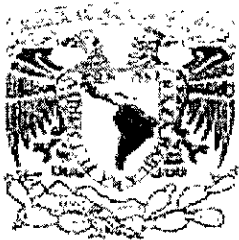


UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA



03088

Análisis de la expresión de actina durante la relación simbiótica entre
Phaseolus vulgaris-Rhizobium

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

EDGAR DANTÁN GONZÁLEZ

DIRECTOR DE TESIS:

DR. FEDERICO E. SÁNCHEZ RODRÍGUEZ

CUERNAVACA, MORELOS

OCTUBRE DEL 2001

03088



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).

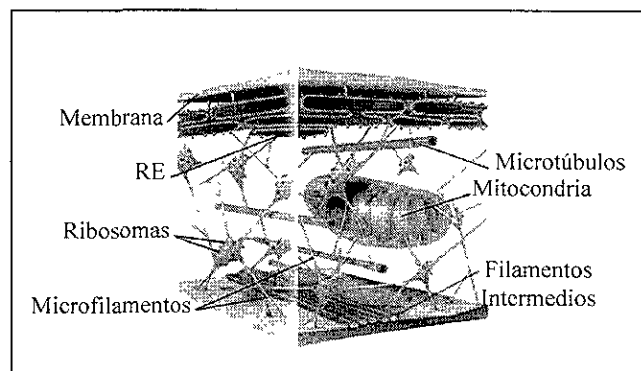
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición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

INDICE	PAGINA
I.-RESUMEN	i
II.-ABSTRACT	ii
III.-INTRODUCCIÓN	1
Citoesqueleto	2
MICROFILAMENTOS DE ACTINA	3
Características biológicas y funciones de la molécula de actina	3
Aspectos evolutivos de la molécula de actina	5
El citoesqueleto de actina en plantas vasculares	5
La familia génica de actina en plantas vasculares	6
Proteínas de unión a actina en plantas vasculares	7
Modificaciones pos-traduccionales de actina	8
UBIQUITINACIÓN, MÁS QUE UN SISTEMA DE DEGRADACIÓN	9
Ubiquitinación del citoesqueleto	10
IV.-JUSTIFICACIÓN	12
Respuesta de los microfilamentos a estímulos externos de la planta	13
Las relaciones simbióticas (Planta-Microorganismos) como modelo De estudio del citoesqueleto	14
V.-OBJETIVOS	17

INTRODUCCIÓN

Citoesqueleto

Las células eucarióticas tienen la capacidad de responder de una forma rápida y coordinada a una gran variedad de estímulos internos y externos. Estas respuestas están frecuentemente mediadas y dirigidas, por un rápido y dramático rearrreglo del citoesqueleto (Barlow and Baluška, 2000). El citoesqueleto está constituido por una red de proteínas formada principalmente por tres tipos de filamentos: microfilamentos o filamentos de actina, microtúbulos o filamentos de tubulina y filamentos intermedios (Fig. 1). Cada tipo de filamento se construye a partir de monómeros que, en combinación con proteínas específicas asociadas a cada uno de ellos, son capaces de realizar múltiples funciones y construir una gran variedad de estructuras celulares. De hecho, el citoesqueleto de una célula puede influenciar al de células vecinas a través de uniones intercelulares, o por su efecto sobre la matriz extracelular. De esta manera, los cambios en la forma y en la polaridad celular se coordinan intra- e inter-celularmente en organismos multicelulares (Alberts *et al.*, 1989).



Tomado de: www.seoulin.co.kr/~virbio/index-cytoskeleton.html

Fig. 1. Esquema que representa la localización de los tres sistemas de filamentos que constituyen al citoesqueleto.

Los microtúbulos miden aproximadamente 20 a 25 nanómetros de diámetro y están constituidos principalmente por heterodímeros de α y β tubulina alineadas en forma helicoidal entre sí. Los microtúbulos participan de manera importante en diversas funciones entre las que se encuentran

la división celular, la movilidad de la célula, el transporte de organelos, así como el mantenimiento de la forma celular.

Los filamentos intermedios tienen un diámetro promedio de ocho a diez nanómetros y están compuestos por un conjunto de proteínas como vimentina, desmina, keratinas, entre otras. La composición específica de los filamentos intermedios varía de acuerdo al tipo celular, sin que se altere su estructura y características bioquímicas. Entre las principales funciones de los filamentos intermedios se encuentra el proporcionar rigidez y mantener la estructura celular, así como ofrecer soporte mecánico a la célula.

Los microfilamentos tienen un diámetro de siete a nueve nanómetros, están constituidos principalmente por actina y están directamente involucrados en distintas formas de movilidad celular (entre las cuales se incluye la contracción muscular), en la citocinesis, las interacciones célula-célula y célula-substrato, la transducción de señales, la localización de componentes celulares, el transporte de organelos y de vesículas y el establecimiento de la morfología celular (Puius *et al.*, 1998). Las estructuras formadas a partir de este tipo de filamentos poseen características bioquímicas y biofísica únicas cuya regulación se encuentra finamente controlada tanto temporal como espacialmente.

MICROFILAMENTOS DE ACTINA

Características biológicas y funcionales de la molécula de actina.

La actina es una de las proteínas más abundantes dentro de la célula eucariótica. Consiste en una sola cadena polipeptídica de aproximadamente 375 residuos de amino ácidos. La actina tiene diferentes estados de organización. Se puede encontrar como actina monomérica (llamada actina G o actina globular), en la que cada monómero se encuentra unido tanto a una molécula de ATP, como a un ion de Mg^{2+} en sitios altamente específicos (fig. 2a) (Sheterline and Sparrow, 1994; Cooper and Schafer, 2000). La actina tiene la propiedad de autoensamblarse para formar polímeros (llamados actina F, filamentos de actina o microfilamentos), los cuales son considerados como la forma funcional de la actina en la célula (Fig. 2b). Distintos elementos

contráctiles y estructurales contienen arreglos de filamentos de actina cuyo ensamblaje se dirige durante procesos de desarrollo y de diferenciación celular (Sheterline and Sparrow, 1994). La naturaleza del citoesqueleto de actina dentro de una célula se modula por varios factores que incluyen diferencias en el pH, concentración de sales o de iones, así como presencia de un amplio rango de proteínas asociadas a este y que son capaces de entrecruzar a los microfilamentos en apretados paquetes o en laxas redes, así como de proteger sus extremos (capping), y de fraccionarlos parcial o completamente (Pollard and Cooper, 1986; Hartwing and Kwiatkowski, 1991).

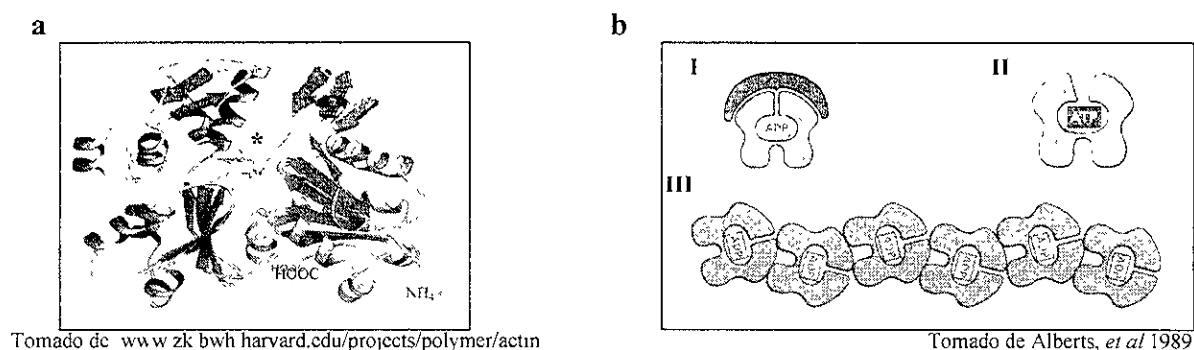


Fig. 2.-a) Modelo de la molécula de actina, las cadenas alfa y betas son indicadas, el asterisco muestra el sitio de unión a ATP y Mg. **b)** Actina monomérica y actina filamentosa. **I** y **II**, muestran los monómeros de actina, actina G, unidos con ADP y una proteína asociada (**I**) o con una molécula de ATP (**II**), **c)** muestra los monómeros auto-ensamblados para la formación de un microfilamento de actina filamentosa o actina F.

El ensamblaje de los microfilamentos se inicia por una reacción favorable de nucleación y se propaga por la adición de subunidades a los extremos del filamento en crecimiento a manera de una hélice lineal, lo que genera una polaridad en la estructura. El proceso de nucleación es limitante, ya que los dímeros de actina no son estables a menos que se adicione un tercer monómero. De hecho, el tamaño del núcleo crítico parece ser justamente el trímero de actina (Mannherz, 1992; Zigmond, 1998).

Ya sea como una molécula monomérica o como un polímero filamentoso, la actina se localiza predominantemente en el citoplasma celular, aunque también se ha detectado su presencia en el núcleo (Sheterline and Sparrow, 1994) y en la matriz extracelular (Ding *et al*, 1996)).

Aspectos evolutivos de la molécula de actina.

La secuencia de amino ácidos y las propiedades bioquímicas de la actina se encuentran conservadas a lo largo de la evolución de los eucariontes (Kabsch and Vandekerckhove, 1992). En organismos multicelulares como las plantas y los animales, la actina generalmente se presenta como una familia génica compleja, y como copias únicas en muchos protistas (Sook *et al.*, 1999).

La actina comparte una historia evolutiva común con proteínas relacionadas a actina (ARPs por sus siglas en inglés). En eucariontes algunas de estas proteínas han sido identificadas en diversos phyla indicando que, como la actina, se generaron por eventos de duplicación génica que se produjeron en un punto próximo a la divergencia entre procariontes y eucariontes. Las relaciones evolutivas entre las ARPs y la actina no son claras. Sin embargo, los análisis filogenéticos llevados a cabo, indican que tanto las ARPs como la actina divergieron a partir de un ancestro común antes de la separación de los principales grupos de eucariontes, y que las características comunes en cada una de ellas han sido retenidas (Mullins *et al.*, 1996; Ressad, *et al.* 1999). Recientemente, se ha demostrado que el ancestro común de la actina esta presente en los organismos procariontes (van den Ent *et al.*, 2001).

El citoesqueleto de actina en plantas vasculares.

Si bien es cierto que la mayor información sobre la función y la regulación del citoesqueleto se ha obtenido a partir de estudios llevados a cabo en sistemas animales, en las células vegetales igualmente se han identificado muchos de los componentes y funciones del citoesqueleto de actina (Vahey and Scordilis, 1980; McLean *et al.*, 1990a; Villanueva *et al.*, 1990; Liu and Yen, 1992), tubulina (Lloyd *et al.*, 1979; Yadav and Filner, 1983) y de los filamentos intermedios en células animales (Beven *et al.*, 1991; McNulty and Saunders, 1992; Mínguez and Moreno, 1993; Yu and Moreno, 1999).

En distintos sistemas vegetales, se ha demostrado que la actina participa en las corrientes citoplásmicas, en el movimiento de cloroplastos, en la forma y en la determinación del plano de

división celular, en la graviperecepción en estocitos, en el crecimiento de extremos de células especializadas. Así, por ejemplo, la actina juega un papel importante en la germinación de tubos polínicos, en la formación de tricomas y pelos radiculares, en la citocinesis; en el mantenimiento de la arquitectura celular; en la deposición y el engrosamiento diferencial de la pared celular como ocurre en los elementos de las traqueidas; y en el transporte y en el movimiento de organelos (Meagher, 1991). La actina también participa activamente en el movimiento flagelar en las algas verdes y podría estar involucrada en el movimiento flagelar de células germinales en plantas vasculares primitivas (Meagher, 1991; Schmidt and Hall, 1998; Barlow and Baluška, 2000).

El gran número e importancia de las funciones celulares llevadas a cabo por la actina en células vegetales sugiere la existencia de diversos mecanismos de control. Algunos ejemplos son: la expresión diferencial de isoformas durante el desarrollo del nódulo en *Phaseolus vulgaris* (Pérez *et al.*, 1994), la distribución preferencial de las isoformas, λ y μ en el primordio y el protodermo de raíces apicales y laterales (McLean *et al.*, 1990a), la fosforilación durante la germinación de esporas en *Dictyostelium* (Gauthier *et al.*, 1997) y la modulación por iones de calcio y moléculas de señalización de naturaleza lipídica, que se propone actúan sobre distintas proteínas de unión a actina (Grabski *et al.*, 1998), entre otros.

La familia génica de actina en plantas vasculares.

En plantas vasculares la actina, al igual que en organismos animales, se encuentra codificada por familias multigénicas. El número mínimo de las secuencias génicas entre las familias parece ser mayor de diez (Meagher and McLean, 1990). La secuencia de amino ácidos deducida a partir de numerosos genes de actina en angiospermas, señala que esta proteína se encuentra conservada con respecto a las actinas de otros reinos (animales, hongos o protistas) compartiendo 310 de los 376 amino ácidos. Lo anterior se refleja en los perfiles hidropáticos comparados entre actinas pertenecientes a distintos grupos filogenéticos que resultan prácticamente indistinguibles (Hightower and Meagher, 1986).

Sin embargo en plantas vasculares, la comparación de las secuencias de actina que comprenden a una familia génica sugiere que la diversidad de sus miembros es mucho mayor si se compara con la diversidad existente entre especies altamente divergentes en animales (McCurdy and Williamson, 1991). Por ejemplo, en soya (*Glycine max*), entre las tres clases de actina identificadas se presentan de 8 a 14 diferencias en residuos cargados, mientras que en las secuencias que codifican para la actina en organismos animales no hay más de tres substituciones (Meagher, 1991).

Aunque las funciones precisas de las diferentes isoformas de actina en angiospermas no se han determinado, se propone que estas variantes juegan papeles específicos dentro de la célula e interactúan con distintos componentes del citoesqueleto vegetal. Distintos estudios han demostrado que la expresión de algunos de los genes que codifican para las diversas isovariantes de actina en plantas vasculares presentan patrones temporales y espaciales específicos (An *et al.*, 1996; Huang *et al.*, 1996 a y b; McDowell *et al.*, 1996; Huang *et al.*, 1997). Sin embargo, la expresión de muchos de ellos se sobrelapa considerablemente (Meagher *et al.*, 1999). Se propone que la combinación de distintos tipos de actinas co-expresados en el mismo tipo celular intervienen en procesos que son necesarios para la rápida respuesta de las células vegetales a señales internas y externas (Meagher *et al.*, 1999). Sin embargo, en *Arabidopsis* la expresión y regulación de sólo una isoforma de actina está regulada por la presencia de auxinas (Muthugapatti *et al.* 2001)).

Proteínas de unión a actina en plantas vasculares.

En los sistemas vegetal y animal, tanto la actina G como la actina F son capaces de interactuar con un grupo de proteínas que, en conjunto, modulan el comportamiento del citoesqueleto de actina, provocando cambios en la arquitectura celular.

El alineamiento de diversas secuencias que codifican para actina en angiospermas revela la presencia de regiones de aminoácidos conservadas entre plantas y animales. Dichas regiones frecuentemente coinciden con aquellas propuestas como sitios de interacción actina-actina o bien, con sitios de interacción actina-ABPs (McElroy *et al.*, 1990).

La mayoría de los estudios llevados a cabo sobre la caracterización de proteínas de unión a actina en angiospermas, a nivel bioquímico y molecular, se han enfocado a la profilina y al factor despolimerizante de actina. En ambos casos, se ha demostrado que dichas proteínas funcionan *in vitro* de una manera similar a sus contrapartes en hongos y animales (Gibbon *et al.*, 1997; Jiang *et al.*, 1997a y b; Staiger *et al.*, 1997; Theriot, 1997; Ballweber *et al.*, 1998; Didry *et al.*, 1998; Gibbon *et al.*, 1998). Sin embargo, la complejidad de la familia génica que codifica ya sea para profilina o para ADF, al igual que la familia génica de actina en plantas vasculares, supera el número de miembros con respecto a organismos animales (Gibbon *et al.*, 1997; Huang *et al.*, 1996b; Staiger *et al.*, 1997; Gibbon *et al.*, 1998). Este hecho, aunado a las diferencias bioquímicas existentes entre las distintas isoformas y al patrón de expresión diferencial específico de tejido (Staiger *et al.*, 1993; Huang *et al.*, 1996b; Gibbon *et al.*, 1997; Jiang *et al.*, 1997a y b; Staiger *et al.*, 1997; Didry *et al.*, 1998; Gibbon *et al.*, 1998; Guillén *et al.*, 1999; Meagher *et al.*, 1999), han llevado a proponer que la expresión simultánea de isovariantes de actina y de ABPs pudiera resultar en un eficiente complejo que favorece la rápida respuesta del sistema ante una gran variedad de estímulos ambientales (Meagher *et al.*, 1999; Staiger, 2000).

Modificaciones pos-traduccionales de actina.

Como respuesta a diferentes fenómenos y eventos celulares, en sistemas animales, la actina puede ser regulada por modificaciones postraduccionales, como fosforilación y ubiquitinación entre otras. La fosforilación de actina en *Dictyostelium* se ha relacionado con la reorganización del citoesqueleto durante la germinación de las esporas (Gauthier *et al.*, 1997) en los sistemas vegetales se ha detectado la fosforilación de actina como parte fundamental para el movimiento contractil de hojas en *Mimosa pudica* (Kameyama *et al.*; 2000). Por otra parte, Ball *et al* 1987, reporta la presencia de artrina, una forma estable de actina ubiquitinada, en el músculo de vuelo de *Drosophila*, pero la función de esta modificación no ha sido determinada. En sistemas vegetales no existe ningún reporte previo de ubiquitinación de actina.

Ubiquitinación, más que un sistema de degradación.

La ubiquitina, es una proteína globular de aproximadamente 79 aminoácidos (~ 9.5 kDa), que se encuentra altamente conservada a lo largo de la evolución en todos los sistemas eucarióticos, con sólo tres diferencias a nivel de aminoácidos, entre la ubiquitina de humano y la ubiquitina de levadura (Fedorova *et al*, 1998). La ubiquitina forma conjugados covalentes (ubiquitinación) con proteínas que juegan papeles importantes en la regulación de diferentes procesos vitales o para la célula (Joazeiro and Hunter, 2000). La ubiquitinación se lleva a cabo a través de uniones isopeptídicas de su extremo carboxilo (Glicina 76) con el grupo ϵ de una lisina de la proteína blanco (Trausch *et al*, 1993). Basándose en el número y localización de moléculas de ubiquitina que se unen a las proteínas; se han determinado dos tipos de ubiquitinación, poliubiquitinación y monoubiquitinación (Hicke, 2001) (fig. 3).

La poliubiquitinación de proteínas se lleva a cabo por la formación de múltiples cadenas de ubiquitina, donde la Glicina 79 de una segunda ubiquitina se une a la Lisina 48 de la primera ubiquitina. La poliubiquitinación es la modificación por ubiquitina más común y mejor documentada, se lleva a cabo en proteínas normales o anormales, dañadas o con un plegado defectuoso, para ser degradadas por el sistema de proteosoma, en un proceso dependiente de ATP (Fig. 4). Independientemente de la degradación por medio del sistema de proteosoma, proteínas poliubiquitinadas, también son degradadas en vacuolas y/o en lisosomas (Lenk and Sommer, 2000; Weissman, 2001). La degradación de proteínas dependiente de ubiquitina es un mecanismo de regulación para diversos eventos celulares como regulación del ciclo celular, en la biogenesis de organelos, apoptosis, regulación en la proliferación celular, reparación del ADN y respuesta a estrés, entre otras funciones (Joazeiro and Hunter, 2000; Neish *et al*, 2000; Kokame *et al*, 2000; Harris *et al*, 1999).

Lo monoubiquitinación de proteínas es la unión de una o algunas moléculas de ubiquitina a lo largo de la proteína blanco, sin llegar a formarse cadenas largas. Hasta hace muy poco las funciones de esta modificación no habían sido descritas, lo que era evidente es que no se trataba, como en el caso de la multiubiquitinación, de un sistema de regulación por degradación de

JUSTIFICACIÓN

Respuesta de los microfilamentos a estímulos externos de la planta.

La dinámica red conformada por distintos elementos del citoesqueleto en células eucariotas reorganiza continuamente la arquitectura citoplásmica en respuesta a una gran variedad de estímulos tanto internos como externos. En párrafos anteriores se ha mencionado el papel de la actina en el establecimiento de la polaridad celular, en la determinación del plano de división, en la elongación y la deposición de la pared celular, entre otros. Como organismos sésiles, las plantas vasculares tienen que contener con un gran número de condiciones climáticas adversas, las cuales incluyen diversos tipos de estrés abiótico como el frío, la sequía y daños por luz ultravioleta. Así mismo, interactúan con patógenos y organismos simbióticos. Para contener con el ataque o promover la interacción de los microorganismos, las plantas han desarrollado la habilidad de detectar a los microorganismos o a las moléculas secretadas por estos (elicitores) (Spaink, 2000; Downie and Walker, 1999). La percepción de estas moléculas va seguida de una transducción de señales que da como resultado una respuesta de defensa la cual implica diversos eventos, como la generación de especies reactivas de oxígeno (lo que se conoce como “explosión oxidativa”), la síntesis de fitoalexinas, expresión de genes que codifican para proteínas relacionadas a patógenos, división celular, muerte celular programada, síntesis de fitohormonas, deposición de la pared celular, movimiento y organización de organelos, entre otros (Romeis, 2001). Todos estos eventos están mediados por una intrincada cascada de eventos regulatorios, directamente o indirectamente relacionados con el equilibrio existente entre actina G y la actina F dentro de la célula (Draamsim and Cossart, 1998).

El fenómeno de polimerización y despolimerización de los microfilamentos de actina, juega un papel determinante en el dinamismo y la capacidad de respuesta de las células vegetales ante diferentes tipos de infecciones (revisado por Staiger 2000). Los rearrreglos de los microfilamentos de las células vegetales ante la presencia de diferentes microorganismos, ocurren inclusive aún antes del contacto de éste con la célula hospedera. En diferentes trabajos se ha reportado que la primera respuesta de las células vegetales ante la presencia de los hongos, es la polimerización de actina en el sitio de contacto del hongo con la célula hospedera, así como

la modificación del citoesqueleto vegetal 3 ó 4 horas antes de la penetración del patógeno, deduciendo que existen moléculas o elicitores que la planta detecta aún antes de la infección (Staiger 2000).

Las relaciones simbióticas (Planta-Microorganismo) como modelo de estudio del citoesqueleto

Las primeras etapas de la interacción entre la planta hospedera y el patógeno van acompañadas de la producción de señales, las que inducen una respuesta en cada uno de los organismos involucrados (Grant and Mansfield 1999). Este proceso implica la interacción entre una molécula señal del patógeno y un putativo receptor de la planta. Este reconocimiento es seguido por una cascada de transducción de señales que da como resultado diversas respuestas de defensa en la planta, incluyendo el movimiento de organelos y del núcleo hacia el sitio de ataque del patógeno, posicionamiento de la pared celular, elevación de los niveles de calcio intracelular, división celular y formación de nuevos órganos (Spaink, 2000).

Las plantas leguminosas, como el frijol (*Phaseolus vulgaris*), establecen una relación simbiótica con bacterias fijadoras de nitrógeno del género *Rhizobium*. Las raíces de la planta son infectadas con la bacteria induciendo la formación de un nuevo órgano denominado, nódulo simbiótico (Sánchez *et al*, 1991; Broughton *et al*, 2000). Las bacterias se encuentran dentro de los nódulos envueltas en una membrana derivada de las células de la planta, estas estructuras son conocidas como simbiosomas (Verma *et al*, 1978). Durante las primeras etapas de esta asociación, las moléculas señal son sintetizadas por la bacteria y son esenciales para el inicio de la respuesta morfogénica y organogénica en la planta hospedera apropiada que culmina con la formación del nódulo simbiótico (Spaink, 2000) (Fig. 5). Estas moléculas son llamadas “factores de nodulación” (Factores Nod), los cuales son lipoquitooligosacaridos decorados, cuya estructura es especie dependiente y contribuye a la especificidad del hospedero (Long, 2001; Schultze and Kondorosi, 1998).

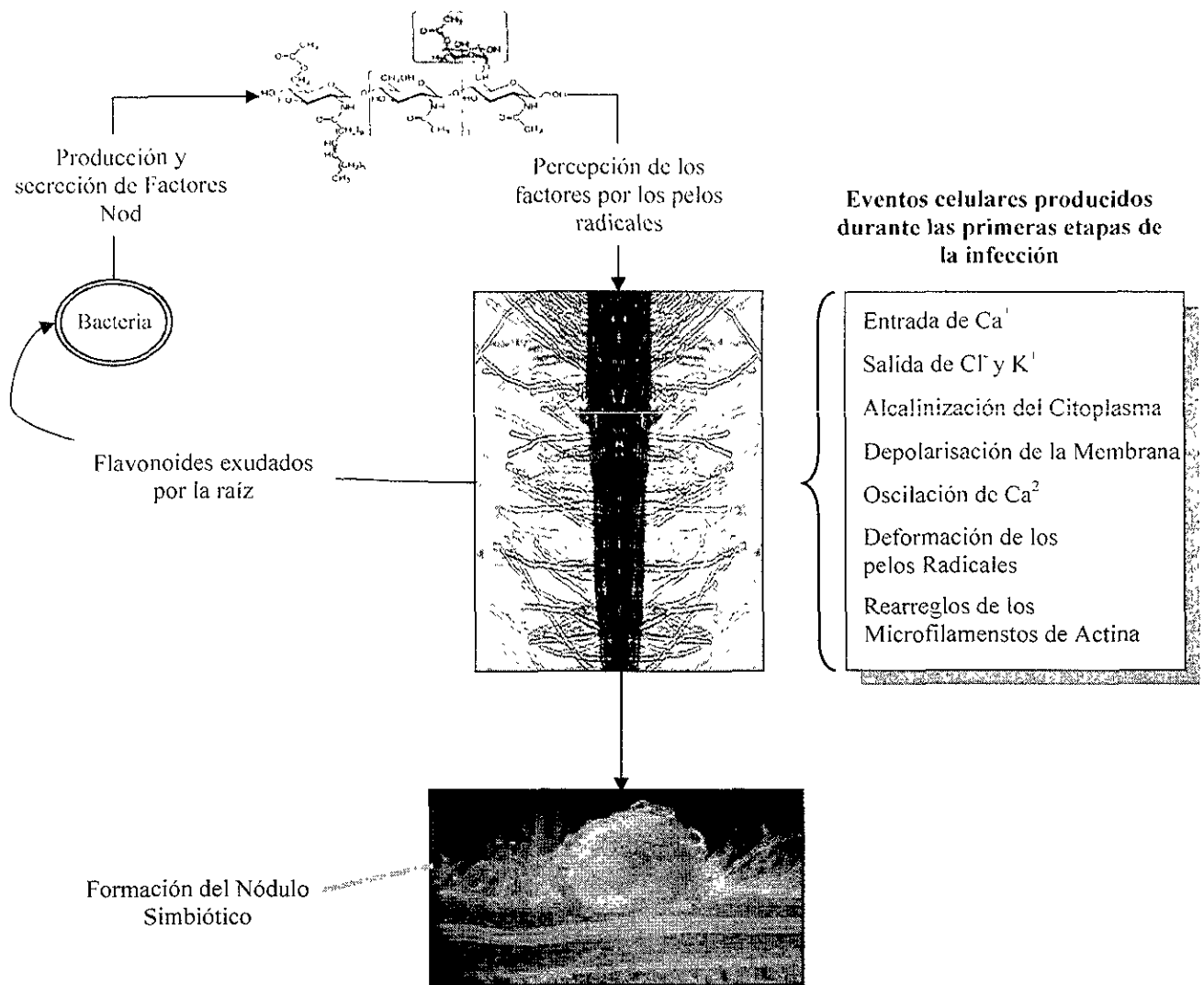


Fig 5.-Esquema de los eventos moleculares y celulares durante las primeras etapas de la formación del nódulo simbiótico

El citoesqueleto vegetal juega un papel importante para el principio del desarrollo y el mantenimiento del nódulo simbiótico, así como para el crecimiento, deformación y polaridad del pelo radicular (Schultze and Kondorosi, 1998). La actividad del citoesqueleto de actina se da desde las primeras etapas de la morfogénesis del nódulo, participando en la formación del hilo de pre-infección y la división de las células corticales. Cárdenas *et al* en 1998, mostraron que los Factores Nod inducen procesos que modifican substancialmente los microfilamentos de actina en los pelos radiculares de *Phaseolus vulgaris*. Estos cambios se caracterizan por una dramática fragmentación de los cables de actina presentes en los pelos radiculares, estos son rápidamente

reducidos a filamentos cortos en los primeros cinco minutos de contacto con los Factores Nod, recuperando su forma de 15 a 30 minutos después.

La diversidad de funciones de los microfilamentos de actina, así como su capacidad para responder a la interacción con microorganismos, está dada principalmente por una regulación de la expresión diferencial de las isoformas de actina (Meagher *et al*, 2001). En otros sistemas simbióticos, se ha reportado la expresión diferencial de isoformas de actina, en particular durante la relación simbiótica existente entre las raíces de *Pinus sylvestris* con el basidiomiceto *Suillus bovinus*, la expresión de las isoformas de actina es regulada con la formación de ectomicorrizas, modulando tanto el número de isoformas como los niveles de expresión de las mismas en las raíces de la planta (Niini *et al* 1996). En este mismo sentido, estudios previos en el laboratorio, Pérez *et al* 1994, demostraron que en ensayos de purificación de actina vegetal en *Phaseolus vulgaris*, se presentaba una expresión diferencial de las isoformas de actina en los nódulos. La presencia de un patrón de expresión diferencial de las isoformas de actina durante el establecimiento de una relación simbiótica, nos hace suponer que existe una regulación de las isoformas de actina de un tejido a otro, durante la formación del nódulo o bien, como consecuencia de la presencia de la bacteria. Este patrón podría estar regulado a nivel transcripcional o bien a nivel postraduccional.

Como se comentó anteriormente, el citoesqueleto vegetal responde a una gran variedad de estímulos, que incluso pueden determinar diferentes niveles de expresión y/o inducir diversas modificaciones postraduccionales de la actina. En este trabajo se planteó el objetivo de entender como es la regulación y el patrón de expresión de actina durante la formación del nódulo simbiótico, a lo largo de la interacción establecida por *Phaseolus vulgaris* y la bacteria fijadora de nitrógeno del género *Rhizobium etli*.

OBJETIVO GENERAL

Determinar los diferentes niveles de regulación y la posible expresión de la actina durante la relación simbiótica entre *Phaseolus vulgaris* y *Rhizobium*.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar el patrón de expresión diferencial de las isoformas de actina en *Phaseolus vulgaris* durante la organogénesis del nódulo simbiótico.
- Caracterizar la posible respuesta de los microfilamentos de actina vegetal ante la presencia de un microorganismo.

Los datos principales de este trabajo fueron reportados y publicados en la revista “*Molecular Plant Microbe Interactions*”, aquí se presenta el artículo y un anexo de resultados no reportados en dicho artículo.

Actin monoubiquitylation is induced in plants in response to pathogens and symbionts.

Edgai Dantán-González¹, Yvonne Rosenstein², Carmen Quinto¹ and Federico Sánchez¹

¹ Departamento de Biología Molecular de Plantas, Instituto de Biotecnología, UNAM, Apartado Postal 510-3, Cuernavaca Morelos 62271, México.

² Departamento de Genética y Fisiología Molecular, Instituto de Biotecnología, UNAM, Apartado Postal 510-3, Cuernavaca Morelos 62271, México.

Keywords: cortical cytoskeleton, microfilaments stabilization, oxidative burst.

Correspondence and request for material should be addressed to Federico Sánchez. (federico@ibt.unam.mx).

Most dramatic examples of actin reorganization have been described during host-microbe interactions. Plasticity of actin is in part due to post-translational modifications such as phosphorylation or ubiquitylation. Here, we show for the first time, that actins found in root nodules of *Phaseolus vulgaris* are modified transiently during nodule development by monoubiquitylation. This finding was extended to root nodules of other legumes and to other plants infected with mycorrhiza or plant pathogens such as *Pseudomonas* and *Phytophthora*. However, neither viral infections nor diverse stressful conditions (heat shock, wounding, or osmotic stress) induced this response. Additionally, this phenomenon was mimicked by the addition of a yeast elicitor or H₂O₂ to *Phaseolus vulgaris* suspension culture cells. This modification seems to provide increased stability of the microfilaments to proteolytic degradation, and to be found in fractions where the actin cytoskeleton is associated to membranes. All together these data suggest that actin monoubiquitylation may be considered as an effector mechanism of a general plant response against microbes.

INTRODUCTION

Plants initiate various defense responses when attacked by microbes such as fungi and bacteria. Whereas some of these defense mechanisms are induced only after pathogen attack, others are preformed and constitute generalized physical and physiological barriers that hinder pathogen infection. Similar to animal immune responses, following pathogen infection, plant responses to microbes involve a network of signal transduction pathways leading to regulation of gene expression (Yang et al, 1997). Pathogen recognition at the site of infection initiates rapid signaling processes that activate multicomponent defense responses both, at local and systemic levels (Cohn et al, 2001; Grant et al, 1999; Scheel, 1998; McDowell and Dangel, 2000). Similar responses can be triggered by elicitor molecules derived from various fungi or bacteria or from proteins secreted by various microorganisms. The generation of a response to a given stimulus is thought to require three main events: stimulus perception, generation and transmission of a signal, and subsequent changes in downstream biochemical processes (Yamaguchi et al, 2000).

The directed movement of vesicles and of the nucleus towards the site of infection, the formation of wall appositions, elevation of cytosolic calcium levels (Cardenas et al, 1999; van der Luit et al, 2000), the induction of phytohormone synthesis (Møller and Chua, 1999), cell division, formation of new organs, oxidative burst response (Sandermann, 2000), and reorganization of the actin cytoskeleton (Staiger, 2000) are only a few examples of the response a plant can generate after pathogen recognition.

The actin cytoskeleton forms a dynamic network, which reorganizes rapidly in response to a variety of stimuli (Staiger, 2000). In eukaryotic cells -actin exists both- in a polymeric, filamentous (F) and monomeric, globular (G) forms. Alterations in the balance of monomeric and polymerized actin results in changes in cell shape, movement and polarity. In plants, F-actin is considered to provide the driving force for cytoplasmic streaming as well as to constitute the molecular railroad tracks upon which vesicle transport occurs (Schmidt and Hall, 1998). Treatment of barley coleoptile cells with microfilament inhibitors has been shown to suppress the overall polarized defense-related reactions beneath *Erysiphe pisi* developing appressoria, suggesting that the cytoskeleton might play an important role in directing of certain defense-related compounds and/or organelles (Kobayashi, 1997). On the other hand, Cardenas et al 1998, showed that Nod factors appear to induce a rapid and reversible fragmentation in the actin cytoskeleton in *Phaseolus vulgaris* root hair cells, and these events may be a necessary prelude for the formation of infection threads by Rhizobia.

Rearrangements of actin microfilaments are coordinated and regulated by a plethora of actin regulatory binding proteins (Puius et al, 1998), the functions of which may be controlled by numerous signals including Ca⁺, phosphoinositides, pH, or reversible phosphorylation (Schmidt and Hall, 1998; Kameyama et al, 2000). In animal systems, rearrangements of the actin cytoskeleton may also result of posttranslational modifications such as methylation, phosphorylation, or ubiquitin conjugate formation (Kalhor et al, 1999; Gauthier et al, 1997; Ball et al, 1987).

Recently, polypeptide tags have emerged as important post-translational regulators of

protein function in plants (Vierstra and Callis, 1999). Ubiquitin is one of the most conserved proteins identified to date. Amino acid sequences are identical among all higher-plant species examined and differ only by one, two or three amino acid substitutions from *Chlamydomonas*, yeast, and mammalian ubiquitin sequence respectively. Degradation of proteins by the ubiquitin system starts by tagging polypeptides through isopeptide bonds linking the carboxy-terminal glycine 76 of ubiquitin to the ϵ -amino group of select lysine residues of the protein substrate (Jentsch and Pyrowolakis, 2000). In plants, proteolysis by the ubiquitin/proteasome pathway has also been proposed to play an important role in various fundamental biological processes such as hormone responses, light perception, environmental adaptation, and floral development (Gray and Estelle, 2000; Callis and Vierstra, 2000). Contrary to polyubiquitylation that tags proteins for degradation, stable monoubiquitin or ubiquitin-like adducts such as those found in nuclear histones, receptors and arthrin (a stable actin form from *Drosophila* flight muscle), confers stability and differential subcellular localization to proteins albeit that the physiological significance of this is not yet fully understood (Hicke, 2001; Robzyk et al, 2000; Shih et al, 2000; Trausch et al, 1993; Ball et al, 1987).

Here, we show for the first time that in plants, actin filaments are stabilized by monoubiquitylation tagging. In addition to its induction in root-nodules, this modification of actin molecules was also triggered in all other plant tissues tested, when plants were infected with various pathogens and symbionts. Furthermore, neither viral infections, nor diverse stressful conditions triggered this response, suggesting that actin monoubiquitylation may be part of a plant innate immune response specifically directed against bacterial and fungi or related signaling metabolites. This was further supported by the fact that adding elicitors or H_2O_2 to suspension culture cells, also induced this actin modification.

RESULTS

Differential expression of actin isoforms during root-nodule development.

In plants, actin isoforms are temporally and/or spatially regulated during diverse organogenic processes (McLean et al, 1990; Barlow and Baluška, 2000). The symbiotic interaction between *Rhizobium* and legume roots leads to the formation of a new organ: the root-nodule (Spaink, 2000). In order to identify root and root-nodule specific developmental markers, actin-isoforms were analysed by two-dimensional immunoblotting in *Phaseolus vulgaris* protein extracts. Interestingly, the pattern of actin isoforms, as detected by the anti-actin monoclonal antibody (mAb) N-350, was different in root and root-nodules. Three actin isoforms were identified in extracts from 10-day roots, while up to six

isoforms were detected in root-nodules obtained 10-25 days after inoculation (*dat*, Fig. 1). Three of the isoforms were common to both organs (5.5, 5.6 and 5.7 pI), while the other three (5.3, 5.4 and 5.8 pI) were specific of root-nodule, and were transiently expressed. In senescent root-nodules (27 *dat*), where nitrogen fixation activity ceases, the actin isoform pattern was identical to that of roots. These data suggested that the novel actin isoforms that we identified, participate in root-nodule development and/or nitrogen fixation.

Root-nodule actin is modified by covalent bound ubiquitin.

Surprisingly, the anti-actin mAb N-350 recognized several proteins of relative molecular mass $\sim 63,000$ ($M_r \sim 63$ kDa). The isoelectric points of these were comprised within the same range as the 42 kDa actin isoforms. (Fig.1). To eliminate possible artefacts, immunopurified N-350 mAb and three additional antibodies that have been reported to cross-react with plant actin (Villanueva et al, 1999) were tested. Consistently, all anti-actin antibodies recognized the same actin and the same 63 kDa protein isoforms (data not shown).

The fact that the 63 kDa proteins recognized by the anti-actin mAbs had a similar isoelectric pattern than 42 kDa actin, that these proteins had a mass difference of 20K with 42 kDa actin isoforms, even under reducing conditions, suggested to us that they could be a covalent modification of actin. Covalent tagging with monoubiquitin has been demonstrated for arthrin, a form of actin specific of *Drosophila* flight muscle (Ball et al, 1987). We investigated this possibility. All 63 kDa proteins were indeed recognized by both anti-actin and anti-ubiquitin antibodies (Fig. 2 A,B). Since ubiquitin monomers have a molecular mass of 8.5 kDa, the 20 kDa difference between the 42 kDa actin and the 63 kDa isoforms could result of the binding of two ubiquitin molecules to each actin isoform, a modification known as monoubiquitylation (Hicke, 2001). Interestingly, this modification was a transient event during nodule organogenesis, correlating with the time of maximum metabolic activity (Fig. 1).

Actin-ubiquitylation is not associated to developmental or nitrogen fixation process.

Root-nodules are organs where robust cell division and expansion take place (Spaink, 2000). In order to determine if actin-ubiquitylated isoforms were characteristic of growth-developmental processes, different *P. vulgaris* organs were analysed. Ubiquitylation of actin was absent in leaves, roots, shoot, floral or root meristematic zones, but present in root-nodules (Fig. 2C). These data suggested that in *P. vulgaris*, actin-ubiquitylation is a root-nodule specific phenomenon, apparently unrelated to other plant vegetative growth and developmental processes. Even more, actin modification is exclusively found in root-nodules of *-Glycine*

max, *Lotus japonicus* and *Medicago sativa*- and not in other organs (Fig. 2D). All together this data suggested that actin-ubiquitylation might be important for the development of the root-nodule or for the nitrogen fixation process.

In order to discriminate between these two possibilities, *P. vulgaris* root-nodules were induced with wild type *Rhizobium etli* (CFN3), and two different isogenic ineffective strains (CFN4202), and IFC01 strains (Tabche et al. 1998). As previously reported (Soberón et al. 1993), in CFN4202 mutant-induced nodules the infection seemed to proceed up to a certain point, however, the nodule lacked bacteroids, while in IFC01 induced nodules, bacteria readily differentiated into the intracellular form. In root-nodules lacking bacteroids, the ubiquitylated form of actin was absent (Figure 2D lane 11), as opposed to root-nodules induced with the wild-type and non-fixing IFC01 strain (Fig. 2D, lanes 10, 12, respectively), suggesting that this phenomenon is probably more related to the presence of the bacteria in the nodule, than to the nitrogen fixation process.

Actin-ubiquitylation is specific of plant-bacterial and fungal interactions, and it is not a response to stressful abiotic conditions.

The establishment of symbiosis of *Rhizobium* with *P. vulgaris* can be considered as a stressful situation for the plant. To test the possibility that actin-ubiquitylation might reflect a response to stress, bean plants were exposed to various stressful conditions and were analysed for the presence of the actin-ubiquitin conjugate. As shown in Fig. 3A, none of the conditions tested, osmotic shock, wound, or darkness resulted in ubiquitylation of actin isoforms.

The possibility that actin ubiquitylation could be related to the infective process was further evaluated. Total protein extracts from several tissues were obtained from different species of plants infected with fungi, bacteria or virus and screened for ubiquitin-modified actin by immunoblotting. Interestingly, actin ubiquitylation was not exclusive of *Rhizobium* infection. The 63 kDa actin isoform was consistently detected in plants infected with fungi (*Phytophthora capsici* or *Glomus interadians*) or pathogenic bacteria (*Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*), but in none of the plants infected with tobacco mosaic virus (TMV) (Fig. 3B). Additionally, *P. vulgaris* suspension cells were infected with *Pseudomonas s. pv. tabaci*, treated with yeast elicitor, given a heat shock or an oxidative burst (H₂O₂). Ubiquitin-conjugated actin was detected only when cells were exposed to *Pseudomonas s. pv. tabaci*, yeast elicitor or H₂O₂, but not in response to heat shock (Fig. 3C).

Bacteria and fungi, but not viruses, produce signalling molecules (Nod factors and elicitors) that have been shown to induce host plant responses such as rearrangements and polarization of the actin cytoskeleton (Staiger,

2000; Cárdenas et al. 1998; Kobayashi, 1997). Ubiquitylation of actin was only induced when *P. vulgaris* roots were treated with a yeast elicitor but not with nodulation factors (Nod factors) from

Rhizobium etli, even at 10⁻⁶ M, a much higher concentration than that used to trigger the formation of nodule-like structures in bean roots (10⁻⁸ M) (Cárdenas et al. 1995) (Fig. 3D). This suggests that specific bacterial molecules (elicitors) but not Nod factors are required to trigger the actin ubiquitylation response in root-nodules.

Monoubiquitylation is not a tag for actin degradation.

Ubiquitin has been associated to the proteasome-protein degradation pathway (Jentsch and Pyrowolakis, 2000; Weissman, 2001). We explored the possibility that the actin-Ub conjugate we detected could be part of a degradation event. In root-nodule protein extracts prepared under conditions where G-actin is stabilized with actin stabilization buffer (0.2 mM CaCl₂, 2mM Tris pH 7, 0.75mM mercaptoethanol, 0.2mM ATP, ASB) (Ren et al. 1997), actin is degraded at 4°C, even in the presence of protease inhibitors; this process is accelerated by 2M urea. Actin degradation was evaluated in *P. vulgaris* root-nodule extracts obtained 16 *dia* with *Rhizobium*. As shown in figure 4A, the 42 kDa actin form was rapidly degraded within the first 30 minutes. However, the ubiquitylated form of actin resisted to proteolytic degradation and remained stable for several hours, even in the presence of 2M urea.

Actin ubiquitylation is preferentially associated to filaments and/or membranes.

A rapid response to a stimulus is often associated with a massive reorganization of actin cytoskeleton. Cellular mechanisms that control the F-actin/G-actin ratio are essential to orchestrate this response. Recent reports point out that monoubiquitylated proteins, rather than being rapidly degraded, tend to be more stable (Hicke, 2001). Even more, it has been proposed that monoubiquitylation and ubiquitin-related modifications of proteins change the function of the targeted protein or promote its relocalization to a different subcellular compartment (Hicke, 2001; Shih et al. 2000). We investigated the cellular distribution of the ubiquitylated form of actin. In root-nodules, bacteroids are enclosed in a peribacteroidal membrane resulting from an invagination process of plant plasma membrane (Verma et al. 1978). When membranes from *P. vulgaris* root-nodules were fractionated, we observed that ubiquitin-conjugated actin was detected in the endomembrane (ER and Golgi) as well as in the peribacteroidal membrane-enriched fractions, but that it was absent from the bacteroid fraction (Fig. 4B). Additionally, the ubiquitylated form of actin was only present in the insoluble

fraction of root-nodules extracts obtained under G-actin stabilizing conditions, whereas the 42 kDa actin was only present in the soluble fraction (Fig. 4C, lanes 1,2). Treatment of root-nodule tissues with N-Octyl- β -D-glucoside (O β G) extracted about 20% of the Ub-actin conjugate into the soluble fraction (lanes 3,4), while sonication extracted up to 80 % (lanes 5,6). However, after centrifugation at 100,000 g for 45 minutes of the sonicated extract soluble fraction, the ubiquitin-modified actin was again found in the pellet fraction (lanes 7,8). These data suggested that Ub-actin is tightly associated to cell membranes and/or it is in its polymeric form, possibly as subcortical filamentous actin.

DISCUSSION

Actin isoforms have been found to be differentially expressed during various developmental processes in plants (McLean et al, 1990). Here, we show by two-dimensional immunoblotting that three and up to six actin isoforms were clearly detected in *Phaseolus vulgaris* root and root-nodule extracts, respectively. Three out of the six-actin isoforms are transiently and specifically expressed during most of the root-nodule organogenesis process, while the other three isoforms are common to root and to root-nodule extracts. Furthermore, late in root-nodule development, when nitrogen fixation ceases (27 *dai*), the nodule-specific actin isoforms are no longer detected and the actin isoform pattern of nodules is again identical to that of roots (Fig. 1). The fact that the most acidic actin isoforms (PI= 5.3 and 5.4) and the most basic one (PI=5.8) were only specifically detected during nodule development, suggests that they could have an important role in root-nodule organogenesis or nitrogen fixation.

Interestingly, in root-nodule extracts obtained between 10-18 *dai*, the anti-actin mAb N-350 recognized several proteins of 63 kDa that had a similar isoelectric pattern than the 42 kDa actin isoforms (Fig. 1). The fact that these proteins had a mass difference of about 20K with the 42 kDa actin, and that they were readily detected by an anti-ubiquitin polyclonal antibody, suggests that they are most probably the result of the binding of two ubiquitin molecules (8.5 kDa/each) to each root-nodule 42 kDa actin isoform (Fig. 2). Multi-ubiquitin chains at least four subunits long are required for efficient recognition and degradation of ubiquitylated proteins by the proteasome (Weissman, 2001). Covalent protein tagging of one-two ubiquitin molecules to a particular protein is a process known as monoubiquitylation (Hicke, 2001). Instead of routing proteins through the proteasome, monoubiquitylation is thought to regulate the location and activity of diverse proteins. Monoubiquitylation has been shown to be involved in at least three distinct cellular functions: histone regulation, endocytosis and the budding of retroviruses from the plasma membrane (Hicke, 2001). Arthrin, a

monoubiquitylated form of actin, specific of *Drosophila* flight muscle, has been shown to be more stable while retaining its capacity to form filaments and to interact with ligands such as DNase I and profilin (Just, 1993). The monoubiquitylation of nodule actin isoforms we describe here is a transient event that correlates with the period of maximal metabolic activity of the root-nodules. Data provided here support the fact that actin monoubiquitylation is not a systemic induced response since it was absent in leaves, roots, shoots, floral or root meristematic zones of *P. vulgaris* nodulated plants. Furthermore, actin monoubiquitylation could not be detected in nodules approaching senescence (after 20 *dai*) (Fig 1 and 2C), suggesting that this posttranslational modification is not linked to general plant developmental or proteolic/degradative processes.

Since we detected monoubiquitylated actin exclusively in symbiotic root-nodules of diverse legumes (Fig. 2D), we initially thought that this biochemical modification of actin was necessary for an efficient nitrogen fixation process. This possibility was discarded since no monoubiquitylated actin was detected in non-fixing root-nodules induced by the ineffective strain of *Rhizobium* CFN4202, suggesting that this phenomenon is probably more related to the presence of the bacteria in the nodule, than to the nitrogen fixation process (Fig. 2D). This result was further supported by the fact that actin ubiquitylation was detected in nodules infected with IFC01, a strain of *Rhizobium* defective in nitrogen fixation activity which contains bacteroids (Tabche et al, 1998) (Fig. 2D). All together, these data suggest that actin monoubiquitylation is part of a mechanism by which plants recognize microbes. Whether live bacteria and/or associated signaling molecules are important for inducing this response remains to be determined.

Nod factors are pivotal for the capacity of rhizobia to induce root-nodules (Spaink, 2000). We could detect ubiquitylated of actin only when *P. vulgaris* roots were treated with a yeast elicitor but not with *R. etli* Nod factors (Fig. 4D). This result is probably consistent with the fact that Nod factors have rather been found to be responsible for the fragmentation of actin filaments in the root hair (Cardenas et al, 1999). Other bacterial signaling molecules but not Nod factors, might be required for triggering host defense responses in inoculated roots legumes (Spaink, 2000). Further investigation will be required to determine which of these molecules are responsible for the monoubiquitylation of actin.

The actin cytoskeleton is a highly dynamic network and it is regulated by various stimuli and associated signaling pathways. Modification of actin levels in response to diverse stresses is well documented (Olinevich et al, 2000). The fact that we could not find ubiquitylated actin in plants subjected to heat-

shock, osmotic, saline or darkness stress (Fig. 3B), suggests that in response to plant bacterial and fungal infections, which often involve additional osmotic and wounding stresses, monoubiquitylation of actin molecules is not directly related to such stressful conditions.

Pathogenic bacteria and fungi have been found to harbor the ability to control plant actin dynamics and rearrangements (Staiger, 2000). In barley coleoptile and flax cells, actin rearrangements occurs 3-4 h prior to penetration by *Erysiphe* or *Melampsora* (Staiger, 2000). Additionally, a *Magnaporthe mps1* strain unable to form a penetration peg on plant epidermal cells, still elicits rearrangements of the actin cytoskeleton, thus suggesting that a signal must originate from the microbe (Xu et al, 1998). Since wounding does not induce the monoubiquitylation of actin (Fig. 3A), our data would support the idea that wounding is not involved in such actin responses.

The fact that monoubiquitylated actin seems to be tightly bound to cell membranes and/or preferentially organized in microfilaments (Figs. 4B,C) rather than tagged to G-actin (soluble form), strongly suggests that the actin cortical cytoskeleton is a preferential target for monoubiquitylation, most probably providing enhanced filament stabilization and/or directing it to a different subcellular localization. Whether the ubiquitylation of actin could be related to a possible accumulation of cytoplasm and actin filaments at the site of microbe contact, where plant cells generate also elaborate wall appositions, or papillae remains to be determined.

Data presented in figure 3B indicate that actin ubiquitylation is a local, generalized plant response to different bacteria and fungi but no to viral infections. Data obtained when a yeast elicitor was added to *P. vulgaris* roots or suspension culture cells, suggested that actin mono-ubiquitylation is part of a plant primary recognition mechanism. Since H_2O_2 was sufficient to induce actin monoubiquitylation, it is probable that the rapid production and accumulation of ROS, such as O_2 and H_2O_2 , known as the oxidative burst (Yang et al, 1997), participates in the signaling pathway leading to it (Fig. 3C). All together, data presented here suggest that monoubiquitylation of actin represents a general plant response to bacterial or fungal infections. Further investigation is currently underway to characterize the perceptive and signaling pathways leading to it as well as the biological significance of this phenomenon in the context of a plant innate immune response to bacterial or fungal infections.

MATERIALS AND METHODS

Antibodies and chemicals. Anti-actin monoclonal antibody N350 was purchased from Amersham (Arlington Heights, IL., USA), anti-actin monoclonal antibody clone 3AD2-EA (Mab) hybridoma supernatant, anti-actin polyclonal antibody from Sigma (St. Louis, MO, USA), all

have been shown to cross-react with plant actin (Villanueva et al 1999). The rabbit anti-bovine red blood cell ubiquitin was from Sigma and anti-ubiquitin monoclonal antibody from Zymed Labs. Alkaline-phosphatase-conjugated anti-rabbit and anti-mouse antibodies and substrates were from Boehringer-Mannheim (Indianapolis, IN., USA). Ampholytes were purchased from Sigma. All other chemicals were reagent grade.

Germination of common bean (*Phaseolus vulgaris* L. cv. Negro jamapa) seeds and harvesting of root nodules. Seeds were surface-sterilized in 10% (v/v) commercial bleach, rinsed with running tap water, sown on water-saturated towels and germinated in the dark at 27 ± 1 °C and 100% relative humidity. After 5 to 7 days, seedlings were transferred to vermiculite and grown for 20 days in a greenhouse. 10-day-old roots were collected in liquid nitrogen and stored at -70 °C. Alternatively, germinated seeds were planted in pots containing vermiculite and half of them were inoculated with *R. etli* CFN3, CFN4202, and IFC01. Root nodules were harvested after 10,12,16,18 20 or 27 days.

Water deficit treatment: After 4 days of germination, seedlings of *P. vulgaris* were selected based on uniform size and transplanted to vermiculite containing different amounts of water. Control plants were irrigated with 5 ml of water per gram of vermiculite ($Y_w = -0.074$ Mpa), while the water deficit conditions corresponded to $Y_w = -0.35$ Mpa, 1/12 the amount of water of the control. Vermiculite was maintained at constant water potential throughout the experiment.

Plant salt treatment: At the three-leaf stage, bean seedlings were grown for 3 days in a greenhouse in hydroponics, using a standard irrigating solution containing 250 mM NaCl.

Suspension culture cells treatments: *P. vulgaris* leaf cultured cells were maintained as described (García-Gómez et al, 2000). **Treatments:** 1.5 g cell were transferred at 50 ml Linsmaire and Skoog (Fisher and Tsai, 1978) medium in 100-ml Erlenmeyer flasks. The yeast elicitor, *P. syringae* pv. *tabaci* or H_2O_2 , were applied after 3 days of growth at the concentrations indicated in the corresponding figure. Heat shock treatment was also applied after 3 days of growth.

Isolation of membranes from root-nodule: Membranes were fractionated as described in Verma et al, 1978.

Tobacco plant infection with TMV: Tobacco leaf were inoculated by microprojectile bombardment with TMV or pUC18 (negative control) as described previously (Schaffer et al. 1995).

Protein extraction, SDS-PAGE (2-D PAGE) and immunoblotting. The frozen tissue samples were first ground in liquid nitrogen, resuspended in Laemmli extraction buffer and boiled immediately for 10 min with shaking. The supernatants were recovered by centrifugation at 14,000 g and equal amounts of total proteins were analyzed by SDS-PAGE, or two-dimensional SDS-PAGE (2-D PAGE) and immunoblotting. For 2-D PAGE, protein extracts in Laemmli

sample buffer were diluted 1:1 in O'Farrell's, analysed by isoelectric focusing for the first dimension and by SDS-PAGE for the second dimension according to O'Farrell et al. 1975. For immunoblotting, following transfer of the proteins to nitrocellulose, the membranes were blocked with 5% of milk in phosphate-buffered saline (PBST, 10 mM Na-phosphate; 150 mM NaCl, pH 7.4 and 0.05% Triton X-100) for 1 h at 42 °C. The membranes were then incubated overnight at 4 °C with either a 1/4000 dilution of anti-actin mAbs or 1/5000 dilution of anti-ubiquitin antibodies in 0.05% Triton X-100 in PBS (PBST). After three washes in PBST, membranes were incubated with a 1/5000 dilution of alkaline-phosphatase-conjugated secondary antibodies for 1 h at 25 °C. The membranes were then washed three times with PBST, rinsed with PBS and the proteins were visualized by nitro-blue tetrazolium and bromochloro indolyl phosphate according to the manufacturer (Boehringer-Mannheim). For densitometric scans, the images of the western blots or photographic films were captured by an Apple Color One Scanner using Adobe Photoshop software and the bands were quantified according to their pixel value using NIH-Image software.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank A. Covarrubias and B. García-Gómez for critical reading of our manuscript; A. Bailey and R. Rivera for providing biological materials, P. Rueda and M. Rocha for suspension cells and yeast elicitor; M. Hernández for anti-body anti-actin 3AD2-EA, M. Soberón for CFN4202 and IFC01 strains; L. Cárdenas for providing Nod-Factors; G. Guillen, R. Aparicio and J. Olivares for invaluable technical assistance. This research was supported in part by grant 33350-N and a scholarship from CONACyT and IN-211600 DGAPA-UNAM. This paper is dedicated to the memory of H. Perez.

LITERATURE CITED

- Ball, E. Karlik, C.C., Beall, C.J., Saville, D., Sparrow, J.C., Bullard, B. and Fyberg, E. A. 1987. Arthrin, a myofibrillar protein of insect flight muscle, is an actin-ubiquitin conjugate. *Cell* 51: 221-228.
- Barlow, P. and Baluška, F. 2000. Cytoskeleton perspectives on root growth and morphogenesis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 51: 289-322.
- Callis, J. and Vierstra, R. 2000. Protein degradation in signaling. *Curr. Opin. Plant Biol.* 3: 381-386.
- Cardenas, L., Dominguez, J., Quinto, C., Lopez-Lara, I. M., Lugtenberg, B. J., Spaink, H. P., Rademaker, G. J., Haverkamp, J. and Thomas-Oates, J. E. 1995. Isolation, chemical structures and biological activity of the lipochitin oligosaccharide nodulation signals from *Rhizobium etli*. *Plant Mol. Biol.* 29: 453-464.
- Cárdenas, L., Vidali, L., Domínguez, J., Pérez, H., Sánchez, F., Hepler, P.K. and Quinto, C. 1998. Rearrangement of actin microfilaments in plant root hairs responding to *Rhizobium etli* nodulation signal. *Plant Physiol.* 116: 871-877.
- Cárdenas, L., Fejo, J. A., Kunkel, J. G., Sánchez, F., Holdaway-Clarke, T., Hepler, P.K. and Quinto, C. 1999. *Rhizobium* Nod factors induce increases in intracellular free calcium and extracellular calcium influxes in bean root hairs. *Plant J.* 19: 347-352.
- Cohn, J., Sessa, G. and Martin, G.B. 2001. Innate immunity in plants. *Curr Opin Immunol.* 13: 55-62.
- Fisher, J. B., and Tsai, J. H. 1978. In vitro growth of embryos and callus of coconut palm. *In Vitro.* 14: 307-311.
- García-Gómez, B. I., Campos, F., Hernández, M. and Covarrubias, A. A. 2000. Two bean cell wall proteins more abundant during water deficit are high in proline and interact with a plasma membrane protein. *Plant J.* 22: 277-288.
- Gauthier, M., Lydan, M., O'Day, D. and Cotter, D. 1997. Endogenous autoinhibitors regulate changes in actin tyrosine phosphorylation during *Dictyostelium* spore germination. *Cell Signal.* 9: 79-83.
- Grant, M. and Mansfield, J. 1999. Early events in host-pathogen interactions. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2: 312-319.
- Gray, W. and Estelle, M. 2000. Function of the ubiquitin-proteasome pathway in auxin response. *TIBS.* 25: 133-138.
- Hicke, L. 2001. Protein regulation by monoubiquitin. *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* 2: 195-201.
- Jentsch, S. and Pyrowolakis, G. 2000. Ubiquitin and its kin: how close are the family ties? *Trends Cell Biol.* 10: 335-342.
- Just, I., Hennessey, E.S., Drummond, D.R., Aktories, K. and Sparrow, C. 1993. ADP-ribosylation of *Drosophila* indirect-flight-muscle actin and arthrin by *Clostridium botulinum* C2 toxin and *Clostridium perfringens* iota toxin. *Biochem. J.* 291: 409-412.
- Kalhor, H.R., Niewmierycka, A., Faull, K.F., Yao, X., Grade, S., Clarke, S. and Rubenstein, P. 1999. A highly conserved 3-methylhistidine modification is absent in yeast actin. *Arch Biochem Biophys.* 370: 105-11.
- Kameyama, K., Kishi, Y., Yoshimura, M., Kanzawa, N., Sameshima, M. and Tsuchiya, T. 2000. Tyrosine phosphorylation in plant bending. *Nature* 407: 37.
- Kobayashi, Y., Kobayashi, I., Funaki, Y., Fujimoto, S., Takemoto, T. and Kunoh, H. 1997. Dynamic reorganization of microfilaments and microtubules is necessary for the expression of non-host resistance in barley coleoptile cells. *Plant J.* 11: 525-537.
- McDowell, J. and Dangl, J. 2000. Signal transduction in the plant immune response. *TIBS.* 25, 79-82.
- McLean, B.G., Huang, S.R., McKinney, E.C. and Meagher, R.B. 1990. Plants contain highly divergent actin isoforms. *Cell Motil Cytoskeleton.* 17: 276-90.

- Møller, S.G. and Chua, N. 1999. Interactions and intersections of plant signaling pathways. *J. Mol. Biol.* 293: 219-234.
- O'Farrell, P.M. 1975. High resolution two dimensional gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 250: 40007-4021.
- Olinevich, O.V., KhoKhlova, L.P. and Raudaskoski, M. 2000. Effect of abscisic acid and cold acclimation on the cytoskeletal and phosphorylated proteins in different cultivars of *Triticum aestivum* L. *Cell Biol International.* 24:365-373.
- Puius, Y.A., Mahoney, N.M. and Almo, S.C. 1998. The modular structure of actin-regulatory proteins. *Curr. Opin Cell Biol* 10: 23-34.
- Ren, H., Gibbon, B., Ashworth, S., Sherman, D., Yuan, M. and Staiger, C. 1997. Actin purified from maize pollen functions in living plant cells. *Plant Cell* 9, 1445-1457.
- Robzyk, K., Recht, J. and Osley, M. 2000. Rad6-dependent ubiquitination of histone H2B in Yeast. *Science.* 287: 501-504.
- Sandermann, H. 2000. Active oxygen species as mediators of plant immunity: Three case studies. *Biol. Chem.* 381: 649-653.
- Schaffer, R. L., Miller, C. G., and Petty I. T. 1995. Virus and host-specific adaptations in the BL1 and BR1 genes of bipartite geminiviruses. *Virology.* 214: 330-338.
- Scheel, D. 1998. Resistance response physiology and signal transduction. *Curr. Opin. Plant Biol.* 1: 305-310.
- Schmidt, A. and Hall, M.N. 1998. Signaling to the actin cytoskeleton. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 14: 305-338.
- Shih, S., Sloper-Mould, K. and Hicke, L. 2000. Monoubiquitin carries a novel internalization signal that is appended to activated receptors. *EMBO J.* 19: 187-198.
- Soberón, M., Aguilar, G. and Sánchez, F. 1993. *Rhizobium phaseoli* cytochrome c-deficient mutant induces empty nodules on *Phaseolus vulgaris* L. *Molecular Microbiology* 8: 159-166.
- Spaank, H. 2000. Root nodulation and infection factors produced by rhizobial bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 54: 257-288.
- Staiger, C. 2000. Signal to the actin cytoskeleton in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 51: 257-288.
- Tabche, M., García, E.G., Miranda, J., Escamilla, J.E. and Soberón, M. 1998. *Rhizobium ethi* cycHJKL gene locus involved in c-type cytochrome biogenesis: sequence analysis and characterization of two cycH mutants. *Gene.* 208: 215-219.
- Trausch, J.S., Grenfell, S.J., Handley-Gearhart, P.M., Ciechanover, A. and Schwartz, A.L. 1993. Immunofluorescent localization of the ubiquitin-activating enzyme, E1, to the nucleus and cytoskeleton. *Am. J. Physiol.* 264: 93-102.
- van der Luit, A. H., Platti, L., van Doorn, A., Musgrave, A., Felix, G., Bolter, T. And Munnik, T. 2000. Elicitation of suspension-cultured tomato cells triggers the formation of phosphatidic acid and diacylglycerol pyrophosphate. *Plant Physiol.* 123, 1507-1515.
- Verma, D., Kazazian, V., Zogbi, V. and Bal, K. 1978. Isolation and characterization of the membrane envelope enclosing the bacteroids in soybean root nodules. *J. Cell Biology.* 78: 919-936.
- Vierstra, R. and Callis, J. 1999. Polypeptide tags, ubiquitous modifiers for plant protein regulation. *Plant Mol Biol.* 41: 435-442.
- Villanueva, M. et al 1999. Actin expression in germinating seeds of *Phaseolus vulgaris* L. *Planta* 207: 582-589.
- Weissman, A.M. 2001. Themes and variations on ubiquitylation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* 2: 169-178.
- Xu, J-R., Staiger, C. J. and Hamer, J. E. 1998. Inactivation of the mitogen-activated protein kinase Mps1 from the rice blast fungus prevents penetration of host cells but allows activation of plant defense responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95: 12713-12718.
- Yamaguchi, T., Yamada, A., Hong, N., Ogawa, T., Ischii, T. and Shibuya, N. 2000. Differences in the recognition of glucan elicitor signals between rice and soybean: b-glucan fragments from the rice blast disease fungus *Pyricularia oryzae* that elicit phytoalexin biosynthesis in suspension-cultured rice cells. *Plant Cell.* 12: 817-826.
- Yang, Y., Shah, J. and Klessig, D.F. 1997. Signal perception and transduction in plant defense responses. *Genes Dev.* 11: 1621-1639.

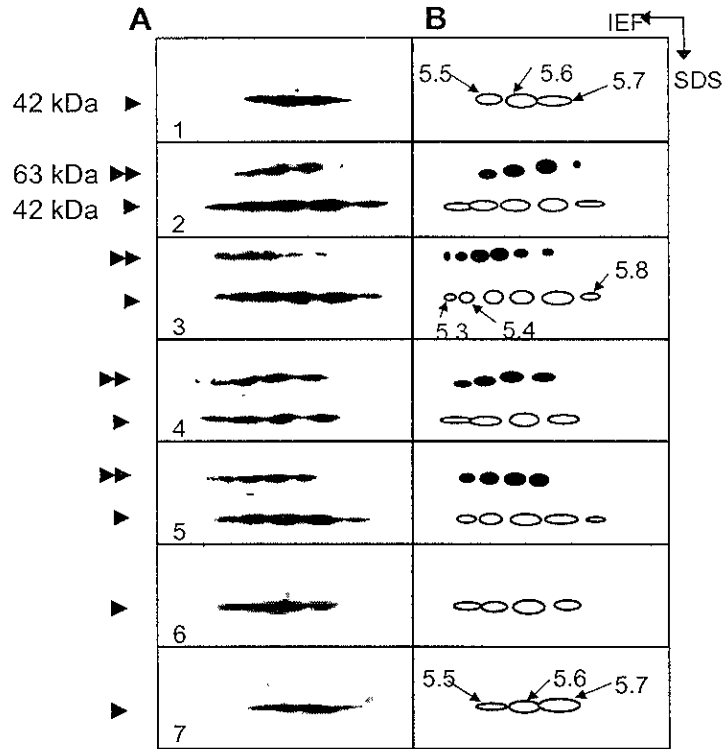


Fig. 1. Two-dimensional gel electrophoretic analysis of actin expression during *P. vulgaris* root-nodule development. **A**, Immunodetection of actin isoforms with anti-actin mAb N-350 in 10-day old root (1), or root-nodule total protein extracts isolated from plants 10,12,16,18,20 and 27 *dai* (2-7, respectively). **B**, Actin isoforms are schematized, the pI values of corresponding isoforms are indicated.

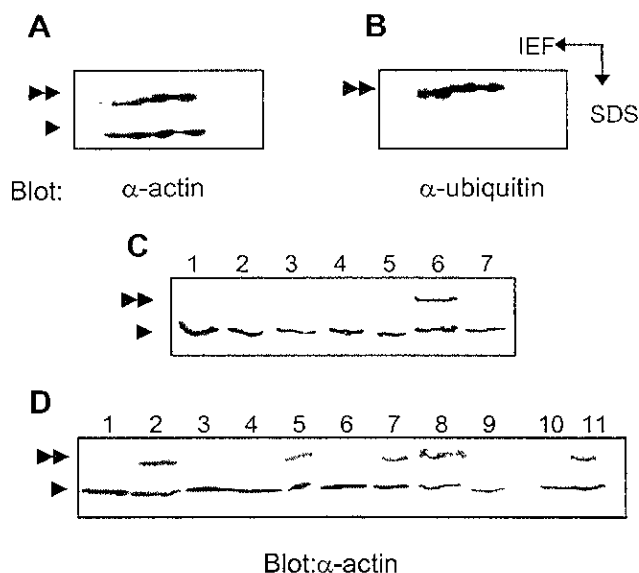


Fig. 2. The 63 kDa protein corresponds to a monoubiquitylated actin form specific of root-nodules. A, 2-D PAGE western blotting of total protein extracts of *P. vulgaris* 16 dai nodules with anti-actin mAb N-350 and B, anti-ubiquitin polyclonal antibody. C, Western-blot of total protein extracts from *P. vulgaris*: hypocotyl dividing zones (lane 1), elongation zones (lane 2) and not-growing zones (lane 3); flowers (lane 4); leaves (lane 5); nodules (lane 6) and roots (lane 7) D, Different organs from various leguminous plants were tested for the presence of ubiquitylated actin: *Glycine max* leaves, root-nodules or roots (lanes 1-3); *Lotus japonicus* leaves, root-nodules or roots (lanes 4-6); *Medicago sativa* root-nodules (lane 7); *P. vulgaris* root-nodules (8) and roots (9). Nodules from *P. vulgaris* inoculated with CFN2402 or IFCO1 strains (lanes 10,11). Data shown are representative of 3 independent experiments. Single arrowheads: 42 kDa actin; double arrowheads: 63 kDa ubiquitylated actin.

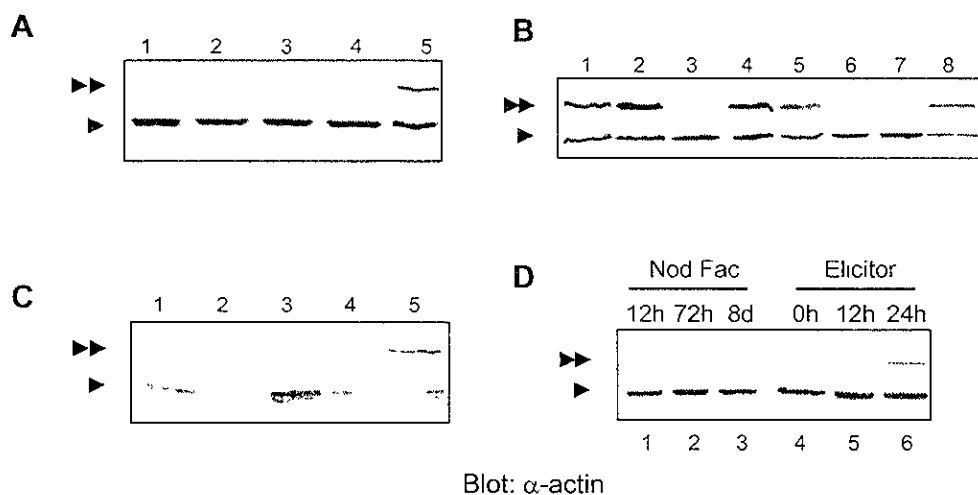


Fig. 3. Environmental stress does not trigger actin-ubiquitylation and actin ubiquitylation is triggered in response to microbial infections or related signalling molecules. **A**, *P. vulgaris* plants were subjected to different environmental stressful conditions: leaves from salt stressed plants (lane 1), total plantlet extract after 72h of darkness (lane 2), roots from water deficit stressed plants (lane 3), wounded leaves (lane 4), *P. vulgaris* root-nodules (16 *dapi* (lane 5). **B**, Ubiquitylated-actin was detected by immunoblotting total protein extracts from various plants/organs locally infected with different microorganisms: *P. vulgaris* root-nodules inoculated with *Rhizobium etli* (lane 1); *Nicotiana tabacum* leaves after 72h of infiltration with *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* (lane 2) or with H₂O (lane 3); *Capsicum annuum* leaves and roots infected with *Phytophthora capsici* P1319 (lanes 4 and 5), or uninfected leaves from control plants (lane 6); TMV particle-bombarded *N. tabacum* leaves after 72h of infection (lane 7); *P. vulgaris* roots inoculated with *Glomus interadians* (lane 8). **C**, *P. vulgaris* suspension culture cells. Control (lane 1); or treated for 2h: at 42°C (heat shock, lane 2), with 4 mM H₂O₂ (lane 3), yeast elicitor (25mg/ml) (lane 4) or 1x10⁹ cfu/ml *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* (lane 5). **D**, Total protein extracts from *P. vulgaris* roots incubated for the indicated times with *R. etli* Nod factors (lanes 1-3); or yeast elicitor (lanes 4-6). Equivalent amounts of protein were loaded in each lane. Data shown are representative of 3 independent experiments.

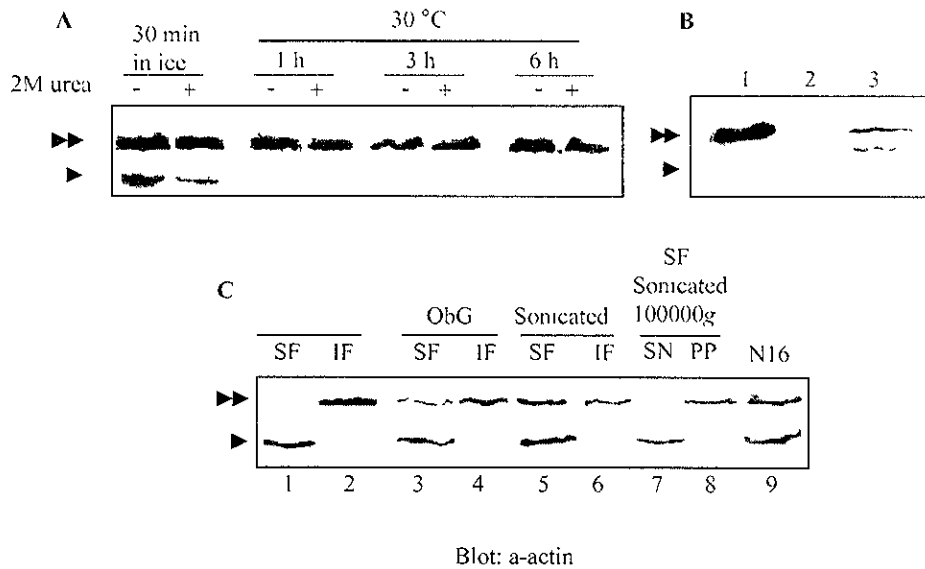


Fig. 4. Ubiquitylated-actin is stable and preferentially associated to membranes or filamentous actin. A, *P. vulgaris* root-nodules (16 dai) frozen in liquid nitrogen, ground and resuspended in ASB with or without 2M urea and shaken at 30°C for the indicated times. B, *P. vulgaris* root-nodule endomembranes (lane 1), bacteroids (lane 2) or peribacteriodal membranes (lane 3) C, ASB-resuspended root-nodule tissue was: incubated without (lanes 1,2), with 0.7% ObG (lanes 3,4), or sonicated for 4 min at 4°C (lanes 5,6). Samples were centrifuged at 4,000 g for 10 min and the soluble (lanes 1,3,5) and insoluble fractions (lanes 2,4,6) were resolved by SDS-PAGE. The soluble fraction from the sonicated extract was further partitioned by centrifugation at 100,000 g for 45 min, and the supernatant (lane 7) and the pellet (lane 8) were both analyzed. A 16 dai root-nodule sample was included as control (lane 9).

RESULTADOS ANEXOS

I UBIQUITINACIÓN DE ACTINA

Inmunodetección de la proteína de 63 kDa con diferentes anticuerpos anti-actina.

Los anticuerpos anti-actina en algunas ocasiones reconocen otras proteínas ya sea por interacción inespecífica o bien por que pueden detectar proteínas relacionadas a actina. Para corroborar que la proteína de 63 kDa estaba relacionada con actina, se probaron tres diferentes anticuerpos. Adicionalmente, el anticuerpo anti-actina N-350 fue inmuno-adsorbido para evitar reconocimientos inespecíficos (Fig. 6).

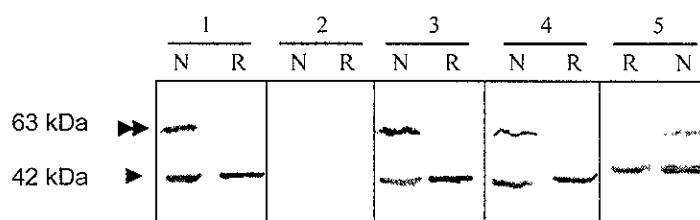


Fig. 6.- Western blot de extractos totales con diferentes anticuerpos. Revelado con fosfatasa alcalina. 1.- Policlonal α -actina (Sigma). 2.- Solo segundo anticuerpo. 3.- Monoclonal α -actina (Sigma). 4.- Monoclonal α -actina (Acites de pollo). 5.- N-350 Inmuno-adsorbido. N= Nódulo. R= Raíz.

Todos los anticuerpos reconocieron consistentemente a la proteína de 63 kDa en extractos totales de nódulo, lo que muestra que la proteína de 63 kDa es actina.

La proteína de 63 kDa no es producto de una modificación transcripcional

Aunque no es común, existen reportes de modificaciones de empalme diferencial en genes de actina (Castanotto and Rossi, 1998), por lo que se analizaron los mensajeros de actina en el tejido de nódulo. Utilizando ARN total de diferentes tejidos de frijol y una sonda homóloga de actina, se realizó un análisis tipo northern blot para determinar si la proteína de 63 kDa era producto de un gen que codifica para un mensajero mayor de 1.7 Kb, que es el promedio de los

mensajeros que codifican para una proteína de 42 kDa, o bien un procesamiento por empalme diferencial (Fig. 7).

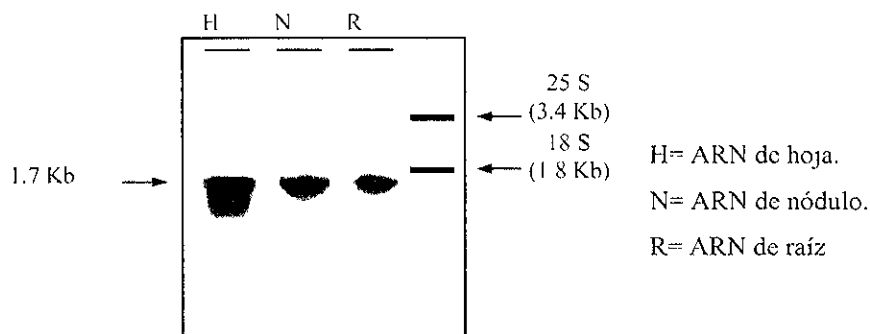


Fig. 7.- Northern blot utilizando ARNs, de diferentes tejidos y una sonda de actina de frijol marcada con ^{32}P . Hibridación a 65 °C. 10 μm de ARN total en cada muestra.

En todos los tejidos se observó solamente una banda de 1.7 Kb correspondiente al transcrito de actina, corroborando que la proteína de 63 kDa, no es producto de una modificación post-transcripcional.

Inmunodetección utilizando un anticuerpo policlonal anti-ubiquitina en diferentes órganos.

Par determinar si la actina ubiquitinada era una modificación exclusiva del nódulo, se realizaron ensayos tipo western, utilizando extractos totales de diferentes órganos de *Phaseolus vulgaris* con un anticuerpo policlonal anti-ubiquitina (Fig. 8). En todos los órganos analizados se detectaron diferentes proteínas ubiquitinadas, pero solamente en el nódulo se encontró la actina formando conjugados con ubiquitina.

Diferentes bandas son detectadas con el anticuerpo antiubiquitina en los diferentes tejidos de la planta. Es muy interesante que la banda que corresponde a la actina ubiquitinada es la que es reconocida por el anticuerpo con mayor intensidad.

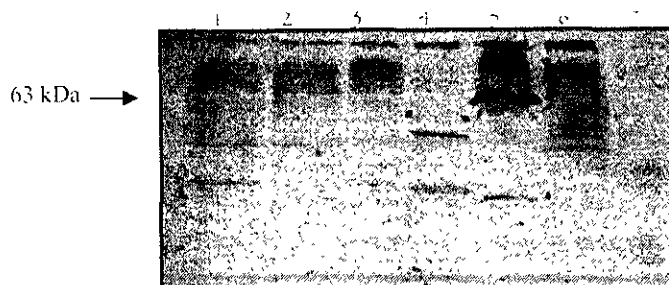


Fig. 8.- Western blot de extractos totales de diferentes órganos de frijol, utilizando el anticuerpo policlonal anti-ubiquitina. Gel de acrilamida al 15%. Revelado con fosfatasa alcalina. 1.- Tallo (zona de división), 2.- Tallo (zona de elongación), 3 - Tallo (zona madura), 4.- Flor, 5.- Nódulos, 6.-Hoja y 7.-Raíz.

Los resultados reportados en *Drosophila* son reproducibles.

Uno de los argumentos que se emplearon para concluir que la actina de 63 kDa se trataba de una modificación postraduccional vía ubiquitina, fue el trabajo realizado en *Drosophila* (Ball *et al* 1986). Para revalidar los resultados obtenidos con los anticuerpos utilizados durante este trabajo, el monoclonal anti-actina (Amerscham) y el policlonal anti-ubiquitina (Sigma), se elaboraron ensayos tipo western, similares a los ya reportado en *Drosophila* con dichos anticuerpos (Fig. 9).

La artrina, forma ubiquitinada de actina en el músculo de vuelo de *Drosophila*, es reconocida por ambos anticuerpos. Lo anterior corrobora que la proteína de 63 kDa se trata de actina modificada por ubiquitina.

Monoubiquitinación de actina en plantas

Como se mencionó durante la introducción, la monoubiquitinación de proteínas es la unión de una o más moléculas de ubiquitina con su sustrato, sin formar múltiples cadenas de ubiquitina unidas entre sí. El reporte de artrina señala a esta como una actina monoubiquitinada; uno de los fundamentos para esta aseveración está basado en el peso molecular de una molécula de actina y una de ubiquitina, 42 y 13 kDa respectivamente, la artrina tiene un peso molecular de 55 kDa, que es exactamente la suma de una molécula de actina y una de ubiquitina (Fig. 9). En este

trabajo se reporta que la proteína de 63 kDa se trata de una monoubiquitinación, con dos moléculas de ubiquitina unidas a una de actina, pero interesantemente, también se logro detectar un intermediario entre la actina de 42 kDa y la de 63 kDa, es decir una proteína de 55 kDa como artrina en *Drosophila* (Fig. 10).

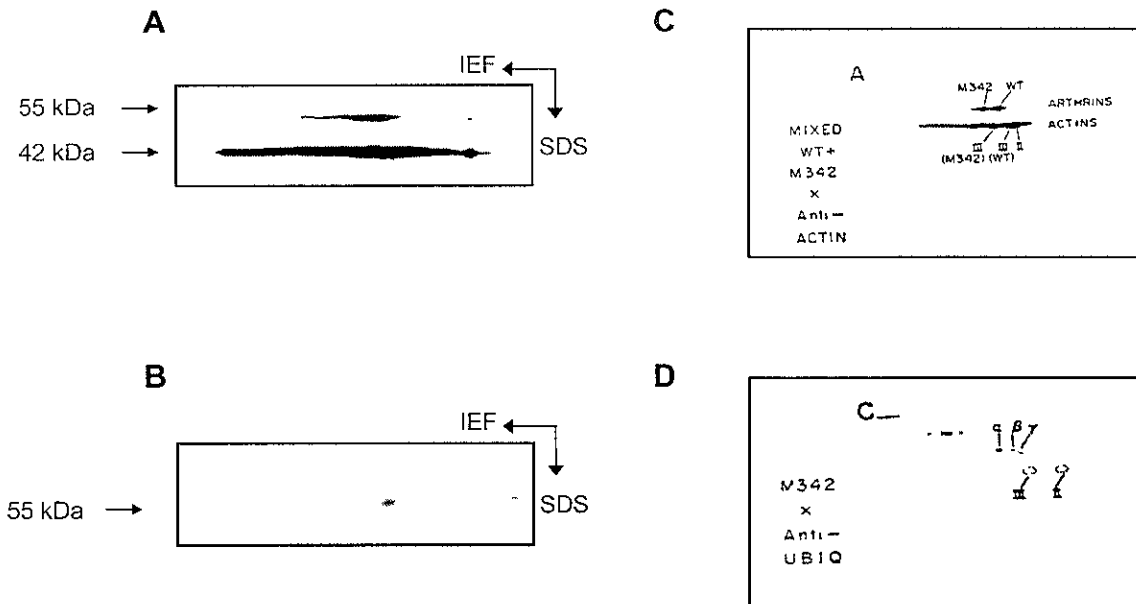


Fig. 9.- Análisis de la expresión de actina en *Drosophila* en geles de doble dimensión (2-D). **A)** Inmunodetección de las isoformas de actina con el anticuerpo anti-actina N-350 en extractos totales de proteínas de *Drosophila*. **B)** Western-blot de 2-D de extractos totales de proteínas de *Drosophila* con el anticuerpo policlonal anti-ubiquitina. **C** y **D**, Figuras tomadas del artículo Ball, et al, Cell, 1986. **C**, Western -blot de 2-D de proteínas de *Drosophila* con el anticuerpo anti-actina N-350 y **D**, con el anticuerpo policlonal anti-ubiquitina.

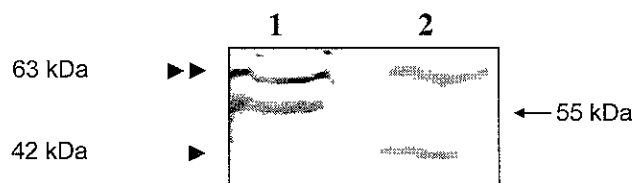


Fig. 10.- Inmunodetección de actina y actina ubiquitinada con anti-ubiquitina (1) y anti-actina (2) en nódulos de 14 días.

Aunque el intermediario de 55 kDa no se detecta en todos los casos, se observa muy bien durante la preparación de simbiosomas (Fig. 4b del artículo) y en algunos días de la organogénesis del nódulo simbiótico.

La monoubiquitinación de actina no está presente en células animales infectadas con patógenos.

Como se muestra en la figura 3a del artículo, la ubiquitinación de actina es inducida en diversas plantas que han sido infectadas con diferentes microorganismos, excepto aquellas que son infectadas con virus. Por otro lado, como se mencionó anteriormente, todos los reportes sobre ubiquitinación de actina están realizados en los sistemas animales, en donde se sabe que la ubiquitinación de algunas proteínas del citoesqueleto está relacionada con enfermedades del sistema nervioso, pero hasta el momento no existe ningún reporte de que esta modificación en los microfilamentos esté relacionada con infecciones o ataque de patógenos en las células de los sistemas animales. Para determinar si la respuesta que se observa en las plantas infectadas se encuentra también en animales, se analizaron dos tipos de células de origen animal infectadas con diferentes patógenos; un tipo celular fue el timo de cabra que fue infectado con brucelosis y el otro, un cultivo celular de cáncer de laringe humano (HEp-2), infectadas con la cepa E2348/69, que es una *E. coli* enteropatógena (Fig. 11).

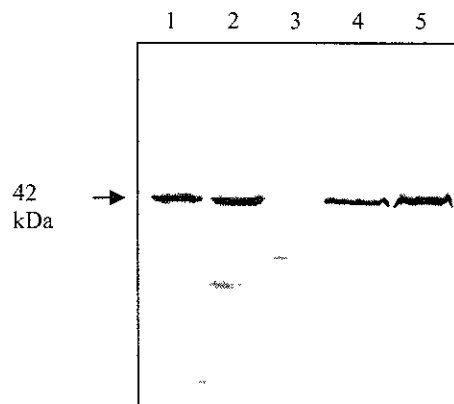


Fig. 11.- Western blot de extractos totales de diferentes tipos celulares de origen animal, utilizando el anticuerpo monoclonal anti-ubiquitina N-350. Gel de acrilamida al 10%. Revelado con fosfatasa alcalina. 1.- Células de Humano, 2.- Células de Humano infectadas con *E. Coli*, 3.- Células de *E. Coli*, 4.- Timo de cabra, 5.- Timo de cabra infectado con brucelosis

En ninguno de los dos casos la actina forma conjugados con ubiquitina como respuesta a la infección de patógenos a las células de origen animal.

Probable fosforilación de la actina ubiquitinada en residuos de treonina.

Diversos reportes indican que ciertas proteínas, como las ciclinas y algunos receptores, deben ser fosforiladas como requisito previo para ser modificados vía ubiquitina (Riezman, 1998). Se investigó la posibilidad que la actina de 63 kDa este fosforilada como parte de la respuesta de la planta a la presencia de microorganismos. Utilizando ³³P inorgánico para marcaje *in vivo* de plantas de frijol inoculadas con la cepa CIAT-899, se realizaron extractos de la fracción insoluble de nódulos de 16 días con y sin fosfatasa alcalina. Una señal de gran intensidad es detectada justo en el sitio donde migran las isoformas de actina de 63 kDa (Datos no mostrados).

Para determinar que residuos de la actina ubiquitinada son fosforilados, tres diferentes anticuerpos, anti-fosfoserina, anti-fosfotreonina y anti-fosfotirosina, fueron utilizados en ensayos tipo western con extractos de la fracción insoluble de nódulos de 16 días. Solamente con el anticuerpo anti-treonina, es detectada una banda de 63 kDa (datos no mostrados). Por esta razón, un ensayo tipo western en geles de doble dimensión, fue realizado utilizando una fracción enriquecida de la actina ubiquitinada, con el anticuerpo anti-fosfotreonina (Fig. 12).

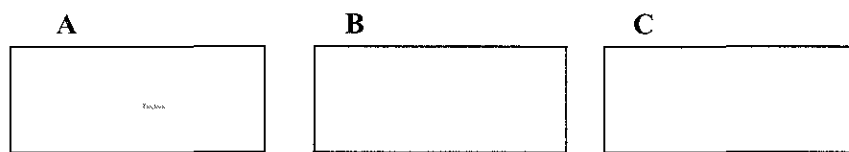
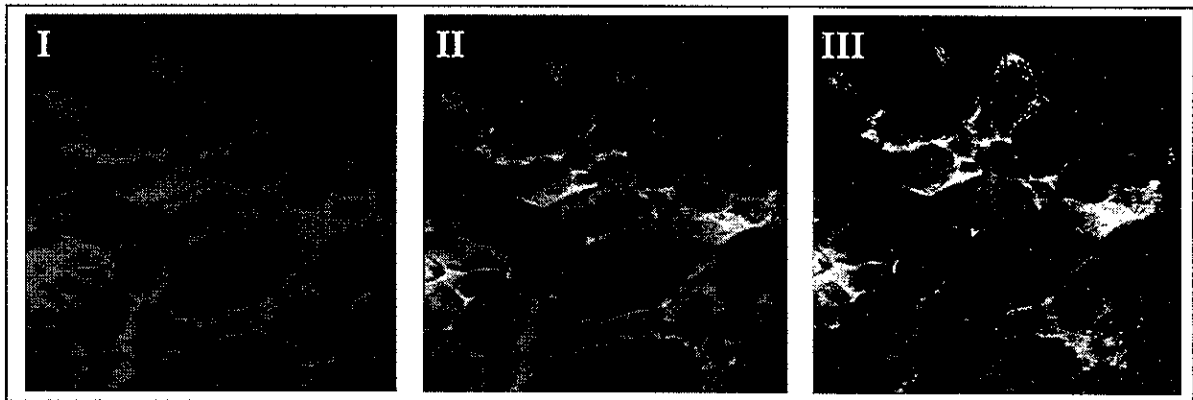


Fig. 12.- Inmunodetección dela actina de 63 kDa con el anticuerpo anti-fosfotreonina (A), membrana teñida con ponceau (B), anti-fosfotreonina incubado previamente con 1mg de fosfotreonina (C).

Localización de actina F y Ubiquitina en nódulos simbióticos

En el artículo publicado, se propone que la ubiquitinación de actina está asociada preferentemente a los microfilamentos y/o a membranas, así mismo, se consideró la posibilidad de que esta modificación se localice en la actina que forma parte del citoesqueleto subcortical. Con la finalidad de poder co-localizar a la actina-F y la ubiquitina dentro de la estructura del nódulo, se realizaron inmunodetecciones en cortes de nódulos de 16 días, con la ayuda de un microscopio confocal y la utilización de faloidina rodhaminada, una droga que se une específicamente a los filamentos de actina y un segundo anticuerpo derivatizado que reconoce al anticuerpo anti-ubiquitina (Fig.13 a y b)

A



B

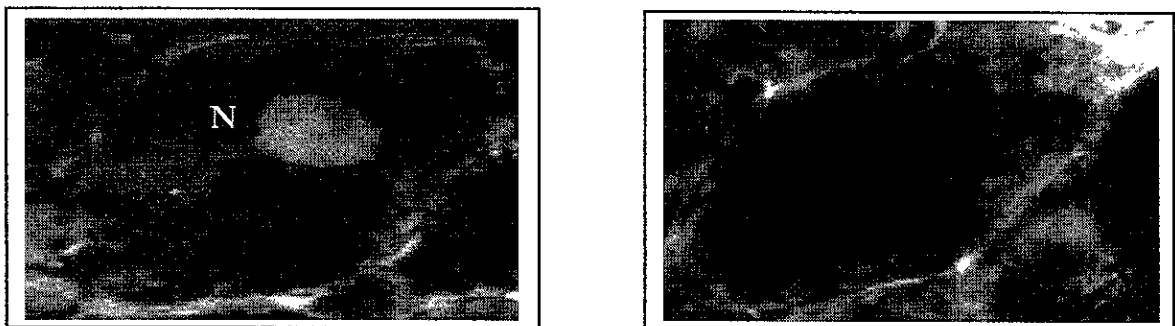


Fig. 13a.- Colocalización de actina F y ubiquitina. Cortes de nódulo de 50 μ m. Objetivo 40x. (A) Falloidina flereseinada. (I). Anti-ubiquitina (III). Colocalización de ambas señales (II). Imagen de un solo corte. (B) Amplificación de dos secciones de la imagen de la sobreposición de ambas señales. Las flechas indican la colocalización de actina y ubiquitina en los sitios de los microfilamentos corticales. N, indica el núcleo de un célula.

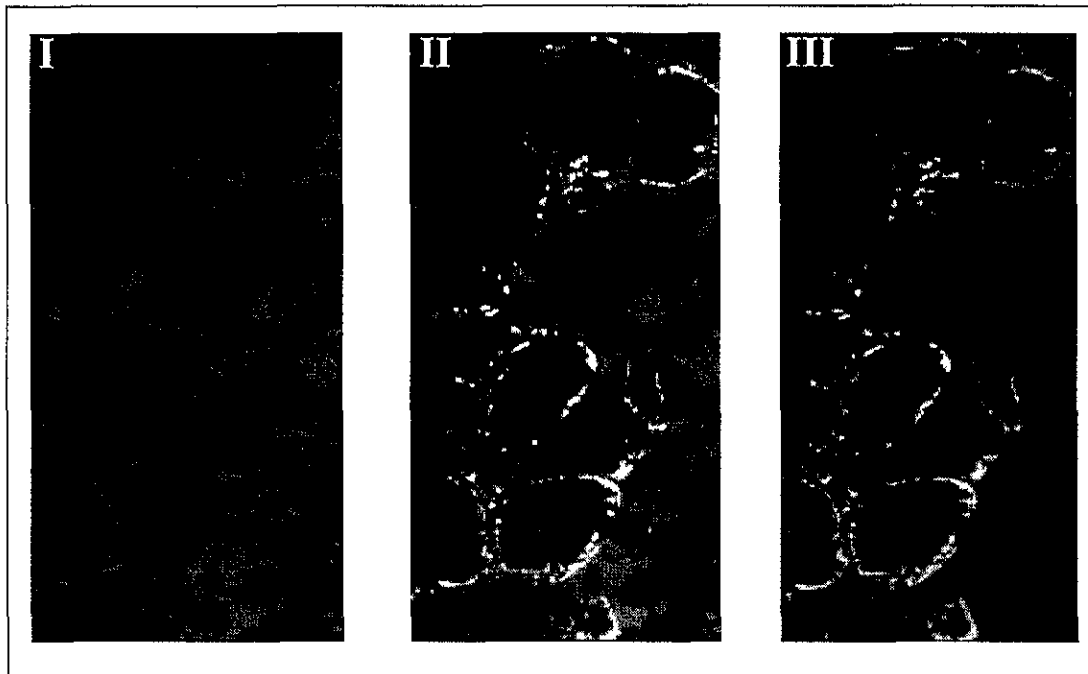


Fig. 13b.- Colocalización de actina F y ubiquitina. Cortes de nódulo de 50 μm . Objetivo 10x. (A) Phalloidina flereseinada. (I). Anti-ubiquitina (III). Colocalización de ambas señales (II). Imagen de un solo corte. Las flechas indican la colocalización de actina y ubiquitina en los sitios de los microfilamentos corticales.

II Purificación del conjugado actina-ubiquitina.

El hecho de que la actina ubiquitinada se encuentre en la fracción insoluble dificulta su purificación, así que se intentó solubilizarla utilizando 24 diferentes detergentes. Cantidades equivalentes de la fracción insoluble fueron incubadas con cada uno de los 24 detergentes por espacio de 1h con agitación constante y posteriormente analizada la fracción soluble de cada ensayo (Fig. 14)

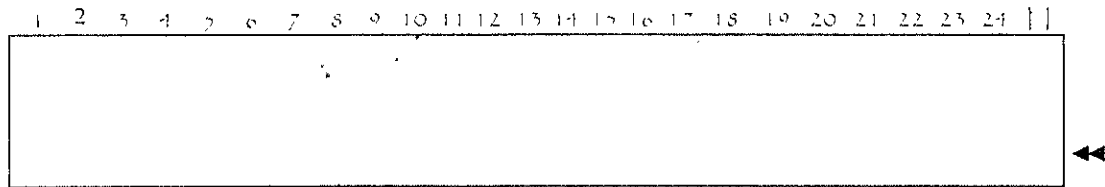


Fig. 14.- Análisis tipo western blot de el extracto slubilizado de la fracción soluble de nódulos de 16 días con diferentes detergentes, utilizando el anticuerpo anti-actina. Gel de acrilamida al 10%. 1.- C12E9, 2.- C12E8, 3.- n-Dodecyl- β -D-maltoside, 4.- Sucrose monolaurate, 5.- CYMAL-6, 6.- n-Decyl- β -D-maltoside, 7.- CFAB, 8.- Deoxy-Big Chap, 9.- Triton λ -100, 10.- LDAO, 11.- CYMAL-5, 12.- Zwittergent 3-12, 13.- Nonyl- β -D-glucosido, 14.- 1-S-Octyl- β -D-thioglucoosido, 15.- DDAO, 16.- HECAMEG, 17.- n-Octanoyl-sucrose, 18.- n-Octyl- β -D-glucosido, 19.- Heptyl- β -D- thio, 20.- CYMAL-3, 21.- C-HEGA-10, 22.- Zwittergent 3-10, 23.- ME:GA-8, 24.- n-hexyl- β -D-glucosido. FI.- Fracción Insoluble.

De todos los detergentes utilizados los que lograron solubilizar a la actina de 63 kDa fueron: Triton 100x, Nonyl- β -D-glucosido, HECAMEG, Heptyl- β -D-thioglucopy, n-Octyl- β -D-glucosido (O β D) y CYMAL-3. Si bien algunos detergentes lograron solubilizar a la actina de 63 kDa el rendimiento en todos los ensayos fue muy escaso. Ya que todos los detergentes fueron utilizados justo en su concentración micelar mínima (MCM), se probó el triton x-100 y el O β D a diferentes concentraciones sin obtener resultados significativos en la solubilización de la proteína (datos no mostrados). Adicionalmente, se sonicó la fracción insoluble a diferentes tiempos, logrando solubilizar la proteína después de sonicar el extracto durante 4 min. (ver figura 4d del artículo).

Enriquecimiento de la actina de 63 kDa por adsorción.

Con un porcentaje significativo de la proteína soluble, se inició la purificación de la proteína utilizando de columnas de afinidad. Se emplearon dos diferentes columnas, una columna de hidroxilapatita que tiene la capacidad de unir proteínas ácidas, y una columna de DEAE-Sephacel que es capaz de adsorber a la actina de 42 kDa. La actina de 63 kDa es capaz de unirse a ambas columnas y puede enriquecerse por medio de fraccionamientos (Figs. 15a y 15b)

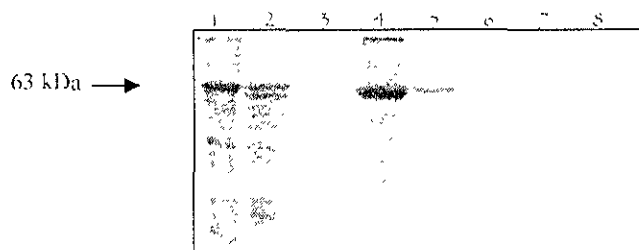


Fig. 15a.- Enriquecimiento por adsorción de la actina de 63 kDa por una columna de Hidroxilapatita . Gel de acrilamida al 10%, teñido con azul de coomasie. 1.- Fracción total sonicada de nódulos de 16 días. 2.-Fracción total sonicada de diferentes días, 3.- Lavado 4 mM fosfatos, 4-8.- Elusión con 10 mM, 20 mM, 30 mM, 40 mM y 50 mM de fosfatos, respectivamente.

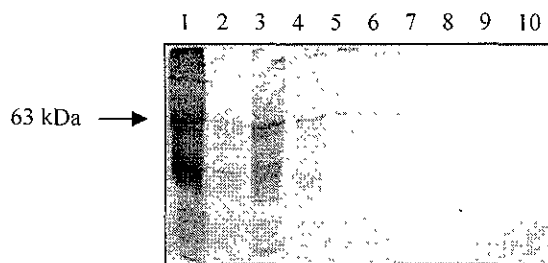


Fig. 15b.- Enriquecimiento por adsorción de la actina de 63 kDa por una columna de DEAE-Sephacel. Gel de acrilamida al 10%, teñido con azul de coomasie. 1.- Fracción total sonicada de nódulos de 16 días, 2.- Lavado 50 mM NaCl, 3-10.- Elusión 100 mM, 200 mM, 300 mM, 400, 500 mM, 600 mM, 700 mM NaCl y 800 mM de NaCl.

Ambas columnas son capaces de unir a la actina de 63 kDa y si bien no se obtiene una fracción pura de la proteína el sistema de purificación por medio de columnas de intercambio iónico promete ser una excelente herramienta para la purificación del conjugado. Por otro lado, se ha intentado la purificación de la proteína por electrolución, obteniendo resultados positivos, aunque el rendimiento es muy bajo.

III ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE ACTINA.

Expresión diferencial de las isoformas de actina en frijol.

En el laboratorio previamente, se había demostrado que existía una expresión diferencial de las isoformas de actina durante la formación del nódulo. Durante procesos de purificación de actina, Pérez, H. y colaboradores, determinaron que en raíces de 7 días se expresaban dos isoformas, mientras que en los nódulos de 21 días, solo se detectaba una. Los ensayos tipo western blot en geles de doble dimensión, se realizaron utilizando extractos totales de proteínas en condiciones reductoras, para evitar la actividad proteolítica, de tres diferentes órganos (flor, nódulo y raíz) (Fig. 16).

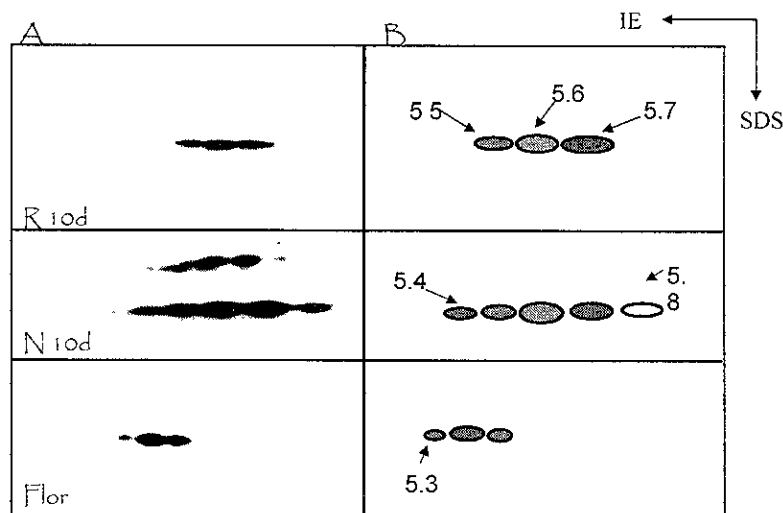


Fig. 16.- Inmunodetección en un gel de doble dimensión de las isoformas de actina en tres diferentes tejidos utilizando el anticuerpo anti-actina. Gel de acrilamida al 10%. A, inmunodetección de las isoformas de actina. B, esquematización de las isoformas. Los pI son indicados.

En raíces de 10 días fueron detectadas tres isoformas, mientras que los nódulos de 10 días presentan cinco isoformas de actina. En este mismo ensayo, se incluyeron extractos totales de flor, este órgano presenta un número de isoformas similar al de raíz, pero solo una de ellas es compartida con este órgano, sin embargo con el nódulo comparte las otras dos (ver Fig. 1 del artículo). Durante la organogénesis del nódulo existe una expresión diferencial, se expresan un total de seis isoformas en los días de mayor actividad en el nódulo, 12-16 días y en los días de envejecimiento del nódulo el patrón de isoformas es similar al de la raíz.

DISCUSIÓN

Expresión de las isoformas de actina.

En trabajos previos en el laboratorio, H. Pérez reportó la presencia de dos isoformas de actina en raíces y una en nódulos de *Phaseolus vulgaris*. La diferencia en el número de isoformas detectadas durante este trabajo con respecto al reporte anterior se debe básicamente a tres razones fundamentales; H. Pérez localizó una gran actividad proteolítica en los extractos de nódulo, aún más, detectó la presencia de una proteasa con gran afinidad por actina, además él utilizó para sus experimentos extractos de proteínas de la fracción soluble, mientras que los extractos utilizados en este reporte son extraídos en condiciones que previene la actividad proteolítica y al mismo tiempo se obtiene las proteínas de la fracción soluble y de la insoluble (ver material y métodos en el artículo). Finalmente, H. Pérez utilizó nódulos de 21 días donde sólo se expresan tres isoformas, una de ellas mayoritariamente, es muy probable que debido a la actividad proteolítica sólo recuperaba en sus fracciones enriquecidas a la isoforma mayoritaria.

En animales se ha reportado la expresión diferencial de isoformas de actina durante el proceso de organogénesis, de forma similar en los sistemas vegetales la expresión de la actina es regulada espacial y temporalmente en diversos órganos (Muthugapatti *et al*, 1999), en algunas ocasiones la expresión es incluso inducida por fitohormonas (Muthugapatti *et al*, 2001). La formación del nódulo simbiótico constituye un claro ejemplo de la organogénesis en plantas, resultando un modelo ideal para la realización de estudios en la expresión de actina. Los resultados de la expresión de las isoformas de actina (ver Fig.1 artículo) demuestran que de forma similar a lo que ocurre en los sistemas animales, la actina se expresa diferencialmente durante la organogénesis del nódulo simbiótico En las raíces de *Phaseolus vulgaris* se expresan tres isoformas, una de ellas mayoritariamente (pI 5.6), mientras que en los primeros días del desarrollo del nódulo (10 días) el número de isoformas aumenta a cinco y durante el desarrollo del nódulo llega hasta seis. La presencia de tres nuevas isoformas en el nódulo, dos de ellas más ácidas (pI 5.3 y 5.4) y otra más básica (pI 5.8), con respecto a la raíz, indica que el control de la expresión diferencial de actina podría estar sujeta a funciones específicas de cada una de las isoformas expresadas en las primeras etapas del desarrollo, o a la participación del citoesqueleto

durante el proceso de fijación de nitrógeno, particularmente la isoforma más básica (pl 5.8) que tiene una expresión nódulo específico.

Por otra parte, en el tejido de flor se expresan tres isoformas, mismo número que el de la raíz, pero a diferencia de este órgano, en la flor se expresan las isoformas más ácidas (pl 5.3 y 5.4). Existen reportes de isoformas de actina específicas para polen, que se encuentran involucradas en tipos de crecimiento como el desarrollo del tubo polínico. Durante las primeras etapas de la nodulación se presentan un gran número de eventos celulares que involucran al citoesqueleto, es muy probable que varias de estas funciones estén coordinadas por alguna o las tres nuevas isoformas de actina. Por ejemplo, el crecimiento del tubo polínico presenta muchas similitudes con el hilo de infección, lo que posiblemente sugiera que la isoforma involucrada en ambos eventos sea la misma.

Las variaciones en el número de isoformas durante los diferentes días de la nodulación, indican probablemente que existen funciones específicas para cada isoforma, que podrían ser necesarias durante los tiempos de mayor actividad del proceso de fijación de nitrógeno, esto se nota claramente durante los días 10, 12, 14 y 18; a partir de los 21 días de nodulación, la mayoría de las actividades y procesos celulares del nódulo se apagan, comenzando una etapa de senescencia de este órgano; interesantemente, a partir de esos días tanto el número como las concentraciones de las isoformas de actina repiten el patrón que presenta la raíz, lo que refuerza la idea de que las tres nuevas isoformas se expresan para realizar funciones determinadas. Por otra parte, suponemos que las tres isoformas originales presentes en raíz tienen preferentemente funciones vegetativas, sin embargo no hemos analizado las isoformas del meristemo de la raíz para sustentar esta hipótesis.

Lo anterior debe estar relacionado a la regulación de diferentes proteínas de unión a actina involucradas en el desarrollo y funcionamiento del nódulo. La profilina es una de las proteínas asociadas a la actina que modula y regula la polimerización de los microfilamentos. En los nódulos de frijol, la profilina es modificada por diversas fosforilaciones que dan como resultado cinco isoformas específicas del nódulo (Guillen *et a* 1998). El número de estas isoformas varía durante la ontogenia del nódulo (Guillen, G. comunicación personal). El hecho de que exista una

regulación en la expresión de las isoformas de profilina, similar al de la actina, sugiere que probablemente las diversas funciones de los microfilamentos durante la simbiosis esté regulada por una expresión conjunta, no solamente de actina, sino de un gran número de proteínas asociadas a los microfilamentos como profilina

Ubiquitinación de actina

Este es el primer reporte de ubiquitinación de actina en plantas, como se ha mencionado, existen sólo algunos reportes de ubiquitinación de actina en sistemas animales. Sin embargo, en plantas esto resulta muy interesante y relevante ya que esta modificación postraduccional de la actina se da como respuesta de las células vegetales a los diversos microorganismos.

En el trabajo ya mencionado de H. Pérez, tampoco se reporta que el anticuerpo anti-actina detecte una proteína de 63 kDa en extractos de nódulos. Como se mencionó anteriormente, en dicho trabajo solo se utilizaron proteínas de la fracción soluble de nódulos de 21 días, en la figura 1 y 4 del artículo se muestra claramente que la actina ubiquitinada no se encuentra después de los 18 días y solo puede ser detectada en la fracción insoluble.

En el primer reporte de actina ubiquitinada en sistemas animales se menciona que esta modificación es tejido específico, el músculo de vuelo de *Drosophila*, incluso se propone que esta modificación es solamente en una isoforma en particular (Ball *et al* 1987); sin embargo, en un reporte posterior se muestra que la ubiquitinación de actina en *Drosophila* no es exclusiva de una sola isoforma, aunque si es tejido específico, isoformas que normalmente no se expresan en el músculo de vuelo al ser expresadas en este tejido la mayoría de ellas son ubiquitinadas, en este trabajo se reporta que todas las isoformas de actina en el nódulo simbiótico son ubiquitinadas, al menos en alguna etapa del desarrollo de este órgano (Fyberg. *et al.*1998). Si bien en un principio podría parecer que la ubiquitinación de actina en plantas también es tejido específico, ya que solamente se presenta en los nódulos simbióticos de diferentes leguminosas y no en el resto de la planta, al realizar ensayos de inmunodetección en otras plantas se detectó que la ubiquitinación de actina también está presente en las raíces de frijol infectadas con micorrizas, en hojas de tabaco y chile infectadas con diferentes patógenos, pero solamente en los sitios de infección de

los microorganismos. Esto indica que la modificación postraducciona de actina no es precisamente tejido específico, si no más bien una respuesta local y específica a la presencia del microorganismo, contrario a muchas respuestas de las plantas a infecciones, ésta no es una reacción sistémica.

Como se muestra en la Figura 3a del artículo, tanto las bacterias como los hongos, pero no los virus, generan la ubiquitinación de actina como una respuesta local y específica de las plantas. Resulta interesante que los virus no generen la misma respuesta que las bacterias y los hongos, esto podría deberse a los mecanismos o estrategias que utilizan los virus para infectar a la planta. Los hongos y las bacterias utilizan, en la mayoría de los casos, moléculas señaes como preámbulo del inicio de la infección, estas moléculas son las responsables de alterar los mecanismos de defensa de la planta, es decir, un gran número de eventos celulares y moleculares comienzan a generarse una vez que la planta detecta a la molécula seña del microorganismo, sin necesidad de que el organismo penetre o tenga contacto con la planta (Staiger, 2000). Kobayashi *et al* en 1997, demostraron que existe un rearrreglo de los microfilamentos aún 3 ó 4 horas antes de la penetración del haustorio contacto del hongo en la planta. Lo anterior es corroborado en este trabajo con los experimentos que se realizaron en las raíces y en células en cultivo de frijol tratadas con un elicitor de levadura. La respuesta de la planta ante el elicitor indica que los mecanismos que regulan la modificación de actina se localizan en los primeros niveles de una cascada de señalización involucrada en la respuesta a patógenos por parte de la planta. Aunado a lo anterior, los trabajos realizados con las células en suspensión tratadas con H_2O_2 , señaan que la ubiquitinación de actina, como respuesta a patógenos, es un evento relacionado a una respuesta inmune de la planta (Sandermann, 2000).

Por otro lado, la ausencia de la ubiquitinación de actina en las células de las raíces ante la presencia de los factores de nodulación, podrían contraponerse con lo anterior. Si bien los factores de nodulación son señaados como la molécula responsable de diversas modificaciones en los pelos radiculares (Cárdenas *et al* 1998), se sabe que es necesario la presencia de otras moléculas de la bacteria para activar el mecanismo completo de respuesta de la planta (Spaink, 2000). Adicionalmente, en las primeras etapas de la percepción del Factor Nod, la “producción de especies reactivos de oxígenos”, como H_2O_2 y O_2^- (ROS, por sus siglas en inglés) es

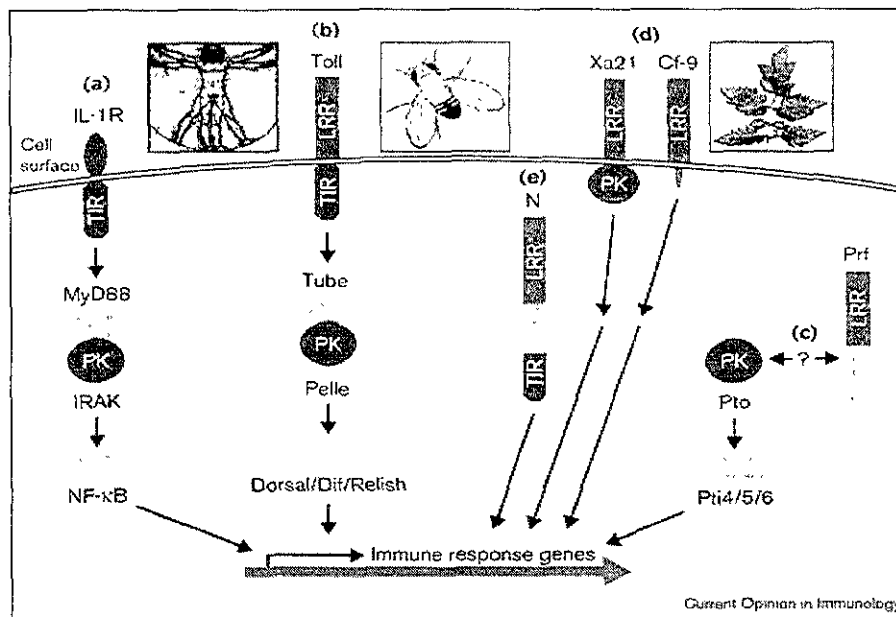
controlada por una catalasa (Santos *et al.*, 2001). Lo anterior resulta muy interesante, ya que si el H_2O_2 es capaz de provocar la ubiquitinación de actina en células vegetales y si ROS está bloqueada en los inicios del establecimiento de la simbiosis, indica con mayor fuerza que el control de la modificación de actina se encuentra ligada a una respuesta innata, lo que se ha denominado la “respuesta inmune innata” de las plantas (Sessa and Martin, 2000).

Las plantas son blanco de un gran número de parásitos, incluyendo virus, bacterias, hongos, nemátodos, insectos e inclusive otras plantas. Las plantas responden a esta presión con mecanismos que involucran el reconocimiento y “contraataque” al organismo invasor. Cuando la planta detecta una invasión induce una respuesta local de defensa en el punto de infección, que incluyen la muerte celular programada, referida como la respuesta hipersensible (HR, por sus siglas en ingles); la reestructuración del citoplasma en el sitio de infección; la producción de metabolitos anti-microbianos y la inducción de la expresión de genes relacionados a defensa (McDowell and Dangl, 2000). Por otro lado, estos mecanismos de defensa no pueden ser utilizados por la planta sin correr el riesgo de producir serios daños colaterales en el tejido de la planta hospedera, por lo que este despliegue de defensa tiene que ser confinado a un tiempo y espacio apropiado. Estos requerimientos sugieren que una compleja red regulatoria, altamente integrada, controla los mecanismos de respuesta de defensa. La respuesta específica a los patógenos está precedida y modulada por la “respuesta inmune innata”.

La inmunidad innata es una forma de defensa contra la infección microbiana conservada por plantas, insectos y vertebrados (McDowell and Dangl, 2000). Estudios recientes de receptores y componentes de la red de transducción de señales que tienen un papel determinante durante la respuesta a patógenos en la planta, han revelado grandes similitudes con las vías de respuesta inmune innata en animales e insectos. De forma similar a lo que ocurre en animales, en plantas los receptores específicos, codificados por genes de resistencia interactúan con productos de genes microbianos que activan la respuesta de defensa de la planta (Cohn *et al.*, 2001) (Fig. 17).

El concepto de inmunidad innata en animales se refiere a la primera línea de defensa del hospedero para limitar la infección durante las primeras horas de presencia del microorganismo. En plantas retadas con patógenos, la primera y rápida orden de respuesta de defensa para

contender con la infección representa un claro caso de inmunidad innata. Dentro de estas primeras respuestas se encuentra la HR, la cual esta asociada a la producción de ROS (Cessna *et al*, 2000).



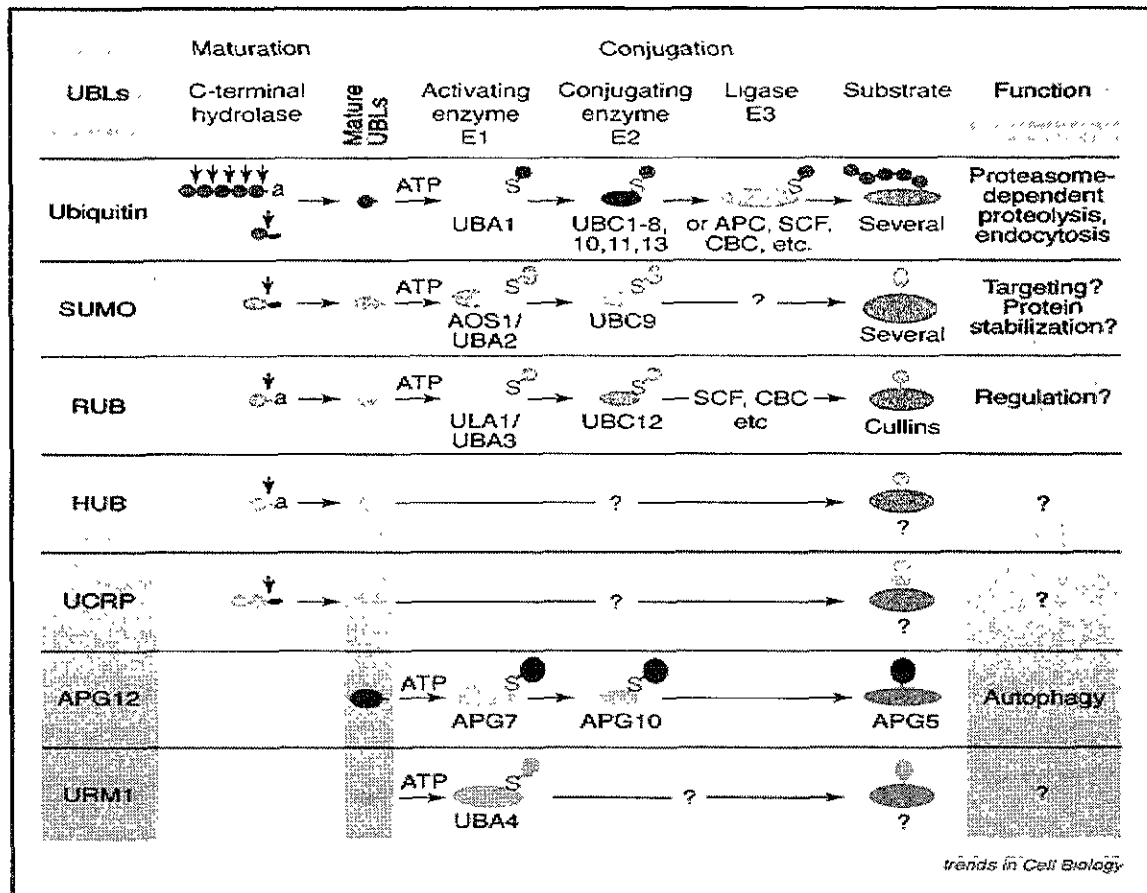
Tomada de Cohn *et al*, 2001

Fig. 17.- Componentes comunes entre animales, insectos y plantas relacionados con la respuesta inmune innata.

Por todo lo anterior, la ubiquitinación de actina como respuesta local y transitoria a la relación simbiótica de la planta con hongos y bacterias, a la interacción con diferentes patógenos; la asociación de esta modificación con H_2O_2 o con la presencia de un elicitor, sugieren fuertemente que la ubiquitinación de actina sea parte de una respuesta inmune innata de la planta.

La ubiquitinación ha estado ligada principalmente a la degradación de proteínas, aún más, hasta hace algún tiempo se pensaba que éste era el único papel de la ubiquitina, sin embargo, en los últimos años se ha demostrado que la modificación de proteínas por ubiquitina o por proteínas similares a ubiquitina (UbL, por sus siglas en inglés) no es sólo una señal para degradación (Hicke, 2001; Melchior, 2000; Viestra and Callis; 1999). Diversas proteínas que son modificadas con ubiquitina son estables aunque su función no sea del todo clara, como las histonas. Otras proteínas modificadas por UbL, tienen diferentes destinos al proteosoma (fig. 18)

(Jentsch and Ulrich, 1998; Gray and Estelle, 2000; Roa-Naik *et al*, 1998; Jentsch and Pyrowolakis, 2000).

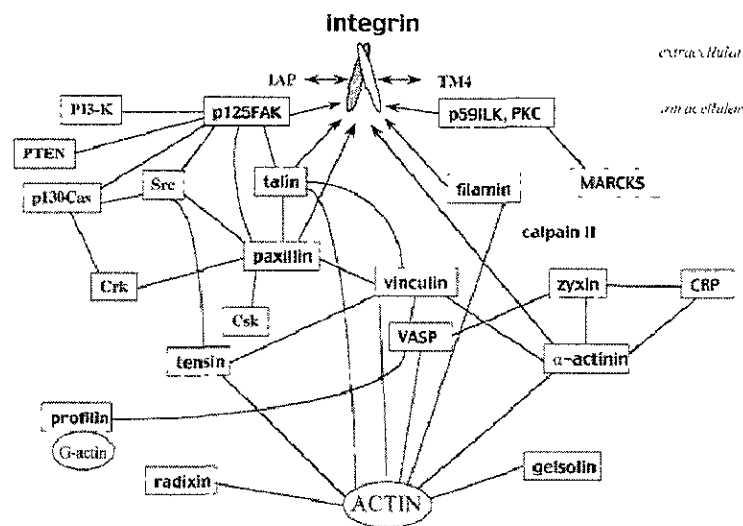


Tomado de Jentsch and Pyrowolakis, 2000

Fig. 18.- Tabla que representa las diferentes Ubls y sus posibles funciones.

En este trabajo se muestra que la ubiquitinación de actina no se trata de una señal para degradación, así mismo que esta modificación se localiza en la zona del citoesqueleto cortical de actina. Como se mencionó anteriormente la monoubiquitinación de proteínas puede estar dada por la unión de una o más moléculas de ubiquitina o de Ubls a lo largo de la proteína blanco (Fig. 3), por lo que es muy probable que la ubiquitinación de actina esté dada por dos moléculas de ubiquitina o bien por dos moléculas de Ubls. Al tratarse de una monoubiquitinación explica el por que la actina no es degradada por el sistema de proteosoma, incluso es mucho más estable que la actina sin modificar (42 kDa); del mismo modo, es muy posible que esta modificación de

actina le proporcione diferentes funciones que intervengan durante las primeras etapas de la respuesta de defensa de la planta ante patógenos. Por otro lado, la localización del conjugado en el citoesqueleto cortical de actina, señala que esta modificación podría estar modificando la localización de la actina “conduciendola” a sitios donde posiblemente realice una función de barrera o contención o bien de soporte y comunicación para el organismo invasor dentro de las células del hospedero. En los sistemas animales se han reportado los denominados sitios de adhesión focal (FAs, por sus siglas en ingles) (Chakraborty *et al*, 1995; Petit and Thiery, 2000), que son entidades de proteínas que sirven de anclaje, sostén y sitios de comunicación de la membrana al citoplasma (Fig. 19). En las plantas la mayoría de los componentes de los FAs no han sido todavía descritos, pero posiblemente la “nueva” función de los microfilamentos ubiquitinados estén supliendo alguna de las funciones de los componentes “faltantes” en plantas.



Tomado de Petit and Thiery, 2000

Fig. 19.- Diagrama que esquematiza las interacciones proteína-proteína detectadas y en descritas en los FKA sistemas animales.

La capacidad de las células de responder a diferentes estímulos externos es regulada y coordinada, en la mayoría de los casos, por la polimerización y despolimerización de los microfilamentos de actina (Dramsi and Cossart, 1998; Schmidt and Hall, 1998), por lo que en los procesos de infección de las plantas por patógenos, la red de los microfilamentos debe de estar desempeñando un papel crucial en la coordinación de la respuesta de la planta, así como en el

mantenimiento de la estructura y forma celular. Lo anterior hace que resulte aun más interesante el hecho que la monoubiquitinación de actina no sea una señal para degradación, inclusive la actina de 63 kDa es más estable que la actina de 42 kDa que no es ubiquitinada. Esto sin duda indica que la ubiquitinación le proporciona a la actina características que podrían estar modificando algunas de las funciones de los microfilamentos o posiblemente su localización celular.

LITERATURA CITADA

- Alberts, B., *et al* (1989). Molecular biology of the cell. 2nd Edition. *Garland Publishing Inc.* pp 613-680.
- An, Y-Q., *et al* (1996). Conserved expression of the Arabidopsis ACT1 and ACT3 actin subclass in organ primordia and mature pollen. *Plant Cell*. **8**: 15-30.
- Ball, E., *et al.* (1987). Arthrin, a myofibrillar protein of insect flight muscle, is an actin-ubiquitin conjugate. *Cell*. **51**: 221-228
- Barlow, P. & Baluška, F. (2000). Cytoskeleton perspectives on root growth and morphogenesis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **51**: 289-322.
- Beven, A., *et al* (1991). Monoclonal antibodies to plant nuclear matrix reveal intermediate filament-related components within the nucleus. *J. Cell Sci.* **98**: 293-302.
- Broughton, W. *et al* (2000). Key to symbiotic harmony. *J. Bacteriol.* **182**: 5641-5652.
- Callis, J. and Vierstra, R. 2000. Protein degradation in signaling. *Curr. Opin. Plant Biol.* **3**: 381-386.
- Cárdenas, L. *et al.* (1998). Rearrangement of actin microfilaments in plant root hairs responding to *Rhizobium etli* nodulation signal. *Plant Physiol.* **116**: 871-877.
- Castanotto, D. and Rossi, J.J. (1998) Cooperative interaction of branch signals in the actin intron of *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* **26**: 4137-4145.
- Cessna, S.G. *et al* (2000) Oxalic acid, a pathogenicity factor for *Sclerotinia sclerotiorum*, suppresses the oxidative burst of host plant. *Plant Cell*. **12**: 2191-2199
- Chakraborty *et al*, (1995) A focal adhesion factor directly linking intracellularly motile *Listeria monocytogenes* and *Listeria ivanovii* to the actin-based cytoskeleton of mammalian cells. *EMBO J.* **14**: 1314-1321.
- Cohn, J., Sessa, G. and Martin, G.B. 2001. Innate immunity in plants. *Curr Opin Immunol.* **13**: 55-62.
- Cooper J.A. and Schafer D.A. (2000) Control of actin assembly and disassembly at filament ends. *Curr. Opin. Cell Biol.* **12**: 97-103 (2000).
- D'Andrea, R.M. *et al* (2001) Abnormal patterns of microtubule-associated protein-2 (MAP-2) immunolabeling in neuronal nuclei and Lewy bodies in Parkinson's disease substantia nigra brain tissues. *Neuroscience Letters*. **3006**: 137-140.
- Didry, D., *et al* (1998) Synergy between actin depolymerizing factor/cofilin and profilin is increasing actin filament turnover. *J. Biol. Chem.* **273**: 25602-25611.
- Ding, B. *et al* (1996) Evidence that actin filaments are involved in controlling the permeability of plasmodesmata in tobacco mesophyll. *Plant J.* **10(1)**: 157-164.
- Downie, J.A. and Walker, S.A. (1999) Plant responses to nodulation factors. *Curr Opin Plant Biol.* **2**: 483-489.

- Dramst, S. and Cossart, P. (1998) Intracellular pathogens and the actin cytoskeleton. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* **14**: 137-166.
- Fedorova, E. *et al* (1998) Ultrastructural immunolocalization of ubiquitin conjugated proteins in legume root nodules. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* **30 (1)**: 85-94.
- Fyberg, E. *et al.* Functional nonequivalence of *Drosophila* actin isoforms. *Biochem. Genetics* **36**: 271-287 (1998).
- Gallucci, L. *et al* (2000) Identification of ubiquitinated repeats in human erythroid α -spectrin. *Eur. J. Biochem.* **267**: 2812-2819.
- Gauthier, M., *et al* (1997). Endogenous autoinhibitors regulate changes in actin tyrosine phosphorylation during *Dictyostelium* spore germination. *Cell Signal.* **9**: 79-83
- Gibbon, B. *et al* (1997) Characterization of maize (*Zea mays*) pollen profilin function in vitro and in live cells. *Biochem J.* **327**: 909-915.
- Gibbon, B. *et al* (1998) Pollen profilin function depends on interaction with proline-rich motifs. *Plant Cell* **10**: 981-993.
- Grabski, S., *et al.* (1998) Regulation of actin tension in plant cells by kinases and phosphatases. *Plant Physiol.* **116**: 279-290.
- Grant, M. and Mansfield, J. (1999). Early events in host-pathogen interactions.. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2**: 312-319.
- Gray, W. and Estelle, M. (2000). Function of the ubiquitin-proteasome pathway in auxin response. *TIBS.* **25**: 133-138.
- Guillén, G., *et al* (1999) Profilin in *Phaseolus vulgaris* is encoded by two genes (only one expressed in root nodules) but multiple isoforms are generated in vivo by phosphorylation on tyrosine residues. *Plant J.* **19**: 497-508.
- Harris, K.F. *et al* (1999) Ubiquitin-mediated degradation of active Src tyrosine kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **96**: 13738-13743.
- Hartwing, J. H. and Kwiatkowski D. J. (1991) Actin-binding proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* **3**: 87-97.
- Hicke, L. (2001) Protein regulation by monoubiquitin. *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* **2**, 195-201
- Hightower, R. C. and Meagher, R. B. (1986). The molecular evolution of actin. *Genetics* **114**: 315-332.
- Huang, S., *et al* (1996a). The *Arabidopsis* ACT4/ACT12 actin gene subclass is strongly expressed in post-mitotic pollen. *Plant J.* **10**: 189-202.
- Huang, S., *et al.* (1996b). The *Arabidopsis* profilin gene family. *Plant Physiol.* **111**: 115-126.
- Huang, S., *et al* (1997). The *Arabidopsis* ACT11 actin gene is strongly expressed in tissues of the emerging inflorescence, developing ovules, and pollen. *Plant Mol. Biol.* **33**: 125-139.

- Iwaya, K. *et al* (1997). Immunoreaction at 43 kDa with anti-ubiquitin antibody in breast neoplasms. *Jpn J Cancer Res.* **88** (3): 273-280.
- Jentsch, S. & Ulrich, H. (1998). Ubiquitous déjà vu. *Nature* **395**: 321-323
- Jentsch, S. and Pyrowolakis, G. (2000). Ubiquitin and its kin: how close are the family ties? *Trends Cell Biol.* **10**: 335-342.
- Jiang, C.-J., *et al* (1997a) The maize actin-depolymerizing factor, ZmADF3, redistributes to the growing tip of elongating root hairs and can be induced to translocate into the nucleus with actin. *Plant J.* **12**: 1035-1043.
- Jiang, C.-J., *et al* (1997b) F-actin and G-actin binding are uncoupled by mutation of conserved tyrosine residues in maize actin depolymerizing factor (ZmADF). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 9973-9978.
- Joazeiro, C. & Hunter, T. (2000). Biochemistry: Ubiquitination—more two to tango. *Science.* **289**, 2061-2062.
- Kabsch W. and Vandekerckhove J. (1992) Structure and function of actin. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **21**: 49-76.
- Kameyama, K. *et al.* (2000). Tyrosine phosphorylation in plant bending. *Nature.* **407**: 37.
- Kobayashi, Y. *et al.* (1997). Dynamic reorganization of microfilaments and microtubules is necessary for the expression of non-host resistance in barley coleoptile cells. *Plant J.* **11**:525-537.
- Kokame, K., *et al* (2000). Herp, a new ubiquitin-like membrane protein induced by endoplasmic reticulum stress. *J Biol. Chem.* **275**, 32846-32853.
- Lenk, U. and Sommer, T. (2000). Ubiquitin-mediated proteolysis of a short-lived regulatory protein depends on its cellular localization. *J. Cell Biochem.* **275** (50): 39403-39410.
- Liu, X. and Yen, L-F. (1992) Purification and characterization of actin from maize pollen. *Plant Physiol.* **99**: 1151-1155.
- Long, S. R. (2001) Genes and signals in the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Plant Physiol.* **125**: 69-72.
- Mannherz H. G. (1992) Crystallization of actin in complex with actin-binding proteins. *J. Biol. Chem.* **267**: 11661-11664.
- McCurdy, D. W. and Williamson, R. E. (1991). Actin and actin-associated proteins in: The cytoskeletal basis of plant growth and form. *Lloyd C. W. Ed. Academic press, N. Y.* pp 3-14.
- McDowell, J. and Dangl, J. (2000). Signal transduction in the plant immune response. *TIBS.* **25**, 79-82.
- McDowell, J., *et al* (1996). Preferential expression of the Arabidopsis ACT7 actin gene in developing tissues. *Plant Physiol.* **111**: 699-711.
- McElroy, D., *et al* (1990). Characterization of the rice (*Oryza sativa*) actin gene family *Plant Mol. Biol.* **15**: 257-268.
- McLean, B. G., *et al* (1990a). Tissue-specific expression of divergent actins in soybean root. *Plant Cell* **2**: 335-344.

- McLean, B. G., *et al* (1990b). Plants contain highly divergent actin isoforms. *Cell Motil. Cytosk.* **17**: 276-290.
- McNulty, A. K. and Saunders, M. J. (1992) Purification and immunological detection of pea nuclear intermediate filaments: evidence for plant nuclear lamins. *J. Cell Sci.* **103**: 407-414.
- Meagher, R. B. (1991) Divergence and differential expression of actin gene families in higher plants. *Int. Rev. Cytol.* **125**: 139-163.
- Meagher, R. B. and McLean, B. G. (1990). Diversity of plant actins. *Cell Motil. Cytosk.* **16**: 164-166.
- Meagher, R. B., *et al* (1999). Isovariant dynamics expand and buffer the responses of complex systems: The diverse plant actin gene family. *Plant Cell* **11**: 995-1005.
- Melchior, F. (2000). SUMO-nonclassical ubiquitin. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **16**: 591-626.
- Minguez, A. and Moreno D-E. S. (1993). Immunological characterization of lamins in the nuclear matrix of onion cells. *J. Cell Sci.* **106**: 431-439.
- Mullins, R. D., Kelleher, J. F. and Pollard, T. D. (1996) Actin' like actin? *Trends Cell Biol.* **6**: 208-212.
- Muthugapatti K. *et al.* (2001) One Plant Actin Isovariant, ACT7, Is Induced by Auxin and Required for Normal Callus Formation. *Plant Cell.* **13**: 1541-1554.
- Muthugapatti, K. *et al* (1999) Actin-organelle interaction: Association with chloroplast in *Arabidopsis* leaf mesophyll cells. *Cell Motil. Cytoskeleton.* **44**: 110-118.
- Neish, A.S. *et al* (2000) Prokaryotic regulation of epithelial response by inhibition of I κ B- α ubiquitination. *Science.* **289**: 1560-1563.
- Niini, S.S. (1996) Tubulin and actin protein patterns in Scots pine (*Pinus sylvestris*) roots and developing ectomycorrhiza with *Suillus bovinus*. *Physiologia Plantarum.* **96**: 186-192.
- Pérez, H. E., *et al* (1994) Actin isoforms in non-infected roots and symbiotic root nodules of *Phaseolus vulgaris* L. *Planta.* **193**: 51-56.
- Petit, V. and Thiery J. (2000) Focal adhesions: structure and dynamics. *Biology of the Cell.* **92**: 477-494.
- Pollard, T. D. (1986) Assembly and dynamics of the actin filament system in nonmuscle cells. *J. Cell Biochem.* **31**: 87-95.
- Puius, Y. A., *et al* (1998) The modular structure of actin-regulatory proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* **10**: 23-34.
- Rao-Naik, C. *et al* (1998) The Rub family of ubiquitin-like proteins. *J. Biol. Chem.* **52**: 34976-34982.
- Ressad, F. *et al.* Control of actin filament length and turnover by actin depolymerizing factor (ADF/cofilin) in the presence of capping proteins and ARP2/3 complex. *J. Biol. Chem.* **274**, 20970-20976 (1999).
- Riezman, H. (1999). Down regulation of yeast G protein-coupled receptors. *Cell Dev. Biol.* **9**: 129-134.
- Romeis, T. (2001). Protein kinases in the plant defence response. *Curr Opin Plant Biol.* **4**: 407-414.

- Sánchez, F. *et al* (1991). Control of nodulation genes in root-nodule development and metabolism. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **42**: 507-528.
- Sandermann, H. (2000). Active oxygen species as mediators of plant immunity: Three case studies. *Biol. Chem.* **381**: 649-653.
- Santos, R. *et al* (2001). Oxidative burst in alfalfa-*Sinorhizobium meliloti* symbiotic interaction. *Mol. Plant-Microbe Interact* **14**: 86-89.
- Schmidt, A. and Hall, M. (1998). Signal to the actin cytoskeleton *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **14**: 305-338
- Schultze, M. and Kondorosi, A. (1998). Regulation of symbiotic root nodule development. *Annu. Rev. Genet.* **32**: 33-57.
- Sessa, G. and Martin, G.B. (2000) Signal recognition and transduction mediated by the tomato Pto kinase: a paradigm of innate immunity in plants. *Microbes and infection.* 1591-1597.
- Sheterline, P. and Sparrow, J. C. (1994) Actin. *Protein profile.* **1**: 1-121.
- Shih, S., *et al.* (2000). Monoubiquitin carries a novel internalization signal that is appended to activated receptors. *EMBO J.* **19**: 187-198
- Sook, S. A., *et al* (1999). The origin and evolution of green algal and plant actins. *Mol. Biol. Evol.* **16**: 275-285.
- Spaink, H. (2000). Root nodulation and infection factors produced by rhizobial bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **54**: 257-288.
- Staiger, *et al* (1993). The profilin multigene family of maize: differential expression of three isoforms. *Plant J.* **4**: 631-641.
- Staiger, *et al* (1997). Profilin and actin-depolymerizing factor: Modulators of actin organization in plants. *Trends Plant Sci.* **2**: 275-281.
- Staiger, C. (2000). Signal to the actin cytoskeleton in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **51**: 257-288.
- Trausch, J.S., Grenfeli, S.J., Handley-Gearhart, P.M., Ciechanover, A. and Schwartz, A.L. 1993. Immunofluorescent localization of the ubiquitin-activating enzyme, E1, to the nucleus and cytoskeleton. *Am. J. Physiol.* **264**: 93-102.
- Vahey, M. and Scordilis, S. P. (1980) Contractile proteins from tomato. *Can. J. Bot.* **58**: 797-801.
- van den Ent, F., *et al* (2001) Prokaryotic origin of the actin cytoskeleton. *Nature.* **413**: 39-44.
- Verma, D., *et al* (1978). Isolation and characterization of the membrane envelope enclosing the bacteroids in soybean root nodules. *J. Cell Biology.* **78**: 919-936.
- Vierstra, R. and Callis, J. (1999). Polypeptide tags, ubiquitous modifiers for plant protein regulation. *Plant Mol. Biol.* **41**: 435-442.

- Villanueva, M. *et al* (1999). Actin expression in germinating seeds of *Phaseolus vulgaris* L. *Planta*. **207**, 582-589.
- Weissman, A.M. (2001). Themes and variations on ubiquitylation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. **2**: 169-178.
- Yu, W. and Moreno D-E. S. (1999). The plant nucleoskeleton: ultrastructural organization and identification of NuMA homologues in the nuclear matrix and mitotic spindle of plant cells. *Exp. Cell Res.* **246**: 516-526.
- Zigmond, S. H. (1998). Actin cytoskeleton: The Arp2/3 complex gets to the point. *Curr. Biol.* **8**: 654-657.