en extractos proteicos de nódulos, aunque con un peso molecular aparente mayor (Fig. 8). Esta diferencia de peso podría deberse a que la levadura esté glucosilando a la N30 en la vía de secreción hacia el medio de cultivo, o que la proteína originada por la clona pESN30 migre con un peso mayor al de la N30 de nódulos porque posee un extremo N-terminal "modificado", ya que dicha clona se produjo al unir la región que codifica para el péptido señal de la clona genómica (npv30-1) con la parte codificante de la clona de ADNc pN311 (Francisco Campos, comunicación personal) la cual está truncada y no tiene la parte que codifica para el péptido señal. Dado que la N30 expresada en levadura es entonces una proteína "híbrida" y está siendo producida en un sistema heterólogo, es posible esperar que tenga un comportamiento diferente a la del nódulo, como es la diferencia en el peso molecular aparente. El hecho de que se detecten dos bandas de nodulina 30 en levadura sugiere que también las dos bandas que se detectan en nódulos pueden ser productos del mismo gen, y que la diferencia de peso entre ellas se deba a algún tipo de procesamiento como remoción del péptido señal o proteólisis en algún otro sitio específico.

2. Comportamiento en 2D SDS-PAGE de la nodulina 30 expresada en levadura

De manera similar como se había observado con los productos de traducción *in vitro* de ARNm de nódulos de frijol (Fig. 4) (Campos et al., 1987), se encontró que la nodulina 30 expresada en levadura no se enfoca en un solo punto en el gradiente isoeléctrico de un gel de dos dimensiones, sino que presenta alrededor de 8 puntos de enfoque (Fig. 9). En este caso dicho comportamiento no se puede explicar por la presencia de polipéptidos relacionados codificados por diferentes ARNm, ya que la N30

proviene de la misma clona (pESN30); pero sí cabe la posibilidad de que los diferentes puntos de enfoque se deban a distintos niveles de fosforilación (Fig. 22), ya que la N30 posee varios sitios potenciales para esta modificación. En el gel de dos dimensiones, la banda de arriba de la nodulina 30 producida en levadura presentó puntos mayoritarios de enfoque hacia el lado básico, mientras que en la banda de abajo los puntos de enfoque más visibles se concentraron hacia el lado ácido (Fig. 9 y 22). Esto concuerda un poco con el análisis hecho en computadora, donde la nodulina 30 completa tiene un pI de 6.1, mientras que sin el posible péptido señal su pI es un poco más ácido (5.9). De igual manera, y apoyando los resultados obtenidos en levadura, el par de bandas presentes en nódulos se comportan de manera similar en un gel de dos dimensiones a las de levadura, siendo más básica la banda de arriba (Fig. 9).

II. ENRIQUECIMIENTO DE LA NODULINA 30 A PARTIR DE NODULOS DE FRIJOL

Debido a los problemas encontrados con la expresión de N30 en levadura, fue necesario buscar otra alternativa para continuar con su caracterización. Se decidió desarrollar un protocolo de purificación a partir de nódulos de frijol que permitiera obtener una buena cantidad de proteína para caracterizarla bioquímicamente.

1) Ensayo con azul de sefarosa e hidroxilapatita

Las primeras resinas que se probaron para emplearlas en la purificación de N30 fueron la hidroxilapatita y azul de sefarosa, esto porque la proteasa mayoritaria que está presente en nódulos no se adsorbe a ellas (Héctor Pérez, comunicación personal), y podrían ser útiles para separar la N30 de esta proteasa y así obtener una fracción más estable. La nodulina 30 sí se adsorbió a estas resinas, y un resultado interesante fue que en los ensayos realizados se detectó una banda de alrededor de 34 kDa

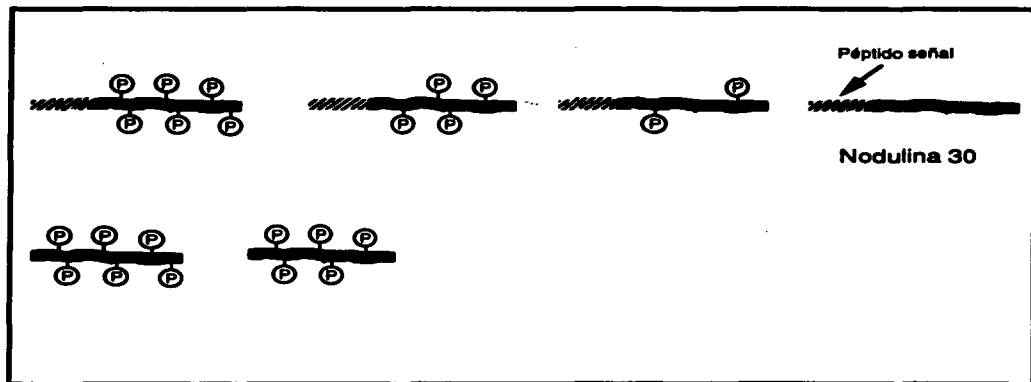
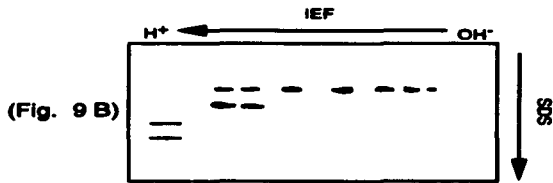


Figura 22. Posible explicación para el comportamiento en 2D SDS-PAGE de la nodulina 30 expresada en levadura

La banda inferior podría ser la proteína procesada (sin el péptido señal), mientras que los distintos puntos de enfoque podrían deberse a niveles de fosforilación diferentes.

que fue reconocida por el anticuerpo contra N30 y que se comportó de manera diferente al doblete (Fig. 11). Por otro lado, se observó que la N30 es susceptible a la degradación durante el proceso cromatográfico, ya que en algunas fracciones se observaron varias bandas hacia abajo del doblete que son reconocidas por el anticuerpo (Fig. 11). En otro ensayo donde las proteínas fueron fraccionadas mediante la resina azul de sefarosa y precipitaciones con acetona, se detectó la misma banda de 34 kDa que se comportó de manera diferente al doblete, pues precipitó con menor concentración de acetona (Fig. 12). El hecho de que esta banda tenga un comportamiento diferente al doblete sugiere que se trata de otra proteína relacionada antigénicamente a N30, de una forma modificada (p. ej. glucosilada) de N30, o de productos de degradación de la banda de 60 kDa que se detectó en el fraccionamiento con etanol (Fig. 10).

2) Precipitaciones con etanol

Para continuar con la purificación se hicieron diferentes tipos de fraccionamientos, de los cuales, la precipitación con etanol fue la que dio mejores resultados. El doblete de N30 se enriqueció en la fracción de 70-80% de etanol, pero también en la fracción de 0-20% se encontró de manera considerable, mientras que en la fracción de 40-60% estuvo totalmente ausente (Fig. 10). Llama la atención que la nodulina 30 presente dos picos de enriquecimiento, uno a baja concentración de etanol (20%) y otro a concentración alta (80%) (Fig. 10). Este comportamiento puede deberse a que si la nodulina 30 se encuentra en forma monomérica sea muy soluble y requiera de una alta concentración de etanol para precipitar, mientras que si se encuentra formando agregados macromoleculares (consigno misma o con otras proteínas) precipite a una menor concentración de etanol (Fig. 23). El hecho de que el doblete de N30 se concentrara, sólo en la fracción de 60-80% de etanol cuando las proteínas fueron extraídas con una solución de ácido tricloroacético al 10% y posteriormente fraccionadas con etanol, es consistente con esta hipótesis, ya que el ácido tricloroacético desnaturaliza y disgrega las proteínas que pudieran estar formando complejos, haciendo que la nodulina 30 (en forma monomérica) precipite sólo a 80% de etanol y no a concentraciones menores (Fig. 18).

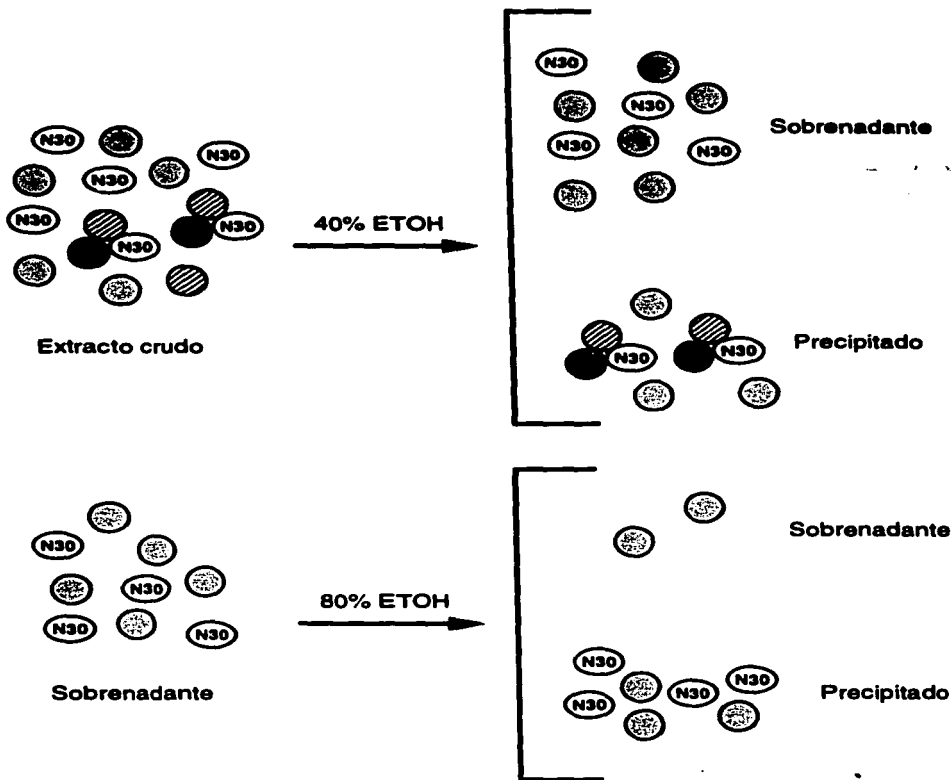


Figura 23. Modelo de precipitación de nodulina 30 con etanol

La nodulina 30 podría estar presente en el extracto crudo en forma monomérica y multimérica. De acuerdo a esta hipótesis, la forma multimérica precipita con 40% de etanol, mientras que la forma monomérica requiere de 80% para precipitar.

La alta solubilidad de la N30 fue aprovechada para separarla de la proteasa mayoritaria, ya que esta última requiere de poco más de 60% de etanol para precipitar, mientras que para precipitar la nodulina 30 es necesario alcanzar una concentración de 80%; sin embargo, no fue posible separar por este método la N30 de otra proteasa de alto peso molecular que es menos abundante y que precipita con 60-80% de etanol (Fig. 13).

3) Cromatografía en adsorbente de zinc

Se ha sugerido que la nodulina 30 podría estar ligando algún metal por medio de sus dominios parecidos a "dedos de zinc" (Sánchez et al., 1992), y se encontró que esta proteína es capaz de adsorberse a una resina que contiene zinc (*Zinc Chelate Affinity Adsorbent*), de lo cual se infiere que por lo menos algunas de sus cisteínas y/o histidinas están accesibles para interactuar con el zinc. Con esta resina se logró enriquecer considerablemente la N30, aunque también se enriquecieron otras proteínas entre las cuales se encuentra una (o unas) que también pesa(n) 30 kDa (Fig. 14). Esto se comprobó cuando una muestra de proteínas, que había sido obtenida a través del fraccionamiento con etanol y la columna de zinc, se pasó por una columna de intercambio iónico (DEAE-sefacel) y se enriqueció una banda de 30 kDa que resultó ser distinta a la nodulina 30, pues el anticuerpo no la reconoció (dato no mostrado).

4) Protocolo para enriquecer la nodulina 30

Finalmente se volvió a probar la resina hidroxilapatita con la muestra de proteínas obtenida de la precipitación con etanol y la columna de zinc. En esta ocasión la N30 se enriqueció mucho en la fracción eluida de la hidroxilapatita, y las bandas correspondientes al doblete de nodulina 30 se pudieron distinguir fácilmente en el gel teñido con Azul de Coomassie (Fig. 15). Las bandas difusas que son reconocidas por el anticuerpo hacia arriba del doblete (Fig. 15) pueden ser productos de degradación de la banda de 60 kDa o pueden deberse a que hay un exceso de antígeno (N30) que ocasiona que éste se "embarre" a lo largo del carril, pues esto también se observó en otras ocasiones donde la N30 estaba muy concentrada (ej. precipitación con 70-80% etanol) (Fig. 13). Esta resina fue la que mejores resultados dio, ya que en el gel teñido con Azul de Coomassie se puede observar que muchas bandas contaminantes se quedan en la fracción de lo no adsorbido a la hidroxilapatita y que las bandas correspondientes a N30 son mayoritarias en la fracción eluida de esta resina. Tomando en cuenta los resultados obtenidos, el protocolo de enriquecimiento al que se llegó finalmente fue: 1) precipitación con etanol (70-80%); 2) adsorción a la resina de zinc y elución con 70 mM de imidazol; 3) adsorción a la resina hidroxilapatita y elución con 50 mM de fosfatos de potasio.

Aunque en la fracción final obtenida de la columna de hidroxilapatita se pueden distinguir las bandas que corresponden al doblete de N30 y hay pocas proteínas contaminantes, el mayor problema para continuar con la purificación es la escasa cantidad de proteína recuperada, la cual apenas era suficiente para hacer el análisis en gel y la inmunodetección.

5) Estimación de la concentración de nodulina 30

Debido a que aún no se ha obtenido la nodulina 30 en forma pura, la concentración de ésta se estimó por computadora en base a las imágenes del gel teñido con Azul de Coomassie y de la inmunodetección (western). De acuerdo a esta estimación, la nodulina 30 forma un 0.32% de la proteína total, y se logró enriquecer 39 veces con el protocolo de enriquecimiento

empleado (Fig. 16). En la estimación de la concentración no se tomó en cuenta la nodulina 30 degradada, por lo que si se lograra controlar su degradación el enriquecimiento sería mayor.

Al final del protocolo de enriquecimiento sólo se obtuvo la banda inferior del doblete de nodulina 30 (Fig. 16). Lo más probable es que la banda superior se haya degradado durante el proceso de enriquecimiento, ya que en algunos experimentos previos se observó que ésta se degrada primero que la banda inferior; como ejemplos están el caso de la cromatografía en azul de sefarosa y precipitaciones con acetona (Fig. 12), y la filtración en gel reportada en otro trabajo (Olivares, 1994), donde al final sólo se detectó la banda inferior del doblete y algunas bandas de degradación hacia abajo de ésta.

6) Banda de 60 kDa que reconoce el anticuerpo

Llama la atención la banda de aproximadamente 60 kDa que es reconocida por el anticuerpo contra N30 en la fracción precipitada con 40-60% de etanol (Fig. 10) y en la muestra de proteínas totales extraídas con solución de Laemmli a 95°C (Figs. 17 y 19). Podría pensarse que la banda de 60 kDa es un artefacto de agregación de la N30 promovido al calentar la muestra de proteínas en la solución de Laemmli alrededor de los 100°C, como se ha reportado en otros trabajos (Gallagher y Leonard, 1987; Takano et al., 1988), que dicha banda es otra proteína relacionada con N30, ó que se trata de una forma glucosilada de N30 (Fig. 24). Esto último puede proponerse debido a que la nodulina 30 comparte algunas características con las proteínas arabinogalactanas (Showalter, 1993; Carpita y Gibeaut, 1993), como son su alto contenido de prolínas, alaninas y serinas, bajo contenido de tirosinas, y alta solubilidad, además de que en levadura esté siendo excretada y presente un peso mayor al esperado probablemente debido a glucosilaciones. La nodulina 30 podría estar siendo glucosilada en sus residuos de serina (O-glucosilación), y de acuerdo con esta posibilidad,

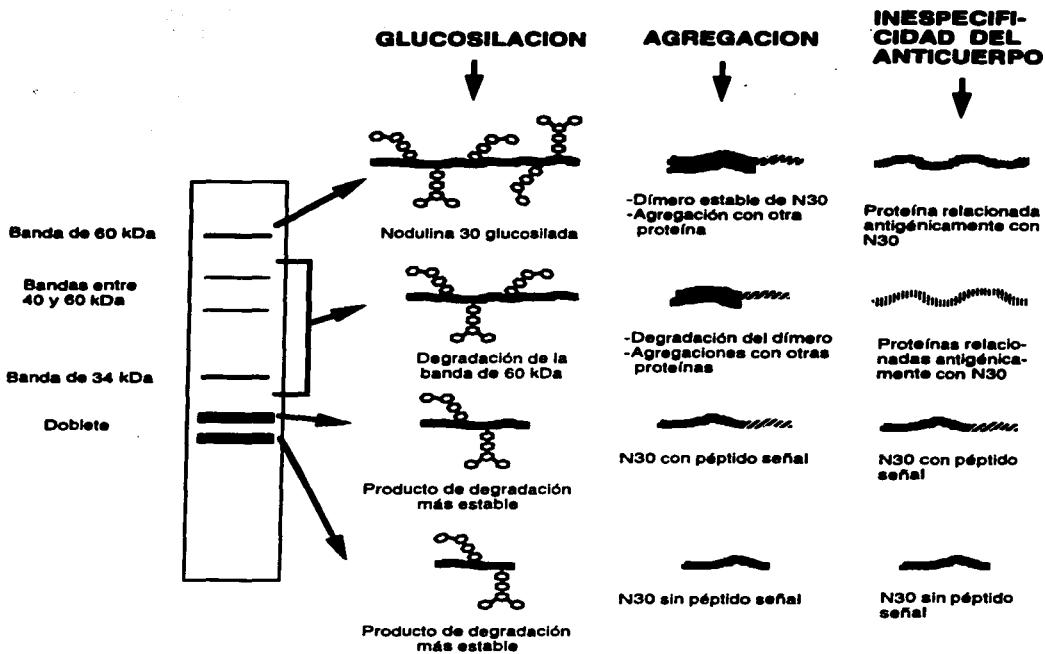


Figura 24. Posibilidades para explicar las bandas de más de 30 kDa que son reconocidas por el anticuerpo contra nodulina 30

las bandas de peso molecular entre 60 y 30 kDa que se observan en la fracción de 0-20% de etanol (Fig. 10) podrían ser productos intermedios de procesamiento de la banda de 60 kDa (Fig. 24).

Un dato que sugiere que la banda de 60 kDa no es un artefacto de agregación es el hecho de que ésta se comporta de manera diferente al doblete de N30 en la precipitación con etanol (Fig. 10), lo cual indica que ya está presente antes de la preparación de la muestra con solución de Laemmli a 95°C.

7) Ensayo de degradación de la banda de 60 kDa

Se sabe que algunas proteasas endógenas son muy activas en SDS (Wu y Wang, 1984) ó, como en el caso de la proteasa mayoritaria de nódulo, su actividad es alta en presencia de urea (Héctor Pérez, comunicación personal); por lo tanto, en el ensayo de degradación de la banda de 60 kDa que se llevó a cabo para ver si ésta podía dar origen al doblete de alrededor de 30 kDa se agregó 0.2% de SDS ó 4 M de urea en algunas fracciones. La muestra de proteínas incubadas a 4°C no mostraron degradación de la banda de 60 kDa, pero el doblete sí disminuyó en intensidad, mientras que a 37°C con SDS la banda de 60 kDa sí se degradó hasta desaparecer a las 23 h de incubación y el doblete se mantuvo igual (Fig. 17). Una explicación para este resultado podría ser que a 37°C con SDS la banda de 60 kDa se esté degradando y dé origen al doblete de N30, por lo tanto, aunque el doblete sí se esté degradando, no se ve diferencia en su concentración conforme transcurre el tiempo (Fig. 25). En cambio, a 4°C sí se observa la disminución en la señal del doblete (Fig. 17) porque la banda de 60 kDa no se está degradando y por lo tanto el doblete no se está restituyendo (Fig. 25). El hecho de que con 4 M de urea a 37°C se observe degradación tanto del doblete como de la banda de 60 kDa, podría explicarse que se debe a que con este tratamiento la degradación es más rápida tanto para la banda de 60 kDa como para el doblete (Fig. 25). En la fracción que se incluyó como control (60-80% de etanol incubada a 37°C), se observa claramente que el doblete sí se degrada (Fig. 17).

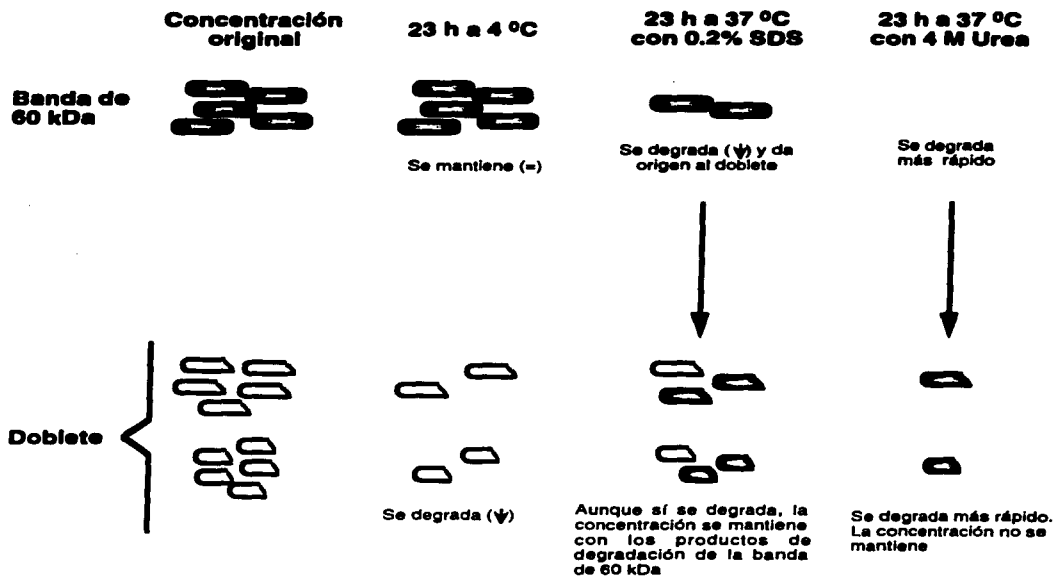


Figura 25. Modelo de degradación de la banda de 60 kDa el cual propone que ésta da origen al doblete de aproximadamente 30 kDa

Con los datos obtenidos hasta ahora no se puede excluir la posibilidad de que las bandas de mayor peso que el doblete sean agregados muy estables de N30, pero hay uno que apunta a que el doblete se origina de la banda de 60 kDa. Este dato se obtuvo cuando se analizó la muestra de proteínas extraídas directamente con solución de Laemmli después de haber sido almacenada por unos días y se observó que aparecieron otras dos bandas de peso molecular entre 30 y 60 kDa, además de que la banda superior del doblete aumentó de concentración (Fig. 19). También concuerda con esta hipótesis el hecho de que el doblete haya sido detectado en la fracción de 40-60% de etanol de las proteínas extraídas con ácido tricloroacético al 10% (Fig. 19) en la que originalmente sólo se había detectado la banda de 60 kDa y otras dos bandas de peso un poco menor (Fig. 18). Sin embargo, algo que no está claro es cómo puede haber degradación de la banda de 60 kDa cuando las proteínas han sido desnaturalizadas con 10% de ácido tricloroacético y/o por calor en presencia de SDS y reductor (2-mercaptoetanol). Tal vez haya proteasas presentes en las muestras que son capaces de recobrar su actividad aún en estas condiciones desnaturalizantes.

8) Inmunolocalización de la nodulina 30

En cuanto a la inmunolocalización, el hecho de que la nodulina 30 haya sido detectada en las células infectadas (Figs. 20 y 21) es consistente con los resultados obtenidos de la hibridación *in situ* de los transcritos de N30 en cortes de nódulo (Campos et al., 1995) y con la expresión de GUS bajo el promotor de nodulina 30 en plantas transgénicas (Carsolio et al., 1994), en los cuales se había detectado su expresión sólo en este tipo de células. Con este resultado también se descarta la posibilidad de que la N30 estuviera siendo excretada hacia la pared celular. Es más, la nodulina 30 al parecer se encuentra en el citosol de las células infectadas (Fig. 21), pero, dado que una célula infectada posee gran cantidad de simbiosomas, aún cabe la posibilidad de que esta proteína se encuentre en el espacio peribacteroidal, lo cual puede ser posible debido a que posee un posible péptido señal (Fig. 5). Para determinar la localización exacta de la N30 dentro de las células infectadas del nódulo es necesario hacer la

inmunolocalización con oro coloidal en microscopio electrónico. Esto se intentó anteriormente (Campos et al., 1992), pero los resultados no fueron conclusivos, tal vez porque el anticuerpo no reconozca al antígeno después de haber sido fijado por los métodos empleados en microscopía o porque los epítopes que reconoce el anticuerpo no queden accesibles para él (Jaime Padilla, comunicación personal).

9) Posibilidad de la N30 para interactuar con otras proteínas

Otra posibilidad que surge en cuanto a las características de la nodulina 30 es que pudiera interactuar con otras proteínas a través de su extremo carboxilo-terminal rico en prolina, ya que éste es similar a secuencias de unión a dominios SH3 (Fig. 26), los cuales están involucrados en la interacción específica entre proteínas (Pawson y Schlessinger, 1993) y han sido identificados en proteínas de células animales que están involucradas en la transmisión de señales de receptores con actividad de tirosina-cinasa. Algunas de estas proteínas tienen actividades enzimáticas (ej. c-Src, PLC γ 1 y Ras-GAP), mientras que otras funcionan sólo como adaptadores moleculares (ej. Crk, Grb2 y Nck). También se han encontrado dominios SH3 en proteínas de citoesqueleto, tales como miosina 1B, fodrina y la proteína de levadura ABP-1 que se une a actina (ver Pawson y Schlessinger, 1993). Los dominios SH3 se unen a secuencias ricas en prolina (Yu et al., 1994), y la región rica en prolina de la nodulina 30 tiene cierta similitud con una secuencia de la proteína de ratón 3BP-1 (Fig. 26), la cual *in vitro* presenta actividad GAP (proteína activadora de GTPasa) con especificidad para proteínas G relacionadas a Rac (Cicchetti et al., 1995), y es capaz de unirse a dominios SH3 (Ren et al., 1993; Cicchetti et al., 1992). Sin embargo, hasta ahora no se han podido aislar proteínas con dominios SH3 ó con secuencias de unión a dominios SH3 en plantas, a pesar de haber usado una gran variedad de técnicas para conseguirlo (Avonce, 1997)..

Otra proteína con la que podría interactuar nodulina 30 es la profilina, ya que *in vitro* esta última interacciona fuertemente con secuencias de poli-L-prolina (Vidali et al., 1995).

La posibilidad de que la nodulina 30 esté interactuando con otras proteínas es apoyada por los experimentos de fraccionamiento con etanol, donde la nodulina 30 precipita en dos fases, comportándose como complejo de alto peso molecular y como proteína monomérica (Figs. 10 y 23).

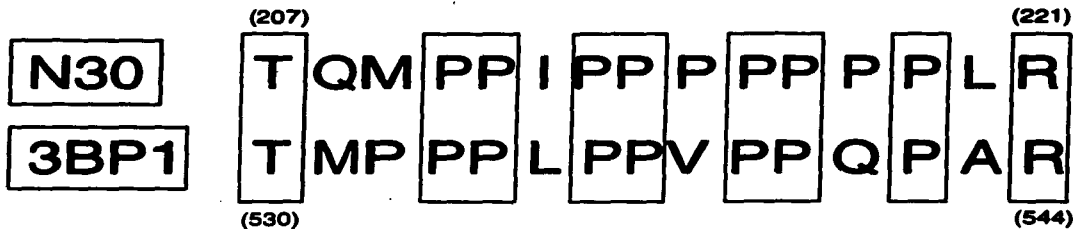


Figura 26. Comparación de la región rica en prolina de la nodulina 30 con el sitio de unión a dominios SH3 de la proteína 3BP-1 de ratón (Ren et al., 1993; Cicchetti et al., 1992 y 1995).

CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos durante la realización de este trabajo, se pueden hacer las siguientes conclusiones:

1. La nodulina 30 producida por levadura se excreta al medio de cultivo, muy probablemente debido a su péptido señal.
2. La clona pESN30, al ser expresada en levadura, da origen a un par de bandas similares a las de nódulo, pero con un peso ligeramente mayor. En un gel de dos dimensiones estas bandas presentan varios puntos de enfoque a lo largo del gradiente isoeléctrico, originando un barrido parecido al observado con los productos de traducción *in vitro* de ARNm de nódulos de frijol.
3. Debido a que la clona pESN30 expresada en levadura da origen a un par de bandas parecidas a las que detecta el anticuerpo en extractos proteicos de nódulos, es probable que también estas últimas provengan del mismo gen.
4. La nodulina 30 presenta un comportamiento peculiar en las precipitaciones con etanol, pues precipita en dos fases: a concentración baja de etanol (20%), comportándose como complejo macromolecular, y a concentración alta (80%), comportándose como una proteína muy soluble.
4. En muchos de los ensayos realizados se pudo apreciar que la nodulina 30 es muy susceptible a la degradación, pues con frecuencia el doblete disminuye de concentración y aparecen bandas hacia abajo de éste.
6. Al parecer, la banda de 60 kDa que reconoce el anticuerpo es capaz de dar origen al doblete de alrededor de 30 kDa, sugiriendo que dicha banda es una forma modificada de N30 (glucosilada) o que se trata de un complejo estable de N30 que se disocia muy lentamente.

7. Mediante los experimentos de inmunolocalización se determinó que la proteína N30 se encuentra en el interior de las células infectadas del nódulo, corroborando los resultados anteriores en los que sólo se detectó su expresión en estas células, y descartando la posibilidad de que estuviera siendo excretada hacia la pared celular. Al parecer, la nodulina 30 se encuentra dispersa en el citoplasma, pero aún cabe la posibilidad de que se encuentre en el espacio peribacteroidal o asociada a la membrana peribacteroidal.

8. En base a la secuencia deducida de aminoácidos, se determinó que la nodulina 30 presenta características parecidas a las proteínas arabinogalactanas, como son: alto contenido de prolina, alaninas y serinas, y bajo contenido de tirosinas. Además, otra característica que comparte la nodulina 30 con las proteínas arabinogalactanas es su alta solubilidad.

9. También en base a la secuencia deducida de aminoácidos, se encontró que la N30 posee un posible sitio de unión a dominios SH3 parecido al de la proteína 3BP1 de ratón.

PERSPECTIVAS

1. Microsecuenciar las bandas de nodulina 30 que se obtienen al llevar a cabo el protocolo de enriquecimiento desarrollado en este trabajo para determinar si las dos bandas son precursor y producto o se trata de proteínas diferentes, además de precisar el sitio de corte (procesamiento) si fuera el caso.

2. Probar, mediante experimentos tipo "western", si la nodulina 30 se une a dominios SH3 o a profilina.

3. Determinar, mediante el uso de lectinas, si las bandas de nodulina 30 presentan glucosilaciones.

4. Determinar si la nodulina 30 se encuentra formando complejos macromoleculares, lo cual se podría llevar a cabo por filtración en gel o por electroforesis en geles no desnaturalizantes (nativos).

5. Llevar a cabo más experimentos para corroborar que la banda de 60 kDa puede dar origen al doblete. Una forma sería correr la fracción donde se enriquece la banda de 60 kDa, cortar esa región, homogeneizarla, y volverla a correr después de haber sido incubada por diferentes tiempos a 37°C para ver si aparece el doblete.

6. Valdría la pena intentar nuevamente la inmunolocalización en cortes de nódulo mediante microscopía electrónica y oro coloidal para determinar exactamente la localización de la N30 dentro de la célula.

7. También sería bueno estandarizar la expresión de nodulina 30 en levadura, ya que los resultados que se obtuvieron usando este sistema fueron muy interesantes. Así, se podría caracterizar el péptido señal de nodulina 30 al expresar ésta sin dicho péptido y otra proteína diferente fusionada al péptido señal de nodulina 30. Para llevar a cabo una expresión consistente de N30 se podrían probar otras cepas de levadura y/o algún otro plásmido para expresión cuya inducción se pueda modular.

8. Finalmente, ya que la purificación de la nodulina 30 por métodos convencionales resultó ser más difícil de lo esperado, una forma para purificarla (o terminar de purificarla) sería mediante una columna de inmunoafinidad hecha con anticuerpos dirigidos contra ella. Para ello será necesario obtener una buena cantidad de anticuerpos que nos permita llevar a cabo este fin.

LITERATURA CITADA

- Akiyoshi DE, Regier DA, Jen G, Gordon MP (1985)** Cloning and Sequencing of the *tsz* gene from *Agrobacterium tumefaciens* strain T37. *Nucl Acids Res* **13**:2773-2788
- Anderson MP, Vance CP, Helchel GH, Miller SS (1989)** Purification and Characterization of NADH-Glutamate Synthase From Alfalfa Root Nodules. *Plant Physiol* **90**:351-358
- Ardourel M, Lortet G, Maillet F, Roche P, Truchet G, Promé J-C, Rosenberg C. (1995)** In *Rhizobium meliloti*, the Operon Associated With the *nod* Box n5 Comprises *nodL*, *noeA* and *noeB*, Three Host-Range Genes Specifically Required for the Nodulation of Particular *Medicago* Species. *Mol Microbiol* **17**:687-699
- Asad S, Fang Y, Wycoff KL, Hirsch AM (1994)** Isolation and Characterization of cDNA and Genomic Clones of MsENOD40; Transcripts Are Detected in Meristematic Cells of Alfalfa. *Protoplasma* **183**:10-23
- Atkins CA (1987)** Metabolism and Translocation of Fixed Nitrogen in the Nodulated Legume. *Plant Soil* **100**:157-169
- Atkinson EM, Palcic MM, Hinds Gaul O, Long SR (1994)** Biosynthesis of *Rhizobium meliloti* Lipooligosaccharide Nod Factors: NodA is Required for an N-Acyltransferase Activity. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**:8418-8422
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K (Ed.) (1989)** Current Protocols in Molecular Biology. New York: John Wiley & Sons
- Avonce N (1997)** Identificación de Proteínas con Dominios SH3 en Plantas. Tesis de Maestría, Instituto de Biotecnología-UNAM, Cuernavaca, Mor.
- Baev N, Endre G, Petrovics G, Banfalvi Z, Kondorosi A (1991)** Six Nodulation Genes of *nod* Box Locus 4 in *Rhizobium meliloti* Are Involved in Nodulation Signal Production: *nodM* Codes for D-Glucosamine Synthetase. *Mol Gen Genet* **228**:113-124
- Bakkers J, Semino CE, Stroband H, Kijne JW, Robbins PW (1997)** An Important Developmental Role for Oligosaccharides During Early Embryogenesis of Cyprinid Fish. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**:7982-7986
- Bauer WD (1981)** Infection of Legumes by Rhizobia. *Ann Rev Plant Physiol* **32**:407-449
- Berg JM (1990)** Zinc Finger Domains: Hypotheses and Current Knowledge. *Annu Rev Biophys Chem* **19**:405-421
- Bergman B, Johansson C, Söderbäck E (1992)** The *Nostoc-Gunnnera* symbiosis. *New Phytol.* **122**:379-400

- Bloemberg GV, Kamst E, Harteveld M, van der Drift KMG, Haverkamp J, Thomas-Oates JE, Lugtenberg JJ, Spalink HP (1995)** A Central Domain of *Rhizobium* Node Protein Mediates Host Specificity by Determining the Hydrophobicity of Fatty Acyl Moieties of Nodulation Factors. *Mol Microbiol* **16**:1123-1136
- Bradford MM (1976)** A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Micrograms Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal Biochem* **72**:248-254
- Brewin NJ (1991)** Development of the Legume Root Nodule. *Annu Rev Cell Biol* **7**:191-226
- Campos F, Carsolio C, Kuin H, Bisseling T, Rocha-Sosa M, Sánchez F (1995)** Characterization and Gene Expression of Nodulin Npv30 from Common Bean. *Plant Physiol* **109**:363-370
- Campos F, Carsolio C, Rocha-Sosa M, Padilla JE, Sánchez F (1992)** Gene Expression and Immunological Characterization of Nodulin-30 (Npv-30), a Highly Transcribed Gene in Nodules From Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.). In *New Horizons in Nitrogen Fixation*, ed. R. Palacios, J. Mora, pp. 332. Cancun:KLUWER ACADEMIC
- Campos F, Padilla J, Vázquez M, Ortega JL, Enríquez C, Sánchez F (1987)** Expression of nodule-specific genes in *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Mol Biol* **9**:521-532
- Capote-Mañez N, Sánchez F (1997)** Characterization of the Common Bean Uricase II and Its Expression in Organs Other Than Nodules. *Plant Physiol* (en prensa)
- Cárdenas L, Domínguez J, Santana O, Quinto C (1996)** The Role of the *nodI* and *nodJ* Genes in the Transport of Nod Metabolites in *Rhizobium etli*. *Gene* **173**:183-187
- Cárdenas L, Vidali L, Domínguez J, Pérez H, Sánchez F, Hepler P, Quinto C** Rearrangement of Actin Microfilaments in Plant Root Hairs Responding to *Rhizobium* Nodulation signals. *Plant Physiol* (en prensa)
- Carlson RW, Price NPJ, Stacey G (1994)** The Biosynthesis of Rhizobial Lipo-Oligosaccharide Nodulation Signal Molecules. *Mol Plant-Microbe Interact* **7**:684-695
- Carpita NC, Gibeaut DM (1993)** Structural Models of Primary Cell Walls in Flowering Plants: Consistency of Molecular Structure With the Physical Properties of the Walls During Growth. *Plant J* **3**:1-30
- Carsolio C, Campos F, Sánchez F, Rocha-Sosa M (1994)** The expression of a chimeric *Phaseolus vulgaris* nodulin 30-GUS gene is restricted to the rhizobially infected cells in transgenic *Lotus corniculatus* nodules. *Plant Mol Biol* **26**:1995-2001
- Cheon C-I, Hong Z, Verma DPS (1994)** Nodulin-24 Follows a Novel Pathway for Integration Into the Peribacteroid Membrane in Soybean Root Nodules. *J Biol Chem* **269**:6598-6602
- Cicchetti P, Mayer BJ, Thiel G, Baltimore D (1992)** Identification of a Protein That Binds to the SH3 Region of Abl and Is Similar to Bcr and GAP-rho. *Science* **257**:803-806

- Cicchetti F, Ridley AJ, Zheng Y, Cerlone RA, Baltimore D (1995)** 3 BP-1, an SH3 Domain Binding Protein, Has GAP Activity for Rac and Inhibits Growth Factor-Induced Membrane Ruffling in Fibroblast. *EMBO J* 14:3127-3135
- Coleman JE (1992)** Zinc Proteins: Enzymes, Storage Proteins, Transcription Factors, and Replication Proteins. *Annu Rev Biochem* 61:897-946
- Cook D, Dreyer D, Bonnet D, Howell M, Nony E, VandenBosch K (1995)** Transient Induction of a Peroxidase Gene in *Medicago truncatula* Precedes Infection by *Rhizobium meliloti*. *Plant Cell* 7:43-55
- Cooper JB, Long SR (1994)** Morphogenetic Rescue of *Rhizobium meliloti* Nodulation Mutants by *Trans*-Zeatin Secretion. *The Plant Cell* 6:215-225
- Cren M, Kondorosi A, Kondorosi E (1995)** NodR Controls Expression of the *Rhizobium meliloti* Nodulation Genes Involved in the Core Nod Factor Synthesis. *Mol Microbiol* 15:733-747
- Crespi MD, Jurkevitch E, Polret M, d'Aubenton-Carafa Y, Petrovics G, Kondorosi E, Kondorosi A (1994)** *enod40*, a Gene Expressed During Nodule Organogenesis. Codes for a Non-Translatable RNA Involved in Plant Growth. *EMBO J* 13: 5099-5112
- Day DA, Udvardi MK (1993)** Metabolite Exchange Across Symbiosome Membranes. *Symbiosis* 14:175-189
- Delwiche CC (1981)** El Ciclo del Nitrógeno. En *La Biosfera*, pp. 144-165 Madrid:Scientific American-Alianza Editorial
- Demont N, Debelle F, Aurelle H, Dénarié J, Promé J-C (1993)** Role of the *Rhizobium meliloti nodF* and *nodE* Genes in the Biosynthesis of Lipo-Oligosaccharidic Nodulation Factors. *J Biol Chem* 268:20134-20142
- Dénarié J, Debelle F, Rosenberg C, (1992)** Signaling and Host Range Variation in Nodulation. *Annu Rev Microbiol* 46:497-531
- Dénarié J, Debelle F, Promé J-C (1996)** Rhizobium Lipo-Chitooligosaccharide Nodulation Factor: Signaling Molecules Mediating Recognition and Morphogenesis. *Annu Rev Biochem* 65:503-535
- Dénarié J, Cullimore J (1993)** Lipo-Oligosaccharide Nodulation Factors: A Minireview New Class of Signaling Molecules Mediating Recognition and Morphogenesis. *Cell* 74:951-954
- Deroche M-E, Carrayol E (1989)** Some Properties of Legume Nodule Phosphoenolpyruvate Carboxylase. *Plant Physiol Biochem* 27:379-386
- Dilworth M, Glenn A (1984)** How Does a Legume Nodule Work?. *TIBS* 9:519-523
- Djordjevic MA, Gabriel DW, Rolfe BG (1987).** *Rhizobium*-the Refined Parasite of Legumes. *Ann Rev Phytopathol* 25:145-168

- Downie JA (1994)** Signalling Strategies for Nodulation of Legumes by Rhizobia. *Trends Microbiol* **2**:318-324
- Eberhard S, Doubrava N, Marfà V, Mohnen D, Southwick A, Darvill AG, Albersheim P (1989)** Pectic Cell Wall Fragments Regulate Tobacco Thin-Cell Layer Explant Morphogenesis. *Plant Cell* **1**:747-755
- Ehrhardt DW, Atkinson EM, Long SR (1992)** Depolarization of Alfalfa Root Hair Membrane Potential by *Rhizobium meliloti* Nod Factors. *Science* **256**: 998-1000
- Ehrhardt DW, Wais R, Long SR (1996)** Calcium Spiking in Plant Root Hairs Responding to *Rhizobium* Nodulation Signals. *Cell* **85**:673-681
- Ehrhardt DW, Atkinson EM, Fauli KF, Freedberg DI, Sutherland DP, Armstrong R, Long SR (1995)** *In Vitro* Sulfotransferase Activity of NodH, a Nodulation Protein of *Rhizobium meliloti* Required for Host-Specific Nodulation. *J Bacteriol* **177**:6237-6245
- Es skew DL, Caetano-Anollés G, Bassam BJ, Gresshoff PM (1993)** DNA Amplification Fingerprinting of the *Azolla-Anabaena* symbiosis. *Plant Mol Biol* **21**:363-373
- Felle HH (1994)** Nod Signal-Induced Plasma Membrane Potential Changes in Alfalfa Root Hairs Are Differentially Sensitive to Structural Modifications of the Lipochito-Oligosaccharide. *Plant J* **7**:939-947
- Firmin JL, Wilson KE, Carlson RW, Davies AE, Downie JA (1993)** Resistance to Nodulation of cv. Afghanistan Peas is Overcome by *nodX*, Which Mediates an *O*-Acetylation of the *Rhizobium leguminosarum* Lipo-Oligosaccharide Nodulation Factor. *Mol Microbiol* **10**:351-360
- Fisher RF, Long SR (1992)** *Rhizobium*-Plant Signal Exchange. *Nature* **357**:655-660
- Fortin MG, Morrison NA, Verma DPS (1987)** Nodulin-26, a Peribacteroid Membrane Nodulin, is Expressed Independently of the Development of the Peribacteroid Compartment. *Nucleic Acids Res* **15**:813-824
- Gallagher SR, Leonard RT (1987)** Electroporetic Characterization of a Detergent-Treated Plasma Membrane Fraction from Corn Roots. *Plant Physiol* **83**:265-271
- Gallie DR (1993)** Posttranscriptional Regulation of Gene Expression in Plants. *Annu Rev Plant Mol Biol* **44**: 77-105
- Goethals K, Mergaert P, Gao M, Geelen D, Van Montagu M, Holsters M (1992)** Identification of a New Inducible Nodulation Gene in *Azorhizobium caulinodans*. *Mol Plant-Microbe Interact* **5**:405-411
- Griffith SM, Vance CP (1989)** Aspartate Aminotransferase in Alfalfa Root Nodules: Purification and Partial Characterization. *Plant Physiol* **90**:1622-1629
- Heldstra R, Geurts R, Franssen H, Spaik HP, Van Kammen A, Blazeling T (1994)** Root Hair Deformation Activity of Nodulation Factors and their Fate on *Vicia sativa*. *Plant Physiol* **105**:787-797

- Hershko A, Ciechanover A (1992).** The Ubiquitin System for protein Degradation. *Annu Rev Biochem* **61**:761-807
- Heussen C, Dowdle EB (1980)** Electrophoretic Analysis of Plasminogen Activators in Polyacrylamide Gels Containing Sodium Dodecyl Sulfate and Copolymerized Substrates. *Anal Biochem* **102**:196-202
- Hirsch AM (1992)** Developmental Biology of Legume Nodulation. *New Phytol* **122**:211-237
- Hirsch AM, Bhuvanewari TV, Torrey JG, Bisseling T (1989)** Early Nodulin Genes are Induced in Alfalfa Root Outgrowths Elicited by Auxin Transport Inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**:1244-1248
- Jabbouri S, Fellay R, Talmont F, Kamalaprija P, Burger U, Rellec B, Promé JC, Broughton J (1995)** Involvement of *nodS* in *N*-Methylation and *nodU* in 6-*O*-Carbamoylation of *Rhizobium* sp. NGR234 Nod Factors. *J Biol Chem* **270**:22968-22973
- Jacobs FA, Zhang M, Fortin MG, Verma DPS (1987)** Several nodulins of soybean share structural domains but differ in their subcellular locations. *Nucleic Acids Res* **15**:1271-1280
- Kouchi H, Hata S (1993)** Isolation and Characterization of Novel Nodulin cDNAs Representing Genes Expressed at Early Stages of Soybean Nodule Development. *Mol Gen Genet* **238**:106-119
- Kozak M (1992)** Regulation of Translation in Eukaryotic Systems. *Annu Rev Cell Biol* **8**: 197-225
- Kurkdjian AC (1995)** Role of the Differentiation of Root Epidermal Cells in Nod Factor (From *Rhizobium meliloti*)-Induced Root-Hair Depolarization of *Medicago Sativa*. *Plant Physiol* **107**:783-790
- Lara M, Porta H, Padilla JE, Folch J, Sánchez F (1984)** Heterogeneity of glutamine synthetase polypeptides in *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Physiol* **76**:1019-1023
- Larsen K, Jochimsen BU (1986)** Expression of Nodule-Specific Uricase in Soybean Callus Tissue is Regulated by Oxygen. *EMBO J* **5**:15-19
- Lee JW, Zhang Y, Weaver CD, Shomer NH, Louis CF, Roberts DM (1995)** Phosphorylation of Nodulin 26 on Serine 262 Affects Its Voltage-sensitive Channel Activity in Planar Lipid Bilayers. *J Biol Chem* **270**:27051-27057
- Marfà V, Gollin DJ, Eberhard S, Mohnen D, Darvill A, Albersheim P (1991)** Oligogalacturonides Are Able to Induce Flowers to Form on Tobacco Explants. *Plant J* **1**:217-225
- Marie C, Barny MA, Downie JA (1992)** *Rhizobium leguminosarum* has two Glucosamine Synthases, GlmS and NodM. Required for Nodulation and Development of Nitrogen-Fixing Nodules. *Mol Microbiol* **6**:843-851

- Martínez-Romero E, Segovia L, Martins-Mercante F, Franco AA, Graham P, Pardo MA (1991) *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. Int J Syst Bacteriol 41: 131-135**
- Matvienko M, Van De Sande K, Yang W-C, Van Kammen A, Bisseling T, Franssen H (1994) Comparison of Soybean and Pea ENOD40 cDNA clones Representing Genes Expressed During Both Early and Late Stages of Nodule Development. Plant Mol Biol 26:487-493**
- McKay IA, Djordjevic MA (1993) Production and Excretion of Nod Metabolites by *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii Are Disrupted by the Same Environmental Factors that Reduce Nodulation in the Field. Appl Environ Microbiol 59:3385-3392**
- Mergaer P, D'Haese W, Geelen D, Promé D, Van Montagu M, Geremia R, Promé JC, Holsters M (1995) Biosynthesis of *Azorhizobium caulinodans* Nod Factors. Study of the Activity of the Nod ABCS Proteins by Expression of the Genes in *Escherichia coli*. J Biol Chem 270:29217-29223**
- Miao G-H, Hirel B, Marsolier MC, Ridge RW, Verma DPS (1991) Ammonia-Regulated Expression of a Soybean Gene Encoding Cytosolic Glutamine Synthetase in Transgenic *Lotus corniculatus*. Plant Cell 3:11-22**
- Mulligan JT, Long SR (1989) A Family of Activator Genes Regulates Expression of *Rhizobium meliloti* Nodulation Genes. Genetics 122:7-18**
- Mylona P, Pawlowski K, Bisseling T (1995) Symbiotic Nitrogen Fixation. Plant Cell 7:869-885**
- Nap J-P, Bisseling T (1990) Developmental Biology of a Plant-Prokaryote Symbiosis: The Legume Root Nodule. Science 250:948-954**
- Newcomb EH, Tandon SR (1981) Uninfected Cells of Soybean Root Nodules: Ultrastructure Suggests Key Role in Ureide Production. Science 212:1394-1396**
- Nguyen T, Zelechowska MG, Foster V, Bergmann H, Verma DPS (1985) Primary Structure of the Soybean Nodulin-35 Gene Encoding Nodule Specific Uricase II Localized in Peroxisomes of Uninfected Cells of Soybean. Proc Natl Acad Sci USA 82:5040-5044**
- Olivares JE (1994) Caracterización Bioquímica y Molecular de la Nodulina 30 de *Phaseolus vulgaris*. Tesis de Licenciatura, Fac. Ciencias Agrícolas, Universidad Veracruzana, Xalapa, Ver.**
- Padilla JE, Campos F, Conde V, Lara M, Sánchez F (1987) Nodule-Specific Glutamine Synthetase is Expressed Before the Onset of Nitrogen Fixation in *Phaseolus vulgaris* L. Plant Mol Biol 9:65-74**
- Padilla JE, Miranda J, Sánchez F (1991) Nodulin regulation in common bean nodules induced by bacterial mutants. Mol Plant-Microbe Interact 4:433-439**

- Papadopoulos K, Roussis A, Katinakis P (1996)** *Phaseolus* ENOD40 is Involved in Symbiotic and Non-Symbiotic Organogenetic Processes: Expression During Nodule and Lateral Root Development. *Plant Mol Biol* **30**:403-417
- Pawson T, Schlessinger J (1993)** SH2 and SH3 Domains. *Current Biology* **3**:434-442
- Pennell RI, Knox JP, Scofield GN, Selvendran RR, Roberts K (1989)** A Family of Abundant Plasma Membrane-Associated Glycoproteins Related to the Arabinogalactan Proteins Is Unique to Flowering Plants. *J Cell Biol* **108**: 1967-1977
- Peters NK, Verma DPS (1990)** Phenolic compounds as regulators of gene expression in plant microbe interactions. *Mol Plant-Microbe Interact* **3**:4-8
- Pichon M, Journet E-P, Dedieu A, De Billy F, Truchet G, Barker DG (1992)** *Rhizobium meliloti* Elicits Transient Expression of the Early Nodulin Gene *ENOD12* in the Differentiating Root Epidermis of Transgenic Alfalfa. *Plant Cell* **4**:1199-1211
- Pueppke SG (1996)** The Genetic and Biochemical Basis for Nodulation of Legumes by Rhizobia. *Critical Rev Biotech* **16**:1-51
- Rae AL, Bonfante-Fasolo P, Brewin NJ (1992)** Structure and Growth of Infection Threads in the Legume Symbiosis with *Rhizobium leguminosarum*. *Plant J* **2**: 385-395
- Ren R, Mayer BJ, Cicchetti P, Baltimore D (1993)** Identification of a Ten Amino Acid Proline-Rich SH3 Binding Site. *Science* **259**:1157-1161
- Richter HE, Sandal NN, Marcker KA, Sengupta-Gopalan C (1991)** Characterization and Genomic Organization of a Highly Expressed Late Nodulin Gene Subfamily in Soybeans. *Mol Gen Genet* **229**:445-452
- Rivers RL, Dean RM, Chandy G, Hall JE, Roberts DM, Zeidel ML (1997)** Functional Analysis of Nodulin 26, an Aquaporin in Soybean Root Nodule Symbiosomes. *J Biol Chem* **272**:16256-16261
- Sadowsky MJ, Cregan PB, Götffert M, Sharma A, Gerhold D, Rodriguez-Quinones F, Keyser HH, Hennecke H, Stacey G (1991)** The *Bradyrhizobium japonicum nola* Gene and its Involvement in the Genotype-Specific Nodulation of Soybeans. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**:637-641
- Saler MH, Tam R, Reizer A, Reizer J (1994)** Two Novel Families of Bacterial Membrane Proteins Concerned with Nodulation, Cell Division and Transport. *Mol Microbiol* **11**:841-847
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989)** *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, Ed 2. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY
- Sánchez F, Padilla JE, Pérez H, Lara M (1991)** Control of Nodulin Genes in Root-Nodule Development and Metabolism. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **42**: 507-528
- Sandal NN, Bojsen K, Marcker KA (1987)** A small family of nodule specific genes from soybean. *Nucleic Acids Res* **15**:1507-1519

- Sandal NN, Marcker KA (1988) Soybean Nodulin 26 is Homologous to the Major Intrinsic Protein of the Bovine Lens Fiber Membrane. Nucleic Acids Res 16:9347**
- Scheres B, van de Wiel C, Zalensky A, Horvath B, Spaink H, van Eck H, Zwartkruis F, Wolters A-M, Gloudemans T, van Kammen A, Bisseling T (1990) The ENOD12 Gene Products Is Involved in the Infection Process During the Pea-Rhizobium Interaction. Cell 60:281-294**
- Scheres B, van Engelen F, van der Knaap E, van de Wiel C, van Kammen A, Bisseling T (1990) Sequential Induction of Nodulin Gene Expression in the Developing Pea Nodule. Plant Cell 2:687-700**
- Schmidt J, Röhrling H, John M, Wieneke U, Stacey G, Konec C, Schell J (1993) Alteration of Plant Growth and Development by *Rhizobium nodA* and *nodB* Genes Involved in the Synthesis of Oligosaccharide Signal Molecules. Plant J 4: 651-658**
- Schubert KR (1986) Products of Biological Nitrogen Fixation in Higher Plants: Synthesis, Transport, and Metabolism. Annu Rev Plant Physiol 37:539-574**
- Schwedock JS, Liu CX, Leyh TS, Long SR (1994) *Rhizobium meliloti* NodP and NodQ Form a Multifunctional Sulfate-Activating Complex Requiring GTP for Activity. J Bacteriol 176:7055-7064**
- Schwedock J, Long SR (1990) ATP Sulfurylase Activity of the *nodP* and *nodQ* Gene Products of *Rhizobium meliloti*. Nature 348:644-647**
- Semino CE, Specht CA, Raimondi A, Robbins PW (1996) Homologs of the *Xenopus* Developmental Gene *DG42* Are Present in Zebrafish and Mouse and Are Involved in the Synthesis of Nod-Like Chitin Oligosaccharides During Early Embryogenesis. Proc Natl Acad Sci USA 93:4548-4553**
- Showalter AM (1993) Structure and Function of Plant Cell Wall Proteins. Plant Cell 5:9-23**
- Spaink HP, Wijfjes AHM, van der Drift KMG, Haverkamp J, Thomas-Oates JE, Lugtenberg BJJ (1994) Structural Identification of Metabolites Produced by the NodB and NodC Proteins of *Rhizobium leguminosarum*. Mol Microbiol 13:821-831**
- Struhl K (1989) Helix-Turn-Helix, Zinc-Finger and Lucine-Zipper Motifs for Eukaryotic Transcriptional Regulatory Proteins. TIBS 14:137-140.**
- Suzuki A, Vidal J, Nguyen J, Gadal P (1984) Occurrence of Ferredoxin-Dependent Glutamate Synthase in Plant Cell Fraction of Soybean Root Nodule (*Glycine max*). FEBS Lett 173:204-208**
- Takano E, Maki M, Mori H, Hatanaka M, Marti T, Titani K, Kannagi R, Ooi T, Murachi T (1988) Pig Heart Calpastatin: Identification of Repetitive Domain Structures and Anomalous Behavior in Polyacrylamide Gel Electrophoresis. Biochemistry 27:1964-1972**
- Thummler F, Verma DPS (1987) Nodulin 100 of Soybean is the Subunit of Sucrose Synthase Regulated by the Availability of Free Heme in Nodules. J Biol Chem 262:14730-14736**

- Truchet G, Barker DG, Camut S, deBilly F, Vasse J, Huguet T (1989)** Alfalfa Nodulation in the Absence of *Rhizobium*. *Mol Gen Genet* **219**:65-68
- van de Sande K, Pawlowski K, Czaja I, Wieneke U, Schell J, Schmidt J, Walden R, Matvienko M, Wellink J, van Kammen A, Franssen H, Bisseling T (1996)** Modification of Phytohormone Response by a Peptide Encoded by *ENOD40* of Legumes and a Nonlegume. *Science* **273**:370-373
- van de Wiel C, Scheres B, Franssen H, van Lierop M-J, van Lammeren A, van Kammen A, Bisseling T (1990)** The Early Nodulin Transcripts ENOD2 is Located in the Nodule Parenchyma (Inner Cortex) of Pea and Soybean Root Nodules. *EMBO J* **9**:1-7
- van Brussel AAN, Bakhuizen R, van Spronsen PC, Spaink HP, Tak T, Lugtenberg BJJ, Kijne JW (1992)** Induction of Pre-Infection Thread Structures in the Leguminous Host Plant by Mitogenic Lipo-Oligosaccharides of *Rhizobium*. *Science* **257**:70-72
- Van Spronsen PC, Bakhuizen R, van Brussel AAN, Kijne JW (1994)** Cell Wall Degradation During Infection Thread Formation by the Root Nodule Bacterium *Rhizobium leguminosarum* Is a Two-Step Process. *Eur J Cell Biol* **64**:88-94
- VandenBosch KA, Bradley DJ, Knox JP, Perotto S, Butcher GW, Brewin NJ (1989)** Common Components of the Infection Thread Matrix and the Intercellular Space Identified by Immunocytochemical Analysis of Pea Nodules and Uninfected Roots. *EMBO J* **8**:335-342
- Vázquez M, Santana O, Quinto C (1993)** Contributions of Promoter Context and Structure to Regulated Expression of the F Plasmid *tra Y* Promoter in *Escherichia coli* K-12. *Mol Microbiol* **8**:369-377
- Verma DPS (1992)** Signals in Root Nodule Organogenesis and Endocytosis of *Rhizobium*. *The Plant Cell* **4**:373-382
- Vidali L, Pérez HE, Valdés V, Noguez R, Zamudlo F, Sánchez F (1995)** Purification, Characterization, and cDNA Cloning of Profilin from *Phaseolus vulgaris*. *Plant Physiol* **108**:115-123
- Vierstra RD (1993)** Protein Degradation in Plants. *Annu Rev Plant Mol Biol* **44**:385-410
- Vign I, das Neves L, van Kammen A, Franssen H, Bisseling T (1993)** Nod Factors and Nodulation in Plants. *Science* **260**:1764-1765
- Weaver CD, Shomer NH, Louis CF, Roberts DM (1994)** Nodulin 26, a Nodule-Specific Symbiosome Membrane Protein from Soybean, Is an Ion Channel. *J Biol Chem* **269**:17858-17862
- Wu F-S, Wang M-Y (1984)** Extraction of Proteins for Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis from Protease-Rich Plant Tissues. *Anal Biochem* **139**:100-103
- Yang W-C, de Blank C, Meskiene I, Hirt H, Bakker J, van Kammen A, Franssen H, Bisseling T (1994)** *Rhizobium* Nod Factors Reactivate the Cell Cycle During Infection and Nodule Primordium Formation, But the Cycle is Only Completed in Primordium Formation. *Plant Cell* **6**:1425-1426

- Truchet G, Barker DG, Camut S, deBilly F, Vasse J, Huguet T (1989)** Alfalfa Nodulation in the Absence of *Rhizobium*. *Mol Gen Genet* 219:65-68
- van de Sande K, Pawlowski K, Czaja I, Wieneke U, Schell J, Schmidt J, Walden R, Matvienko M, Wellink J, van Kammen A, Franssen H, Bisseling T (1996)** Modification of Phytohormone Response by a Peptide Encoded by *ENOD40* of Legumes and a Nonlegume. *Science* 273:370-373
- van de Wiel C, Scheres B, Franssen H, van Lierop M-J, van Lammeren A, van Kammen A, Bisseling T (1990)** The Early Nodulin Transcripts *ENOD2* is Located in the Nodule Parenchyma (Inner Cortex) of Pea and Soybean Root Nodules. *EMBO J* 9:1-7
- van Brussel AAN, Bakhuizen R, van Spronsen PC, Spaik HP, Tak T, Lugtenberg BJJ, Kijne JW (1992)** Induction of Pre-Infection Thread Structures in the Leguminous Host Plant by Mitogenic Lipo-Oligosaccharides of *Rhizobium*. *Science* 257:70-72
- Van Spronsen PC, Bakhuizen R, van Brussel AAN, Kijne JW (1994)** Cell Wall Degradation During Infection Thread Formation by the Root Nodule Bacterium *Rhizobium leguminosarum* Is a Two-Step Process. *Eur J Cell Biol* 64:88-94
- VandenBosch KA, Bradley DJ, Knox JP, Perotto S, Butcher GW, Brewin NJ (1989)** Common Components of the Infection Thread Matrix and the Intercellular Space Identified by Immunocytochemical Analysis of Pea Nodules and Uninfected Roots. *EMBO J* 8:335-342
- Vázquez M, Santana O, Quinto C (1993)** Contributions of Promoter Context and Structure to Regulated Expression of the F Plasmid *tra Y* Promoter in *Escherichia coli* K-12. *Mol Microbiol* 8:369-377
- Verma DPS (1992)** Signals in Root Nodule Organogenesis and Endocytosis of *Rhizobium*. *The Plant Cell* 4:373-382
- Vidali L, Pérez HE, Valdés V, Noguez R, Zamudio F, Sánchez F (1995)** Purification, Characterization, and cDNA Cloning of Profilin from *Phaseolus vulgaris*. *Plant Physiol* 108:115-123
- Vierstra RD (1993)** Protein Degradation in Plants. *Annu Rev Plant Mol Biol* 44:385-410
- Vign I, das Neves L, van Kammen A, Franssen H, Bisseling T (1993)** Nod Factors and Nodulation in Plants. *Science* 260:1764-1765
- Weaver CD, Shomer NH, Louis CF, Roberts DM (1994)** Nodulin 26, a Nodule-Specific Symbiosome Membrane Protein from Soybean, Is an Ion Channel. *J Biol Chem* 269: 17858-17862
- Wu F-S, Wang M-Y (1984)** Extraction of Proteins for Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis from Protease-Rich Plant Tissues. *Anal Biochem* 139:100-103
- Yang W-C, de Blank C, Meskiene I, Hirt H, Bakker J, van Kammen A, Franssen H, Bisseling T (1994)** *Rhizobium* Nod Factors Reactivate the Cell Cycle During Infection and Nodule Primordium Formation, But the Cycle is Only Completed in Primordium Formation. *Plant Cell* 6:1425-1426

- Yang WC, Katinakis P, Hendriks F, Smolders A, de Vries F, Spee J, van Kammen A, Bisseling T, Franssen H (1993) Characterization of GmENOD40, a Gene Showing Novel Patterns of Cell-Specific Expression During Soybean Nodule Development. Plant J 3:573-585**
- Yu H, Chen JK, Feng S, Dalgarno DC, Brauer AW, Schreiber SL (1994) Structural Basis for the Binding of Proline-Rich Peptides to SH3 Domains. Cell 76:933-945**
- Zhang Y, Roberts DM (1995) Expression of Soybean Nodulin 26 in Transgenic Tobacco. Targeting to the Vacuolar Membrane and Effects on Floral and Seed Development. Mol Biol Cell 6:109-117**