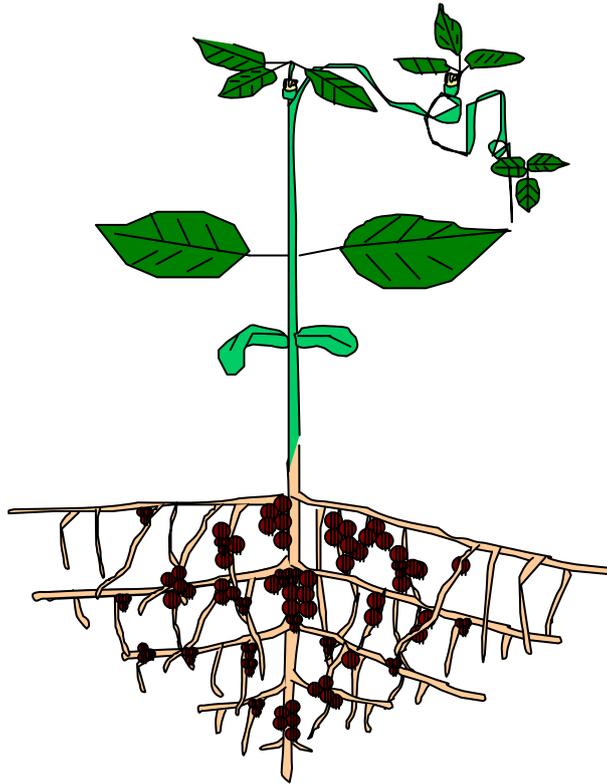




Facultad de Ciencias
Universidad de Córdoba

**Clonación, caracterización y análisis de expresión de
genes que codifican asparragina sintetasa en *Phaseolus
vulgaris***



DANIEL OSUNA JIMÉNEZ
Córdoba, 2000



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

FACULTAD DE CIENCIAS



Clonación, caracterización y análisis de expresión de genes que codifican asparragina sintetasa en *Phaseolus vulgaris*

Memoria presentada por Daniel Osuna Jiménez para optar al grado de Doctor en Bioquímica

Directores del Trabajo:

Dr. Manuel Pineda Priego
Profesor Titular de Bioquímica y Biología Molecular

Dr. Miguel Aguilar Urbano
Profesor Asociado de Bioquímica y Biología Molecular

EMILIO FERNÁNDEZ REYES, Catedrático de Universidad y Director del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Córdoba,

INFORMA:

El trabajo titulado “**Clonación, caracterización y análisis de expresión de genes que codifican asparragina sintetasa en *Phaseolus vulgaris***” ha sido realizado por Daniel Osuna Jiménez, bajo la dirección de los Dres. Manuel Pineda Priego y Miguel Aguilar Urbano en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Córdoba, y reúne todos los requisitos exigidos por la legislación vigente para optar al grado de Doctor en Bioquímica. La propuesta del tribunal que ha de juzgar dicho trabajo fue aprobada en el Consejo de Departamento de 5 de junio de 2000.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmo el presente documento en Córdoba, a 21 de junio de 2000.



Dr. Emilio Fernández Reyes

MANUEL PINEDA PRIEGO, Profesor Titular de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Córdoba, y

MIGUEL AGUILAR URBANO, Profesor Asociado de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Córdoba,

INFORMAN

Que el presente trabajo, titulado “**Clonación, caracterización y análisis de expresión de genes que codifican asparragina sintetasa en *Phaseolus vulgaris***”, ha sido realizado bajo nuestra dirección por Daniel Osuna Jiménez en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Córdoba, y reúne todos los requisitos exigidos para optar al grado de Doctor en Bioquímica.

Y para que conste, firmamos el presente documento en Córdoba, a 21 de junio de 2000.



Dr. Manuel Pineda Priego



Dr. Miguel Aguilar Urbano

*A mi abuelo. Porque su vida ha sido una entrega desmedida de amor y sacrificio a los suyos.
Tu ausencia hace que estés aún más presente.
A mis padres y hermanos.*

Hoy, antes del alba, subí a la colina, miré los cielos apretados de luminarias y le dije a mi espíritu: cuando conozcamos todos esos mundos y el placer y la sabiduría de todas las cosas que contienen, ¿estaremos tranquilos y satisfechos?. Y mi espíritu dijo: no, ganaremos esas alturas para seguir adelante.

Walt Whitman

AGRADECIMIENTOS

Quisiera, en principio, considerar a las personas que han hecho posible la realización de este trabajo, el Dr. Manuel Pineda Priego y el Dr. Miguel Aguilar Urbano. La calidad científica y humana que han mostrado durante estos cuatro años de mi vida, no exentos de dificultades, han incidido de lleno en mi formación. Al Dr. Manuel Pineda quiero agradecerle la confianza que depositó en mí desde el primer momento, dándome la oportunidad de realizar esta Tesis Doctoral. Gracias por vuestra amistad.

Al Dr. Emilio Fernández, como Director del Departamento, darle las gracias por permitirme llevar a cabo este trabajo de investigación. He tenido el placer de trabajar en su grupo, y le agradezco su ayuda y amistad sincera.

De mis compañeros de grupo, quiero hacer alusión especial a Alfonso y Pilar, con los que he compartido muy buenos momentos a lo largo de estos cuatro años. Gracias por vuestra amistad y cariño. Sé que siempre podré contar con vosotros. A Gregorio me gustaría agradecer su amistad, así como su gran aportación a este trabajo; juntos hemos hecho un buen equipo.

A mis compañeros de grupo Javier, Melania, Rosa, Refaei, Marina y Belén, quiero agradecer su simpatía y amistad. A Pepe Vera por haberme aportado tanto como amigo. A Pedro porque durante el poco tiempo que le conozco siempre me ha mostrado lo mejor de él. Gracias por tus útiles consejos y por tu amistad.

Quisiera mencionar a los compañeros de laboratorio que, de una u otra forma, han hecho más fácil el día a día en el laboratorio. A Jesús por concentrar tanta persona en tan poco espacio; pocas veces me he reído tanto como con nuestros episodios diarios. A la porque desde que empezamos en este mundo de la Ciencia has demostrado ser una gran amiga fuera y dentro del laboratorio, a Javier porque en el trabajo diario has dado lo mejor de ti mismo como amigo, a Antonio Casado por saber transmitir sonrisas, a Antonio Benítez por esos momentos inolvidables de convivencia, a Vicente y David por saber impregnar de amistad cada día que he pasado con vosotros, a Susana, Mónica Gavira, Carmen, Ángel, Mercedes, Farid, Andrés, Lara, Mónica Pérez, Maite, Inma, José Antonio, Marisol, Juan Antonio, Yoselín, Pepe, Paqui, Lola, Maribel Igeño, Tino, Rafa Blanco, Enriqueta y Rafa Blasco. Gracias a todos por vuestra amistad y cariño.

A Carmen y Paco; siempre habéis estado ahí. Sois geniales.

A Rocío por su simpatía, amistad y entusiasmo que tan bien sabe contagiar.

A Encarna. Si es buena como genetista, mejor es como persona.

A Toño y Emilia. Gracias por vuestra ayuda y simpatía en todo momento.

A Juanito por llenar mi tiempo de sabiduría.

A Miguel H. por saber darle esa nota de humor a la vida.

A Conchi e Inés quiero agradecer su simpatía, amistad y eficacia en la resolución de mis problemas administrativos.

A mis amigos de Cabra por los buenos ratos vividos.

Al Ministerio de Educación y Ciencia por la concesión de una beca de formación de personal investigador.

Parte de los resultados que se presentan en esta Tesis Doctoral han sido publicados en los siguientes libros y revistas científicas:

Osuna D, Gálvez G, Pineda M, Aguilar M (1999) RT-PCR cloning, characterization and mRNA expression analysis of a cDNA encoding a type-II asparagine synthetase in common bean. *Biochimica et Biophysica Acta* 1445: 75-85.

Osuna D, Gálvez G, Pineda M y Aguilar M (2000). Clonación, caracterización y análisis de la expresión de un cDNA que codifica una asparragina sintetasa de tipo II en judía (*Phaseolus vulgaris*). En: *Avances en el metabolismo del nitrógeno: Bioquímica, Fisiología y Biología Molecular*, (Cánovas F. M. y Florencio F.J., eds.). Servicio de Publicaciones de la Universidad de Málaga. En prensa.

Gálvez G., **Osuna D.**, Pineda M., Pérez-Vicente R. y Aguilar M. (2000). Clonación por RT-PCR y caracterización molecular de un cDNA que codifica una asparragina sintetasa de tipo I en judía (*Phaseolus vulgaris*). En: *Avances en el metabolismo del nitrógeno: Bioquímica, Fisiología y Biología Molecular*, (Cánovas F. M. y Florencio F.J., eds.). Servicio de Publicaciones de la Universidad de Málaga. En prensa.

Asimismo, se han presentado en los siguientes congresos:

Aguilar M., **Osuna D.** y Pineda M. (1997). Molecular cloning of asparagine synthetase gene from *Phaseolus vulgaris*. Vth TRANSLEG MEETING. Córdoba, España.

Osuna D., Pineda M. y Aguilar M. (1997). Clonación molecular del gen de la asparragina sintetasa de judía (*P. vulgaris*). XII REUNIÓN NACIONAL DE LA SEFV-V CONGRESO HISPANO-LUSO DE FISIOLOGÍA VEGETAL. Córdoba, España.

Osuna D., Gálvez G., Pineda M. y Aguilar M. (1999). Clonación, caracterización y análisis de la expresión de un cDNA que codifica una asparragina sintetasa de tipo II en judía (*Phaseolus vulgaris*). V Reunión Nacional del Metabolismo del Nitrógeno. Torremolinos, España.

Gálvez G., **Osuna D.**, Pineda M., Pérez-Vicente R. y Aguilar M. (1999). Clonación por RT-PCR y caracterización molecular de un cDNA que codifica una asparragina sintetasa de tipo I en judía (*Phaseolus vulgaris*). V Reunión Nacional del Metabolismo del Nitrógeno. Torremolinos, España.

Osuna D., Gálvez Valdivieso G., Pérez-Vicente R., Pineda M. y Aguilar M. (1999). Clonación, caracterización molecular y análisis de la expresión de dos genes que codifican asparragina sintetatas en *Phaseolus vulgaris*. VI Congreso Hispano-Luso de Fisiología Vegetal-XIII Reunión Nacional de la SEFV. Sevilla, España.

ABREVIATURAS

A	Absorbancia
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNasa	Desoxirribonucleasa
ADNc	Ácido desoxirribonucleico copia
AMP	Adenosín monofosfato
APS	Persulfato amónico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNasa	Ribonucleasa
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
AS	Asparragina sintetasa
ATP	Adenosín trifosfato
BPB	Azul de bromofenol
BSA	Seroalbúmina bovina
Ci	Curio
CIAP	Fosfatasa alcalina de intestino de ternera
Cpm	Cuentas por minuto
DEPC	Dietil pirocarbonato
DNTPs	Desoxinucleótidos trifosfato
DTT	1,4-Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiamino tetraacético
FAD	Flavín adenín dinucleótido
Fig	Figura
g	Aceleración de la gravedad
GOGAT	γ -oxoglutarato aminotransferasa
GS	Glutamina sintetasa
h	Hora
IPTG	Isopropil β -D-tiogalactósido
kb	Kilobases
kDa	Kilodalton
Km	Constante de Michaelis Menten
LB	Medio de Luria-Bertani (cultivo de microorganismos)
min	Minuto
MOPS	Ácido 3 (N-morfolino) propanosulfónico
NAD(P)H	Nicotín adenín dinucleótido (fosfato) reducido
NiR	Nitrito reductasa
nm	Nanómetros
NR	Nitrato reductasa
Ntn	Nucleófilo N-terminal
PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PEG	Polietilenglicol
pfu	Unidades formadoras de halos (plaque-forming unit)
pI	Punto isoeléctrico
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PRPP	Fosforribosil pirofosfato

p/v	Peso/volumen
RACE	Amplificación rápida de extremos de ADNc (rapid amplification of cDNA ends)
rpm	Revoluciones por minuto
s	Segundo
SDS	Dodecil sulfato sódico
SSC	Solución de citrato sódico y cloruro sódico
T	Temperatura
TAE	Tampón Tris-ácido acético-EDTA
TBE	Tampón Tris-ácido bórico-EDTA
TBS	Tampón Tris-ácido bórico-cloruro sódico
TE	Tampón Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-tetrametil etilendiamina
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
U	Unidad internacional de actividad enzimática
UV	Ultravioleta
Vmax	Velocidad máxima
vol	Volumen
v/v	Volumen/volumen
WT	Tipo silvestre
X-gal	5-Bromo, 4-Cloro, 3-Indolil β -galactósido
λ	Longitud de onda
μ Ci	MicroCurio

ÍNDICE

I. <u>INTRODUCCIÓN</u>	1
1. Importancia del nitrógeno como nutriente.....	2
2. Origen del nitrógeno utilizado por las plantas.....	3
3. Organogénesis y diferenciación del nódulo radical.....	3
4. Fisiología del nódulo: simbiosis <i>Rhizobium</i> -leguminosa.....	8
4.1. Funciones de los fotosintatos.....	8
4.2. Nitrogenasa: propiedades físico-químicas y mecanismo de reacción.....	8
4.3. Metabolismo del carbono en nódulos: asimilación de amonio.....	10
5. Transporte del nitrógeno fijado al resto de la planta.....	12
5.1. Factores genético-moleculares.....	12
5.2. Factores ambientales y nutricionales.....	14
6. Síntesis de amidas en plantas superiores: biosíntesis de asparragina.....	19
7. Aproximaciones al estudio de la asparragina sintetasa.....	22
7.1. Estudios bioquímicos.....	22
7.2. Estudios moleculares.....	23
8. Regulación de la expresión de la asparragina sintetasa.....	24
8.1. Influencia de las condiciones de estrés.....	25
8.2. Influencia de la luz-oscuridad.....	25
8.3. Influencia de una fuente de carbono reducido.....	27
9. Importancia metabólica de la síntesis de asparragina en plantas y animales.....	27
10. Objetivos.....	28
II. <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	29
1. Reactivos.....	30
2. Material biológico.....	43
2.1. Material vegetal.....	43
2.2. Estirpes bacterianas.....	43
2.3. Sondas.....	44
3. Condiciones de cultivo de los microorganismos.....	44
3.1. Cultivos de <i>E. coli</i>	44
3.2. Cultivos de <i>Rhizobium</i>	44
3.3. Conservación de las estirpes bacterianas.....	44

4. Preparación de células competentes y procedimiento de transformación de <i>E. coli</i>	45
5. Construcción y escrutinio de una genoteca genómica de judía en el bacteriófago λ -FIX II.....	45
5.1. Digestión parcial con <i>Sau3AI</i>	46
5.2. Reacción de relleno parcial de los extremos cohesivos.....	46
5.3. Ligación de los brazos de λ -FIX II a los fragmentos de ADN.....	47
5.4. Empaquetamiento del ADN.....	47
5.5. Preparación de las células hospedadoras.....	47
5.6. Infección.....	48
5.7. Escrutinio de la genoteca.....	48
6. Aislamiento y purificación de ADN plasmídico y del bacteriófago λ FIX II.....	49
7. Purificación de fragmentos de ADN.....	51
7.1. Purificación por electroelución.....	51
7.2. Purificación mediante matriz de adhesión.....	51
8. Tratamientos con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico.....	52
9. Concentración de las muestras de ácidos nucleicos.....	52
9.1. Concentración por precipitación.....	52
9.2. Concentración por desecación.....	52
10. Cuantificación y medida de la pureza de ácidos nucleicos.....	52
11. Digestión de ácidos nucleicos con endonucleasas de restricción.....	53
12. Ligación de fragmentos de ADN a vectores plasmídicos.....	53
13. Obtención de sondas radiactivas de simple cadena.....	54
14. Aislamiento de ácidos nucleicos a partir de tejidos vegetales.....	54
14.1. Extracción de ADN genómico de <i>P. vulgaris</i>	54
14.2. Aislamiento de ARN de tejidos de <i>P. vulgaris</i>	55
15. Fraccionamiento de ácidos nucleicos mediante electroforesis.....	56
15.1. Fraccionamiento de ADN.....	56
15.2. Fraccionamiento de ARN.....	56
16. Síntesis de ADNc.....	57
16.1. Síntesis de la primera cadena (5'-3').....	57
16.2. Síntesis de la segunda cadena (3'-5').....	57
16.3. Ligación de adaptadores al ADNc.....	58
16.4. Amplificación de los extremos 5' y 3' de dos ADNcs que codifican asparragina sintetetasas mediante la técnica 5' y 3'-RACE.....	58
17. RT-PCR sobre nódulos en desarrollo.....	59

17.1. Síntesis de la primera cadena de ADNc.....	59
17.2. Condiciones para la amplificación por PCR.....	60
18. Transferencia y fijación de ácidos nucleicos a membranas de nailon.....	60
19. Hibridación de ácidos nucleicos sobre membranas de nailon.....	62
19.1. Hibridación de ADN.....	62
19.2. Hibridación de ARN.....	62
19.3. Lavados de las membranas.....	62
19.4. Detección de las señales de hibridación.....	62
19.5. Eliminación de la sonda hibridada o <i>streeping</i>	63
20. Expresión, purificación y rotura de la proteína de fusión (GST-PVAS2).....	63
20.1. Construcción del plásmido de expresión.....	63
20.2. Expresión de la proteína de fusión.....	64
20.3. Purificación y rotura de la proteína de fusión.....	64
21. Complementación de una estirpe auxótrofa para la asparragina.....	65
21.1. Construcción de los plásmidos de expresión de <i>PVAS1</i> y <i>PVAS2</i>	65
21.2. Estudios de complementación.....	66
22. Obtención de anticuerpos contra la proteína PVAS2.....	67
22.1. Homogeneización del antígeno con adyuvante de Freund.....	67
22.2. Protocolo de inmunización	67
22.3. Extracción de la sangre.....	67
22.4. Obtención del suero (anti-PVAS2).....	67
22.5. Titulación de los anticuerpos.....	68
23. Técnicas de inmunodetección en filtros (<i>Western blot</i>).....	68
23.1. Extracción de proteína de tejidos de <i>P. vulgaris</i>	68
23.2. Cuantificación de proteína.....	69
23.3. Electrotransferencia de proteínas.....	69
23.4. Procedimiento para la inmunodetección de asparragina sintetasa.....	70
24. Ensayo de actividad asparragina sintetasa en geles de poliacrilamida. Condiciones de tinción.....	70
III. RESULTADOS	72
1. Estrategia de clonación de un fragmento de ADNc de una asparragina sintetasa de tipo II.....	73
2. Aislamiento y caracterización de dos clones de ADNc (<i>PVAS1</i> y <i>PVAS2</i>) que codifican sendas asparragina sintetasa.....	76
3. Estructura del gen <i>PVAS1</i>	87
4. Análisis de la expresión de los genes <i>PVAS1</i> y <i>PVAS2</i>	91
4.1. Expresión específica de órganos.....	91

4.2. Análisis de la expresión de <i>PVAS1</i> y <i>PVAS2</i> en cotiledones en germinación.....	92
4.3. Análisis de la expresión de <i>PVAS1</i> y <i>PVAS2</i> en plántulas.....	93
4.4. Análisis mediante RT-PCR de la expresión de <i>PVAS2</i> en nódulos en desarrollo..	94
4.5. Efectos metabólicos del balance carbono-nitrógeno sobre la acumulación de ARNm de <i>PVAS1</i> y <i>PVAS2</i> en raíces de <i>P. vulgaris</i>	95
5. Expresión y purificación de la proteína <i>PVAS2</i>	98
6. Análisis de expresión mediante <i>Western blot</i>	99
6.1. Estudios de la especificidad de los anticuerpos.....	100
6.2. Inmunodetección de AS en tejidos de <i>P. vulgaris</i>	100
6.3. Inmunodetección de AS en nódulos en desarrollo.....	101
6.4. Efecto de la luz/oscuridad en la expresión de proteína AS.....	102
6.5. Efecto de una fuente de carbono reducido y de N inorgánico en la expresión de proteína AS.....	103
7. Ensayo de actividad AS en geles nativos de poliacrilamida.....	104
8. Estudio de complementación de una estirpe auxótrofa de <i>E. coli</i>	105
IV. <u>DISCUSIÓN</u>	107
V. <u>CONCLUSIONES</u>	118
VI. <u>BIBLIOGRAFÍA</u>	120

I. INTRODUCCIÓN

1. IMPORTANCIA DEL NITRÓGENO COMO NUTRIENTE

El nitrógeno (N) es uno de los elementos más ampliamente distribuidos en la Naturaleza. En la atmósfera se halla en forma de dinitrógeno (N₂), que representa alrededor del 78% del total de los gases, lo que equivale a $2,8 \times 10^{14}$ Tm de nitrógeno. La cantidad de nitrógeno en la litosfera es solamente un 25% de la presente en la atmósfera; además, el nitrógeno de la litosfera se encuentra en forma muy estable en rocas primarias y sedimentarias, de modo que tan sólo un 0,03% del nitrógeno de la litosfera se encuentra en el suelo, y sólo una proporción muy pequeña se halla en forma asimilable por los seres vivos. Por tanto, el nitrógeno de la litosfera tiene una participación muy baja en el ciclo de nitrógeno de la biosfera, y la mayor parte del nitrógeno necesario para el crecimiento de las plantas proviene en último término de la atmósfera.

El nitrógeno, el carbono, el hidrógeno y el oxígeno forman los llamados bioelementos primarios porque son los elementos químicos más abundantes y fundamentales de los seres vivos, en los que forman parte de las proteínas, ácidos nucleicos, vitaminas, porfirinas, alcaloides y numerosos productos intermediarios del metabolismo. Los bioelementos que limitan el crecimiento de las plantas, y por tanto la producción de biomasa, son el fósforo y el nitrógeno (Date *et al.*, 1973; Hardy *et al.*, 1975). Ambos son factores limitantes del crecimiento de las plantas en sistemas agrícolas y marinos. La cantidad de N₂ fijado en la Naturaleza es de unas 2×10^8 Tm por año. De esta cantidad, aproximadamente un 5% es fijado por oxidación del N₂ a ácido nítrico en presencia de O₂ y vapor de agua (fenómeno provocado por las descargas eléctricas de las tormentas), y el 95% restante es fijado por microorganismos (Sprenst, 1989b). Este último proceso se denomina fijación biológica del N₂. La fijación biológica desempeña un papel muy importante en la economía del nitrógeno en la práctica agrícola, ya que la cantidad de nitrógeno disponible en la mayoría de los suelos cultivados es baja y en la actualidad no puede suplirse a escala mundial por la producción de fertilizantes. No obstante, los beneficios potenciales de la fijación biológica de N₂ en la agricultura no se podrán aprovechar en su totalidad hasta que no se conozcan en profundidad los factores abióticos y bióticos que influyen en ella, así como sus mecanismos de actuación.

2. ORIGEN DEL NITRÓGENO UTILIZADO POR LAS PLANTAS

Las plantas normalmente adquieren N inorgánico del suelo en forma de nitrato o de amonio. La fuente de nitrógeno para muchas bacterias, hongos, algas y plantas superiores procede de la reducción del nitrato. Es por ello que la ruta de asimilación del nitrato es el proceso cuantitativamente más importante para la adquisición de nitrógeno en la biosfera. El amonio es el producto final de la degradación de proteínas y aminoácidos presentes en el suelo en forma de animales muertos y material vegetal. En suelos bien aireados, este amonio participa del proceso de nitrificación (Schlegel, 1985). Las bacterias del género *Nitrosomonas* y *Nitrobacter* pueden oxidar el amonio a nitrito y nitrato. El amonio y el nitrato pueden ser asimilados como una fuente de nitrógeno por las plantas. El hecho de que el nitrato sea la fuente preferente de nitrógeno de muchas plantas (Guerrero *et al.*, 1981) ha conducido a un abuso en la utilización de abonos nitrogenados en la agricultura moderna con el objeto de aumentar el rendimiento de las cosechas. Sin embargo, esto está causando problemas que afectan tanto a la ecología como a la salud pública. Además, el nitrógeno reducido, urea o sales amónicas de los fertilizantes, se transforma en su mayor parte en nitrato por los microorganismos del suelo de las tierras de cultivo.

A través de la fijación biológica llega al suelo cuatro veces más nitrógeno que por los fertilizantes químicos. La mitad del nitrógeno fijado biológicamente lo suministra la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa mediante un proceso en el que la energía consumida procede del Sol (fotosíntesis). De otra parte, para que las plantas puedan utilizar el N₂ captado por fijadores libres, ha de tener lugar una secuencia de acontecimientos (lisis celular, amonificación, etc.) en la que intervienen grupos de microorganismos especializados. En el transcurso de tales transformaciones ocurren pérdidas de nitrógeno asimilable por inmovilización, fijación a coloides del suelo o desnitrificación. En la fijación simbiótica, el nitrógeno es utilizable por el vegetal (Schubert, 1986).

3. ORGANOGÉNESIS Y DIFERENCIACIÓN DEL NÓDULO RADICAL

En ausencia de N en el suelo, las leguminosas pueden formar una asociación simbiótica con microorganismos fijadores de nitrógeno. *Bradyrhizobium* vive como saprófito en el suelo, donde compite con bacterias quimioheterotrofas. Su densidad de población media en tierras de barbecho se sitúa entre 10² y 10⁵ células por gramo de suelo. Su

supervivencia parece asociada a la condición de poder utilizar compuestos orgánicos presentes en muy baja concentración (Bauer y Caetano-Anollés, 1991). La multiplicación de *Bradyrhizobium* en la rizosfera es un proceso que antecede al de la propia infección. En algunos casos, la composición química de los exudados de la raíz puede condicionar una cierta selectividad de las bacterias. Este es el caso de la secreción de homoserina por las raíces de guisante, ya que este aminoácido es una excelente fuente de C y N para *R. leguminosarum* (Egeraat, 1975).

Las bacterias de *Bradyrhizobium* son atraídas hacia la superficie radical mediante quimiotaxis, aunque también se ha descrito que la presencia de corrientes eléctricas endógenas en las raíces podrían estar implicadas en la atracción de microorganismos (Miller *et al.*, 1986). Concentraciones de algunos flavonoides en el orden de nM provocan una quimiotaxis activa en *Bradyrhizobium*. Esta quimiotaxis puede estar basada en una cierta especificidad entre los flavonoides liberados por la planta y la respuesta de una determinada especie de *Bradyrhizobium* (Phillips *et al.*, 1990). Estos mismos flavonoides, en concentraciones superiores, en el rango de μM , activan los genes responsables de la nodulación (genes *nod*) de la bacteria.

En la adhesión de las bacterias a la raíz aparecen implicados dos tipos de moléculas: lectinas, glicoproteínas sin actividad enzimática producidas por la planta, y ciertos polisacáridos de la pared celular de la bacteria.

Un paso previo a este reconocimiento específico de lectinas y componentes de la pared (del tipo antígeno-anticuerpo) parece ser una unión no específica mediada por una proteína de 14 kDa ampliamente distribuida no sólo en *Bradyrhizobium*, sino también en *Agrobacterium* (Kijne *et al.*, 1990). La proteína, denominada rhicadhesina, es capaz de unir Ca^{2+} *in vitro* y parece mediar la adhesión de *Bradyrhizobium* a las raíces (Smit *et al.*, 1987).

La forma más habitual de infección estudiada hasta la fecha es la asociada a los pelos radicales. En este caso, las bacterias penetran a través de la pared celular del pelo radical, y quedan envueltas en una estructura tubular conocida como cordón de infección, que progresa hacia la base del pelo radical. Este cordón de infección contiene una matriz de origen bacteriano y una glicoproteína de origen vegetal (Bradley *et al.*, 1988).

En el proceso de infección de las raíces de leguminosas por *Rhizobium* para dar lugar al nódulo se pueden distinguir varias etapas que, en esquema, son las siguientes:

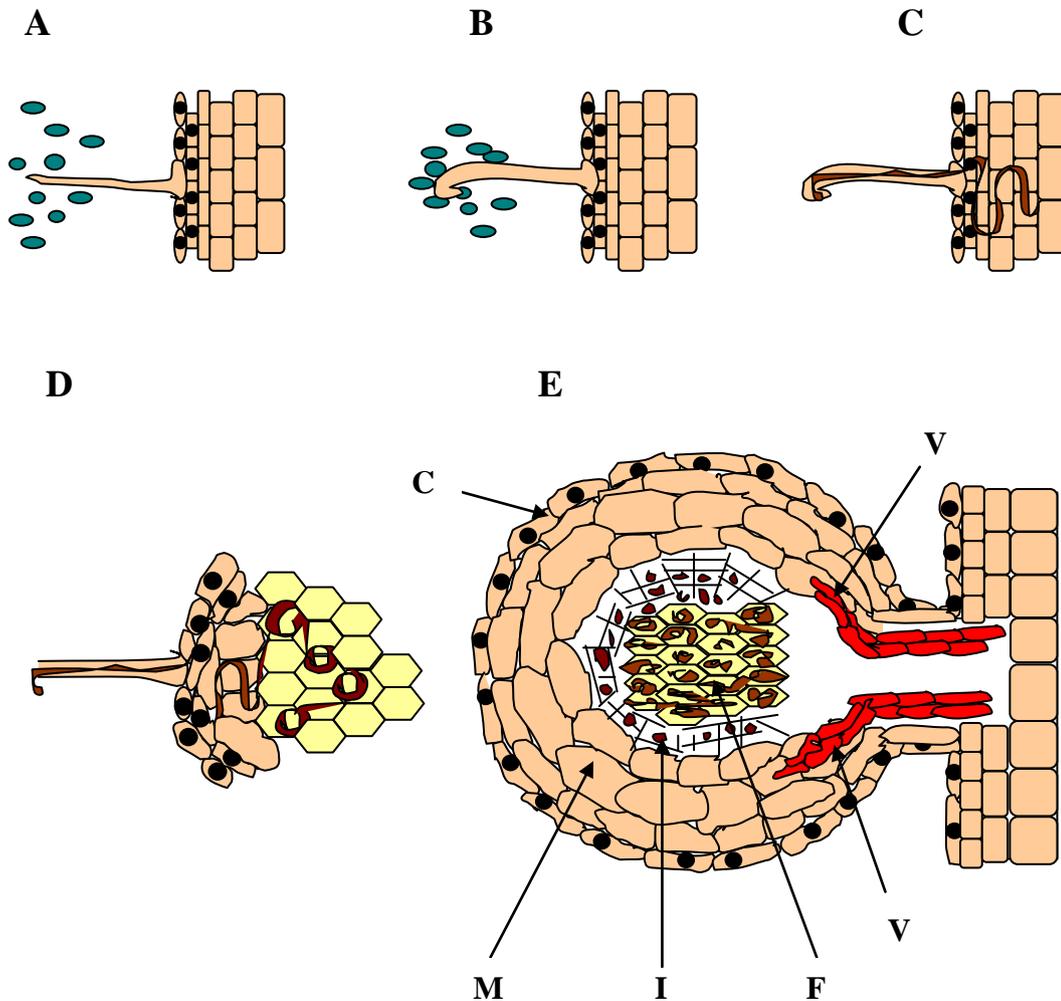


Figura 1. Etapas del proceso de infección de las raíces de leguminosas. En un nódulo fijador se pueden distinguir las siguientes zonas: C: corteza nodular; M: zona meristemática apical, que da la forma particular a cada nódulo; I: zona de infección bacteriana y de crecimiento celular; F: zona fijadora (células ocupadas por bacteroides) y V: trazas del sistema vascular de la raíz. Este modelo corresponde a la alfalfa, trébol y soja. De esta forma, la planta obtiene el N requerido para el crecimiento, proporcionando fotoasimilados para el desarrollo y función del nódulo.

Rhizobium, en presencia de la raíz de la leguminosa correspondiente (Fig. 1A), prolifera por causas aparentemente inespecíficas y es atraído específicamente hacia los pelos radicales, donde origina la curvatura del extremo de los mismos (Fig. 1B). Por este lugar se produce una invaginación de la pared del pelo que conforma un canal por donde penetra la bacteria, para constituir lo que se conoce como cordón o filamento de infección (Fig. 1C). Este filamento atraviesa algunas células corticales, se ramifica y

penetra en otras que se han dividido antes de forma anárquica por efecto de la proximidad de las bacterias. Estas se liberan del filamento en el citoplasma celular y quedan rodeadas, individualmente o en grupos, por una membrana derivada del plasmalema de la célula hospedadora (Fig. 1D). Con la división celular se forma el nódulo, donde se pueden reconocer diferentes zonas (Fig. 1E). El tejido periférico está formado por grandes células vacuoladas (cortex externo), una capa de células esclerenquimáticas (endodermis nodular) y por varias capas de células vacuoladas, densamente empaquetadas (cortex interno), que contienen los haces vasculares. En el tejido central se pueden distinguir células de mayor tamaño que han sido invadidas, y células vacuoladas de menor tamaño no invadidas.

Los nódulos tempranos en estado emergente presentan pequeños gránulos de almidón en al menos diez capas de células ubicadas en la parte proximal del nódulo. En nódulos desarrollados de judía se observan amiloplastos en células no invadidas del tejido central. Los gránulos de almidón disminuyen en sentido proximal-distal, hasta llegar a no observarse en la región distal. Las células más jóvenes invadidas se localizan en la periferia del tejido central y en la región proximal nodular. Así pues, en nódulos maduros, el patrón de distribución del almidón se puede correlacionar con la etapa de desarrollo y la actividad fijadora de nitrógeno de los bacteroides.

Se ha propuesto (Taté *et al.*, 1994) que estos nódulos globosos son consecuencia de dos centros opuestos de división celular: 1) células del cortex externo se multiplicarían cerca del pelo radical antes de ser infectadas, constituyendo las células invadidas el tejido central del nódulo maduro; 2) al mismo tiempo, las células del cortex interno comenzarían a dividirse y a originar una envuelta externa que circundaría el tejido central, constituyendo el parénquima y los haces vasculares.

En nódulos emergentes de una semana, el tejido central aún no está organizado, como se muestra en una sección longitudinal teñida con azul de toluidina (Fig. 2A). Una sección de mismo nódulo (Fig. 2B) muestra pequeños gránulos de almidón teñidos en negro con I₂-KI en unas diez capas de células no invadidas de la parte proximal de la raíz. En secciones longitudinales de nódulos de dos semanas teñidas con I₂-KI (Fig. 2C), el tejido central aparece mejor organizado. Alrededor puede visualizarse el cortex interno, la endodermis nodular y el cortex externo. La distribución de los gránulos de almidón disminuye en sentido proximal-distal. En secciones de nódulos de tres semanas

(Fig. 2D), se reduce la base de anclaje y los haces vasculares conectan el nódulo a la raíz. Los gránulos de almidón se visualizan en las células no invadidas esparcidas entre las capas de células invadidas, así como en las capas celulares que rodean las capas más periféricas de células invadidas. Una sección transversal de un nódulo maduro (Fig. 2E) confirma la existencia de gránulos de almidón en al menos dos capas de células no invadidas que rodean las células periféricas invadidas y un patrón difuso de distribución de los gránulos de almidón en las células no invadidas dispersadas entre las zonas invadidas. En la Fig. 2F se observa el tejido central formado por células invadidas de gran tamaño (teñidas con azul de toluidina) y por células vacuoladas de menor tamaño. Los gránulos de almidón se acumulan en dos o tres capas de células no invadidas que circundan las células periféricas invadidas.

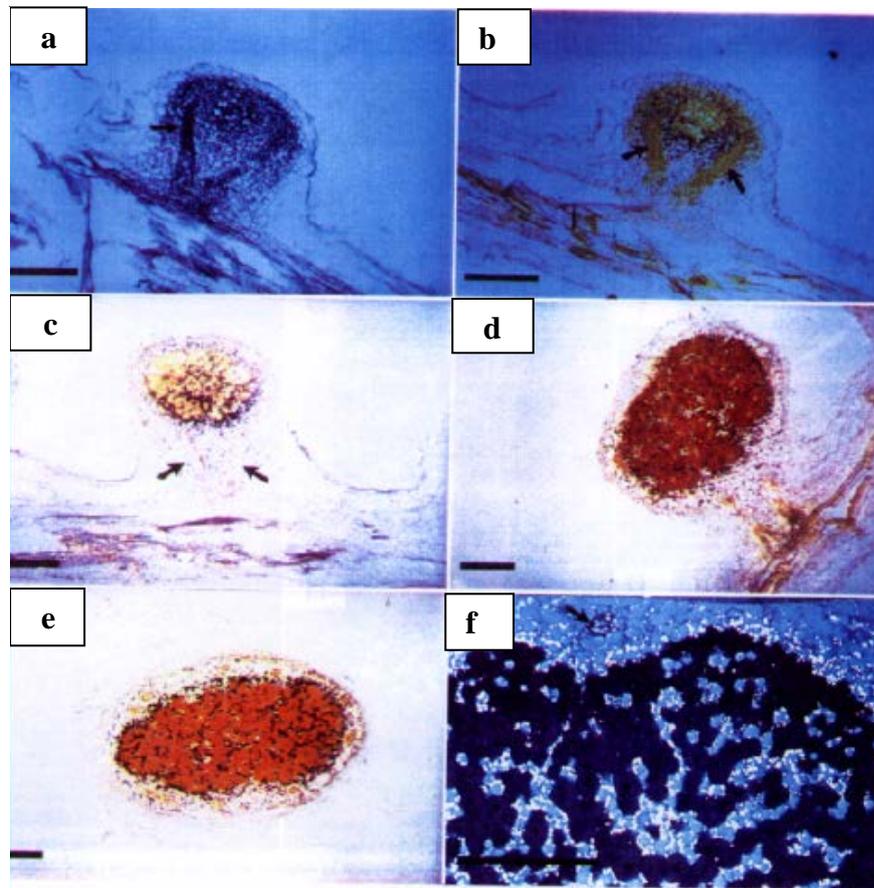


Figura 2. Secciones de 7 μm de nódulos en diferentes estadios de desarrollo. Los nódulos se fijaron y se incluyeron en parafina, para teñirlos después con azul de toluidina y $\text{I}_2\text{-KI}$. Finalmente se visualizaron mediante microscopía de campo claro. Los gránulos de almidón se tiñeron de negro con $\text{I}_2\text{-KI}$. Los haces vasculares se indican con flechas (Taté et al., 1994).

4. FISIOLÓGÍA DEL NÓDULO: SIMBIOSIS *Rhizobium*-LEGUMINOSA

4.1. Funciones de los fotosintatos

Esta simbiosis implica que, antes del comienzo de la fijación del N, la planta hospedadora proporciona los metabolitos de C y N requeridos para el desarrollo del nódulo. El poder reductor y el ATP generados en la fotosíntesis se usan en el ciclo de reducción del carbono. Los fotoasimilados producidos son dirigidos a tejidos sumidero, los cuales reciben de un 15 a un 30% de los fotosintatos netos de la planta (Minchin *et al.*, 1981; Mahon *et al.*, 1983). Este aporte de fotosintatos transportados vía floema tiene varias funciones (Fig. 3):

a) Crecimiento y mantenimiento del tejido nodular.

b) Reacciones endergónicas asociadas con la reducción del N₂ en el bacteroide y con la asimilación del NH₄⁺ producido en el citosol.

c) Síntesis de compuestos orgánicos nitrogenados para ser exportados desde el nódulo. Estos solutos nitrogenados se transportan vía xilema (Pate *et al.*, 1983) a los órganos vegetativos y reproductivos de la planta, y contribuyen al “pool” de N soluble (Atkins *et al.*, 1982). Cuando se requiere un aporte de N, estos compuestos son movilizados desde el “pool” y degradados hasta NH₄⁺ y otros productos, que son reasimilados produciendo los aminoácidos específicos requeridos para la síntesis de ácidos nucleicos, proteínas y otros metabolitos.

En la luz, las reacciones endergónicas implicadas en la asimilación de NH₄⁺ (biosíntesis de aminoácidos y síntesis de macromoléculas) están directamente acopladas a las reacciones que generan energía de la fotosíntesis; mientras que en la oscuridad o en tejidos no fotosintéticos, el fotosintato se consume para producir el ATP y el poder reductor necesarios para que ocurran estos procesos.

4.2. Nitrogenasa: propiedades físico-químicas y mecanismo de reacción

Los nódulos radicales de las leguminosas son los encargados, pues, de la fijación biológica del nitrógeno, que es catalizada por el complejo enzimático nitrogenasa. La reacción es altamente endergónica (~960 kJ/mol N₂ fijado) y su estequiometría teórica es:



En condiciones fisiológicas, los electrones se utilizan para reducir N_2 a NH_4^+ y, en menor cuantía, H^+ a H_2 . La nitrogenasa de bacteroides consta de dos ferrosulfoproteínas. La Fe-proteína (dinitrogenasa reductasa, componente II) es un dímero con estructura α_2 y masa molecular de ~ 62 kDa, y contiene un centro sulfoférico [4Fe-4S].

La FeMo-proteína (dinitrogenasa, componente I) es un tetrámero con estructura $\alpha_2\beta_2$ y una masa molecular de ~ 220 kDa, y contiene ~ 30 átomos de Fe, un número casi equivalente de átomos de S ácido-lábiles y dos átomos de Mo. La Fe-proteína y la FeMo-proteína son extremadamente sensibles al O_2 y se inactivan irreversiblemente cuando se exponen al aire.

El mecanismo de reacción de la nitrogenasa se ha estudiado principalmente en los microorganismos fijadores de vida libre. Sin embargo, el modelo propuesto parece ser generalizable a la nitrogenasa de bacteroides con ligeras modificaciones (Evans *et al.*, 1987). Durante la reacción de la nitrogenasa, el ATP debe encontrarse como complejo ATP-Mg, ya que el ATP libre es un inhibidor. La Fe-proteína enlaza al ATP-Mg y reduce específicamente a la FeMo-proteína, mientras que esta enlaza y reduce al sustrato.

El reductor fisiológico de la Fe-proteína de bacteroides es la ferredoxina, una proteína de potencial redox muy negativo y muy sensible al O_2 . La Fe-proteína reducida se activa por la unión de dos moléculas de ATP-Mg. La activación de la Fe-proteína consiste en un cambio conformacional que hace su potencial redox más negativo en al menos 100 mV. Esta Fe-proteína pasa a tener el potencial redox necesario para reducir la FeMo-proteína. Durante cada ciclo de transferencia de 1 electrón, la Fe-proteína se asocia y disocia de la FeMo-proteína y se hidrolizan dos moléculas de ATP-Mg. Después de tres ciclos de transferencia se genera un trihidruro de la FeMo-proteína. El N_2 desplaza entonces dos átomos de hidrógeno, con lo que el N_2 se enlaza a la FeMo-proteína y se libera H_2 . Después de cinco ciclos se liberan las dos moléculas de NH_4^+ . Este mecanismo de reacción explicaría la estequiometría mínima observada de 1 H_2 producido: 1 N_2 reducido; lo que significa que un mínimo teórico del 25% de los electrones de la nitrogenasa se utilizan en la producción H_2 .

4.3. Metabolismo del nitrógeno en nódulos: asimilación de amonio

Las enzimas implicadas en la asimilación de NH_4^+ están reprimidas en los bacteroides de *Rhizobium* (Boland *et al.*, 1978). El primer producto estable de la fijación del N_2 , el NH_4^+ , se excreta en un 95% desde los bacteroides hacia el citoplasma de las células nodulares, donde se incorpora a compuestos carbonados (Fig. 3). Dicha incorporación debe ser rápida para evitar la acumulación de NH_4^+ en niveles que puedan inactivar a la nitrogenasa y reprimir el sistema de fijación de nitrógeno. La principal vía metabólica de asimilación de NH_4^+ está constituida por dos enzimas de las células nodulares que actúan coordinadamente. El NH_4^+ se incorpora primero a la posición amida de la glutamina, con consumo de ATP, en la reacción catalizada por la glutamina sintetasa. El grupo amida se transfiere a continuación al C-2 del oxoglutarato en la reacción de aminación reductiva llevada a cabo por la glutamato sintasa. Ambas enzimas han sido aisladas y purificadas a partir de nódulos de leguminosas (Cullimore *et al.*, 1983).

Los mecanismos moleculares reguladores del proceso de asimilación de NH_4^+ se han abordado en un principio en el nivel de la glutamina sintetasa. Esta enzima puede comprender del 1 al 2% de la proteína soluble total de órganos que asimilan activamente NH_4^+ . La actividad glutamina sintetasa se incrementa drásticamente durante el desarrollo de los nódulos radicales de las leguminosas, en hojas etioladas expuestas a la luz, y en hojas y raíces de plantas cultivadas en medios con NO_3^- (Kim *et al.*, 1995).

Además de al glutamato, la glutamina puede donar su grupo amida al aspartato para dar asparragina. La reacción es catalizada por la asparragina sintetasa (AS) y requiere la hidrólisis de ATP a AMP y PPi. La otra vía de asimilación de NH_4^+ la constituye la NADH-glutamato deshidrogenasa, que cataliza la incorporación de un grupo amino al oxoglutarato para producir glutamato. Debido a la baja afinidad de esta enzima por el NH_4^+ ($K_m \sim 80 \text{ mM}$) en comparación con la de la glutamina sintetasa ($K_m \sim 0,2 \text{ mM}$), la asimilación de NH_4^+ vía NADH-glutamato deshidrogenasa parece ser relevante sólo cuando el NH_4^+ se encuentra en concentraciones elevadas, probablemente cercanas a la toxicidad. Para la mayoría de las plantas, los datos reflejan que la asimilación de amonio ocurre a través del ciclo de la glutamato sintasa, con alguna contribución de la NADH-glutamato deshidrogenasa. En plantas regadas con nitrato marcado con ^{15}N , rápidamente se detectó el marcaje de glutamina y glutamato, que actúan como precursores en la síntesis de aminoácidos. La reducción de nitrato no es la única fuente de producción de

amonio en tejidos de plantas; de hecho gran parte del amonio asimilado por la glutamina sintetasa en tejidos fotosintéticos procede de la fotorrespiración. Otras fuentes de amonio incluyen reacciones catalizadas por enzimas tales como la asparraginasa y la arginasa (Mifflin y Lea, 1980).

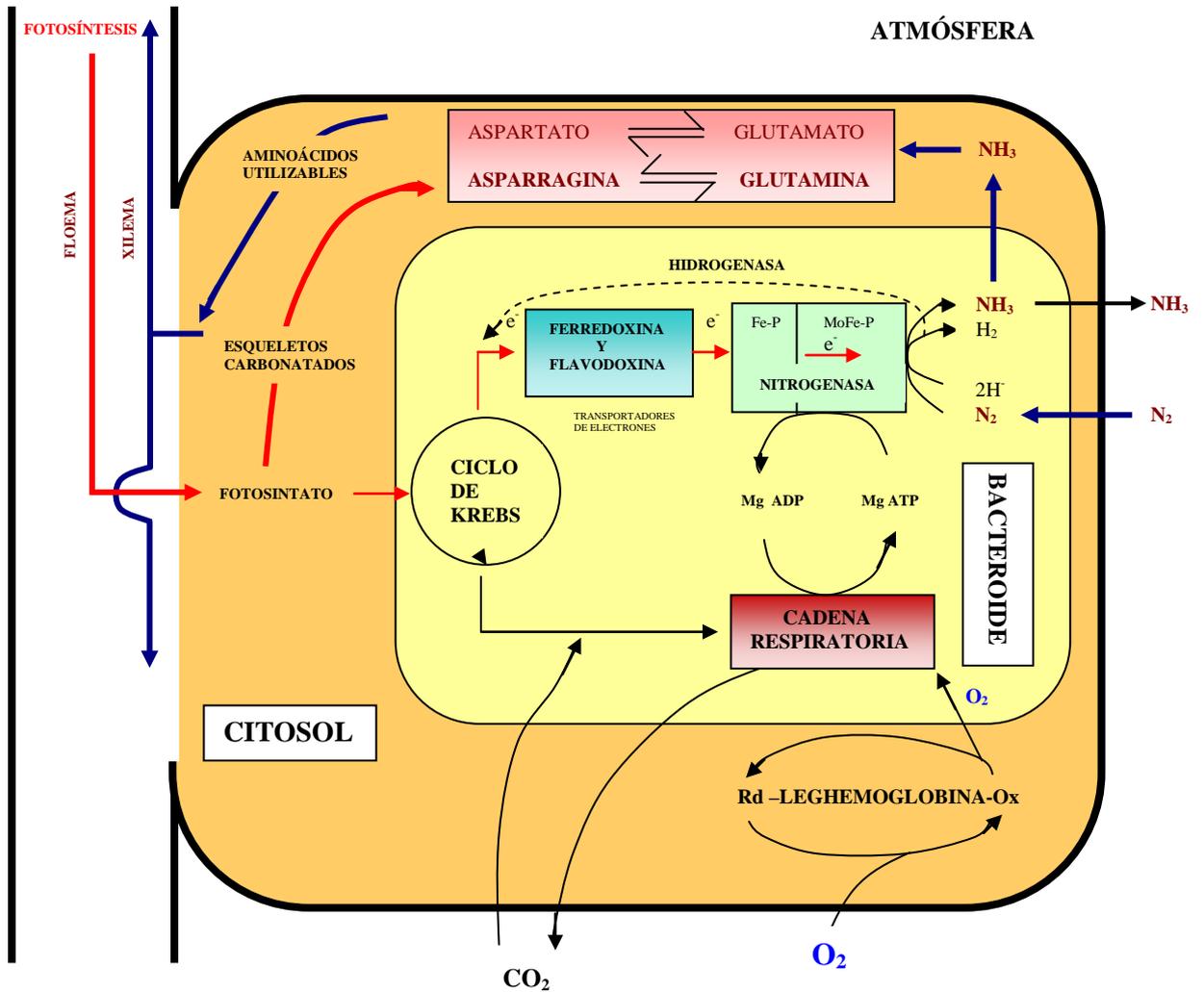


Figura 3. Fijación de nitrógeno por bacteroides en el interior de una célula nodular de raíz. La fijación de nitrógeno en nódulos de leguminosas por los bacteroides de *Rhizobium* se realiza en el interior de las células vegetales que ocupan la zona central del nódulo. Hasta allí llega el fotosintato que va a ser fuente de energía, de electrones y de esqueleto carbonado para la incorporación del amonio formado. La leghemoglobina, que se encuentra en el citosol que rodea al bacteroide, permite la difusión del oxígeno desde el exterior en cantidad suficiente para que puedan desarrollarse las reacciones de oxidación correspondientes, pero a un nivel tal que no se inhiba la actividad nitrogenasa. El amonio producido pasa al citosol de la célula, se incorpora al glutamato con intervención de la glutamina sintetasa y se transfiere al resto de la planta por el xilema.

Otra enzima importante de los nódulos, la fosfoenolpiruvato carboxilasa, contribuye a la asimilación del NH_4^+ proporcionando compuestos carbonados que son

intermediarios del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (vía anaplerótica). Una función importante de la enzima consiste en fijar una parte del CO₂ respiratorio (~10 %). La fosfoenolpiruvato carboxilasa es una enzima citosólica muy abundante en los nódulos (1-2 % de la proteína soluble total) y cataliza la incorporación de CO₂ (realmente HCO₃⁻ ya que el CO₂ debe estar disuelto) al fosfoenolpiruvato produciendo oxalacetato. Éste es bastante inestable y se reduce rápidamente a malato por la malato deshidrogenasa. El malato puede utilizarse como fuente de carbono y energía para los bacteroides o entrar en la mitocondria y oxidarse por el ciclo de Krebs. El malato también puede estar implicado en el ajuste de cargas entre las vacuolas y el xilema; por ejemplo, un 75% de la carga de cationes en el xilema es equilibrado con malato y el resto con aspartato y alantoato (en las leguminosas tropicales). El oxalacetato puede también ser transaminado a aspartato por la aspartato aminotransferasa. El aspartato, a su vez, puede convertirse en asparragina por la asparragina sintetasa. La síntesis de asparragina es particularmente importante en nódulos de raíces de leguminosas, donde gran parte del nitrógeno fijado por la bacteria es rápidamente transferido a asparragina por medio de las actividades glutamina sintetasa y asparragina sintetasa. La asparragina es la principal amida transportada por el xilema hacia la parte aérea en varias leguminosas (Sieciechowics *et al.*, 1988).

5. TRANSPORTE DEL NITRÓGENO FIJADO AL RESTO DE LA PLANTA

5.1. Factores genético-moleculares

Aunque la glutamina es el producto inicial del proceso de fijación del nitrógeno, este compuesto es raramente transportado por la savia xilemática. Razones de tipo genético determinan la naturaleza del compuesto nitrogenado que es exportado vía xilema. El nitrógeno fijado en las raíces de leguminosas se exporta a las partes aéreas de la planta en forma de amidas (glutamina, asparragina) o ureidos (alantoína, alantoato). Aunque el paso de la GS/GOGAT en la asimilación de amonio es común, las rutas responsables de la producción de ureidos y aminoácidos/amidas son muy diferentes.

La síntesis de asparragina se lleva cabo por acción de la asparragina sintetasa, que cataliza la transferencia del grupo amido desde la glutamina hasta el aspartato para dar glutamato y asparragina como productos. El proceso de síntesis de alantoína y alantoato es más complejo, e implica tanto a células infectadas como no infectadas. La glutamina

es el donador de grupo amido para el fosforribosilpirofosfato, para dar fosforribosilamina, que es el sustrato de partida en la ruta de síntesis de purinas. El primer nucleótido de purina que se forma es la inosina monofosfato, que se oxida hasta xantina. Estos procesos ocurren en el plastidio de las células infectadas. Los pasos finales de la formación de ureidos ocurren en el citoplasma, peroxisoma y retículo endoplásmico de las células no infectadas, donde se produce la degradación de la xantina hasta ácido úrico, alantoína y alantoato, respectivamente (Schubert y Boland, 1990) (Fig. 4).

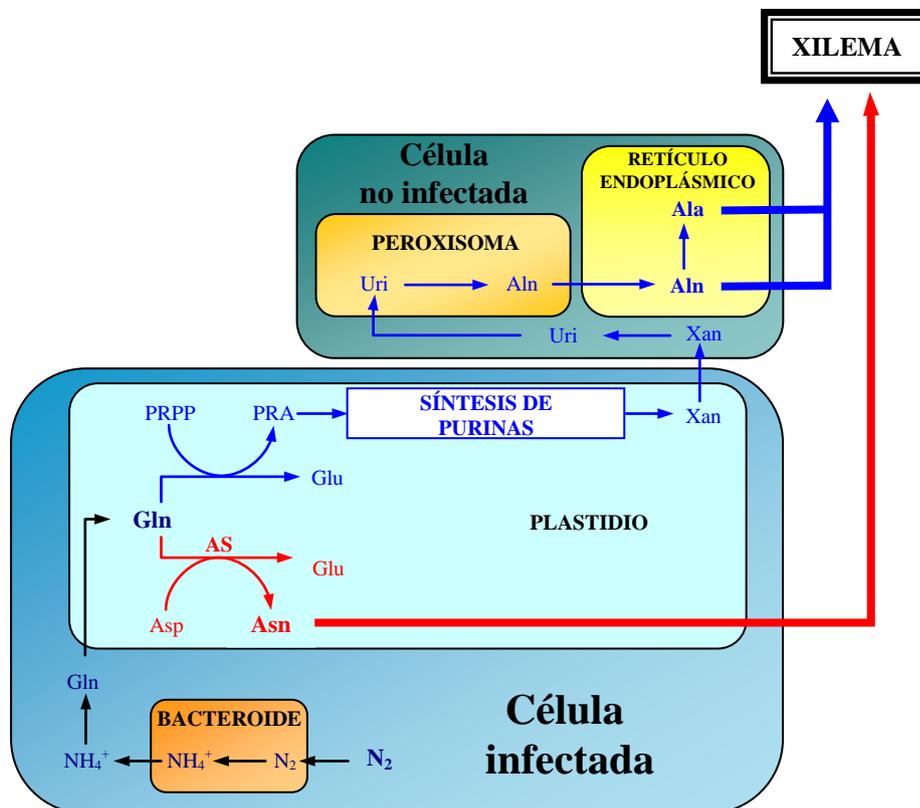


Figura 4: Modelo de la localización subcelular de las reacciones de síntesis de amidas y de ureidos en nódulos de leguminosas exportadoras de ureidos. Este modelo se basa en resultados de fraccionamiento subcelular y estudios ultraestructurales. Los procesos involucrados en la biogénesis de ureidos pueden ocurrir en más de un compartimento subcelular. La localización de las enzimas que intervienen en la conversión de IMP a xantina y la de la AS no es segura. Se ha propuesto que en los nódulos de soja estas reacciones ocurren en los plastidios, mientras que en otras especies como el frijol de vaca pueden tener lugar en el citoplasma. En todos los casos, los intermediarios exportados desde el citoplasma se desconocen. **Ala:** alantoato; **Aln:** alantoína; **AS:** asparragina sintetasa; **Asn:** asparragina; **Asp:** aspartato; **Glu:** glutamato; **Gln:** glutamina; **PRA:** fosforribosilamina; **PRPP:** fosforribosilpirofosfato; **Uri:** ácido úrico; **Xan:** xantina.

Las leguminosas pertenecientes a la tribu *Phaseoleae*, que incluye soja (*Glycine max*), judía (*Phaseolus vulgaris*) y frijol de vaca (*Vigna unguiculata*, *Vigna radiata*),

exportan ureidos desde los nódulos radicales (Sprenst, 1980). No obstante, la asparragina es el aminoácido principal en la savia xilemática de soja (Wong y Evans, 1971; Streeter, 1972), y gran parte del trabajo sobre la síntesis de asparragina se ha llevado a cabo en nódulos de soja. Aunque los ureidos constituyen el principal producto exportable en soja cultivada en condiciones de fijación de nitrógeno, la concentración de asparragina en nódulos es varias veces mayor que la concentración de ureidos, e incluso se exporta asparragina en cantidades detectables desde el sistema radicular nodulado (Streeter, 1972; McClure e Israel, 1979; Schubert, 1981), especialmente durante el desarrollo temprano del nódulo, cuando la asparragina es importada desde el floema para el desarrollo nodular.

Además de los factores genético-moleculares, la distribución relativa de ureidos y amidas en el xilema también está determinada por factores ambientales y nutricionales (Urquhart y Joy, 1981; Schubert, 1986).

5.2. Factores ambientales y nutricionales

La asparragina es un medio más económico para el transporte de nitrógeno que la glutamina, debido a una menor razón C:N (2:1 para la asparragina y 2,5:1 para la glutamina). Los ureidos, con cuatro átomos de nitrógeno por molécula (C:N, 1:1), tienen una ventaja sobre la asparragina, con sólo dos átomos de nitrógeno por molécula (C:N, 2:1), en términos de transporte de nitrógeno y uso eficiente del carbono (Fig. 5). El incremento de la producción y transporte de ureidos en otros tejidos, o en especies de plantas cultivadas en condiciones en las que el carbono puede ser limitante (Mothes, 1961; Polayes y Schubert, 1984), es consistente con esta teoría. De hecho, las leguminosas productoras de ureidos consumen menos fotoasimilados que las leguminosas exportadoras de amidas (Pate *et al.*, 1981; Pate *et al.*, 1983). Hay que prestar una especial atención a la fijación de CO₂ en la ruta de síntesis de aminoácidos y amidas. Se ha especulado sobre el efecto que esta fijación de CO₂ puede tener sobre las velocidades de respiración por gramo de N asimilado (Schubert, 1982; Saari y Ludden, 1987). Recientemente, Layzell y colaboradores (1988) calcularon el coste teórico de sacarosa y la velocidad de intercambio de CO₂ asociados con la síntesis de ureidos y amidas a partir de sacarosa y NH₄⁺. Partiendo de la base de un nódulo entero, se predijo que los nódulos productores de ureidos consumirían un 8% menos de sacarosa por

gramo de N fijado que los nódulos productores de amidas, pero les supondría un aparente coste respiratorio que sería un 5% mayor que en nódulos productores de asparragina. Estas predicciones sugieren que los valores obtenidos de la pérdida respiratoria por gramo de N fijado deben ser tratados con precaución si se utilizan como un indicador del coste energético relativo de la asimilación de N. Estas diferencias en la eficiencia del uso del carbono no pueden atribuirse únicamente a diferencias en el coste de producción de ureidos y amidas. Muchos otros factores pueden contribuir a esta mejora global en la eficiencia (Pate *et al.*, 1981). Por otro lado, la baja solubilidad de los ureidos puede limitar la cantidad de nitrógeno que se puede exportar en esta forma química en climas templados, mientras que no sería inconveniente en climas tropicales (Sprent, 1980).

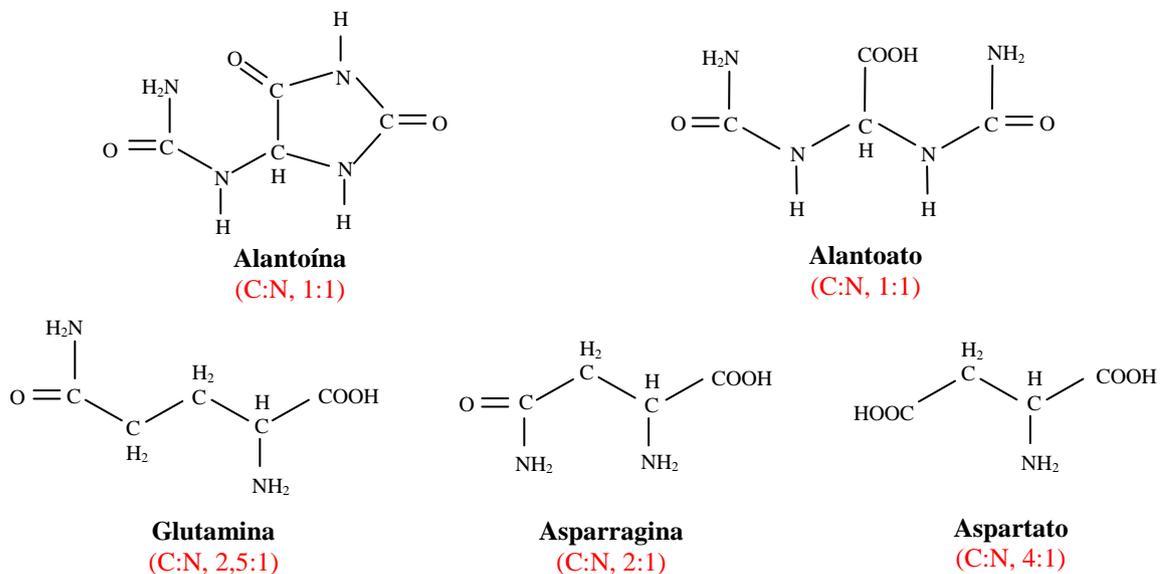


Figura 5: Representación esquemática de la estructura de los ureidos y amidas transportados a través del xilema. Los ureidos (alantoína y alantoato) tienen una relación C:N de 1:1, por lo que presentan una ventaja en términos de nitrógeno exportado y eficiencia en la utilización de carbono sobre las amidas que, como máximo (en el caso de la asparragina), alcanzan una relación C:N de 2:1.

La mayoría de las leguminosas tienden pues a exportar el nitrógeno fijado en forma de los ureidos alantoína y alantoato o la amida asparragina. Esta diferenciación en el compuesto nitrogenado que transportan permite clasificarlas en dos tipos. Las leguminosas de clima tropical (soja, judía) transportan principalmente ureidos, mientras que las leguminosas de clima templado (altramuz, guisante) transportan principalmente asparragina (Schubert, 1986).

La adición de nitrato o amonio a células de plantas superiores, protoplastos o microalgas resulta en algunos casos en un ligero aumento de la fijación fotosintética del carbono (Turpin *et al.*, 1988). Al menos una vez se ha descrito una leve supresión de la fijación de carbono (Larsson *et al.*, 1982). Estos autores afirman que la supresión resulta de una competencia por el poder reductor entre el CO₂ y la asimilación del N. No obstante, se observaron efectos similares durante la asimilación de NH₄⁺ y NO₃⁻, lo que sugiere la implicación de otros factores. Aunque los efectos de la asimilación de N sobre la fijación de carbono en tejidos sin carencias de N son leves, hay un importante efecto en la disponibilidad de CO₂ (Lara *et al.*, 1987). Esto se puede atribuir a la necesidad de proporcionar esqueletos carbonados para la biosíntesis de aminoácidos. Es difícil determinar si el requerimiento de CO₂ para la asimilación de N es mediado por la Rubisco o si es la fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPcase) la que juega un papel importante.

La presencia o ausencia de nitratos o de acetileno, inhibidor de la fijación de nitrógeno, puede condicionar el contenido de ureidos en el xilema. La disminución de la concentración de ureidos en el exudado del xilema como respuesta al nitrato es proporcional a la disminución de la actividad nitrogenasa, también se inhibe la infección radical por *Rhizobium*, el desarrollo del nódulo y la síntesis de proteínas del bacteroide (Streeter, 1988). Sin embargo, las leguminosas exportadoras de amidas son más susceptibles al tratamiento con nitrato que las exportadoras de ureidos. Utilizando nódulos radicales de soja procedentes de la simbiosis soja-*Bradyrhizobium japonicum*, se ha observado que la adición de nitrato inhibe la fijación de nitrógeno y afecta a la funcionalidad de la nitrogenasa del bacteroide; asimismo, redujo en un 75% la actividad 5-fosforribosil-1-pirofosfato amidotransferasa (EC 2.4.2.14), la enzima que cataliza el paso limitante en la biosíntesis de purinas (Reynolds *et al.*, 1984).

La formación de ureidos en plantas tratadas con nitratos puede tener varias explicaciones: 1) Pueden ser sintetizados a expensas del nitrato reducido, bien en la raíz o en los nódulos, ya que las enzimas necesarias son expresadas en el nódulo. 2) Pueden sintetizarse a expensas de nucleótidos degradados como respuesta a la senescencia inducida por el nitrato. 3) A partir del amonio, directamente absorbido por la planta (Schuller *et al.*, 1986). Sin embargo, utilizando mutantes de soja, denominados supernodulantes *nts* (*nitrate-tolerant symbiosis*) que nodulan en presencia de nitratos a

concentraciones consideradas como inhibidoras de la actividad nitrogenasa, producen niveles de ureidos elevados, que se afectan con la dosis de inóculo, indicando que los niveles de ureidos están asociados con la supernodulación (Schuller *et al.*, 1988).

En especies exportadoras de ureidos, estos son mayoritarios en el xilema sólo mientras la planta satisfaga sus requerimientos de nitrógeno principalmente a partir de nitrógeno atmosférico. En leguminosas productoras de amidas, la asparragina es siempre la forma principal de nitrógeno reducido, independientemente de los cambios en las condiciones nutricionales de nitrógeno (Patterson y LaRue, 1983; Schubert, 1986; Peoples *et al.*, 1987).

En la Fig. 6 se representan los principales solutos nitrogenados del exudado xilemático obtenido del frijol de vaca (*Vigna unguiculata* L.) y guisante (*Pisum sativum* L.) cultivados bajo dos regímenes diferentes. -N: plantas totalmente dependientes de una simbiosis efectiva, y +N: plantas regadas con una solución que contiene nitrato. En plantas tales como *Xanthium*, donde no se lleva a cabo reducción de nitrato en la raíz, el nitrato libre constituye un 95% del N soluble xilemático. Sin embargo, las raíces de otras muchas plantas con capacidad de reducir nitrato transportan una proporción del N xilemático en una forma orgánica.

Un estudio de la composición del exudado de las raíces mostró que la asparragina era el principal componente nitrogenado de la savia xilemática en *Lotus japonicus* (Waterhouse *et al.*, 1996). La asparragina del xilema apareció marcada con ^{15}N a una velocidad menor que la asparragina de raíz, lo que sugiere que esta última está ubicada en un “pool” incluido en el citoplasma. La división de la asparragina de raíz entre un “pool” vacuolar, de almacenamiento, y “un pool” citoplásmico, o de transporte, daría como resultado una mayor velocidad de marcaje que la asparragina del xilema. Esta última situación se encuentra frecuentemente en estudios sobre la entrada de nitrato marcado al xilema.

Se ha sugerido recientemente (Lam *et al.*, 1994) que la presencia relativamente alta de residuos de asparragina en la AS implica que la enzima es sintetizada bajo condiciones de suficiencia de nitrógeno. Este contenido relativamente alto de residuos de asparragina se ha observado en genes de la asimilación del N, como NR y GS.

La adición de ^{15}N ($^{15}\text{NH}_4^+$ o $^{15}\text{NO}_3$) al medio de cultivo de plantas de soja muestra diferencias sustanciales en la distribución inicial de N por la savia xilemática. Esta

distribución inicial de ^{15}N es muy diferente, comparando plantas cultivadas en NO_3^- con las cultivadas con N_2 o NH_4^+ . Una considerable acumulación en el tallo ocurre sólo bajo las dos últimas formas de N. No obstante, en todos los casos, una proporción similar del nitrógeno incorporado se transfiere desde el xilema al floema, independientemente de la distribución del N y de la forma en que es aportado. A pesar de las diferentes distribuciones iniciales de N, se obtiene un resultado similar para las tres fuentes de nitrógeno cuando se detecta el ^{15}N después de dos semanas de tratamiento. Así, las hojas y raíces de plantas tratadas con NO_3^- pierden ^{15}N con el tiempo mientras que aumenta el contenido en tallo (McNeil y LaRue, 1984).

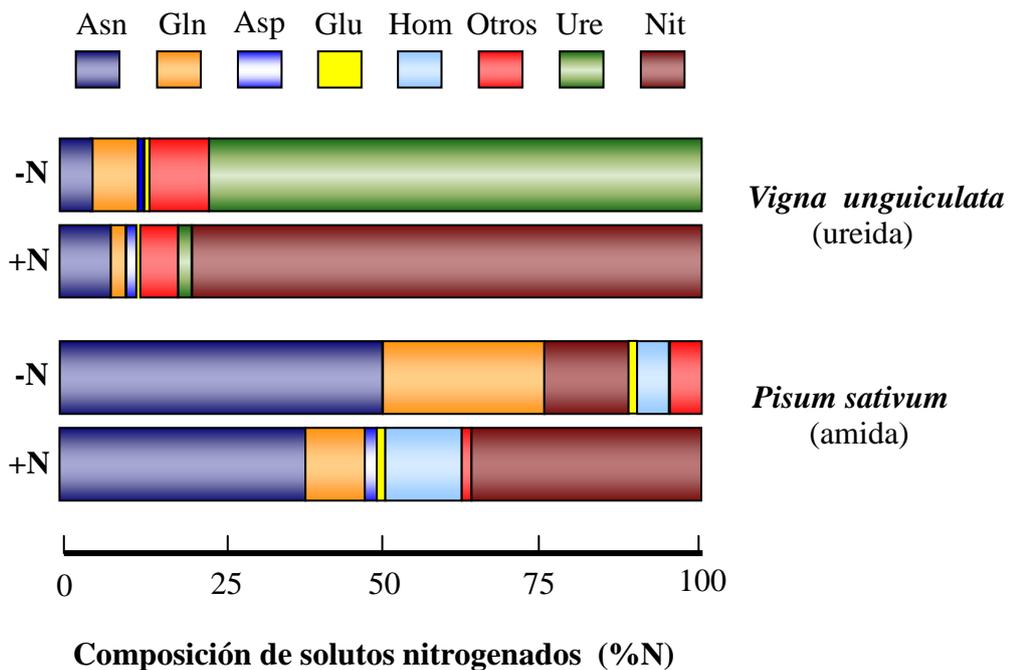


Figura 6. Composición de la fracción nitrogenada presente en el exudado xilemático del frijol de vaca (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) y del guisante (*Pisum sativum* L.). La concentración de los principales solutos nitrogenados del exudado xilemático se midió en plantas cultivadas en dos regímenes diferentes de nitrógeno. -N: plantas totalmente dependientes de una simbiosis efectiva; +N: plantas regadas con una solución de cultivo que contiene nitrato. **Asn:** asparragina; **Gln:** glutamina; **Asp:** aspartato; **Glu:** glutamato; **Hom:** homoserina; **Ure:** ureidos; **Nit:** nitrato. Datos tomados de Peoples *et al.* (1985) y Peoples *et al.* (1987).

Como se ha mencionado antes, en especies exportadoras de ureidos, estos predominan en la composición xilemática mientras la planta satisface sus requerimientos de nitrógeno principalmente a partir del nitrógeno atmosférico. En leguminosas productoras de amidas, la asparragina es siempre la principal forma de

nitrógeno reducido a pesar de los cambios en el estado nutricional de la planta referente al nitrógeno. A pesar de que estos hechos experimentales están bien establecidos, la “lógica de la planta” para usar ureidos o amidas es objeto de continua especulación, y la regulación de los cambios de rutas productoras de amidas a ureidos, y viceversa, es totalmente desconocida (Schubert y Boland, 1990).

6. SÍNTESIS DE AMIDAS EN PLANTAS SUPERIORES: BIOSÍNTESIS DE ASPARRAGINA

A la hora de estudiar la diferenciación metabólica entre ureidos y amidas, hay alguna aproximación que se está haciendo en la ruta de síntesis de ureidos. Se ha prestado una atención especial a la enzima 5-fosforribosil-1-pirofosfato amidotransferasa, que cataliza el paso limitante de la síntesis *de novo* de purinas. Aunque la regulación de la expresión del gen contribuye a regular este paso en bacterias, en eucariotas la mayoría, si no todo el control específico de síntesis de purinas, está a nivel de proteína mediante inhibición *feedback*. Esta regulación *feedback* de la enzima es un ejemplo clásico de control alostérico (Zalkin y Smith, 1998).

A la síntesis de asparragina se le ha prestado una mayor atención. Hay tres posibles rutas para la síntesis de asparragina en plantas superiores (Sieciechowics *et al.*, 1988)(Fig. 7):

a) Síntesis de β -cianoalanina a partir de cisteína y cianuro catalizada por la β -cianoalanina sintasa (EC 4.4.1.9), con la posterior hidrólisis por la β -cianoalanina hidrolasa (EC 4.2.1.65). El cianuro puede ser liberado en la rotura de glicósidos cianogénicos (Conn, 1981; Nahrstedt, 1987), en la reacción de hidroxilamina y glicolato (Hucklesby *et al.*, 1982), y durante la biosíntesis de etileno (Peiser *et al.*, 1984). La posibilidad de que esta ruta no sea más que un mecanismo rápido de detoxificación de cianuro ha sido discutido por Wurtele *et al.* (1984, 1985). Aunque el HCN marcado se convierte en asparragina en cotiledones y hojas de plántulas de leguminosas, ésta no parece ser la principal ruta de síntesis de asparragina (Streeter *et al.*, 1973).

b) Transaminación del ácido 2-oxosuccinámico (OSA) por el correspondiente donador del grupo amino. Esta reacción se ha detectado en extractos de hojas de *Pisum sativum* (Ireland y Joy, 1983), pero la velocidad de síntesis de asparragina fue unas 20 veces menor que la de la reacción reversa. Es por tanto probable que el principal papel

de esta enzima sea el catabolismo de asparragina.

c) Síntesis directa de asparragina a partir de aspartato por una asparragina sintetasa (AS) dependiente de glutamina (EC 6.3.5.4). La reacción catalizada por la AS parece ser la vía fundamental de síntesis de asparragina en plantas (Lea *et al.*, 1990). Esta enzima parece ser clave en la ruta de movilización del nitrógeno fijado biológicamente.

Existen dos tipos de asparragina sintetetasas:

a) Una forma dependiente de amonio, que sintetiza asparragina a partir de amonio y aspartato, con la consiguiente hidrólisis de una molécula de ATP hasta AMP y pirofosfato (Rognes, 1975). Esta AS dependiente de amonio sólo se ha descrito en procariotas, y aparece relacionada evolutivamente con las ARNt aminoacil sintetetasas (Hinchman *et al.*, 1992). El miembro representativo de este grupo de enzimas es la AS codificada por el gen *asnA* de *E. coli* (Hinchman y Schuster, 1992).

b) La segunda clase de AS utiliza preferentemente glutamina como fuente de nitrógeno, aunque también puede emplear amonio como sustrato alternativo. Esta enzima cataliza la transferencia, dependiente de ATP, del grupo amida de la glutamina hasta el aspartato, para dar glutamato y asparragina como productos (Horowitz y Meister, 1972; Rognes, 1975; Hubert y Simoni, 1980). Por lo tanto, en plantas, la AS no interviene normalmente en la ruta de asimilación directa de amonio, a diferencia de lo que ocurre en las bacterias (Richards y Schuster, 1998). En realidad no se puede descartar la existencia de una AS dependiente de amonio en plantas.

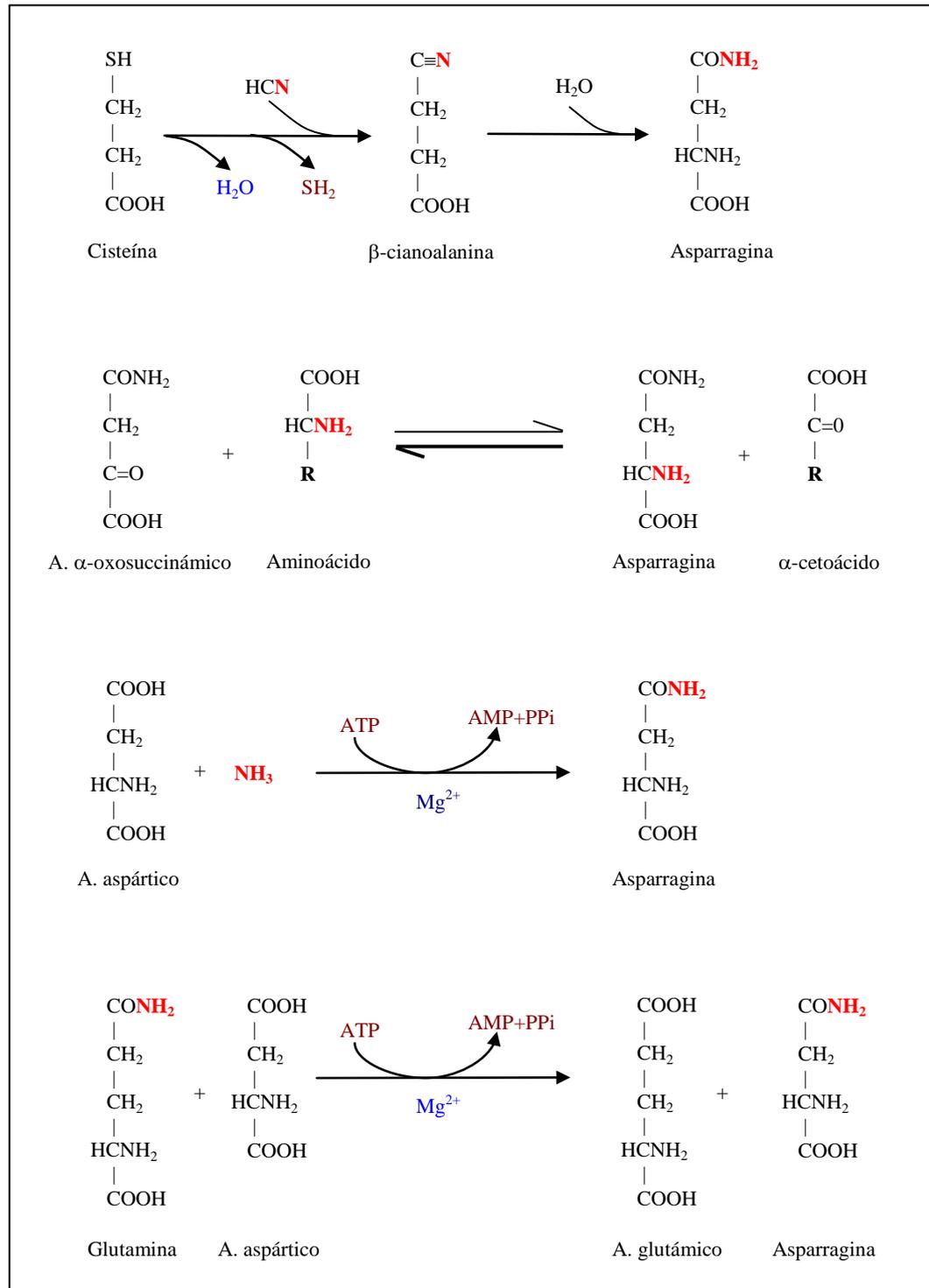


Figura 7. Se muestran las principales rutas de síntesis de asparagina. La reacción catalizada por la AS dependiente de Gln parece ser la vía fundamental de síntesis de asparagina en plantas (Lea *et al.*, 1990).

7. APROXIMACIONES AL ESTUDIO DE LA ASPARRAGINA SINTETASA

7.1. Estudios bioquímicos

En muchas plantas superiores, como soja y judía, la asparragina es un aminoácido importante para el transporte y almacenamiento de nitrógeno durante los procesos de germinación, asimilación de nitrato o amonio, y fijación de nitrógeno (Lea y Fowden, 1975; Sieciechowics *et al.*, 1988). La AS, enzima responsable de la síntesis de asparragina, ha sido aislada y parcialmente purificada de varias plantas: *lupinus* (Rognes, 1980), soja (Huber y Streeter, 1985), maíz (Stulen *et al.*, 1979), y alfalfa (Ta *et al.*, 1989). La AS de plantas no se ha purificado a homogeneidad, y no están separadas y caracterizadas las distintas isoformas. Como ya se ha dicho anteriormente, se han descrito dos formas de AS: una forma dependiente de glutamina (Hubert y Simoni, 1980) y una forma dependiente de amonio (Cedar y Schwartz, 1969). La forma dependiente de glutamina es la más común y está presente en bacterias, plantas y células de mamíferos. Esta forma puede catalizar ambas reacciones, aunque la glutamina es el sustrato preferido. La forma dependiente de amonio se encuentra principalmente en bacterias y sólo puede catalizar la reacción en la que el amonio es la fuente de nitrógeno. No obstante, la AS de raíces de maíz es capaz de utilizar el amonio casi con igual eficiencia que la glutamina y puede utilizar amonio eficazmente cuando éste se halla en exceso (Stulen *et al.*, 1979), lo cual puede ser fisiológicamente importante en este tejido (Oaks y Ross, 1984).

Joy y Ireland (1990) han descrito un método de ensayo y han discutido los posibles factores que pueden interferir en la determinación de V_{max} . La enzima de cotiledones de *lupinus* se inhibía por un inhibidor dializable y termoestable obtenido a partir de un homogeneizado de hojas de guisante (Joy *et al.*, 1983). La presencia de este inhibidor puede ser la causa que explique la ausencia de actividad AS en extractos de hojas verdes. Los cotiledones de semillas en germinación han demostrado ser la mayor fuente de actividad AS, y la enzima se ha estudiado en *lupinus* (Lea y Fowden, 1975; Rognes, 1975, 1980), soja (Streeter, 1973), algodón (Dilworth y Dure, 1978), y *Vigna* (Kern y Chrispeels, 1978). La enzima de *lupinus* requiere Cl^- y se inhibe por la presencia de Ca^{2+} .

Además, la AS no se ha caracterizado bien a nivel bioquímico a causa de su extremada inestabilidad *in vitro* (Hubert y Streeter, 1985). Para mayor dificultad, las

preparaciones de AS parcialmente purificada contienen actividad asparraginasa e inhibidores termoestables (Joy *et al.*, 1983), lo cual hace que los ensayos de actividad AS *in vitro* sean muy difíciles. Por tanto, la purificación a homogeneidad de la AS de plantas es todavía un gran reto.

7.2. Estudios moleculares

Las aproximaciones moleculares se han llevado a cabo con más éxito y se han clonado varios genes que codifican AS de diferentes fuentes: *Arabidopsis thaliana* (Lam *et al.*, 1994), *Pisum sativum* (Tsai y Coruzzi, 1990, 1991), *Asparagus officinalis* (Davies y King, 1993), *Zea mays* (Chevalier *et al.*, 1996), *Glycine max* (Hughes *et al.*, 1997), *Lotus japonicus* (Waterhouse *et al.*, 1996), entre otras. De acuerdo con las secuencias de los ADNcs, todas las AS de plantas son proteínas muy similares que comparten más de un 70% de identidad en la secuencia de aminoácidos. El hecho de que varias de las especies estudiadas posean dos genes homólogos, pero diferentes, para la AS sugiere la existencia de diferentes isozimas. Los productos de ambos genes podrían tener actividad AS ya en forma de monómeros (Richards y Schuster, 1998; Zalking y Smith, 1998), lo que no es incompatible con la posibilidad del acoplamiento para formar homo y heterodímeros. Estudiando las propiedades de la enzima de cotiledones de *lupinus* (Lea y Fowden, 1975; Rognes, 1975, 1980) se ha observado que, en ausencia de sustratos, la filtración en gel indica una masa molecular de 160 kDa, formando un dímero (320 kDa) en presencia de ATP. No obstante, la regulación de las diferentes isoformas de asparragina sintetasa no es bien conocida.

A pesar de la importancia biológica de la asparragina en diversos aspectos del metabolismo de la planta (Lam *et al.*, 1996), y del papel de este aminoácido como un sitio de glicosilación en glicoproteínas eucarióticas (Kornfeld y Kornfeld, 1985), relativamente pocos estudios se han enfocado en la estructura y mecanismo de reacción de las AS de plantas y animales. En parte, esto se ha debido a la dificultad para obtener la enzima altamente purificada de varios tejidos. Estos estudios están siendo posibles gracias a la producción de AS recombinante (Van Heeke y Schuster, 1990; Sheng *et al.*, 1993). El interés en las AS radica en dos cuestiones fundamentales. Primero, la asparragina tiene una razón N/C relativamente alta y es por tanto verosímil que el metabolismo celular de este aminoácido esté unido a la homeostasis de nitrógeno y

biosíntesis de proteína en todos los organismos. Segundo, la eliminación de este aminoácido por la enzima L-asparraginasa es ampliamente usada en protocolos quimioterapéuticos para el tratamiento de la leucemia linfoblástica aguda (ALL) en niños (Ertel *et al.*, 1979).

Hasta la fecha, se han descrito en procariotas y eucariotas dos familias de enzimas AS que no parecen tener gran similitud en la secuencia. Los miembros de la primera familia de enzimas, aislados exclusivamente de procariotas, utilizan amonio como sustrato y parecen estar evolutivamente relacionadas con las amino-acil tRNA sintetetasas (Hinchman *et al.*, 1992). La AS codificada por el gen *asnA* de *Escherichia coli* es el miembro representativo de este grupo de enzimas. Para la segunda clase de AS, la glutamina es la principal fuente de nitrógeno, aunque estas enzimas pueden emplear amonio como un sustrato alternativo. Un análisis de sus secuencias ha revelado que estas enzimas son miembros de la superfamilia de amidotransferasas dependientes de glutamina (Richards y Schuster, 1998; Zalking y Smith, 1998). A diferencia de las bacterias, los organismos eucarióticos no presentan AS dependiente de amonio, similares a *asnA*, puede que debido a la necesidad de mantener concentraciones celulares de amonio a muy bajos niveles.

8. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LA ASPARRAGINA SINTETASA

La asparragina sintetasa es una enzima clave en plantas, así como en el metabolismo de mamíferos; y su regulación por tanto, ha sido objeto de mucho estudio (Gong y Basilico, 1990; Guerrini *et al.*, 1993). En plantas, se piensa que la asparragina juega un papel preponderante en el transporte de nitrógeno, y en guisante (Tsai y Coruzzi, 1990), maíz (Chevalier *et al.*, 1996), soja (Hughes *et al.*, 1997), y *lotus* (Waterhouse *et al.*, 1996), hay dos genes expresados diferencialmente que codifican asparragina sintetetasas dependientes de glutamina; e incluso tres en *Arabidopsis* (Lam *et al.*, 1998). La investigación en este área es complicada por el hecho de que las plantas pueden también sintetizar asparragina por la hidratación catalizada por la enzima de la β -cianoalanina. Las levaduras también poseen dos genes, pero la importancia metabólica de esta observación, y sus respectivos papeles en la célula, quedan aún por determinar (Ramos y Waime, 1979). En células de mamífero, se ha observado que en un mutante AS sensible a la temperatura se bloquea la progresión a través de la fase G1 del ciclo celular

(Gong y Basilico, 1990), y un trabajo reciente muestra que la expresión de AS está controlada tanto a nivel transcripcional como a nivel traduccional (Hutson *et al.*, 1997). La transcripción de los genes AS parece ser un punto clave en la regulación de la síntesis de asparragina. Lam *et al.* (1998) han encontrado una perfecta correlación entre la expresión del gen *ASNI* y el contenido en asparragina en los tejidos de *Arabidopsis*, demostrando que los cambios en la expresión de los genes AS tienen efectos fisiológicamente relevantes.

8.1. Influencia de las condiciones de estrés

Los niveles de asparragina en tejidos de plantas se incrementan con frecuencia bajo condiciones de estrés, tales como deficiencias en un mineral y estrés salino. Un ejemplo de esto puede observarse en tomate, donde la deficiencia en zinc puede conducir a aumentar 50 veces la concentración de asparragina (Stewart y Larher, 1980). Aún no se ha establecido el significado de dicho incremento, pero podría ser un medio de almacenamiento de nitrógeno cuando la síntesis de proteína está inhibida por el estrés. El estrés post-cosecha hace aumentar de 5 a 10 veces el contenido de asparragina en los brotes de espárrago (King *et al.*, 1990).

8.2. Influencia de la luz-oscuridad

La represión por luz de la transcripción del gen AS en guisante y *Arabidopsis* está mediada en parte por fitocromo (Tsai y Coruzzi, 1990; Lam *et al.*, 1994). Estudios más recientes demuestran que la luz puede actuar también indirectamente en la expresión del gen AS vía cambios inducidos por luz en el metabolismo del carbono. Se ha demostrado que la suplementación con sacarosa puede simular los efectos negativos de la luz, reprimiendo la expresión del gen AS en plantas de *Arabidopsis* adaptadas a la oscuridad (Lam *et al.*, 1994) (Fig. 8). Del mismo modo, se ha demostrado que el nivel de ARNm AS incrementa con un descenso del contenido en sacarosa en brotes de espárrago segados (Davies y King, 1993). En puntas de raíz de maíz, se ha observado un incremento de la actividad AS en hambre de azúcar (Brouquisse *et al.*, 1992). En contraste, la actividad AS disminuyó en raíces de maíz cuando se trataron las plantas con glucosa exógena (Stulen y Oaks, 1977). Estos resultados revelan una evidente regulación metabólica, siendo la expresión de los genes AS de plantas sensible a señales

procedentes del metabolismo del carbono y del nitrógeno. La inducción de la expresión de los genes *AS* durante la germinación en el guisante y durante el desarrollo de nódulos radicales, en el guisante y en la alfalfa (Tsai y Coruzzi, 1990; Shi *et al.*, 1997), dos situaciones que implican una importante movilización de nitrógeno, confirman esta regulación metabólica.

Este modelo de regulación es perfectamente coherente con el conocido papel de la asparragina como transportador de nitrógeno preferente en situaciones de déficit de carbono y/o movilización de nitrógeno.

Se han propuesto posibles efectores moleculares que actúan como intermediarios (tales como COP y DET) en la transducción de la señal de la luz (Chory, 1993; Li *et al.*, 1994). No obstante, se desconoce la existencia de un enlace directo entre la expresión del gen y la etapa de transducción de esta señal de la luz. Algunos promotores de genes de la asimilación de nitrógeno, incluidos los de la *GS2* y *AS* de guisante, se conoce que tienen elementos de respuesta a la luz (Tjaden *et al.*, 1995; Ngai *et al.*, 1997).

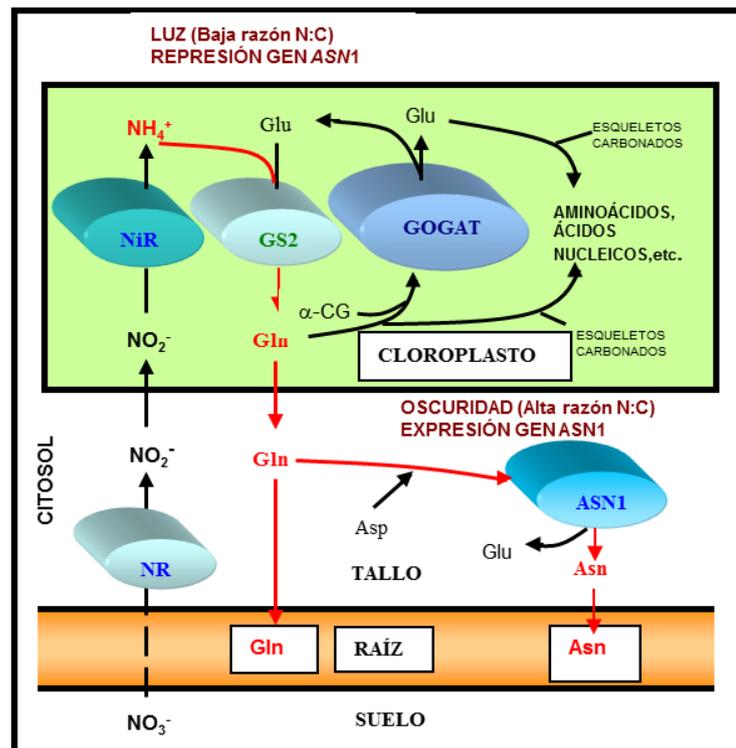


Figura 8. Modelo de trabajo que representa el control metabólico de la asimilación de nitrógeno en forma de Gln y Asn y los efectos sobre la expresión del gen *ASNI* en *Arabidopsis*. Asimismo se muestra el efecto de la luz/oscuridad en la expresión de genes *AS* en *Arabidopsis thaliana*. Nir: nitrato reductasa; GS2: glutamina sintetasa 2; GOGAT: glutamato sintasa; NR: nitrato reductasa; ASNI: asparragina sintetasa de tipo I; Glu: glutamato; Gln: glutamina; Asp: aspartato; Asn: asparragina; α-CG: α-cetoglutarato.

8.3. Influencia de una fuente de carbono reducido

En plantas superiores, la suplementación con azúcar exógena conduce a la represión de un conjunto de promotores implicados en el proceso fotosintético (Sheen, 1990). Un homólogo al factor trans-activador SNF1, que interviene en procesos de represión catabólica en levaduras, se ha identificado en centeno usando técnicas de complementación en levaduras (Alderson *et al.*, 1991). Un gen relacionado con *SNF1* se ha aislado también en *Arabidopsis* (Le Guen *et al.*, 1992). Será interesante determinar los mecanismos por los cuales la luz y la sacarosa afectan recíprocamente al control de los genes *GLN2/GLU1* y *ASN1* en *Arabidopsis*.

Un aporte de sacarosa reprime la inducción en oscuridad del gen *ASN1*, y este efecto se revierte por adición de una fuente de nitrógeno tal como glutamina, glutamato, o asparragina (Lam *et al.*, 1994). Estas observaciones apoyan un modelo en el cual, cuando el “pool” de carbono es relativamente menor que el “pool” de nitrógeno, el producto del gen *ASN1* funciona para conducir el flujo de nitrógeno hacia la asparragina, que actúa como forma de almacenamiento de nitrógeno y/o transporte de nitrógeno a distancias largas (Lam *et al.*, 1994).

9. IMPORTANCIA METABÓLICA DE LA SÍNTESIS DE ASPARRAGINA EN PLANTAS Y ANIMALES

Dos parecen ser los destinos metabólicos de la asparragina. El primero es el uso de este aminoácido en la biosíntesis de proteínas, particularmente como un punto de unión con las estructuras de carbohidratos complejas (Kaplan *et al.*, 1987). La otra función, quizás cuantitativamente más importante, implica la conversión en intermediarios del ciclo del ácido cítrico, y de aquí a glucosa, con un uso concomitante de N en la síntesis de otros aminoácidos. Mientras tiene lugar la hidrólisis de asparragina por asparraginasa(s) celular(es), el flujo a través de este paso es probablemente menor que a través de otras rutas catabólicas. En hígado de rata, la conversión del carbono de la asparragina en oxalacetato ocurre fundamentalmente por una transaminación inicial para dar α -cetosuccinamida y posterior hidrólisis (Maul y Schuster, 1986), aunque la regulación de estas reacciones es aún escasamente conocida. Ciertamente, este paso parece ser el único medio de rotura de la asparragina que es utilizado por la mitocondria (Schuster, 1982). Parece tratarse de dos aminotransferasas diferentes en células de hígado de rata,

mitocondrial y citosólica, que median la síntesis de α -cetosuccinamida a partir de asparragina y que parecen estar reguladas diferencialmente por calcio. Una posibilidad es que el factor que controle la regulación de esta ruta sea la disponibilidad de glioxilato y piruvato en los compartimentos mitocondrial y citosólico. Este paso es, no obstante, el principal medio de conversión de asparragina en glucosa, mucho más que la hidrólisis a ácido aspártico. Ya que el aceptor de N en la transaminación de asparragina a α -cetosuccinamida es el glioxilato, rindiendo glicina, un posible mecanismo por el cual la caída de asparragina puede causar daño celular es a consecuencia del incremento en los niveles de glioxilato.

En el proyecto desarrollado en esta Tesis Doctoral se ha llevado a cabo la clonación de dos genes *AS* de una leguminosa ureida, como es *Phaseolus vulgaris*, debido a nuestra idea de que algunos factores moleculares pueden ser responsables de la integración y correulación de la biosíntesis de ureidos y amidas en raíces de leguminosas. Con el objetivo último de determinar los mecanismos de control de este proceso de diferenciación metabólica, hemos iniciado una aproximación molecular al estudio de la asparragina sintetasa, una de las enzimas clave en el proceso de movilización del nitrógeno desde las raíces hacia las partes aéreas de la planta.

10. OBJETIVOS

Durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral se abarcarán los siguientes objetivos:

- Aislamiento y caracterización del gen o genes que codifican asparragina sintetasa en *Phaseolus vulgaris*. Para ello se utilizará una estrategia combinada de escrutinio de genoteca genómica y RT-PCR con oligonucleótidos degenerados.
- Expresión y purificación de la(s) proteína(s). La(s) enzima(s), tras expresarla(s) en *E. coli*, se someterá(n) a un proceso de purificación para obtenerla en estado homogéneo.
- Obtención de anticuerpos policlonales y análisis de la expresión mediante *Western blot*.
- Análisis de la expresión mediante *Northern blot*. Se aislará ARNm de tejidos de plantas de *P. vulgaris* cultivadas en diferentes condiciones nutricionales, de luz/oscuridad, y bajo condiciones de fotoperíodo normal.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

1. REACTIVOS

1.1. PRODUCTOS QUÍMICOS

Todos los productos y reactivos fueron de alta calidad y se adquirieron en las casas comerciales indicadas entre paréntesis.

Ácido acético (Panreac)

Ácido bórico (Sigma)

Ácido clorhídrico (Panreac)

Agar (Panreac)

Agarosa (Promega)

Alcohol isoamílico (Merck)

Ampicilina (Sigma)

Azul de bromofenol (Sigma)

Bacto-triptona (Difco)

Bromuro de etidio (BrEt) (Sigma)

Citrato sódico (Panreac)

Cloroformo (Merck)

Cloruro sódico (Panreac)

Cloruro cálcico (Panreac)

Cloruro de cesio (USB)

Cloruro amónico (Panreac)

Columnas de filtración en gel *Nick Columns* (Pharmacia)

Dietil pirocarbonato (DEPC) (Sigma)

dNTP's (Pharmacia)

Dodecil sulfato sódico (Sigma)

EDTA- Na_2 (ácido etilen-diamin-tetraacético sal sódica) (ICN)

Etanol absoluto (Merck)

Extracto de levadura (Difco)

Fenol (Sigma)

Ficoll 400 (Sigma)

Formaldehido 37% (Merck)

Fosfato disódico (Panreac)

Fosfato potásico mono y diácido (Panreac)

Gelatina (Bio-Rad)
Glicerol (Panreac)
Glucógeno (Panreac)
Glucosa (Panreac)
Hidrolizado de caseína (N-Z-amina) (Panreac)
IPTG (Isopropil β -D-tiogalactósido) (Pharmacia)
Isopropanol (Merck)
Maltosa (Panreac)
Manitol (Panreac)
Molibdato sódico (MoO_4Na_2) (Panreac)
MOPS (ácido 3(N-morfolino) propanosulfónico) (ICN)
 β -NAD⁺ (Sigma)
N,N-dimetil formamida (Merck)
Papel *Whatmann* 3MM Gel-Blotting-Papers 300x600 mm (Schleicher & Schuell)
Perlita (Dicalite española S.A.)
Polivinilpirrolidona (PVP) (Sigma)
Sulfato de cobre (Panreac)
Sulfato ferroso (Panreac)
Sulfato magnésico (Panreac)
Sulfato de manganeso (Panreac)
Sulfato potásico (Panreac)
Sulfato de zinc (Panreac)
Sulfato de dextrano (Pharmacia)
Termita grado 3 (Asfaltex S.A.)
TRI REAGENT[®]-RNA/DNA/PROTEIN ISOLATION REAGENT (Molecular Research Center, Inc.)
X-gal (5-Bromo-4-cloro-3-indolyl-B-D-galactopiranosido) (USB)
Xilen-cianol FF 0,25% (p:v) (Sigma)
Yoduro sódico (Sigma)

1.2. SOLUCIONES

1.2.1. SOLUCIONES GENERALES

Acetato amónico (NH₄AcO) 4 M
Acetato potásico (KAcO) 3 M (pH 4,8)
Acetato sódico (NaAcO) 3 M
Cloruro cálcico (CaCl₂) 1 M
Cloruro potásico (KCl) 1M
Cloruro sódico (NaCl) 1 M
Na₂-EDTA 0,5 M (pH 8,0)
Etanol absoluto, 95%, 80%, 75% y 70%
Fenol:cloroformo:isoamílico (25:24:1, v:v:v)
Fosfato sódico 1 M (pH 7,2)
Glucosa 1 M
Hidróxido sódico (NaOH) 10 N
Mezcla de dNTPs (dATP, dCTP, dTTP y dGTP) 10 mM
SDS 20% (p:v)
Sulfato magnésico (Mg SO₄) 1 M
Tris-HCl 1M (pH 7,5)
Yoduro sódico (NaI) 6 M

1.2.2. SOLUCIONES PARA LA PURIFICACIÓN DE ADN PLASMÍDICO

•Solución I

Glucosa	50 mM
Tris-HCl	25 mM (pH 8,0)
EDTA	10 mM

•Solución II

NaOH	0,2 N (preparada en el momento)
SDS	1% (p:v)

•Solución III (para un volumen de 100 ml)

KAcO 5M	60 ml
Ácido acético glacial	11,5 ml
H ₂ O	28,5ml

La solución resultante es 3 M con respecto al potasio y 5 M con respecto al acetato.

1.2.3. SOLUCIONES PARA LA PURIFICACIÓN DE ADN MEDIANTE MATRIZ DE ADHESIÓN

•Solución de lavado

Tris-HCl	1 M (pH 7,5)
NaCl	1 M
EDTA	100 mM (pH 8,0)

•Matriz de adhesión *Geno-bind* (Clontech)

1.2.4. TAMPONES Y SOLUCIONES EMPLEADOS EN LA EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO

•Tampón proteinasa K

Tris-HCl	0,2 M (pH 8,0)
EDTA	0,1M
Sarcosil	1%
Proteinasa K	100 µg/ml

•T₁₀E₁ pH 8,0

Tris	10 mM (pH 8,0)
EDTA	1 mM (pH 8,0)

•Isopropanol saturado con NaCl

1.2.5. SOLUCIONES EMPLEADOS EN LA PREPARACIÓN DE MUESTRAS DE ÁCIDOS NUCLEICOS PARA ELECTROFORESIS

•Solución de carga para electroforesis de ADN (10x)

Azul de bromofenol	0,8% (p:v)
Xilen-cianol FF	0,50% (p:v)
Ficoll tipo 400	30% (p:v) en H ₂ O

•Solución de carga para electroforesis de ARN (5x)

Glicerol	50% (p:v)
Na ₂ -EDTA	1 mM (pH 8,0)

Azul de bromofenol 0,4% (p:v)

Xilen cianol FF 0,4% (p:v)

1.2.6. TAMPONES EMPLEADOS EN LA CONSTRUCCIÓN Y ESCRUTINIO DE LA GENOTECA GENÓMICA EN λ FIX II

•Tampón de relleno (10x)

Tris-HCl 60 mM (pH 7,5)

NaCl 60 mM

MgCl₂ 60 mM

Gelatina 0,5%

DTT 10 mM

•Tampón de ligación (10x)

Tris-HCl 500 mM (pH 7,5)

MgCl₂ 70 mM

DTT 10 mM

•STE (10x) (autoclave)

NaCl 1 M

Tris-HCl 200 mM (pH 7,5)

EDTA 100 mM

•Tampón SM (autoclave)

NaCl 100 mM

MgSO₄ 7H₂O 10 mM

Tris-HCl 50 mM (pH 7,5)

Gelatina 0,01% (p:v)

1.2.7. TAMPONES Y SOLUCIONES PARA LA SÍNTESIS DE ADNc

•Tampón de síntesis de la primera cadena (5x)

Tris 250 mM (pH 8,5)

MgCl₂ 40 mM

KCl 150 mM

DTT 5 mM

1.2.9. SOLUCIONES PARA LA HIBRIDACIÓN DE ARN

•Solución Denhardt

BSA (Fracción V)	1% (p:v)
Ficoll 400	1% (p:v)
PVP 360	1% (p:v)

Se pasó por un filtro de 0,45 μm y se almacenó en partes alícuotas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso.

•ADN de timo de ternera sonificado

Se hidrató en 10 ml de H_2O destilada el ADN de timo de ternera a una concentración de 10 mg/ml mediante agitación magnética. Una vez disuelto, la solución adquiere un aspecto gelatinoso que perderá con la sonicación. Esta solución se sonicó durante 8 min al 30% de potencia en un sonicador Vibra Cell de Sonic&Materials INC.

1.2.10. FENOL NEUTRO

Se licuó el fenol a $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se mezcló con un volumen igual de Tris-HCl 1M (pH 8,0) durante 10-15 min. Una vez separadas las dos fases, se retiró el Tris-HCl y se añadió un nuevo volumen del mismo. Este proceso se repitió hasta que el Tris-HCl alcanzó pH 8,0. Cuando se consiguió dicho pH, se añadió hidroxiquinoleína hasta un 0,1% (p:v de fenol) y se almacenó en oscuridad a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

1.2.11. FORMAMIDA DESIONIZADA

A 50 ml de N,N-dimetil-formamida se añadieron 5 g de resina Bio-Rad AG 501-X8 y se mezcló durante 30 min a temperatura ambiente. Se filtró a través de una doble capa de papel secante, se repartió en partes alícuotas y se almacenó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

1.3. TAMPONES

Todos los tampones que lleven la indicación “(autoclave)” se prepararon y, posteriormente, se esterilizaron en autoclave durante 20 min a $120\text{ }^{\circ}\text{C}$.

•Tampón TE (autoclave)

Tris-HCl	10 mM (pH 7,5)
Na_2 -EDTA	1 mM

•Tampón TAE

Tris-Acetato 40 mM

Na₂-EDTA 2 mM

Ajustar a pH 8,5 con ácido acético.

•Tampón TB

Pipes 10 mM

CaCl₂ 15 mM

KCl 250 mM

MnCl₂ 55 mM

Antes de añadir el MnCl₂, se ajustó el pH a 6,7 con KOH. Posteriormente se disolvió el MnCl₂ y se filtró la solución. A pH superior se produce la precipitación del MnCl₂, de ahí que se ajuste el pH antes de añadir dicho compuesto.

•Tampón TBE

Tris 89 mM

H₃BO₃ 89 mMNa₂-EDTA 2 mM

Ajustar a pH 8,0 con HCl.

•Tampón TNE

Tris-HCl 50 mM (pH 7,5)

NaCl 150 mM

EDTA 1 mM

•Tampón MOPS (10x) (autoclave)

MOPS 200 mM

NaAcO 50 mM

Na₂-EDTA 1 mM

El tampón MOPS (10x) se prepara con agua tratada con DEPC, se ajusta con NaOH a pH 7,0 y se esteriliza en autoclave. No se afecta, aunque después de esterilizarlo tome una coloración amarilla.

•Tampón SSC (20x)

NaCl 3 M

Cittrato sódico 0,3 M

Ajustar a pH 7,0 con NaOH.

•Tampón OPA (10x) (Pharmacia)

Se obtuvo directamente de la casa comercial Pharmacia con la siguiente composición:

Tris-acetato	100 mM (pH 7,5)
Acetato magnésico	100 mM
KAcO	500 mM

•Tampón para PCR (10x) (C. Viral)

Se obtuvo directamente de la casa comercial C. Viral con la siguiente composición:

(NH ₄) ₂ SO ₄	166 mM
Tris-HCl	670 mM (pH 8,8)
Tween-20	0,1% (v:v)

•Tampón de la ligasa de T4 (10x) (MBI Fermentas)

Se obtuvo directamente de la casa comercial MBI Fermentas con la siguiente composición:

Tris-HCl	400 mM (pH 7,5)
MgCl ₂	100 mM
DTT	100 mM
ATP	5mM (pH 7,8)

•Tampón PBS

Solución salina tamponada, cuya composición es:

NaCl	0,14 M
KCl	2,7 mM
KH ₂ PO ₄	1,5 mM
Na ₂ HPO ₄	8,1 mM

•Tampón PBST

NaCl	150 mM
Na ₂ HPO ₄	16 mM
NaH ₂ PO ₄	4 mM. Ajustar el pH a 7,3
Tritón X-100	1% (v:v)

•Tampón de Laemmli

Tris-HCl	50 mM (pH 8,5)
β-mercaptoetanol	100 mM

SDS	2% (p:v)
Azul de bromofenol	0,1% (p:v)
Glicerol	10% (v:v)

•**Tampón de Laemmli para nativo**

Tris-HCl	50 mM (pH 8,5)
β -mercaptoetanol	100 mM
Azul de bromofenol	0,1% (p:v)
Glicerol	10% (v:v)
PMSF	2 mM

•**Tampón TTBS**

Tris-HCl	100 mM
NaCl	0,9% (p:v)
Tween-20	0,1% (v:v)

•**Tampón TBS** (igual que el tampón TTBS pero sin Tween-20)

1.4. MEDIOS DE CULTIVO

•**Medio LB** (autoclave)

NaCl	170 mM
Bacto-triptona	10 g/l
Extracto de levadura	5 g/l

Para medios LB sólidos, se añadió agar al 1,5% (p:v)

•**Medio LBMG**

LB (autoclave)	
MgCl ₂	20 mM
Glucosa	20 mM

•**Medio Mínimo para bacterias**

Sales M9 (5x)	200 ml/l
Glucosa	20 mM
MgSO ₄	1 mM
CaCl ₂	0,1 mM
Hidrolizado de caseína	50mg/l

•Medio NZY (autoclave)

NaCl	100 mM
MgSO ₄ 7 H ₂ O	10 Mm
Extracto de levadura	5 g/l
Hidrolizado de caseína	10 g/l

Ajustar a pH 7,5 con NaOH. Para medios sólidos, se añadió agar al 1,5% (p:v).

•TB Agarosa de cobertura

NaCl	10 mM
Bacto-triptona	10 g/l
Agarosa	6 g/l, 0.6% (p:v)
MgSO ₄	10 mM (filtrado con un filtro de 0,22 µm)

El medio se esterilizó en autoclave antes de añadir el MgSO₄. Posteriormente se dejó enfriar hasta alcanzar 48 °C y se añadió el MgSO₄.

•Sales M9 (5x) (autoclave)

Na ₂ HPO ₄ 7H ₂ O	115 mM
KH ₂ PO ₄	110 mM
NaCl	42,5 mM
NH ₄ Cl	93,5 mM

Ajustar a pH 7,4 con NaOH 10 N

•Medio para *Rhizobium leguminosarum* (autoclave)

K ₂ HPO ₄	2,3 mM
KH ₂ PO ₄	0,73 mM
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,81 mM
NaCl	1,7 mM
CaCl ₂	0,36 mM
Extracto de levadura	0,8 g/l
Manitol	55 mM

Ajustar a pH 7,2. Para medio sólido, se añadió agar al 1,5% (p:v).

1.5. SOLUCIÓN NUTRITIVA (HARPER & GIBSON) PARA PLANTAS**•Macronutrientes (1x) (autoclave)**

KH ₂ PO ₄	0,7 mM
---------------------------------	--------

K ₂ SO ₄	1 mM
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,8 mM
CaCl ₂	0,5 mM
FeSO ₄	0,9 mM

Se ajustó el pH a 6,5 con KOH. Para el primer riego se diluyó hasta ½, mientras que el resto se hizo con ¼ de la concentración normal.

●**Micronutrientes** (autoclave)

H ₃ BO ₃	46 mM
MnSO ₄ ·H ₂ O	12 mM
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,7 mM
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,3 mM
Na ₂ MoO ₄	0,6 mM

Añadir 1 ml por litro de solución nutritiva.

1.6. ANTIBIÓTICOS

Ampicilina preparada a una concentración de 100 mg/ml en agua, esterilizada por filtración (0,2 µm), repartida en partes alícuotas y congelada a -20 °C. Para su uso, se descongeló y se añadió al medio en una concentración de 50 µg/ml, procurando que éste se encontrase a una temperatura inferior a 55 °C.

1.7. ENZIMAS

1.7.1. ENZIMAS MODIFICADORAS: Fragmento Klenow de la ADN polimerasa I (Pharmacia); Transcriptasa inversa de AMV (Clontech); ARNasa H (Clontech); ADN polimerasa I de *E. coli* (Clontech); ADN ligasa de *E. coli* (Clontech); ADN ligasa de T4 (Pharmacia); ADN polimerasa de T4 (Clontech); Taq polimerasa *EcoTaq* (c.viral).

1.7.2. ENDONUCLEASAS DE RESTRICCIÓN: *Bam*HI (Pharmacia), *Eco*RI (MBI Fermentas), *Eco*RV (MBI Fermentas), *Hind*III (Pharmacia), *Pst*I (Pharmacia), *Sal*I (MBI Fermentas).

1.7.3. UNIDADES DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

● Se define una unidad (U) de ADN polimerasa como la cantidad de enzima que incorpo-

ra 10 nmoles de dNTPs en forma de ácido insoluble después de una incubación de 30 min a 37 °C utilizando como sustrato poli(dA-dT)·poli(dA-dT) en el tampón apropiado.

- Se define una unidad de transcriptasa inversa AMV como la cantidad de enzima que incorpora 1 nmol de dTTP en un producto insoluble en ácido en 10 min a 37 °C. Se define una unidad de ARNasa H como la cantidad de enzima que cataliza la producción de 1 nmol de nucleótido soluble en ácido en 20 min a 37 °C usando un híbrido ADN:ARN como sustrato.

- Se define una unidad de ADN ligasa de *E. coli* como la cantidad de enzima que une al menos el 50% de los fragmentos resultantes de la digestión del ADN del bacteriófago λ con *Hind*III en 30 min a 16 °C en un volumen de 20 μ l conteniendo una concentración de extremos 5' de 0,8 nM.

- Se define una unidad de ADN ligasa de T4 como la cantidad de enzima que une al menos el 90% de los fragmentos resultantes de la digestión del ADN del bacteriófago λ con *Hind*III en 30 min a 16 °C en un volumen de 20 μ l conteniendo una concentración de extremos 5' de 0,12 μ M.

- Se define una unidad de Taq polimerasa como la cantidad de enzima que incorpora 10 nmoles de dNTPs en forma de ácido insoluble después de una incubación de 30 min a 72 °C utilizando el tampón adecuado.

- Se define una unidad de enzima de restricción como la cantidad de enzima requerida para digerir 1 μ g de ADN del bacteriófago λ en 1 h a 37 °C en un volumen de 50 μ l utilizando el tampón adecuado.

1.8. ISÓTOPOS RADIOACTIVOS

(α -³²P)dCTP (Amersham): 3000 Ci/mmol, 10 μ Ci/ μ l

1.9. KIT DE BIOLOGÍA MOLECULAR

Marathon[™] *cDNA Amplification Kit* (Clontech)

QIAGEN Plasmid mini kit (Quiagen)

Oligolabelling kit (Pharmacia)

2. MATERIAL BIOLÓGICO

2.1. MATERIAL VEGETAL

Se utilizaron plantas de judía (*Phaseolus vulgaris*) de la variedad Creat Northern, proporcionadas por Eurosemillas (Córdoba). Dichas semillas se germinaron y cultivaron en un medio compuesto por perlita/termita (1:2). Tras germinar, se inocularon con una suspensión de *Rhizobium leguminosarum* cepa ISC14 que se había cultivado a baja temperatura (inferior a 30°C). Las plantas se cultivaron en cámaras de cultivo en condiciones de fotoperiodo de día largo (16 h de luz, 8 h de oscuridad), humedad relativa del 70% y temperatura de 22 °C. El riego se realizó cada 7 días con la solución nutritiva antes descrita.

Los distintos órganos recolectados se congelaron inmediatamente con nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C hasta el momento de su utilización.

2.2. ESTIRPES BACTERIANAS

Para la infección con la genoteca genómica se utilizó la estirpe de *E. coli* XL1-Blue MRA (P2) [$\Delta(mcrA)183$, $\Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173$, *endA1*, *supE44*, *thi-1*, *gyrA96*, *relA1*, *lac*.(P2 lisogénico)], que selecciona fagos recombinantes.

Los experimentos de clonación se realizaron en *E.coli* DH5 α F' [*supE44*, $\Delta lacU169$, ($\phi 80 lacZ \Delta M15$), *hsdR17*, *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *relA1*].

Para la expresión y purificación de la proteína PVAS2 se empleó la estirpe de *E. coli* BL21 (DE3) [*hsdS*, *gal* ($\lambda cIts857$, *ind1*, *Sam7*, *nin5*, *lac UV5-T7 gen1*)]. Esta estirpe se emplea en la expresión, a un alto nivel, de genes clonados en vectores de expresión que contienen el promotor del bacteriófago T7. El bacteriófago λ DE3 es el portador de la ARN polimerasa del bacteriófago T7, el cual se integra en el cromosoma de BL21.

Para los estudios de complementación de los genes *PVAS1* y *PVAS2*, se utilizó la estirpe auxótrofa para la asparragina *E. coli* ER#4813 (*asnB32*, λ^- , *relA1*, *spoT1*, *asnA31*, *thi-1*) procedente del *Escherichia coli* Genetics Stock Center, (New Haven, CT). Dicha estirpe se cultivó a 28 °C.

La inoculación de las plantas de judía se realizó con *Rhizobium leguminosarum* cepa ISC14, suministrada por el Centro de Investigación y Formación Agraria Las Torres-Tomejil (Sevilla). Esta variedad es idónea para la inoculación de la judía.

2.3. SONDAS

Para los experimentos de transferencia de Southern sobre ADN de judía, se utilizó el fragmento de 380 pb amplificado con los oligonucleótidos ASP2 y ASP3, que contiene parte de la secuencia del ADNc del gen *PVAS2*.

Para los análisis de expresión mediante Northern, se utilizó un fragmento de 445 pb amplificado con los oligonucleótidos PVAS1-7/PVAS1-8, para detectar el transcrito de *PVAS1*. Este fragmento contiene 159 pb del extremo 3' no traducido más la región carboxi-terminal del ADNc del gen *PVAS1* (desde el nucleótido 1455 hasta el 1899).

Para detectar el transcrito de *PVAS2*, se utilizó como sonda un fragmento de 866 pb que incluía la región 3' no traducible y extremo carboxilo terminal del ADNc de *PVAS2* (nucleótidos 1089-1955). Esta sonda se construyó por PCR empleando los oligos AS15 (5'-TTT CAC AAG GCA CCC AAC AAG-3') y AS21 (5'-TGC GTG CAT AAC TGA GAA AAT AA-3'). Una sonda más específica de 202 pb se obtuvo por PCR empleando los oligos AS18 (5'-GGT GTT GCC ATC CAG AGC-3') y AS21 (secuencia ya descrita), que incluía la región 3' no traducible (nucleótidos 1753-1955).

3. CONDICIONES DE CULTIVO DE LOS MICROORGANISMOS

3.1. CULTIVOS DE *E. coli*

Los cultivos líquidos crecieron en LB suplementado con ampicilina (50 µg/ml) incubados en un agitador orbital a 37 °C a 200-350 rpm procurando dejar una cámara de aire al menos cinco veces mayor que el volumen de cultivo.

3.2. CULTIVOS DE *Rhizobium*

Se cultivó en el medio sólido antes descrito y se almacenó a 4 °C hasta su utilización. Antes de inocular las plantas, fue necesario refrescar el cultivo en medio líquido a baja temperatura (inferior a 30 °C) para evitar la pérdida del plásmido portador de los genes responsables de la fijación de nitrógeno.

3.3. CONSERVACIÓN DE LAS ESTIRPES BACTERIANAS

Las estirpes bacterianas se almacenaron en el mismo medio nutritivo utilizado para su crecimiento, suplementado con glicerol estéril a una concentración final del 40% (v:v) y a -80 °C hasta su utilización.

4. PREPARACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES Y PROCEDIMIENTO DE TRANSFORMACIÓN DE *E. coli*

4.1. PREPARACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES

A partir de las células almacenadas en glicerol se hizo un cultivo en placa en el medio apropiado y se incubó durante toda la noche a 37 °C. Con una de estas colonias, se inocularon 10 ml de medio LBMG y se cultivó en un agitador orbital a 37 °C a 200 rpm durante toda la noche. Posteriormente se inocularon 40 ml de medio LBMG con un volumen de cultivo suficiente como para que la A_{550} inicial fuese de 0,1-0,2 y se incubó a 25 °C a 250 rpm hasta alcanzar una A_{550} de 0,5-0,6. (El resto del protocolo se desarrolló a 4 °C y con material preenfriado). Seguidamente se incubó en hielo durante 10 min, se transfirió a un tubo estéril y se concentraron las células por centrifugación a 500 g a 4 °C durante 5 min. Tras eliminar el sobrenadante, se incubaron las células en hielo y se resuspendieron en 12 ml de tampón de transformación (TB). Se incubaron durante 10 min en hielo y se volvieron a centrifugar a 500 g a 4 °C durante 5 min. Se resuspendieron nuevamente en 3 ml de tampón TB frío y se añadió DMSO hasta alcanzar una concentración final del 7%. Finalmente, se repartieron en partes alícuotas de 200 μ l, se rociaron los viales con nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C hasta su utilización.

4.2. TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS

Se mezclaron 100-200 μ l de células competentes con el ADN (hasta 20 μ l) en un tubo de 1,5 ml preenfriado en hielo, y se incubaron en hielo durante 30 min. A continuación se incubó durante 2 min a 42 °C y de nuevo en hielo durante 1-2 min. Se añadieron 200 μ l de LB y se incubó a 37 °C durante 30 min. Finalmente, se sembraron entre 50 μ l y 500 μ l de las células transformadas en placas de medio selectivo apropiado y se incubó a 37 °C durante 12-14 h.

5. CONSTRUCCIÓN Y ESCRUTINIO DE UNA GENOTECA GENÓMICA DE JUDÍA EN EL BACTERIÓFAGO λ FIX II

Para la construcción de la genoteca genómica, se utilizó el vector λ FIX II (*Lambda FIX[®] II/XhoI Partial Fill-In Vector Kit*) (Stratagene). El uso de este vector requiere que

los fragmentos de ADN a ligar tengan un tamaño de 9-23 kb y cuenten con extremos cohesivos del tipo 5'-GA-3' (Fig. 9).

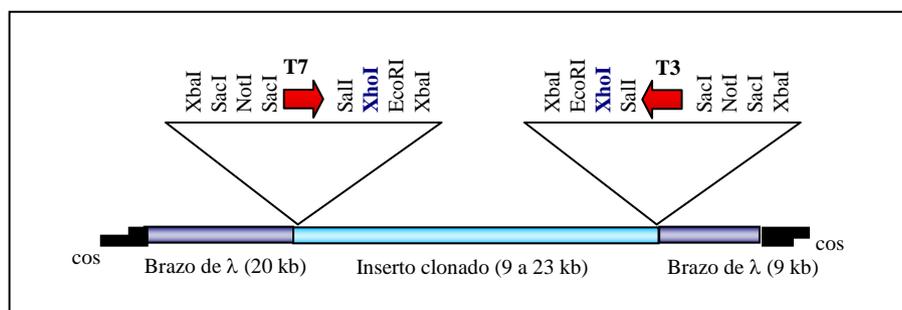


Figura 9. Estructura general del bacteriófago recombinante en el vector λ FIX II.

5.1. DIGESTIÓN PARCIAL CON *Sau3AI*

Para calcular la concentración ideal de enzima de restricción, se digirieron 100 μ g de ADN genómico de judía con distintas concentraciones de la enzima. Se consideró ideal utilizar 0,4 U de *Sau3AI* (12000 U/ml) para digerir 25 μ g de ADN. La reacción se incubó durante 1 h a 37 °C. Transcurrido este tiempo, el producto de la digestión se fraccionó en un gel de agarosa al 0,8 % en tampón TAE, se seleccionó la banda que correspondía a un tamaño aproximado de 14 kb, y se procedió a su purificación mediante matriz de adhesión (ver apartado 7.2). Seguidamente se extrajo con fenol:cloroformo:isoamilo (25:24:1), y se precipitaron los ácidos nucleicos con etanol.

5.2. REACCIÓN DE RELLENO PARCIAL DE LOS EXTREMOS COHESIVOS

En un tubo de 1,5 ml se mezclaron 50 μ g de fragmentos de ADN de aproximadamente 14 kb, 30 μ l de tampón de relleno (10x), 5 μ l de dGTP (10 mM), 5 μ l de dATP (10 mM), 8 μ l de Klenow (10000 U/ml) y H₂O mili-Q hasta 300 μ l, y se incubó durante 15 min a temperatura ambiente (Fig. 10). Posteriormente, se añadieron 33 μ l de STE (10x) y 100 μ l de STE (1x), y se extrajo 2 veces con fenol:cloroformo:isoamilo (25:24:1). Seguidamente, se precipitaron los ácidos nucleicos con etanol y se concentraron por desecación. Finalmente, se redisolvió con 25 μ l de Tris-EDTA.

5.3. LIGACIÓN DE LOS BRAZOS DE λ FIX II A LOS FRAGMENTOS DE ADN

Se mezclaron 1 μ l de vector λ FIX II (1 μ g/ μ l), 1 μ l de fragmentos de ADN (0,6 μ g/ μ l), 0,5 μ l de tampón de ligación (10x) (Pharmacia), 0,5 μ l de ATP 10 mM (pH 7,5) y 0,3 μ l de ADN ligasa de T4 (6200 UW/ml) en un volumen final de 5 μ l. La reacción se incubó a 4 °C durante toda la noche.

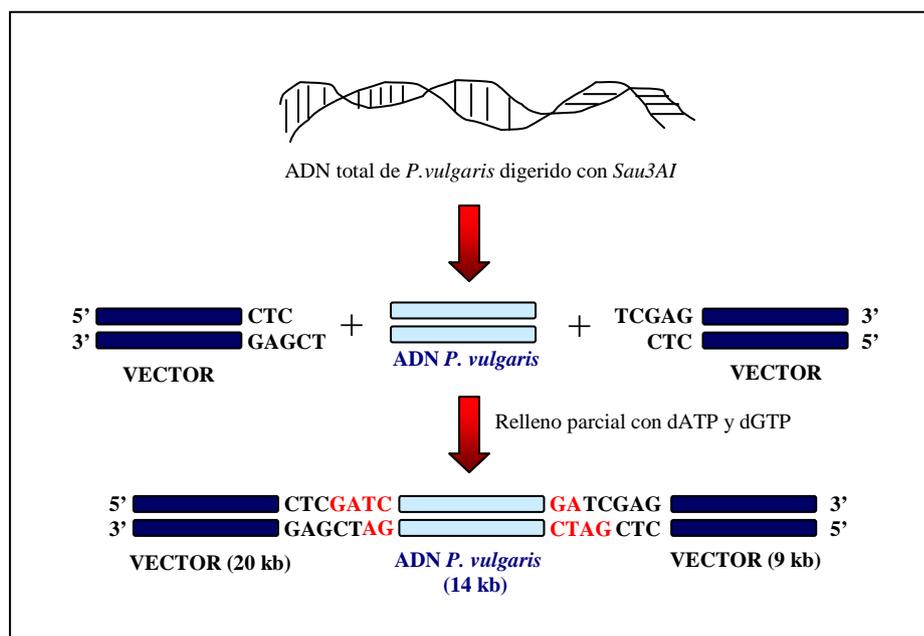


Figura 10. Construcción de una genoteca genómica de judía en el bacteriófago λ FIX II. Tras la digestión con *XhoI*, el relleno parcial con dTTP y dCTP hace que los extremos del vector sean ahora compatibles con extremos de ADN genómico de judía digeridos con la enzima *Sau3AI* y rellenos con dGTP y dATP.

5.4. EMPAQUETAMIENTO DEL ADN

El ADN se empaquetó utilizando el kit *Gigapack[®] II XL Packaging Extract* (Stratagene) siguiendo las recomendaciones de la casa comercial, y se almacenó resuspendido en tampón SM a 4 °C hasta su utilización.

5.5. PREPARACIÓN DE LAS CÉLULAS HOSPEDADORAS

A partir de las células almacenadas en glicerol se hizo un cultivo en placa en medio LB y se incubó durante toda la noche a 37 °C. Con una de las colonias, se inocularon 10 ml de medio LB suplementado con maltosa al 0,2% (p:v) y $MgSO_4$ 10 mM. Este cultivo se incubó a 37 °C, en agitación durante 4-6 h, cuidando que la A_{600} no superase el valor de

1. Posteriormente, se concentraron las células por centrifugación a 600 g durante 10 min. La pella se resuspendió en el volumen necesario de MgSO₄ 10 mM estéril para que la A₆₀₀ fuese 0,5.

5.6. INFECCIÓN

Se preparó una dilución 1:10 de ADN empaquetado, en tampón SM. Seguidamente, se mezcló 1 µl de esta solución con 200 µl de células hospedadoras (resuspendidas en MgSO₄ 10 mM y con una A₆₀₀=0,5) y se incubó a 37 °C durante 15 min para favorecer la adhesión del bacteriófago a la bacteria. Tras este periodo de incubación, se añadieron 8 ml de TB agarosa de cobertera, que se mantenía en un baño a 48 °C, y se vertió sobre placas de medio NZY, procurando que quedase distribuido homogéneamente por toda la superficie. Tras incubarlas durante toda la noche a 37 °C, se obtuvo un título de 2·10⁸ pfu/ml.

5.7. ESCRUTINIO DE LA GENOTECA

Siguiendo el método descrito en el apartado anterior, se cultivaron 10 placas de NZY (50000 pfu/placa). Transcurrido el tiempo de incubación, se realizó la transferencia de los fagos a membranas de nailon HybondTM-N (Amersham). De cada placa se hicieron dos réplicas, dejándolas hibridar 2 y 3 min, respectivamente. Posteriormente, se trataron las membranas con las siguientes soluciones:

- Solución desnaturalizante.** Se sumergieron durante 2 min en una solución de NaCl 1,5 M y NaOH 0,5 M.
- Solución neutralizante.** Las membranas se mantuvieron durante 3 min en una solución de NaCl 1,5 M y Tris-HCl 0,5 M (pH 8,0).
- Solución de equilibrado.** Las membranas se equilibraron por inmersión durante 3 min en una solución de Tris-HCl 0,2 M (pH 7,5) y SSC (2x).

Después de este tratamiento, el ADN se fijó a las membranas en un StratalinkerTM 2400 (Stratagene) como se describe en el apartado 18.3. La prehibridación e hibridación se realizaron en las mismas condiciones que se describen en el apartado 19.1. Como sonda se utilizó un fragmento de 388 pb de ADNc correspondiente al gen *PVAS2*. Los escrutinios secundario y terciario se realizaron de la misma manera.

6. AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE ADN PLASMÍDICO Y DEL BACTERIÓFAGO λ FIX II

6.1. AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE ADN PLASMÍDICO

Para el aislamiento y purificación rutinaria de ADN plasmídico se inocularon 3 ml de medio LB suplementado con ampicilina (50 μ g/ml) con la colonia bacteriana, y se incubaron durante toda la noche como se describe en el apartado 3.1. En un tubo de 1,5 ml se centrifugaron a 6000 g durante un min, y se secó la pella. Las células se resuspendieron en 200 μ l de Solución I, y se agitó vigorosamente hasta la completa disolución de la pella. Tras incubarlo a temperatura ambiente durante 5 min, se añadieron 200 μ l de Solución II, se mezcló suavemente por inversión, y se volvió a incubar 5 min a temperatura ambiente para provocar la ruptura de las células. Se añadieron 200 μ l de Solución III, se mezcló suavemente y se mantuvo en hielo durante 5 min. Seguidamente se centrifugó a 6000 g durante 5 min, se decantó el sobrenadante en un tubo limpio, se añadieron 420 μ l de isopropanol para precipitar los ácidos nucleicos y se agitó vigorosamente. Se incubó 5 min a temperatura ambiente, se centrifugó durante 10 min a 6000 g, y se eliminó el sobrenadante.

Cuando la pella estuvo totalmente seca, se resuspendió en 200 μ l de tampón TE. Para eliminar la contaminación proteica, se añadieron 200 μ l de fenol, se agitó vigorosamente, y se centrifugó durante 5 min a 6000 g para separar las dos fases. La fase acuosa se transfirió a un nuevo vial, y se eliminaron los restos de fenol por adición de 200 μ l de cloroformo, agitación vigorosa durante 1 min y centrifugado a 6000 g durante 5 min. La fase acuosa se recogió y se añadieron 20 μ l de NaAcO 3 M y 500 μ l de etanol al 95% para precipitar el ADN. Se mezcló y se mantuvo a -20 °C durante 2 h. Se centrifugó a 4 °C durante 15 min y se secó totalmente la pella para redisolverla finalmente en 20 μ l de tampón TE y almacenarla a 4 °C.

Para el aislamiento y purificación de ADN plasmídico de gran pureza se utilizó el kit comercial *Qiagen plasmid mini kit* (Quiagen).

6.2. AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE ADN DEL BACTERIÓFAGO λ FIX II

Se preparó un cultivo de 10 ml en medio LB, suplementado con MgSO_4 10 mM y maltosa al 0,2%, de la estirpe XLI-Blue MRA (P2) a 28-30 °C durante toda la noche. Se tomaron 2 ml de este cultivo y se infectaron con 50 μl de una suspensión de fagos (con un título de 10^8 pfu/ml) durante 20 min a temperatura ambiente. Se mezcló con un cultivo de 200 ml de LB suplementado con MgSO_4 10 mM y maltosa al 0,2%, y se incubó en agitación durante toda la noche a 37 °C. Seguidamente, se provocó la lisis bacteriana añadiendo cloroformo a una concentración final del 2%, y se incubó en agitación a 37 °C durante 30 min. Los restos bacterianos se precipitaron por centrifugación a 5500 g durante 20 min. El sobrenadante, que contenía los fagos, se trató con ADNasa a una concentración final de 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y se incubó a 37 °C durante 30 min. Posteriormente, se añadió NaCl hasta alcanzar una concentración 1 M, se incubó a 4 °C durante 1 h, y se centrifugó a 5500 g durante 20 min. Se recogió el sobrenadante, se precipitaron los fagos con una concentración final del 10% de PEG-6000 y NH_4AcO 0,3 M, se incubó durante 2 h a 0 °C, y se centrifugó a 5500 g durante 20 min. La pella de fagos se resuspendió con 5 ml de tampón SM, se añadieron 3,85 g de CsCl, y se trasvasó a tubos *quick seal* de 5 ml. Se centrifugó en una ultracentrífuga *Beckman XL-90* a 95000 g durante 24 h a 4 °C, utilizando el rotor SW 50.1. Seguidamente, se recogió la banda de fagos con una jeringa.

Para lisar los fagos, se añadió EDTA 25 mM y se incubó a 55 °C durante 15 min. Posteriormente, se añadió un volumen igual de fenol:cloroformo:isoamilo (25:24:1), se agitó suavemente y se centrifugó a 1000 g durante 5 min. Seguidamente, se añadió un volumen igual de cloroformo, se mezcló suavemente, se volvió a centrifugar a 1000 g, y se recogió el sobrenadante.

Los ácidos nucleicos se precipitaron por adición de 2,5 volúmenes de etanol al 100%, se incubaron en hielo durante 30 min y se centrifugaron a 7500 g durante 20 min. Finalmente, se resuspendieron en 500 μl de tampón TE.

7. PURIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE ADN

7.1. PURIFICACIÓN POR ELECTROELUCIÓN

Se preparó un gel de agarosa al 1,2% en el tampón TAE y se realizó una electroforesis de la muestra añadiendo solución de carga de ADN. Se visualizó la banda de interés con un transiluminador de luz UV de λ larga, para evitar provocar mutaciones y, con ayuda de un bisturí estéril, se extrajo el fragmento del gel que contenía la banda. Se introdujo en una bolsa de diálisis, previamente lavada con agua destilada, se añadió 1 ml de tampón TAE o TE, y se selló por ambos extremos con dos pinzas situando el fragmento en uno de los extremos de la bolsa. Se colocó en un tanque de electroforesis con tampón TAE o TBE (dependiendo de si se añadió TAE o TE), de forma que el ADN pudo migrar hacia el polo positivo saliendo del bloque de agarosa. Posteriormente se sometió a un pulso inverso de 30 s para evitar que el ADN quedase adherido a la bolsa de diálisis, se recogió el tampón del interior, y se precipitó por el método convencional (ver apartado 9.1).

7.2. PURIFICACIÓN MEDIANTE MATRIZ DE ADHESIÓN

Se preparó un gel de agarosa al 1,2% en tampón TAE y, tras añadir solución de carga, se procedió a la electroforesis de los productos. Se seleccionó el fragmento de interés visualizando el gel con un transiluminador de luz UV de λ larga, y se extrajo del gel con ayuda de un bisturí estéril. Se pesó el fragmento de agarosa, se añadieron 3 volúmenes de NaI 6 M con relación al peso de la agarosa y se incubó a 55 °C durante al menos 5 min hasta conseguir la fusión de la agarosa. Posteriormente, se añadieron 5 μ l de matriz de adhesión Geno-Bind (Clontech). Se incubó 15 min en hielo agitando cada minuto por inversión. Se centrifugó a máxima velocidad durante 1 min, y se lavó el precipitado 3 veces con 500 μ l de solución de lavado previamente enfriada. Se eliminó el sobrenadante cada vez, siendo especialmente cuidadoso en el último lavado, para evitar dejar restos del etanol presente en el tampón de lavado.

Finalmente, se procedió a la separación del ADN de la matriz de adhesión (Geno-Bind) por resuspensión con 5 μ l de agua mili-Q e incubación a 55 °C durante 10 min. Se centrifugó durante 1 min, y se recogió el sobrenadante, que contenía el ADN.

8. TRATAMIENTOS CON FENOL:CLOROFORMO: ISOAMÍLICO

Este tratamiento permitió desnaturalizar y eliminar proteínas de las soluciones de ácidos nucleicos. A la solución de ácidos nucleicos se añadió un volumen de la fase fenólica (inferior) de una mezcla de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1, v:v:v). Se mezcló vigorosamente durante 10 s al menos, y se centrifugó a 6000 g durante 10 min. Posteriormente, se recuperó la fase acuosa (superior), y se eliminaron los restos de fenol por adición de un volumen de cloroformo:isoamílico (25:1, v:v), agitación vigorosa y centrifugación a 6000 g durante 10 min. Finalmente, se recogió la fase acuosa y se precipitaron los ácidos nucleicos como se indica en el apartado 9.1.

9. CONCENTRACIÓN DE LAS MUESTRAS DE ÁCIDOS NUCLEICOS

9.1. CONCENTRACIÓN POR PRECIPITACIÓN

Los ácidos nucleicos se precipitaron por adición de 0,1 volúmenes de NaAcO 3M (pH 4,8) y 2,5 volúmenes de etanol absoluto. La mezcla se agitó, se mantuvo a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante al menos 2 h, y se precipitó mediante centrifugación a 6000 g a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Las sales se eliminaron lavando el precipitado con etanol al 70% (v:v). Posteriormente, se centrifugó durante 15 min a máxima velocidad en una centrífuga de mesa a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Tras la eliminación del sobrenadante, los ácidos nucleicos se redisolviéron en el volumen deseado de H_2O estéril o tampón TE.

9.2. CONCENTRACIÓN POR DESECACIÓN

Cuando las muestras fueron de pequeño volumen, se concentraron mediante un sistema de desecación al vacío *SpeedVac SVC1000* (Savant).

10. CUANTIFICACIÓN Y MEDIDA DE LA PUREZA DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Las concentraciones de ácidos nucleicos se determinaron utilizando diferentes métodos. Las muestras de ADN se cuantificaron de manera aproximada en geles de agarosa, por comparación con un patrón de ADN de concentración conocida. Otras veces (siempre en el caso de ARN) se cuantificaron espectrofotométricamente.

La pureza de las muestras de ácidos nucleicos se determinó calculando las relaciones entre las absorbancias a 260 nm, 280 nm y 230 nm. La relación entre las

absorbancias a 260 nm y 280 nm muestra la contaminación proteica. Este valor debe estar comprendido entre 1,7 y 1,9 en las muestras de ADN, y entre 1,9 y 2,0 en el caso de ARN. La relación entre las absorbancias a 260 nm y 230 nm indica la contaminación por polifenoles, de modo que un valor superior a 2 indica ausencia significativa de polifenoles en la muestra.

11. DIGESTIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS CON ENDONUCLEASAS DE RESTRICCIÓN

Para las digestiones de ADN con endonucleasas de restricción se siguieron las recomendaciones de las casas comerciales. Por lo general, se utilizaron de 1 a 4 unidades de enzima (U) por μg de ADN, con un tiempo de incubación de 2 h a la temperatura adecuada.

12. LIGACIÓN DE FRAGMENTOS DE ADN A VECTORES PLASMÍDICOS

Se utilizó una relación molar 3:1 del fragmento a ligar respecto del vector. La ligación se llevó a cabo en un volumen variable de entre 5 y 20 μl , dependiendo del experimento, y manteniendo siempre una concentración de ADN en la mezcla de ligación de alrededor de 10 a 20 $\text{ng}/\mu\text{l}$. Para calcular el número de microgramos de fragmento y vector en una relación molar 3:1 se utilizó la siguiente fórmula:

$$\boxed{x = 3 \cdot (a \cdot b) / c}, \text{ donde}$$

x = microgramos del fragmento a ligar

a = tamaño del fragmento a ligar en pb

b = microgramos de vector

c = tamaño del vector en pb

Un ejemplo de ligación en el que un fragmento de ADN de 2 kb se liga a un vector tipo Bluescript sería como sigue:

En un tubo de 1,5 ml mezclar:

Fragmento 2000 pb (20 $\text{ng}/\mu\text{l}$)	3 μl
Vector 3000 pb (20 $\text{ng}/\mu\text{l}$)	1,5 μl
Tampón de ligación (10x)	1 μl
Ligasa T4 (2000 U/ml)	1 μl
H ₂ O mili-Q	Hasta 10 μl

La reacción se incubó a 14 °C durante toda la noche.

13. OBTENCIÓN DE SONDAS RADIOACTIVAS DE SIMPLE CADENA

Se utilizó el kit comercial *Oligolabelling* (Pharmacia), que se basa en el uso de hexanucleótidos aleatorios como cebadores para la reacción de polimerización llevada a cabo por el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I. El ADN a marcar se diluyó en tampón TE hasta alcanzar una concentración de 25-50 ng en un volumen no superior a 34 μ l. Se desnaturalizó por calentamiento a 95-100 °C durante 2-3 min, y se enfrió inmediatamente después en hielo durante 2 min. A continuación, se le añadió la mezcla de reacción (*Reagent Mix*) que contenía los dNTPs (excepto dCTP), los hexanucleótidos aleatorios y el tampón adecuado para la reacción. Posteriormente, se añadieron el nucleótido marcado radioactivamente (α -³²P)dCTP y el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I (9,1 U/ μ l), y finalmente se incubó la reacción a 37 °C durante 30-60 min.

Para purificar los fragmentos marcados radioactivamente, se utilizaron *Nick-Columns*. Se equilibraron con 2 volúmenes de agua destilada, y se añadieron los 50 μ l de la sonda marcada más 400 μ l de agua. Tras descartar este volumen, la elución de la sonda se realizó con otros 450 μ l de agua. La sonda así purificada se hirvió durante 10-15 min para separar las cadenas. Inmediatamente después se enfrió en hielo durante 5 min para evitar que renaturalizasen las cadenas.

14. AISLAMIENTO DE ÁCIDOS NUCLEICOS A PARTIR DE TEJIDOS VEGETALES

14.1. EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO DE *P. vulgaris*

Se pesaron 3 g de tejido y se trituraron utilizando un mortero de porcelana con 6 ml de tampón proteinasa K. El tejido se pasó a un tubo Corex de 15 ml, se incubó a 45-50 °C durante 1 h, y se centrifugó a 1000 g durante 10 min. Se recogió el sobrenadante y se ajustó el volumen hasta 3 ml con tampón proteinasa K. Seguidamente, los ácidos nucleicos se precipitaron por adición de 2 volúmenes de etanol (6 ml), y centrifugación a 11000 g a 4 °C. El precipitado de ácidos nucleicos se redisolvió en 3 ml de tampón TE y se repitió el paso de precipitación. Tras eliminar el sobrenadante, se dejó secar la pella al aire y se redisolvió en 4 ml de tampón TE. Posteriormente, se añadieron 4,5 g de CsCl y 400 μ l de bromuro de etidio (EtBr) (10 mg/ml), se trasvasó a tubos *quick seal* de 5 ml, y se centrifugó en una ultracentrífuga *Beckman XL-90* a 200000 g durante 16-20 h a 20-22 °C utilizando el rotor NVT 90.

Seguidamente, se procedió a la extracción de la banda de ADN mediante punción utilizando una aguja de 18 G y trasvase a un tubo Corex cónico de 15 ml.

El BrEt se extrajo añadiendo un volumen igual de isopropanol saturado con NaCl. Este proceso se repitió de 3 a 4 veces hasta asegurarse de que todo el BrEt se había eliminado.

Para precipitar el ADN, se añadieron 2 volúmenes de tampón TE más 2 volúmenes de etanol, y se incubó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante toda la noche. (Si la sal de cesio precipitó, se añadió más tampón TE). Se concentró por centrifugación a 10100 g y se redisolvió con 100 μl de tampón TE. Posteriormente, se transfirió a un tubo de 1,5 ml, se añadieron 0,1 volúmenes de NaAcO 3 M más 2 volúmenes de etanol, y se dejó precipitar a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 1 h. Se centrifugó ligeramente a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, y se lavó la pella de ADN con 1 ml de etanol al 70%. Se centrifugó a 6000 g durante 5 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, se eliminó el etanol, y se secó la pella de ADN mediante un sistema de desecación al vacío *SpeedVac SVC1000* (Savant). La pella se redisolvió en un volumen apropiado de tampón TE, y se cuantificó espectrofotométricamente.

14.2. AISLAMIENTO DE ARN DE TEJIDOS DE *P. vulgaris*

Para evitar posibles contaminaciones con ribonucleasas, todo el material se esterilizó en autoclave previamente. El agua destilada contenía DEPC en una proporción del 0,01% (p:v). Para la extracción de ARN se utilizó TRI REAGENT[®]-RNA/DNA/PROTEIN ISOLATION REAGENT (Molecular Research Center, Inc), y se procedió como sigue:

Se pesaron 200 mg de tejido y se trituró utilizando un mortero de porcelana, hasta conseguir un polvo fino, evitando que se descongelase mediante la adición continua de nitrógeno líquido. Posteriormente, se homogeneizó mediante la adición de 1 ml de *TRI Reagent* y se incubó durante 5 min a temperatura ambiente para permitir la completa disociación de los complejos nucleoproteicos. Se añadieron 200 μl de cloroformo, se agitó vigorosamente, y se incubó a temperatura ambiente durante 2-15 min. Transcurrido este tiempo, se centrifugó a 6000 g durante 15 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. La fase acuosa, que contenía el ARN, se precipitó por adición de 500 μl de isopropanol e incubación a temperatura ambiente durante 5-10 min. Se centrifugó a 6000 g durante 8 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. El concentrado de ARN se lavó con etanol al 75% para eliminar las sales, se dejó secar a temperatura ambiente, y se redisolvió en un volumen apropiado de agua tratada con

DEPC. Una vez redissuelto, el ARN se cuantificó mediante espectrofotometría y se comprobó la integridad de la muestra (apartado 10).

15. FRACCIONAMIENTO DE ÁCIDOS NUCLEICOS MEDIANTE ELECTROFORESIS

15.1. FRACCIONAMIENTO DE ADN

El ADN se fraccionó mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa de concentración adecuada. Las muestras se aplicaron tras mezclarlas con 0,1 volúmenes de tampón de carga (10x). El tampón de electroforesis fue TAE (1x) o TBE (1x). Los geles utilizados contenían EtBr a una concentración de 0,5 µg/ml. Como marcadores de peso molecular se utilizó ADN de bacteriófago λ digerido con *HindIII*.

15.2. FRACCIONAMIENTO DE ARN

Tras la extracción de ARN, se comprobó la integridad de las muestras mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,2% en tampón TBE (1x) y teñido con BrEt (0,5 µg/ml) utilizando el mismo tampón como electrolito. El gel se visualizó con un transiluminador de luz UV.

Una vez comprobada la integridad de las muestras, se procedió al fraccionamiento del ARN en geles de agarosa al 1%, utilizando tampón MOPS (1x). Para su preparación se fundió la cantidad de agarosa necesaria en 283 ml de agua mili-Q tratada con DEPC. Una vez fundida, se incubó dicha solución junto con el MOPS (10x) en un baño a 60 °C. Cuando ambas soluciones alcanzaron la misma temperatura, se añadió MOPS a una concentración final 1x mientras se agitaba suavemente hasta que se mezclaron. Posteriormente se adicionó formaldehído hasta alcanzar una concentración final del 1%, se dejó enfriar un poco, se añadió EtBr (5 µg/ml) y, tras una suave agitación, se vertió en la cubeta de electroforesis, donde se dejó gelificar por espacio de 1 h.

Las muestras de ARN necesitaron un tratamiento de desnaturalización antes de fraccionarlas. A una cantidad determinada de ARN (15 µg) se añadieron 25 µl de formamida desionizada, 5 µl de tampón MOPS (10x) y 9 µl de formaldehído. Las mezclas se incubaron a 65 °C durante 15 min y se enfriaron inmediatamente en hielo. Finalmente, se añadió un volumen adecuado de tampón de carga (5x), y se procedió a la electroforesis utilizando como electrolito el tampón MOPS (1x).

16. SÍNTESIS DE ADNc

Para la síntesis de ADNc se utilizó el kit comercial *Marathon™ cDNA Amplification* (Clontech), y se procedió como se indica en los apartados siguientes.

16.1. SÍNTESIS DE LA PRIMERA CADENA (5'-3')

En un tubo de 0,5 ml se mezclaron 4 µg de ARN total de raíces, 1 µl de cebador de síntesis de ADNc (10 µM) y agua estéril hasta un volumen final de 5 µl. Se incubó la mezcla a 70 °C durante 2 min, se enfrió en hielo durante el mismo tiempo, y se centrifugó brevemente. Seguidamente, se añadieron 2 µl de tampón de síntesis de primera cadena (5x), 2 µl de dNTP (10 mM), 0,5 µl de (α -³²)dCTP (1 µC/µl) y 1 µl de transcriptasa inversa de AMV (20 U/µl). Se mezcló y se incubó a 42 °C durante 1 h. Transcurrido este tiempo, se colocó en hielo para interrumpir la reacción de síntesis de la primera cadena.

16.2. SÍNTESIS DE LA SEGUNDA CADENA (3'-5')

Todos los tubos que se utilizaron en este proceso se enfriaron previamente en hielo. A los 10,5 µl de reacción de primera cadena se añadieron 48 µl de agua estéril, 16 µl de tampón de síntesis de la segunda cadena (5x), 1,6 µl de mezcla de dNTP (10 mM) y 4 µl de cóctel de enzimas (20x). La mezcla se incubó a 16 °C durante 1,5 h. Seguidamente, se añadieron 2 µl de ADN polimerasa de T4 (5 U/µl), se volvió a incubar a 16 °C durante 45 min, y se detuvo la reacción de síntesis por adición de 4 µl de EDTA-glucógeno. Posteriormente, se añadieron 100 µl de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1,v:v:v) y, tras agitar vigorosamente, se centrifugó a 6000 g durante 10 min. Se transfirió la fase acuosa a un tubo limpio, y se eliminaron los restos de fenol por adición de 100 µl de cloroformo isoamílico (25:1,v:v), agitación vigorosa y centrifugación a 6000 g durante 10 min. Seguidamente se trasvasó la fase acuosa a un nuevo tubo.

Para precipitar los ácidos nucleicos se añadieron ½ volumen de NH₄AcO 4 M y 2,5 volúmenes de etanol al 95 %, se agitó vigorosamente y se centrifugó a 6000 g durante 20 min. Se eliminó el sobrenadante. Para eliminar las sales, se cubrió la pella con 300 µl de etanol al 80% y se centrifugó a 6000 g durante 10 min. Posteriormente se eliminó el sobrenadante y se dejó secar la pella al aire durante 10 min. Finalmente, el precipitado se disolvió en 10 µl de agua mili-Q y se almacenó a -20 °C.

16.3. LIGACIÓN DE ADAPTADORES AL ADNc

En un tubo de 0,5 ml se mezclaron 5 μ l de ADNc, 2 μ l de adaptadores (kit comercial Marathon), 2 μ l de tampón de ligación de ADN (5x) y 1 μ l de ADN ligasa T4 (1u/ μ l). Se agitó vigorosamente, se centrifugó brevemente, y se incubó a 16 °C toda la noche. Para detener la reacción, se calentó a 70 °C durante 5 min. Se diluyó hasta una concentración aproximada de 5 μ g/ml añadiendo 90 μ l de tampón Tricina-EDTA, y se almacenó a -20°C hasta su utilización.

16.4. RACE-PCR

Mediante esta técnica se consiguieron amplificar los fragmentos 5' y 3' del ADNc del gen *PVAS1*. Se prepararon las siguientes reacciones de PCR:

	5' RACE	3' RACE	CONTROL 3'
ADNc (diluciones 1/50 y 1/250)	5 μ l	5 μ l	5 μ l
Oligonucleótido AP1	1 μ l	1 μ l	1 μ l
Oligonucleótido PVAS1-1	-	0,5 μ l	-
Oligonucleótido PVAS1-2	0,5 μ l	-	-
Mezcla maestra	42,8 μ l	42,8 μ l	42,8 μ l
H ₂ O mili-Q	-	-	0,5 μ l
Eco Taq polimerasa (5 U/ μ l)	0,5 μ l	0,5 μ l	0,5 μ l

De igual forma, se amplificaron por PCR los fragmentos 5' y 3' del ADNc del gen *PVAS2*. Se prepararon las siguientes reacciones de PCR:

	5' RACE	3' RACE	CONTROL 3'
ADNc (diluciones 1/50 y 1/250)	5 μ l	5 μ l	5 μ l
Oligonucleótido AP1	1 μ l	1 μ l	1 μ l
Oligonucleótido ASN10	-	0,5 μ l	-
Oligonucleótido ASN11	0,5 μ l	-	-
Mezcla maestra	42,8 μ l	42,8 μ l	42,8 μ l
H ₂ O mili-Q	-	-	0,5 μ l
Eco Taq polimerasa (5 U/ μ l)	0,5 μ l	0,5 μ l	0,5 μ l

Cada mezcla maestra contiene 5 μ l de tampón PCR (10x), 5 μ l de dNTP (5mM), 1,8 μ l de MgCl₂ (50mM) y 31 μ l de H₂O mili-Q.

Se utilizó el siguiente programa de PCR: Un paso inicial de desnaturalización de 30 s a 94 °C, seguido de 5 s a 94 °C y 3 min a 68 °C (30 ciclos).

Para comprobar que los fragmentos amplificados correspondían a asparragina sintetasa, se realizó una PCR utilizando los oligos específicos PVAS1-1 y PVAS1-2 para el gen *PVAS1* y los oligonucleótidos ASN10 y ASN11 para el gen *PVAS2*, con el siguiente programa: 94 °C / 1 min; 94 °C / 30 s, 65 °C / 1 min, 72 °C / 1 min (35 ciclos); 72 °C / 10 min.

17. RT-PCR SOBRE NÓDULOS EN DESARROLLO

Se utilizó el kit Ready•To•Go™ de Pharmacia•Biotech.

17.1. SÍNTESIS DE LA PRIMERA CADENA DE ADNc

Dado que se trata de un gen cuyo ARNm está poco representado en las distintas etapas de análisis, y que se partió de ARN total, usamos 2 µg del mismo. El protocolo dado incluía los siguientes pasos:

- Llevar la muestra de ARN a un volumen de 25-30 µl en un tubo de microcentrífuga libre de ARNasas, utilizando agua tratada con DEPC.
- Calentar a 65°C durante 10 minutos y colocar a continuación en hielo durante 5 minutos.
- Transferir la solución de ARN al tubo que contiene las esferas con los reactivos para llevar a cabo la reacción de síntesis de la primera cadena. Esto se realizó sin mezclar.
- Añadir el oligonucleótido elegido (en nuestro caso se emplearon 40 pmoles del oligonucleótido ASN10, específico del ADNc de *PVAS2*) y agua tratada con DEPC hasta un volumen final de 33 µl, y dejar a temperatura ambiente durante un minuto aproximadamente.
- Mezclar el contenido del tubo suavemente, aspirando y soltando con la pipeta, y dar al final un breve pulso en la centrífuga.
- Incubar a 37 °C durante 60 minutos.

17.2. CONDICIONES PARA LA AMPLIFICACIÓN POR PCR

La cantidad de ADNc total que se debe usar depende de la abundancia relativa del ADNc de interés en la mezcla final de reacción. Para ADNcs correspondientes a ARNs poco abundantes, es recomendable utilizar en la PCR todo el volumen de la reacción de síntesis de ADNc. Se siguió el protocolo dado por los fabricantes:

- Se llevaron los 33 μ l de la reacción de síntesis de ADNc a un volumen final de 100 μ l, añadiendo 40 pmoles del oligonucleótido ASN11 (cadena complementaria), 1 μ l de *Taq* ADN polimerasa, y completando con agua tratada con DEPC. Esto se realizó en un tubo de microcentrífuga de 0,5 ml y se añadió una gota de aceite mineral encima de la muestra para prevenir la evaporación.
- Se colocaron las muestras en un termociclador, empleando el siguiente programa de PCR:
 - Desnaturalización a 95 °C durante 1 minuto
 - Apareamiento a 55 °C durante 1 minuto
 - Extensión a 72 °C durante 1 minutoSe repitió un total de 45 ciclos.

18. TRANSFERENCIA Y FIJACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS A MEMBRANAS DE NAILON

18.1. TRANSFERENCIA DE ADN o *Southern blot*

Se utilizaron membranas de Nylon-N (NYTRAN[®] 0,45 μ m de Shleicher & Schuell). La transferencia se realizó por capilaridad, pasando los ácidos nucleicos desde el gel hasta la membrana. El gel se sometió a un tratamiento triple antes de transferir el ADN:

- 1.-Tratamiento depurinizante.** Con objeto de fraccionar el ADN y conseguir una transferencia más eficaz, se hicieron dos incubaciones de 15 min con HCl 0,25 N.
- 2.-Tratamiento desnaturizante.** El gel se lavó dos veces con una solución de NaCl 1,5 M y NaOH 0,5 M durante 15 min para provocar la desnaturización del ADN.
- 3.-Tratamiento neutralizante.** Consistió en un lavado de 15 min con una solución de NaAcO 3 M (pH 4,8).

Una vez realizado este tratamiento, el gel está preparado para la transferencia. Se preparó una cubeta con tampón de transferencia SSC (20x), sobre la cual se colocó un vidrio. Se realizó un puente con papel *Whatmann* 3MM empapado en tampón de transferencia, procurando que ambos extremos se mantuviesen sumergidos en el tampón. En el centro del papel *Whatmann* 3MM se colocó el gel con los pocillos hacia abajo y sobre él la membrana de nailon. En todo el proceso se evitó la aparición de burbujas entre las distintas interfases, ya que esto dificultaría el ascenso del ADN por capilaridad. Se cortaron dos trozos de papel *Whatmann* 3 MM, se empaparon en SSC (20x), y se colocaron sobre la membrana. Para evitar que el tampón difundiera y asegurar la transferencia a través del gel, se colocó plástico en la zona donde no había gel. Sobre todo el conjunto se colocó un bloque de toallas de papel absorbente, otro vidrio y un peso aproximado de 1 kg. La transferencia se dejó durante al menos 12 h.

18.2. TRANSFERENCIA DE ARN o *Northern blot*

Para transferir ARN no fue necesario hacer un tratamiento previo del gel. El tampón de transferencia fue SSC (10x), siguiendo el mismo procedimiento que se utilizó para transferir ADN.

18.3 FIJACIÓN DE LOS ÁCIDOS NUCLEICOS A LA MEMBRANA DE NAILON

Tras desmontar el sistema de transferencia, la membrana se lavó en SSC (2x) para eliminar el exceso de sales, y se colocó sobre un papel *Whatmann* 3MM con la superficie a la que estaban adheridos los ácidos nucleicos hacia arriba. La fijación de estos a la membrana se realizó por irradiación con 1200 kJ de radiación de luz UV de λ corta (260 nm) durante 50 s utilizando un *Stratalinker* (Stratagene). Seguidamente, se introdujo la membrana entre dos papeles *Whatmann* 3MM, y estos entre dos cristales sujetando todo el conjunto con pinzas. Se introdujo en un horno a 80 °C durante al menos 2 h.

19. HIBRIDACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS SOBRE MEMBRANAS DE NAILON

19.1. HIBRIDACIÓN DE ADN

Las membranas se prehibridaron al menos durante 2 h a 65 °C utilizando la solución de hibridación de Church. Transcurrido este tiempo, se añadió la sonda radioactiva, previamente desnaturalizada mediante hervor durante 5 min, y se dejó hibridando durante toda la noche.

Tanto el proceso de prehibridación como la hibridación se llevaron a cabo en tubos cilíndricos, en un horno de hibridación rotatorio, para asegurar la distribución homogénea de las soluciones por toda la membrana.

19.2. HIBRIDACIÓN DE ARN

Las membranas se prehibridaron durante al menos 2 h a 42 °C con una solución compuesta por formamida 50%, SSC (5x), sulfato de dextrano 5%, SDS 0,5% y ADN de timo de ternera 0,1 mg/ml. Tras este tiempo, se añadió la sonda previamente desnaturalizada mediante hervor durante 5 min, y se dejó hibridando durante toda la noche a 42 °C. Tanto la prehibridación como la hibridación se realizaron en un recipiente rectangular, cerrado herméticamente, utilizando un baño para mantener la temperatura constante.

19.3. LAVADOS DE LAS MEMBRANAS

Para controlar la especificidad de la unión de la sonda a los ácidos nucleicos fijados a la membrana, se realizaron dos lavados de 15 min cada uno con una solución compuesta por SSC (2x)/SDS 0,1%; y otros dos con otra solución de SSC (0,1x)/SDS 0,1%. Los lavados en baja estringencia se realizaron con estas soluciones a temperatura ambiente, mientras que los de alta estringencia se efectuaron a 65 °C.

19.4. DETECCIÓN DE LAS SEÑALES DE HIBRIDACIÓN

Una vez lavadas las membranas, se envolvieron en plástico. Para detectar la señal, se expusieron películas fotográficas *HyperfilmTM MP* (Amersham) a la radiación emitida por las membranas, y se introdujeron en casetes *Amersham*. Dichos casetes se almacenaron a -80 °C durante el tiempo suficiente para que las películas quedaran impresionadas.

Transcurrido este tiempo, las películas se revelaron por inmersión en líquido revelador (AGFA) durante 2 min, lavado con agua, inmersión en líquido fijador (AGFA) durante 2 min y un último lavado con agua. Para evitar que las películas fotográficas se velaran, todo el proceso se realizó en oscuridad o en presencia de luz roja.

19.5. ELIMINACIÓN DE LA Sonda HIBRIDADA

Para eliminar la sonda hibridada en las membranas de transferencia, éstas se introdujeron en un recipiente con una solución de SDS al 0,1% (p:v) hirviendo, y se dejaron enfriar en agitación hasta que alcanzaron la temperatura ambiente.

20. EXPRESIÓN, PURIFICACIÓN Y ROTURA DE LA PROTEÍNA DE FUSIÓN (GST-PVAS2)

20.1. CONSTRUCCIÓN DEL PLÁSMIDO DE EXPRESIÓN

Los fragmentos 5' y 3' (*EcoRI* / *SalI*) de ADNc del gen *PVAS2* obtenidos mediante la técnica 5' y 3' RACE se digirieron con la enzima *HpaII*, que corta los fragmentos de dicho gen en un sitio común. Estos fragmentos se ligaron por este sitio común, y la región correspondiente a la fase abierta de lectura se amplificó por PCR. Dos oligonucleótidos fueron diseñados para la clonación en fase con el carboxilo terminal del gen de la GST (glutación S-transferasa), que estaba incluido en el vector de expresión pGEXKG:

AS22-5 (5'-CCGGAATTCCGATGTGTGGTATTCTTG-3'), que contiene el sitio propuesto de unión a glutamina y una extensión en 5' que contiene un sitio *EcoRI* para la clonación direccional en pGEXKG.

AS2-3 (5'-CGCGTCGACGCGTTAGCTCTGGATGGCA-3'), correspondiente a la región 3' hasta el codón de terminación, y una extensión en 5' que contiene un sitio *SalI* para la clonación en el vector de expresión.

La reacción de amplificación del ADNc de *PVAS2* fusionado se llevó a cabo en un volumen final de 50 μ l, y contenía 1 μ l (1 ng) del ADNc fusionado, 1 μ l del oligonucleótido AS22-5 (10 pmoles), 1 μ l del oligonucleótido AS2-3 (10 pmoles), 20 mM de Tris-HCl (pH 8,4), 50 mM de KCl, 2,5 mM de MgCl₂, 10 mM de DTT, 200 μ M de cada uno de los desoxinucleótidos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), y 1,25 unidades de Taq polimerasa. El programa de PCR empleado fue de una primera desnaturalización a

94 °C durante 1 min, seguido de una segunda desnaturalización a la misma temperatura durante 30 s, una etapa de apareamiento a 55 °C durante 1 min y una extensión a 68 °C durante 5 min (35 ciclos). Se añadió una etapa de extensión final a 68 °C durante 5 min. El producto de 1755 pb se aisló en un gel de agarosa, se digirió con las enzimas de restricción *EcoRI* y *Sall*, y se clonó en los sitios *EcoRI* y *Sall* presentes en el vector de expresión. El nuevo plásmido se denominó pPVAS2G y se utilizó para transformar la estirpe BL21 de *E. coli*.

20.2. EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA DE FUSIÓN

La expresión de la proteína de fusión se llevó a cabo como describieron Smith y Johnson (1988). Veinte mililitros de un cultivo mantenido toda la noche a 37 °C se inoculó en un litro de 2xYT que contenía 50 µg/ml de ampicilina. El cultivo se incubó con fuerte agitación a 37 °C hasta que se alcanzó una $A_{600}=1$. Entonces se añadió IPTG para dar una concentración final de 0,2 mM, y se incubó el cultivo durante tres horas más. Las células se recogieron por centrifugación y se resuspendieron en diez mililitros de PBST, que contenía 2 mM de EDTA, 0,1% de β-mercaptoetanol y 0,2 mM de PMSF. Las células se lisaron pasándolas dos veces por una presión de 83 bares en la prensa de French. El lisado bacteriano se centrifugó a 12000 g durante 20 min a 4 °C, para eliminar la fracción insoluble. El extracto sobrenadante contenía la proteína de fusión (GST-PVAS2), que mostró un peso molecular de 91810 en SDS-PAGE (7,5%).

20.3. PURIFICACIÓN Y ROTURA DE LA PROTEÍNA DE FUSIÓN

Un mililitro de extracto bacteriano, preparado como se ha descrito, se mezcló con 2 ml de suspensión de glutatión-agarosa y se incubó durante 30 min a 4 °C con suave agitación. Las esferas de agarosa se lavaron cuatro veces con 10 ml de PBST cada vez, y a continuación se realizó la elución de la proteína de fusión por competición con glutatión, haciendo 2 lavados de 2 min cada uno con 1 ml de Tris-HCl 50 mM (pH 8,0) que contenía 10 mM de glutatión. El glutatión libre se eliminó por dialisis en una solución de Tris-HCl 50 mM (pH 8,0), NaCl 150 mM, y 0,1% de β-mercaptoetanol. Aproximadamente 2 mg de proteína de fusión se incubaron con 4 µg de trombina durante 20 min a temperatura ambiente en 2 ml de tampón de rotura (Tris-HCl 50 mM (pH 8,0), NaCl 150 mM, CaCl₂ 2,5 mM, 0,1% de β-mercaptoetanol). La glutatión S-

transferasa y el resto de la proteína de fusión no lisada se eliminaron por adición de glutatión-agarosa (50% v/v) a la reacción de rotura. Tras una incubación durante 30 min a 4 °C, se centrifugó durante 10 min a 5000 g, y se recogió el sobrenadante, que contenía la proteína pura. Una parte alícuota de este sobrenadante mostró en SDS-PAGE (10%) una proteína de 65810 Da, correspondiente a PVAS2.

21. COMPLEMENTACIÓN DE LA ESTIRPE ER # 4813 DE *E. coli*

21.1. CONSTRUCCIÓN DE LOS PLÁSMIDOS DE EXPRESIÓN DE PVAS1 Y PVAS2

Para la clonación del cDNA de *PVAS1* en el vector de expresión pUC18, se diseñaron los siguientes oligonucleótidos:

AS1-5 (5'-CCGGAATTCCGGATGTGTGGCATACTTG-3'), que contenía el sitio propuesto de unión a glutamina y una extensión en 5' que presenta un sitio *EcoRI*, para la clonación direccional en el vector pUC18.

AS1-3 (5'-CGCGTCGACGCGCTAGATGGCAACTCCTAAGG -3'), que se utilizó anteriormente en la clonación en pGEXKG, correspondiente a la región 3' hasta el codón de terminación, y contenía una extensión en 5' con un sitio *SalI*.

La PCR realizada con esta pareja de oligonucleótidos rindió un producto de 1764 pb, que fue aislado en un gel de agarosa, digerido con las enzimas de restricción *EcoRI* y *SalI*, y clonado direccionalmente en los sitios *EcoRI* y *SalI* del plásmido pUC18. Las condiciones de PCR fueron las mismas que las utilizadas anteriormente en la clonación del gen en pGEXKG (purificación de la proteína). El plásmido resultante se denominó pPVAS1U y se empleó en la transformación de la línea auxotrófica ER # 4813 (*asnA31 asnB thi-1 relA1 spoT1*).

Y para la clonación del gen *PVAS2* en el vector de expresión pUC18, se diseñaron los oligonucleótidos siguientes:

AS2-5 (5'-CCGGAATTCCGGATGTGTGGTATTCTTG-3'), que contenía el sitio propuesto de unión a glutamina y una extensión en 5' que presenta un sitio *EcoRI*, para la clonación direccional en el vector pUC18.

AS2-3 (5'-CGCGTCGACGCGTTAGCTCTGGATGGCA-3'), correspondiente a la región 3' hasta el codón de terminación, y contenía una extensión en 5' con un sitio *SalI*.

La PCR desarrollada con esta pareja de oligonucleótidos rindió un producto de 1756 pb, que fue aislado en un gel de agarosa, digerido con las enzimas de restricción *EcoRI* y *SalI*, y clonado direccionalmente en los sitios *EcoRI* y *SalI* del plásmido pUC18. Las condiciones de PCR fueron las mismas que las utilizadas para la clonación del gen *PVAS1*. El plásmido resultante se denominó pPVAS2U y se empleó en la transformación de la línea auxotrófica ER # 4813.

21.2. ESTUDIOS DE COMPLEMENTACIÓN

La estirpe de *E.coli* auxotrófica para la asparragina se transformó con los plásmidos pUC18 (como control), pPVAS1U y pPVAS2U, y se extendió sobre placas de LB con ampicilina (50 µg/ml). Se seleccionaron varios transformantes de las construcciones pPVAS1U y pPVAS2U, y se analizaron por digestión con enzimas de restricción y secuenciación parcial, con objeto de determinar si había ocurrido algún tipo de reordenamiento en las secuencias. Ya que el medio M9 descrito en los manuales de protocolos sobre medios de cultivo era muy rico en hidrolizado de aminoácidos de caseína, se crecieron cultivos durante toda la noche de las estirpes silvestre (DH5α), y del auxótrofo ER#4813 en medio M9 con diferentes diluciones de dicho hidrolizado, a 28 °C. La dilución 1/2000 se consideró idónea, ya que la estirpe silvestre creció bien, mientras que ER#4813 no creció apenas. Así pues, las estirpes transformadas con las diferentes construcciones se cultivaron en medio M9 durante toda la noche a 28 °C. Los distintos cultivos se centrifugaron a 4500 rpm durante 5 min, y la pella de células obtenida se resuspendió en medio M9 sin aminoácidos, con objeto de descartar nutrientes del medio que pudiesen interferir en los estudios de crecimiento. Tras centrifugar y resuspender de nuevo, se hicieron las diluciones apropiadas con objeto de partir de la misma densidad óptica, y se inocularon los siguientes medios M9 con ampicilina 50 µg/ml: (-) IPTG (-)100 µg/ml de asparragina, (+) IPTG (-) 100 µg/ml de asparragina, (-) IPTG (+)100 µg/ml de asparragina, (+) IPTG (+)100 µg/ml de asparragina, (para las células que contenían las construcciones pPVAS1U y pPVAS2U); y los medios (-) IPTG (-) 100 µg/ml de asparragina, (-) IPTG (+)100 µg/ml de asparragina, y (+) IPTG (+)100 µg/ml de asparragina, (para las células que contenían el vector pUC18). Se midió la densidad óptica a 550 nm a distintos tiempos.

22. OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS POLICLONALES CONTRA LA PROTEÍNA PVAS2

22.1.HOMOGENEIZACIÓN DEL ANTÍGENO CON ADYUVANTE DE FREUND

A la banda del gel de poliacrilamida perteneciente a la proteína PVAS2 se le añadió 1 ml de solución salina tamponada (PBS). La mezcla se trituró a alta velocidad en un homogeneizador Ultra-Turrax T25 (Ika-Labortechnik). Cuando la suspensión de acrilamida se hizo uniforme, se añadió 1 ml de adyuvante de Freund, completo o incompleto, dependiendo de la fase de inmunización. Posteriormente, se homogeneizó la mezcla en el mismo equipo y a la misma velocidad, hasta que la emulsión quedó densa y uniforme.

22.2. PROTOCOLO DE INMUNIZACIÓN

Para la primera inmunización, un homogeneizado preparado en adyuvante completo de Freund, que contenía aproximadamente unos 400 µg de asparragina sintetasa, se inyectó con una jeringa de 5 ml y una aguja de 0,9 x 25 mm, en cuatro dosis de 500 µl en ambos lados de la zona dorsal de la escápula y de las caderas. Las siguientes inmunizaciones, aproximadamente cada dos semanas, se realizaron con 200 µg de la proteína en adyuvante incompleto de Freund.

La inoculación se realizó por vía subcutánea, pinzando la piel del conejo e introduciendo la aguja aproximadamente 1 cm, para evitar la pérdida de emulsión. La aguja se retiró, una vez aplicada la dosis, sin soltar la piel. Antes de la primera inmunización, se tomó sangre del conejo para la obtención del suero preinmune.

22.3. EXTRACCIÓN DE LA SANGRE

Tanto para la obtención del suero no inmune (SNI) como del suero anti-asparragina sintetasa (anti-PVAS2), se extrajo la sangre de la arteria central de la oreja. Para ello se introdujo una aguja hipodérmica de 0,9 x 25 mm hacia la parte central de la misma.

22.4. OBTENCIÓN DEL SUERO anti-PVAS2

La sangre recogida se incubó durante una hora a 37 °C, con objeto de favorecer la formación de un coágulo que contuviera las células sanguíneas, así como para evitar las

posibles interferencias debidas al complemento. Posteriormente se centrifugó a 2500 g durante 30 min a 4 °C, y se recogió el suero, que fue repartido en fracciones y conservado a -20 °C.

22.5. TITULACIÓN DE LOS ANTICUERPOS

La titulación de los anticuerpos se realizó mediante la técnica de Western. Para ello, se cargaron 500 ng de la proteína pura en varios pocillos de un gel de poliacrilamida al 10% en SDS y se desarrolló la electroforesis durante 40 min a 200V. A continuación se montó el sistema de transferencia (ver apartado 23.3.), la cual se desarrolló durante 3 h a 70 voltios en la cámara fría (4°C). Tras finalizar, se lavó la membrana en TTBS varias veces y se incubó con agitación suave durante 1 h a temperatura ambiente en TTBS con 3% de Blotto. Se lavó de nuevo en TTBS y, tras recortar las diferentes calles de la membrana, se incubó con el anticuerpo primario durante toda la noche a 4 °C, empleando diluciones desde 1:100 a 1:5000 en TTBS al 0,3%. Tras la incubación, y para eliminar el anticuerpo primario inespecífico no unido, se lavó 3 veces en TTBS (5 min cada vez), y se hibridó con el anticuerpo secundario (anticuerpo de cabra contra IgG de conejo conjugado a peroxidasa) a un título 1:1000 durante 1 h en agitación suave a temperatura ambiente. Se lavó de nuevo para eliminar el anticuerpo secundario no unido. Para el revelado se prepararon las siguientes soluciones: solución A (300 mg de 4-cloro-1-naftol en 10 ml de metanol frío) y solución B (30 µl de H₂O₂ al 30% en 50 ml de TBS preparado inmediatamente antes de usar). Justo antes de sumergir la membrana en la mezcla de reacción se mezclaron las soluciones de revelado. La reacción se paró lavando con agua.

23. TÉCNICAS DE INMUNODETECCIÓN EN FILTROS (*Western blot*)

23.1. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA DE TEJIDOS DE *P. vulgaris*

Se trituraron en nitrógeno líquido 0,5 g de cada tejido, al que se añadieron 2 volúmenes (1 ml) de tampón de carga con SDS, y se incubó a 100 °C durante 10 min. Tras centrifugar en una microfuga durante 25 min a 4 °C, se recogió el sobrenadante y se procedió a la cuantificación.

23.2. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA

Para la cuantificación de proteína, se siguió el protocolo de Schaffner y Weissmann (1973). Se cogieron 5 y 10 μl de cada extracto de proteínas, que se llevaron a 270 μl con H_2O . Se añadió a cada vial 30 μl de una solución Tris-HCl 1 M (pH 7,5) que contenía un 10% de SDS, y se invirtió el vial varias veces. A continuación se añadieron 100 μl de una solución al 50% de ácido tricloroacético en H_2O , y se vorteo después. Tras colocar un filtro de 0,45 μm en el sistema de fijación de proteínas de Bio-Rad (Bio-DOT™ APPARATUS), cada muestra de proteína acidificada se introdujo con cuidado en un pocillo. Cuando la muestra pasó a través del filtro, se limpió cada pocillo con 300 μl de una solución al 6% de ácido tricloroacético en H_2O . Una vez fijadas las proteínas, se sumergió el filtro en una solución al 0,1% de Negro amido (disolver 25 mg de este producto en 25 ml de una solución de MeOH:HAc:H₂O (9:2:9)) durante 10 min. Tras enjuagar con H_2O , se sumergió el filtro tres veces (3 min cada vez), en una solución de destinción que contenía MeOH:HAc:H₂O (9:2:8), agitando suavemente. El filtro, tras secarse sobre papel *Whatmann*, se cortó en pequeños discos correspondientes a las diferentes muestras. Cada disco se introdujo en un eppendorf al que se había añadido previamente 1 ml de solución de elución (NaOH 25 mM, EDTA 0,05 mM y etanol al 50%), se dejó a temperatura ambiente durante 20 min, se vorteo y, para finalizar, se midió la absorbancia del eluato a 630 nm. Este ensayo no presenta interferencias y es altamente cuantitativo cuando se compara con el análisis aminoacídico.

23.3. ELECTROTRANSFERENCIA DE PROTEÍNAS

La electrotransferencia de proteínas desde geles de poliacrilamida a filtros de nailon (Schleicher & Schuell), se realizó utilizando el sistema de transferencia de Bio-Rad (Trans-Blot® Transfer Medium), en un tampón cuyo contenido era: Tris-glicina 25 mM (pH 8,3), 0,1% (p/v) de SDS y 20% (v/v) de metanol. El sistema de transferencia se montó colocando en contacto con el cátodo dos papeles secantes del mismo tamaño que el gel, saturados en el tampón de transferencia. Sobre estos se colocó el gel separador y encima de éste la membrana de nailon, hidratada en H_2O mili-Q y enjuagada en el tampón de transferencia. Finalmente, se pusieron otras 2 piezas de papel secante sobre la membrana, humedecidas en tampón de transferencia, y en contacto con el ánodo. Con objeto de eliminar posibles burbujas de aire, se pasó una pipeta a modo de rodillo sobre

cada una de las capas. La transferencia se llevó a cabo a 70 V durante 3 horas en la cámara fría (4 °C).

23.4. PROCEDIMIENTO PARA LA INMUNODETECCIÓN DE ASPARRAGINA SINTETASA

Se cargó cada pocillo de un gel de poliacrilamida al 10% en SDS con 100 µg de proteína procedente de los diferentes tejidos, y se desarrolló la electroforesis durante 3 h a 80 V (4 °C). A continuación se montó el sistema de transferencia (ver apartado 23.3), la cual se llevó a cabo durante toda la noche a 22 V en la cámara fría (4 °C). Tras finalizar, se lavó la membrana en TTBS varias veces, prehibridando en placa de Petri con agitación suave durante 1 h a temperatura ambiente en TTBS al 3% de Blotto. Se lavó de nuevo en TTBS y se incubó la membrana con el anticuerpo primario (anti-PVAS2) durante toda la noche a 4 °C, empleando una dilución 1:1000 del anticuerpo en TTBS al 0,3% de Blotto. Tras la incubación, y para eliminar el anticuerpo primario inespecífico no unido, se lavó 3 veces en TTBS (5 min cada vez), y se hibridó con el anticuerpo secundario (en algunos casos se empleó anti-IgG de conejo obtenido de cabra conjugado a peroxidasa; y en los casos en que se pretendía una mayor sensibilidad, se empleó anti-IgG de conejo obtenido de cabra conjugado a fosfatasa alcalina) a un título 1:1000 durante 1 h en agitación suave a temperatura ambiente. Se lavó de nuevo para eliminar el anticuerpo secundario no unido, y finalmente se procedió al revelado. Las soluciones de revelado contenían: 10 ml de metanol, al que se añadió 0,03 g de 4-cloro-1-naftol (se puso a -20 °C) y por otra parte 50 ml de TBS al que se añadió 30 µl de H₂O₂ al 30% (se añadió antes de usar). Justo antes de sumergir la membrana se mezclaron ambas soluciones de revelado. Con fosfatasa alcalina se utilizó como sustrato para el revelado el 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato. La reacción se paró lavando con agua.

24. ENSAYO DE ACTIVIDAD AS EN GELES DE POLIACRILAMIDA

Se obtuvieron extractos crudos de la estirpe de *E. coli* BL21 transformada con pGEXKG (control) y de la estirpe transformada con el plásmido que tiene clonado en fase un ADNc de una AS de tipo II con el extremo C terminal de Sj26, una glutatión S-transferasa de 26 kDa, después de 3 horas de inducción con IPTG (1 mM). Para ello, se

lisaron las células por paso a través de la prensa de French, centrifugando a continuación a 12000 g durante 20 min a 4 °C. Se mezclaron partes alícuotas de cada extracto con 1 volumen de tampón de carga sin SDS, y se cargaron por triplicado en un gel nativo de poliacrilamida. La electroforesis se desarrolló a 80 V durante aproximadamente 2 h. Finalizada la electroforesis, el gel se dividió en tres partes. Una parte se tiñó con azul de Coomassie durante 20 min, y se trató después con solución de destinción durante 1 h. Otra parte se incubó durante 1 h a 30 °C en una mezcla de reacción que contenía Tricina 50 mM (pH 7,75), MgCl₂ 10 mM, β-mercaptoetanol 50 mM, glutamina 10 mM, ATP 5 mM, L-aspartato 2,5 mM, y pirofosfatasa (2 U/ml mezcla de reacción). Y la tercera parte se incubó en la misma mezcla de reacción, pero sin ATP.

La determinación de fosfato inorgánico se llevó a cabo por el método del fosfomolibdato (Chen *et al.* en 1956). Está basado en la formación de un complejo verde azulado de Mo(V) por reacción del fosfato con molibdato amónico y la siguiente reducción de este complejo con ácido ascórbico. El reactivo se preparó mezclando en proporción 1:2:1:1 las siguientes soluciones: ácido sulfúrico 6 N, H₂O destilada, molibdato amónico tetrahidrato (NH₄)₆Mo₄O₂₄·4H₂O al 2,5% y ácido ascórbico al 10%. Este reactivo debe prepararse en el momento de su utilización.

III. RESULTADOS

1.- Estrategia de clonación de un fragmento de ADNc de una asparragina sintetasa de tipo II

El alineamiento de secuencias de AS de diversas plantas (maíz, espárrago, guisante, *Arabidopsis*, *Brassica*, etc), permitió reconocer una serie de dominios conservados. Sobre estos dominios, se diseñaron oligonucleótidos degenerados (ASP1, ASP2, ASP3 y ASP6) con un grado de degeneración minimizado teniendo en cuenta la frecuencia de uso de codones en judía (Fig. 11).

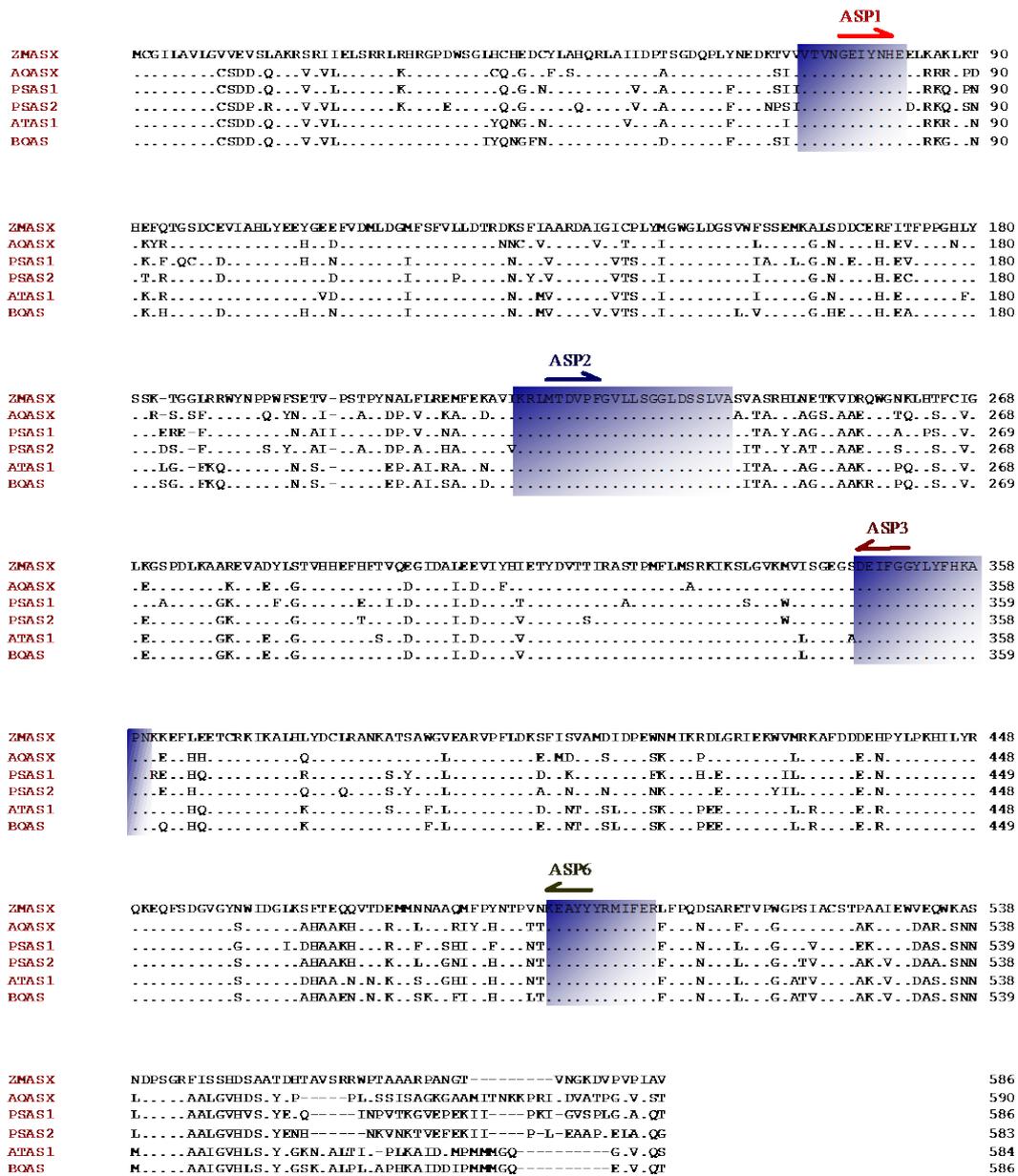


Figura 11. Oligonucleótidos degenerados diseñados a partir de dominios conservados de AS de diversas especies de plantas (ZM: *Zea mays*. AO: *Asparagus officinalis*. PS: *Pisum sativum*. AT: *Arabidopsis thaliana*. BO: *Brassica oleracea*).

La secuencia nucleotídica de los oligonucleótidos degenerados que se diseñaron se muestra a continuación:

ASP1 5'-GA(A,G)AT(C,T)TA(C,T)AA(C,T)CA(C,T)GA(AG)G-3'

ASP2 5'-ATGAC(A,C,T)GA(C,T)GT(G,C,T)CC(C,T)TT(C,T)GG-3'

ASP3 5'-TA(A,T)CC(A,T)CC(A,G)AA(A,G,T)AT(C,T)TC(A,G)TC-3'

ASP6 5'-TA(A,G)TA(A,G)TA(A,G,T)GC(C,T)TC(C,T)TT(C,T)G-3'

Posteriormente se comprobó la eficacia de las diferentes combinaciones de oligonucleótidos degenerados en la amplificación de fragmentos de un plásmido que contenía un ADNc de AS de ápices de espárrago (Fig. 12). Las condiciones óptimas de PCR fueron las siguientes: (94 °C/1min, 50 °C/1min, 72 °C/1min) x 40 ciclos, más una etapa de extensión final de 72 °C/5min.

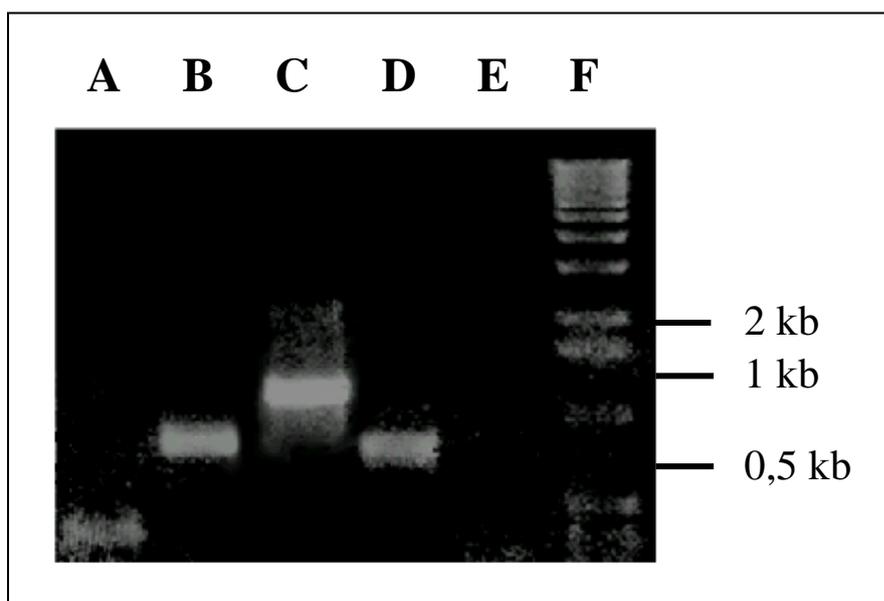


Figura 12. PCR sobre ADNc de ápices de espárrago. Para comprobar la eficacia de diferentes parejas de oligonucleótidos degenerados se llevó a cabo una PCR empleando los mismos sobre ADNc de la AS de ápices de espárrago. **A**, ASP2+ASP3. **B**, ASP1+ASP3. **C**, ASP1+ASP6. **D**, ASP2+ASP6. **E**, control negativo (sólo oligo AS1). **F**, marcadores de peso molecular (escala de 1 kb).

Una vez probada la eficacia de los oligonucleótidos degenerados, se aplicaron en las mismas condiciones de PCR sobre ADNc obtenido por retrotranscripción de ARN total proveniente de diversos tejidos de judía.

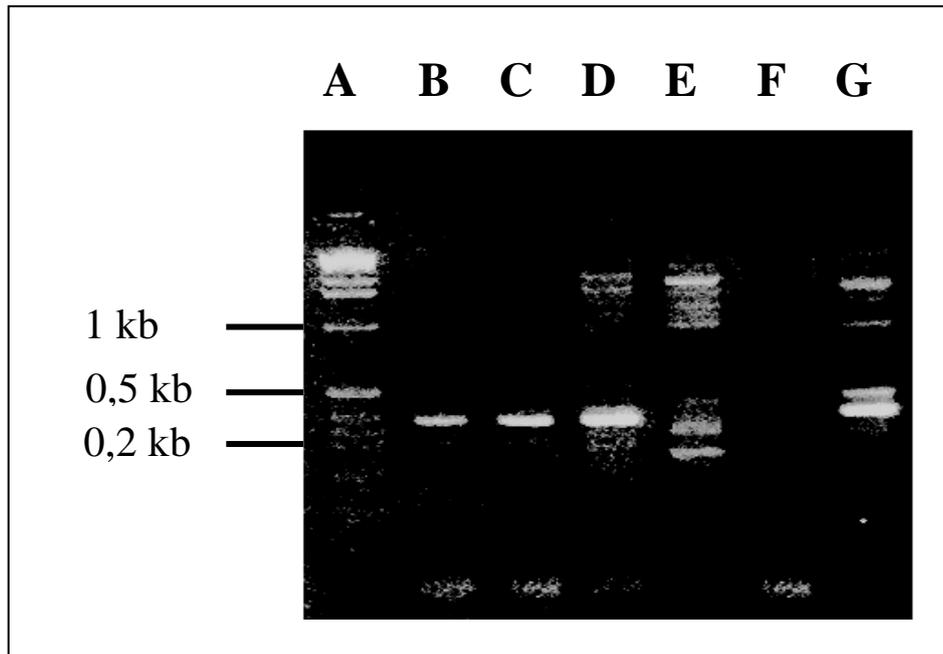


Figura 13. Productos de amplificación de ADNc de diferentes tejidos de *P. vulgaris*. Se obtuvo por retrotranscripción ADNc de hojas (B), raíces (C), cotiledones de semillas en germinación (D), y nódulos en condiciones de fijación (E), empleándose en la PCR la combinación de oligonucleótidos ASP2/ASP3. (A), escalera de 1 kb. (F), control negativo con un solo oligo (ASP2). (G), control positivo con ADNc de AS de espárrago.

Como se muestra en la Fig. 13, se obtuvieron productos de PCR únicos y del tamaño esperado a partir de ADNc de hojas y raíces, y múltiples productos en el caso de cotiledones y nódulos. El fragmento de 388 pb obtenido a partir de ADNc de raíces se clonó en KS+ y se secuenció completamente en ambos sentidos.

Para analizar la complejidad de la familia de genes AS, se llevó a cabo un análisis mediante *Southern blot*. Se digirió ADN genómico total con varias enzimas de restricción (*EcoRI*, *BamHI*, *HindIII* y *PstI*), se corrió un gel de agarosa al 0,8% y, una vez transferido a una membrana de nailon, ésta se hibridó con el fragmento de ADNc de 388 pb de *PVAS2* (nucleótidos 688-1075) marcado con ^{32}P (Fig. 14). Bajo condiciones de hibridación de alta estrictencia, y lavados a baja estrictencia, múltiples fragmentos de ADN genómico hibridaron con la sonda. Algunos de los fragmentos producidos por una enzima de restricción dada hibridaron más débilmente que otros, y prácticamente desaparecieron después de realizar lavados a alta estrictencia. Este patrón de hibridación es consistente con la existencia de al menos dos genes de AS en judía.

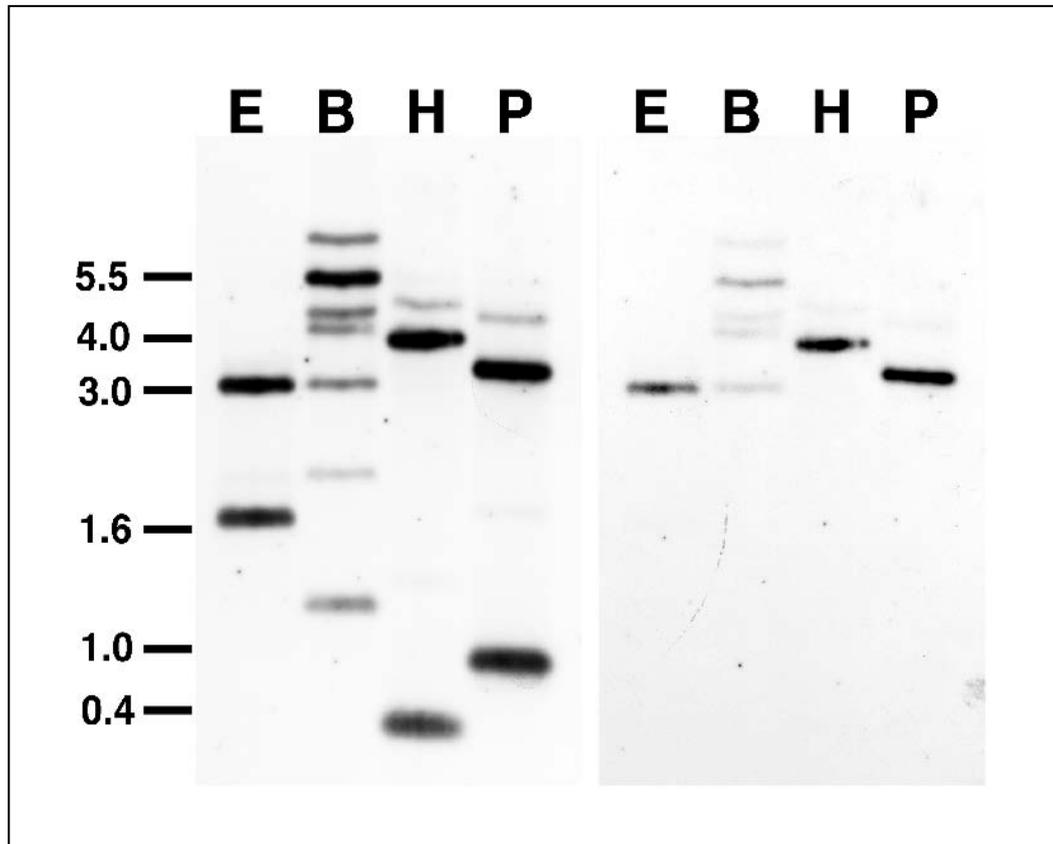


Figura 14. Análisis mediante Southern. ADN genómico de judía se digirió con las enzimas de restricción *EcoRI* (E), *BamHI* (B), *HindIII* (H), y *PstI* (P), se separó en un gel de agarosa, fue transferido a una membrana de nylon N⁺, y se hibridó con un fragmento de 388 pb (nucleótidos 688-1075) de *PVAS2*. El panel de la izquierda muestra el patrón de hibridación después de hacer lavados a baja estringencia, mientras que el panel de la derecha muestra el resultado después de hacer lavados a alta estringencia.

2.- Aislamiento y caracterización de dos clones de ADNc (*PVAS1* y *PVAS2*) que codifican sendas asparragina sintetetas

Un fragmento interno de 388 pb de un supuesto ADNc de AS fue en un principio aislado a partir de ARN total de raíz mediante la técnica de RT-PCR usando los oligonucleótidos degenerados ASP2 y ASP3. Este fragmento, una vez clonado, se sometió a secuenciación, lo que reveló un grado de similitud máximo con una AS de tipo II de soja (*Glycine max*). La secuencia de este fragmento interno de ADNc permitió el diseño de los oligonucleótidos específicos ASN10 (5'-GGC ATC CAT CAC TTC TCG CTA CTT G-3') y ASN11 (5'-CTC CGG AGA TAA CCC ATT TGA CAC C-3'), que se usaron en experimentos de 5'- y 3'- RACE-PCR. Los clones p5PVAS2 y p3PVAS2 se aislaron y se secuenciaron completamente. Esto permitió la reconstrucción

de un ADNc completo de 2044 pb (pPVAS2). Ambos clones se secuenciaron utilizando en un principio los oligonucleótidos T3 (5'-AAT TAA CCC TCA CTA AAG GG-3') y T7 (5'-GAT ATA CGA CTC ACT ATA GGG C-3'). Posteriormente se diseñaron los oligonucleótidos específicos AS14 (5'-GGC AAC ACC AAG AGG AGC AG-3'), AS15 (5'-TTT CAG AAG GCA CCC AAC AAG-3'), AS16 (5'-CAT GGA GAA GGC TTT GTG GAC-3') y AS17 (5'-CAA GTA GCG AGA AGT GAT GGA TG-3') para completar la secuenciación. Esto permitió comprobar que entre ambos abarcaban la totalidad de la región codificante del ADNc de *PVAS2*. La reconstrucción del ADNc completo (pPVAS2) se realizó por digestión de ambos clones en la región común con la enzima *EcoRV*, y posterior ligación, como se muestra en la Fig. 18. Considerando la existencia de al menos dos genes AS diferentes en judía, y para descartar la posibilidad de que el ADNc completo reconstruido pudiera ser un híbrido de los dos genes, se llevó a cabo una PCR con los oligonucleótidos específicos del gen (AS20 y AS21). El producto de 1,9 kb se clonó en el vector pBluescript KS+. Se secuenciaron ambos extremos de este ADNc y se compararon las secuencias a los productos de 5'- y 3'-RACE-PCR aislados previamente. De ello se concluyó que el ADNc *PVAS2* no es un híbrido, sino que representa en realidad un gen individual. La secuencia de nucleótidos y aminoácidos deducida correspondiente a la mayor fase abierta de lectura (ORF) del ADNc *PVAS2* se muestra en la Fig. 15. El posible codón de iniciación ATG se localiza en los nucleótidos 1-3. Un codón de terminación 5' en fase (TAA) se localiza 12 nucleótidos secuencia arriba del codón de inicio, lo cual indica que la traducción no podría comenzar secuencia arriba. Una posible señal de poliadenilación (AATAAGA) se localiza en los nucleótidos 1941-1947. Esta señal es altamente homóloga a la secuencia consenso de la señal de poliadenilación de plantas (AAUAAAA). La fase abierta de lectura desde el codón de inicio hasta el codón de terminación (TAA) codifica un péptido de 584 aminoácidos con un peso molecular relativo de 65810, un punto isoeléctrico de 6,4, y una carga neta de -7,2 a pH 7,0.

```

ctaatagcactcactatagggctcgagcggccgcccgggaggtCTGCCATTAACACATCACA
ATGTGTGGTATTCTTGCTGTTCTTGGTTGTTCTGATCACTCTCGAGCCAAAAGGGTTCGCGTTCCTAGAG 69
M C G I L A V L G C S D H S R A K R V R V L E
CTCTCTCGCAGATTGAAGCACCGTGGGCCTGATTGGAGTGGGCTCCATCAACATGGTGACTGCTTTTTG 138
L S R R L K H R G P D W S G L H Q H G D C F L
GCACATCAACCTTTAGCCATTGTAGATCCAGCTTCTGGGGATCAACCTCTCTTCAACGAGGACAATCC 207
A H Q R L A I V D P A S G D Q P L F N E D K S
GTCATTGTCACGGTAAATGGAGAGATTTACAACCATGAAGAACTCAGGAAACAGCTTCTGGTCAACAAG 276
V I V T V N G E I Y N H E E L R K Q L P G H K
TTTGAAGTGGAGTGTGATGTTATTGCACACTTGTACGAGGAACATGGAGAAGGCTTTGTGGAC 345
F R T G S D C D V I A H L Y E E H G E G F V D
ATGCTGGATGGTATCTTCTCGTTTGTCTTCTGGATACCCGTGACAACAGTTTATAGTGGCTCGAGAT 414
M L D G I F S F V L L D T R D N S F I V A R D
GCTATAGGGGTCACTTCCCTGTACATTGGTTGGGATTAGATGGCTCTGTTTGGATTTTCATCTGAAATG 483
A I G V T S L Y I G W G L D G S V W I S S E M
AAAGGCCTGAATGATGATTGTGAACATTTTGTGTTTCCACCTGGTCACTTGTACTCTAGCAAAGAC 552
K G L N D D C E H F E C F P P G H L Y S K D
AGAGGGTTTTCGAGATGGTACAACCTCCTTGGTTCTCTGAAGCTATTCCATCTGCCCTTATGACCTT 621
R G F R R W Y N P P W F S E A I P S A P Y D P
CTAGTTTTCGAGACGTGCCTTTGAGCAGGCAGTGATAAAAAGGTTGATGACTGGTGTGCCTTTTCGGTGT 690
L V L R R A F E Q A V I K R L M T D V P F G V
CTACTTTCGGAGGTTTGGACTCTTCACTGGTGGCATCCATCACTTCTCGCTACTTGGCCAACACAAG 759
L L S G G L D S S L V A S I T S R Y L A N T K
GCTGCTGAGCAGTGGGGATCAAAGTTACATTGTTCTGTGTAGGACTTGGGGCTCACCAGATTTAAAG 828
A A E Q W G S K L H S F C V G L E G S P D L K
GCTGCAAAAAGATTGCTGACTATCTAGGCCTGTCCACCACGAGTTTCACTTCACTGTTTCAGGATGGA 897
A A K E V A D Y L G T V H H E F H F T V Q D G
ATAGATGCCATTGAGGATGTTATATACCATGTGCAAACTTATGATGTGACCACAATTAGAGCAGCAG 96
I D A I E D V I Y H V E T Y D V T T I R A S T
CCCATGTTTCTCATGTCTCGGAAGATTAAATCACTAGGTGTCAAATGGGTTATCTCCGGAGAAGGATCA 1035
P M F L M S R K I K S L G V K W V I S G E G S
GATGAGATCTTTGGAGGGTATCTGTACTTTTACAAGGCACCCAACAAGGAGGTTTCACAGAGAAACA 1104
D E I F G G Y L Y F H K A P N K E E F H R E T
TGCCGCAAGATCAAAGCACTCCACCAATATGACTGCTTGCAGGAGCAATAAATCAACATTTGCTTGGGGT 1173
C R K I K A L H Q Y D C L R A N K S T F A W G
CTAGAAGCCCAGTACCATTTTGGACAAGGAGTTTATCAATGCTGCAATGAACATTGACCCCGAGCAT 1242
L E A R V P F L D K E F I N A A M N I D P E H
AAAATGATAAAAAGAGATGAAGGACGAATTGAGAAGTGGATTCTGAGGAGAGCCTTTGATGATGAAGAC 1311
K M I K R D E G R I E K W I L R R A F D D E D
CAGCCTTATCTGCCAAAGCACATTTTATACAGGCAGAAAGAACAATTCACTGATGGAGTTGGCTATAGT 1380
Q P N S A R L T V P G G A S V A C S T A K A V
TGGATTGATGGCCTTAAGGCTCATGCTGCAAAAACATGTGACTGACAAAATGATGCTTAATGCTGGTAA 1449
W I D G L K A H A A K H V T D K M M L N A G N
ATCTATCCCCACAACCCCCAGTAACCAAGGAGCATACTACTATAGAATGATCTTTGAGAGGTCTTTC 1518
I Y P H N T P V T K E A Y Y Y R M I F E R F F
CCTCAGAACTCAGCTAGGCTCACTGTTCCCTGGAGGAGCAAGTGTGCTTGCAGCACAGCCAAAGCTGTT 1587
P Q N S A R L T V P G G A S V A C S T A K A V
GAATGGGATGCTGCTTGGTCTAACAACCTTGACCCTTCTGGTAGAGCAGCACTTGGAGTGCACATTTCA 1656
E W D A A W S N N L D P S G R A A L G V H I S
GCTTATGAGAAATCAGAACAATTAGCCAACAAGGTGTAGAAAATAGAGAAGATTATACCTATGGATGCT 1725
A Y E N Q N N L A N K G V E I E K I I P M D A
GCTCCTTGTGTTGCCATCCAGAGC TAATATGAAGCTGCGACTCAGAATAATTGGGCGAGAATGAAG 1794
A P L G V A I Q S *
ATGATTAAGCTAAACACTGATGAAAAACCCCTGCTGTGTAATTTCACTTGGCTAAGCTTGATATACA 1863
AGGCTTTCCAAAGAGTGTAAAGTGTAGTACTACCTTGAGTTATGTGATTTGAACTCTT AATAAGAGTGT 1932
TTATTTTCTCAGTTATGCACGCAAAATCCATTATCTCAGTAGTATAGTGGTTACCGTATTTTATTGCAA 2001
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAacctgcccgggcccgcctcgagccctatagtgagtcgattag 2025

```

Figura 15: Secuencia nucleotídica y aminoácídica de la proteína deducida del ADNc PVAS2. Los codones de iniciación y terminación se muestran en negrita. La secuencia de aminoácidos se presenta en color rojo oscuro. La posible señal de poliadenilación aparece en color rojo.

La secuencia de aminoácidos deducida de PVAS2 se alineó con las secuencias AS de soja, guisante, *lotus*, haba, *Arabidopsis*, *E. coli* y *Homo sapiens* para determinar regiones conservadas dentro de estas secuencias (Fig. 21). PVAS2 comparte regiones altamente homólogas con todas las AS, empezando por el dominio de unión a glutamina (GAT), que es muy específico de las AS y otras Ntn amidotransferasas (Zalkin y Smith, 1998). Los residuos esenciales de este dominio (Cys¹-Arg²⁶-Gly²⁷-Gly³²-Arg⁷³-Pro⁸⁶-Asn¹⁰¹-Gly¹⁰²-Asp¹²⁷, notación de la PRPP amidotransferasa) están conservados en las AS de soja, guisante, *lotus*, haba, *Arabidopsis*, *Homo sapiens*, *E. coli*, y también en PVAS2 de judía (Cys¹-Arg³⁰-Gly³¹-Gly³⁶-Pro⁶¹-Asn⁷⁴-Gly⁷⁵-Asp⁹⁷, notación de PVAS2 después de la eliminación de la metionina inicial).

Los residuos esenciales para la unión de aspartato y ATP están también conservados en PVAS2. Se ha demostrado que tres residuos aminoacídicos (Thr³¹⁵, Thr³¹⁶, y Arg³¹⁸) intervienen en la unión del aspartato y estabilización de intermediarios en la formación del β-aspartil-AMP en la ASNB de *E. coli* (Boehlein *et al.*, 1997a). La Cys⁵²², que está también conservada en todas las AS excepto en la AS1 de humanos, podría formar parte del sitio de unión a aspartato en la ASNB de *E. coli* (Boehlein *et al.*, 1997b). Otra cadena aminoacídica, localizada entre la Ser²³³ y la Ser²³⁷ (notación de PVAS2), está conservada en todas las AS y otras enzimas que hidrolizan ATP como la GMP sintetasa (Mäntsälä *et al.*, 1992) y ATP sulfurilasa (Leyh *et al.*, 1992). Recientes análisis realizados en la secuencia de la proteína ASNB de *E. coli* sugieren que estos residuos pueden estar implicados en la unión de pirofosfato (Richards y Schuster, 1998).

La secuencia deducida de aminoácidos de PVAS2 mostró una similitud significativa con otras asparragina sintetetasas. Presentó la máxima homología con otras AS de leguminosas, como la AS2 de soja (95,9 %), AS1 de *lotus* (90,9 %), la AS2 de guisante (90,6 %), y AS de haba (86,1 %), mientras que mostró mucha menor similitud con la ASNB de *E. coli* (52,3 %) y AS1 de humanos (31,9 %). El porcentaje de similitud e identidad aminoacídica, junto con el cladograma (Fig. 22), indica que PVAS2 está íntimamente relacionada con otras AS de tipo II.

Con objeto de aislar otros genes de asparragina sintetasa, se construyó una genoteca de ADN genómico de judía en λFIX II (ver Materiales y Métodos, apartado 5). Se estimó que el tamaño del genoma de *P. vulgaris* era de 2×10^6 kb y, teniendo en cuenta

que el tamaño medio de inserto era de 15 kb, se calculó que sería preciso analizar $1,3 \times 10^5$ clones independientes, para estar seguros de que se analizaba todo el genoma. Se deseaba aislar varios clones independientes, por lo que se decidió rastrear 5×10^5 clones. Se utilizó como sonda el fragmento de 388 pb de ADNc correspondiente a *PVAS2*, obteniéndose como resultado dos clones independientes, que se denominaron λ gPVAS1 y λ gPVAS2. Se eligió λ gPVAS1 para un análisis más detallado. Se digirió con distintas enzimas de restricción, y se analizó mediante Southern, utilizando como sonda un ADNc completo de espárrago con el fin de identificar parte de la región codificante. La sonda hibridó con un fragmento de 2,5 kb de la digestión con *Hind*III de dicho clon. El gel de agarosa y el resultado del Southern se muestran en la Fig. 16.

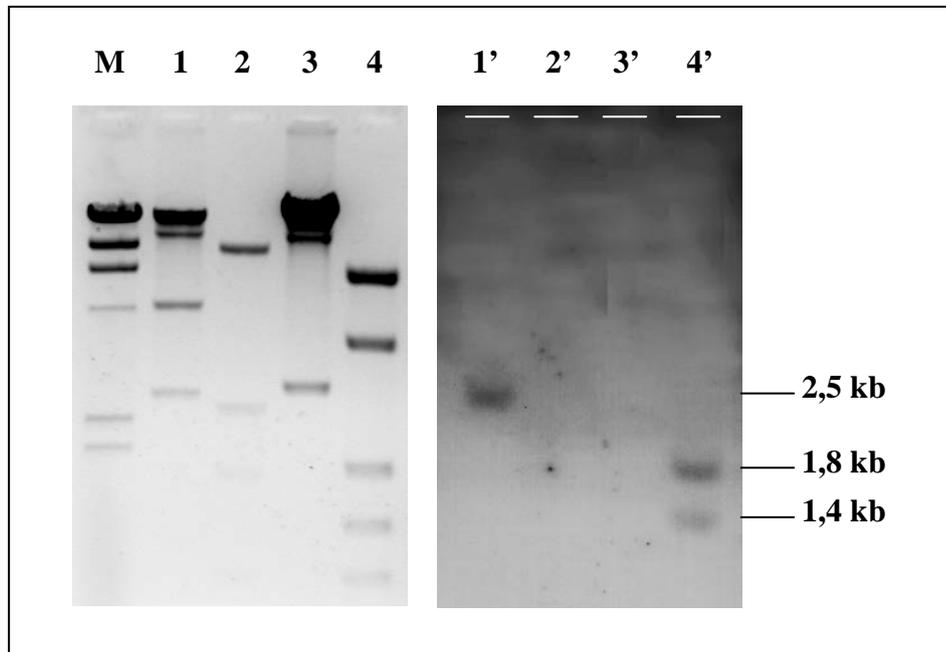


Figura 16. Mapeo de la región codificante de los clones genómicos λ gPVAS1 y λ gPVAS2. El clon genómico λ gPVAS1 se digirió con las enzimas *Hind*III y *Hpa*II (calles 1 y 2, respectivamente); las mismas enzimas se utilizaron para el clon λ gPVAS2 (calles 3 y 4). Tras realizar una transferencia a una membrana de nailon, se hibridó ésta con una sonda correspondiente al ADNc completo de ápices de espárrago.

La subclonación de este fragmento en pBluescript KS+ (p2.5AS1) permitió su secuenciación. Con el objeto de identificar la región codificante, esta secuencia se alineó con la secuencia del ADNc de asparragina sintetasa de tipo I de soja (*Glycine max*). Las regiones en las que la homología es alta, corresponderían a exones, mientras que las discontinuidades serían secuencias intrónicas (Fig. 17). A partir de uno de estos fragmentos, que correspondía a una región central de la región codificante, se diseñaron

los oligonucleótidos específicos PVAS1-1 (5'-GCT GTC ACG GCT CGC TAC C-3') y PVAS1-2 (5'-CTT TGT TGG GTG CCT TGT GG-3'), que se utilizaron en la clonación mediante RT-PCR de un ADNc completo proveniente de dicho gen.

Con objeto de aislar el ADNc se utilizaron las técnicas de 5'- y 3'- RACE-PCR. El oligonucleótido PVAS1-1 se utilizó para obtener el extremo 3', un fragmento de ADNc de 1,3 kb. Con PVAS1-2, se amplificó un fragmento de 1,1 kb del extremo 5'. Utilizando de este modo los oligonucleótidos, se consiguió que ambos extremos de ADNc tuviesen una región común. Estos fragmentos se clonaron en los sitios *EcoRI* y *SalI* del vector Bluescript-KS+ (p5PVAS1 y p3PVAS1). Ambos clones se secuenciaron utilizando en un principio los oligonucleótidos T3 (5'-AAT TAA CCC TCA CTA AAG GG-3') y T7 (5'-GAT ATA CGA CTC ACT ATA GGG C-3'). Posteriormente se diseñaron oligonucleótidos específicos PVAS1-3 (5'-AAG GCA CCC AAC AAA GAA GAG T-3') PVAS1-4 (5'-CTG TAC GAG GAG CAC GGA GAA-3'), PVAS1-7 (5'-CCC CTT CAA CAC TCC AAC CAC-3') y PVAS1-8 (5'-CAT TAT GAT AGT GTG AGG TGA C-3') para completar la secuenciación. Esto permitió comprobar que entre ambos abarcaban la totalidad de la región codificante del ADNc de *PVAS1*. La reconstrucción del ADNc completo (pPVAS1) se realizó por digestión de ambos clones en la región común con la enzima *EcoRV*, y posterior ligación, como se muestra en la Fig. 18.

Al igual que en el caso de *PVAS2*, se comprobó que pPVAS1 no era una quimera. Para ello se diseñaron oligos específicos para los extremos y se reamplificó un ADNc completo correspondiente a *PVAS1*. El ADNc tiene una longitud de 2086 pb. La secuencia de nucleótidos y aminoácidos deducida correspondiente a la mayor fase abierta de lectura (ORF) del ADNc *PVAS1* se muestra en la Fig. 24. El posible codón de iniciación (ATG) se localiza en los nucleótidos 1 al 3. En el mismo marco de lectura, y 21 nucleótidos en dirección 5', se encuentra un codón de terminación (TAG), lo que indica que la traducción no podría iniciarse más arriba. Entre los nucleótidos 1935 y 1942 se encuentra una posible señal de poliadenilación (AATCAAAA), que presenta alta homología con la señal de poliadenilación consenso en plantas (AAUAAAA). La fase abierta de lectura desde el posible codón de iniciación hasta el codón TAG codifica una proteína de 579 aminoácidos, con un peso molecular relativo de 65265, un punto isoeléctrico (pI) de 6,27 y una carga neta de -9,3 a pH 7,0.

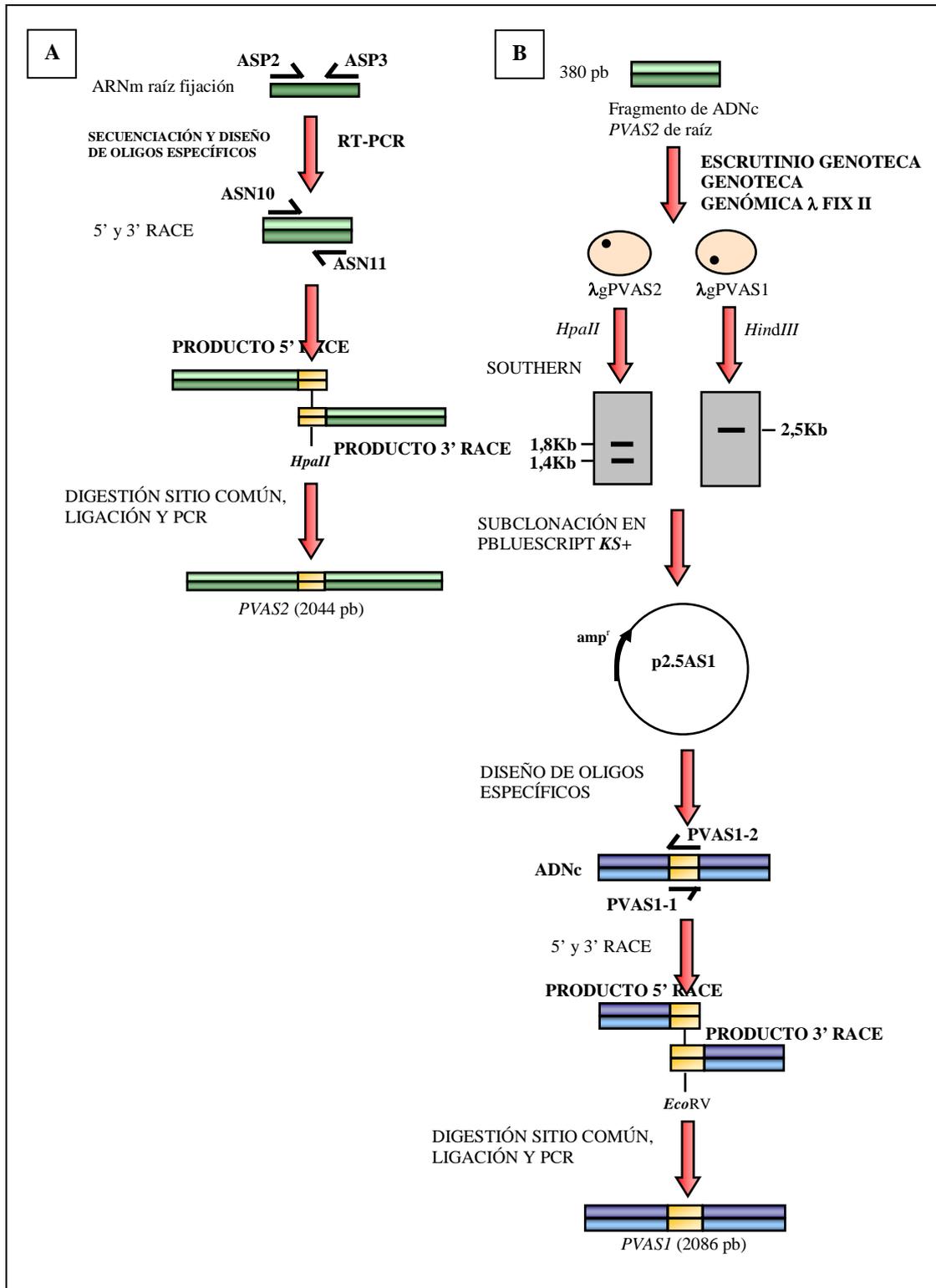


Figura 18. Esquema general del procedimiento de clonación de dos ADNc que codifican sendas asparragina sintetetas en judía. A: clonación de PVAS2. B: clonación de PVAS1.

Para localizar regiones conservadas, se alineó la secuencia aminoacídica predicha de PVAS1 con otras AS de judía, soja, *lotus*, haba, guisante, *Arabidopsis*, espárrago, maíz y *E. coli*. Como se muestra en la Fig. 21, PVAS1 comparte regiones muy homólogas con las AS de leguminosas. En el extremo 5', el dominio de unión a glutamina (GAT) es muy específico en AS y otras Ntn amidotransferasas (Zalkin y Smith, 1998). Todos los residuos esenciales de este dominio (Cys¹-Arg²⁶-Gly²⁷-Gly³²-Arg⁷³-Pro⁸⁶-Asn¹⁰¹-Gly¹⁰²-Asp¹²⁷, en notación de la PRPP amidotrasferasa) se conservan en las AS de estos organismos y también en PVAS1 de judía (Cys¹-Arg³⁰-Gly³¹-Gly³⁶-Pro⁶¹-Asn⁷⁴-Gly⁷⁵-Asp⁹⁷, notación de PVAS1 después de eliminar la metionina inicial).

También se mantienen los residuos para la unión del aspartato y ATP. En un principio se reconocieron los tres aminoácidos (Thr³¹⁵, Thr³¹⁶, Arg³¹⁸) que intervienen en la unión al aspartato o en la estabilización de intermediarios en la formación de β-aspartil-AMP en la ASNB de *E. coli* (Boehlein *et al.*, 1997a). La Cys⁵²² también se conserva en todas las asparragina sintetetasas, excepto la de humanos, por lo que se ha propuesto que puede formar parte del sitio de unión a aspartato en la ASNB de *E. coli* (Boehlein *et al.*, 1997b). También la región aminoacídica situada entre las Ser²³² y Ser²³⁷ (notación PVAS1) se conserva en todas las AS y otras enzimas que hidrolizan ATP, como la GMP sintetasa (Mäntsälä *et al.*, 1992) y ATP sulfurilasa (Leyh *et al.*, 1992). Recientes análisis informáticos de la secuencia aminoacídica de la ASNB de *E. coli* sugieren que esos residuos podrían intervenir en la unión de pirofosfato (Richards y Schuster, 1998).

La comparación de la secuencia aminoacídica predicha de PVAS1 con la de asparragina sistetasas de otros organismos reveló que PVAS1 presenta un alto grado de identidad con otras asparragina sintetetasas. La mayor homología la muestra con asparragina sintetetasas de otras leguminosas como AS1 de soja (92,7%), AS2 de *lotus* (87,9%), PVAS2 de judía (86,7%), AS1 de *lotus* (86,5%), AS2 de soja (86,4%), PSAS1 de guisante (86,0%), VFAS1 de haba (85,7%) y PSAS2 de guisante (84,1%).

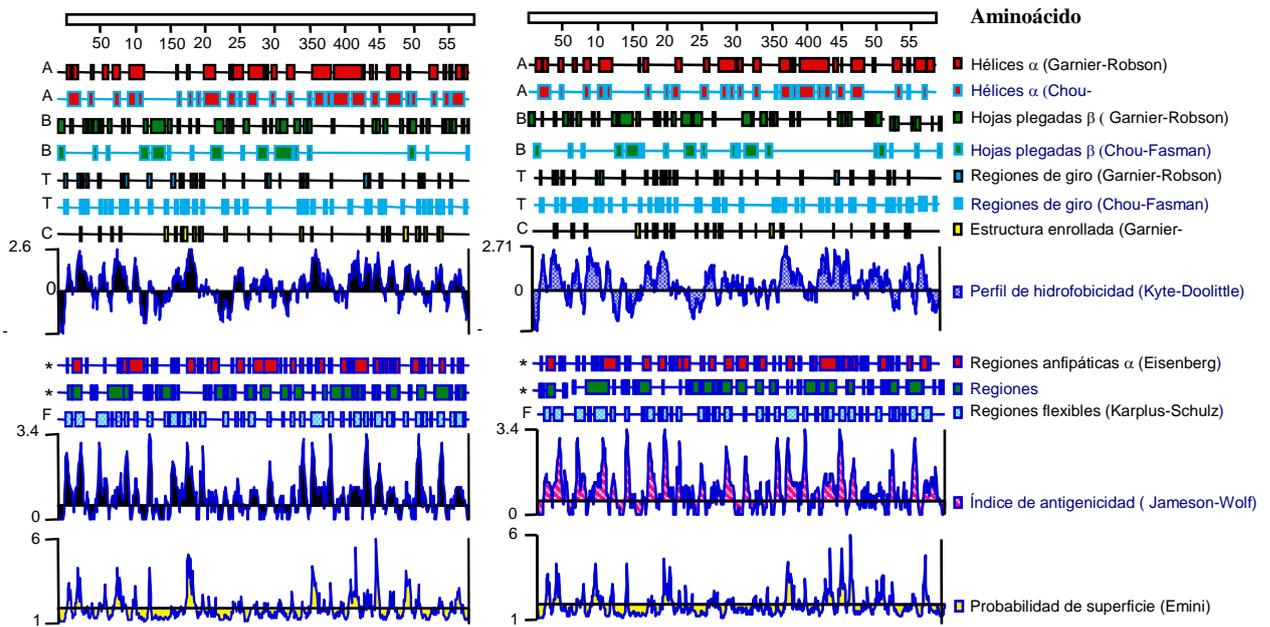


Figura 19. Características estructurales, perfil de hidrofobicidad y propiedades antigénicas de las proteínas PVAS1 y PVAS2.

	% Similitud aminoácidos	% Similitud ADNc	Referencia
<i>Glycine max</i> AS	96,0	92,7	Yamagata et al. (1998)
<i>Glycine max</i> AS1	92,7	92,0	Hughes et al. (1997)
<i>Lotus japonicus</i> AS2	87,9	84,8	Waterhouse et al. (1996)
<i>Phaseolus vulgaris</i> PVAS2	86,7	82,4	Osuna et al. (1999)
<i>Lotus japonicus</i> AS1	86,5	81,8	Waterhouse et al. (1996)
<i>Glycine max</i> AS2	86,4	83,7	Hughes et al. (1997)
<i>Pisum sativum</i> PSAS1	86,0	81,5	Tsai et al. (1990)
<i>Vicia faba</i> Vfas1	85,7	81,6	Kuester et al. (1997)
<i>Pisum sativum</i> PSAS2	84,1	80,2	Tsai et al. (1990)
<i>Asparragus officinalis</i> AS	80,8	69,7	Davies et al. (1993)
<i>Arabidopsis thaliana</i> ASN1	80,8	69,4	Lam et al. (1994)
<i>Brassica oleracea</i> AS	79,8	68,2	Paek et al. (1995)
<i>Arabidopsis thaliana</i> ASN3	76,6	66,5	Lam et al. (1998)
<i>Arabidopsis thaliana</i> ASN2	75,6	65,7	Lam et al. (1998)
<i>Oryza sativa</i> AS	74,4	63,9	Sasaki et al. (1994)
<i>Zea mays</i> AS	72,2	62,9	Chevalier et al. (1996)
<i>Escherichia coli</i> asnB	51,3	45,9	Scofield et al. (1990)

Figura 20. Tabla que muestra la similitud, tanto a nivel proteico como de ADNc, de la asparragina sintetasa de tipo I de *P. vulgaris* con las de otras plantas superiores, incluida la asparragina sintetasa de tipo II de *P. vulgaris*, así como con las de *E. coli*. La similitud de los ADNc se refiere sólo a la región codificante.

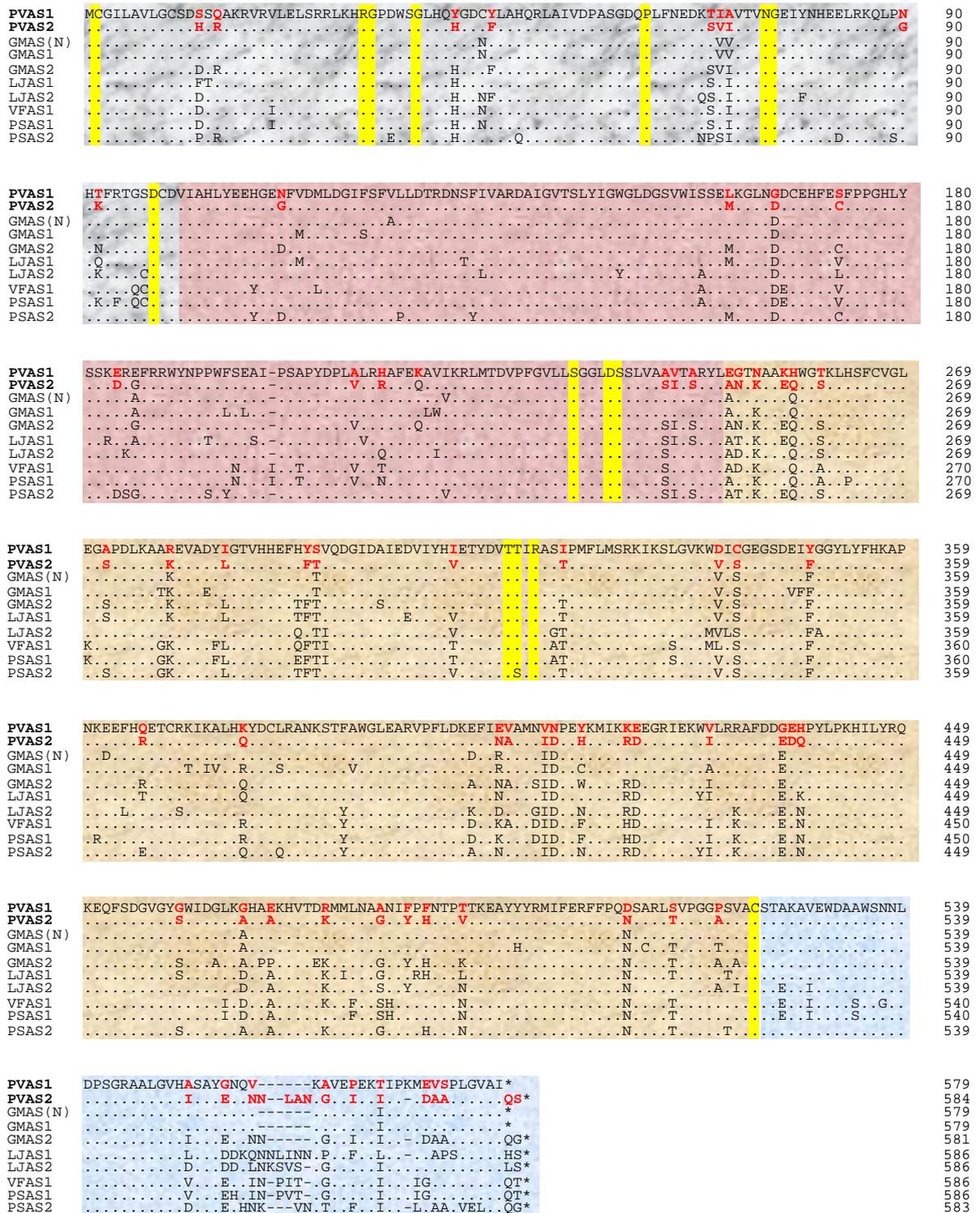


Figura 21. Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de las proteínas codificadas por PVAS1 y PVAS2 con varias AS de plantas Para realizar el alineamiento se utilizó el método Clustal del paquete informático Lasergene (DNASTAR). En amarillo se marcan los aminoácidos esenciales. Los dominios de unión a glutamina, ATP y aspartato aparecen marcados en gris, granate y marrón, respectivamente. En azul se muestra la región hipervariable. Las secuencias polipeptídicas de AS utilizadas en la comparación son AS1 de judía (PVAS1), AS2 de judía (PVAS2), AS de soja (GMAS(N)), AS1 de soja (GMAS1), AS2 de soja (GMAS2), AS1 de lotus (LJAS1), AS2 de lotus (LJAS2), AS1 de haba (VFAS1), AS1 de guisante (PSAS1) y AS2 de guisante (PSAS2).

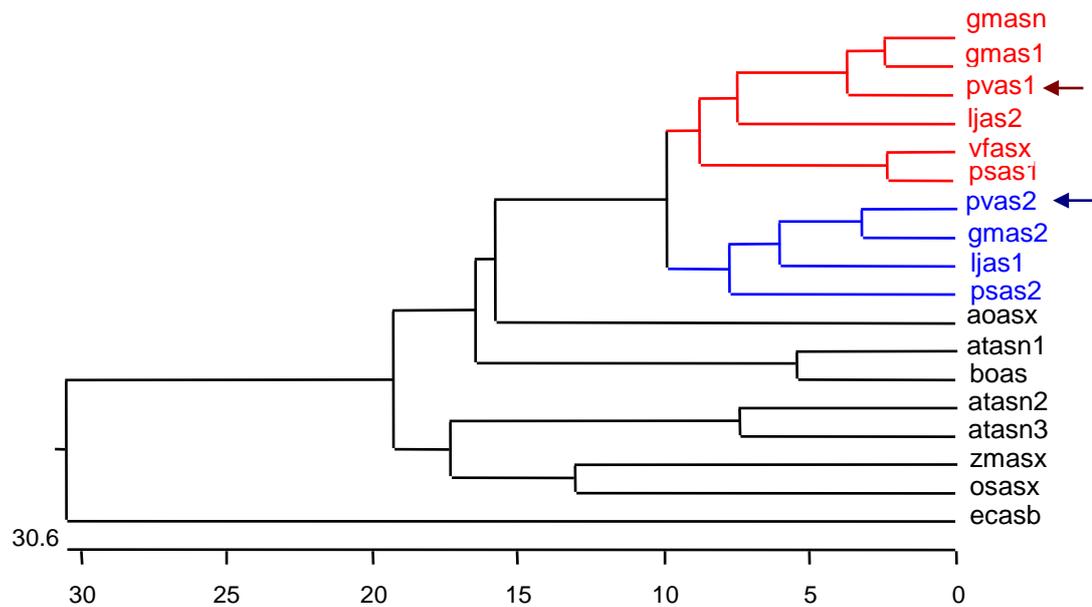


Figura 22. Distancias filogenéticas entre varias AS de plantas y bacterias. Este cladograma se construyó tras una comparación múltiple de secuencias nucleotídicas utilizando el método Clustal del programa Lasergene (DNASTAR). En rojo y azul se marcan las AS de tipo I y tipo II de leguminosas respectivamente.

Se puede apreciar que en las leguminosas se produce una diferenciación dendrítica entre AS de tipo I y AS de tipo II, aunque hasta el momento no podemos indicar si esa diferenciación tiene alguna implicación funcional.

3.- Estructura del gen *PVASI*

Para secuenciar la región genómica del gen *ASI* de *P. vulgaris*, se subclonó un fragmento *Sac* I de 7 kb, que contenía toda la región codificante del gen. Este fragmento se obtuvo mediante análisis Southern con una sonda construida con un ADNc completo de AS de espárrago. La comparación de las secuencias genómica y del ADNc reveló que *ASI* presenta 12 intrones (Fig. 23A). El primero, de 958 pb, localizado entre las posiciones 229-1186; el segundo, de 304 pb, localizado entre las posiciones 1327-1631; el tercero, de 113 pb, localizado entre las posiciones 1725-1838; el cuarto, de 104 pb, localizado entre las posiciones 1981-2085; el quinto, de 150 pb, localizado entre las posiciones 2276-2426; el sexto, de 99 pb, localizado entre las posiciones 2592-2691; el séptimo, de 94 pb, localizado entre las posiciones 2768-2862; el octavo, de 96 pb, localizado entre las posiciones 3085-3181; el noveno, de 85 pb, localizado entre las posiciones 3314-3399; el décimo, de 86 pb, localizado entre las posiciones 3480-3566;

el undécimo, de 91 pb, localizado entre las posiciones 3652-3743; y el duodécimo, de 95 pb, localizado entre las posiciones 3848-3943. La región promotora secuenciada tiene una longitud de 916 pb, con una posible caja TATA situada en la posición -55 del hipotético inicio de la transcripción. En la posición -640 a -621 se localiza un motivo de secuencia que regula la transcripción dependiente de nitrato en plantas (Hwang *et al.*, 1997). Este motivo, encontrado en promotores de genes que codifican para la nitrato reductasa (NR) y nitrito reductasa (NiR) de diversas plantas (*Arabidopsis*, *Nicotiana*, maíz, espinaca, tomate, arroz, cebada y judía), consiste en una secuencia rica en A/T seguida inmediatamente por GGTC A o por AGTC A. Otro motivo para la regulación positiva por nitrato son dos cajas GATA que no distan entre sí más de 30 pb. En el promotor del gen *AS1* de judía se localiza un motivo GATA entre las posiciones -347 a -359. Hay que destacar la existencia de elementos reguladores de la transcripción, presentes en el promotor del gen *AS1* de guisante (Ngai *et al.*, 1997), y que intervienen en el proceso de represión por luz de estos genes (Fig. 23B). Las secuencias ricas en A/T, presentes repetidas veces en la región promotora, se han descrito en general asociadas a elementos reguladores positivos en plantas (Bustos *et al.*, 1989; Forde *et al.*, 1990). La presencia de estas secuencias sugiere un tipo de regulación compleja para este gen, que implica el reconocimiento de las mismas por factores de transcripción semejantes a los descritos para este tipo de secuencias en otras leguminosas. No obstante, tanto su posible función como la presencia e identificación de los factores reguladores requieren de una mayor investigación.

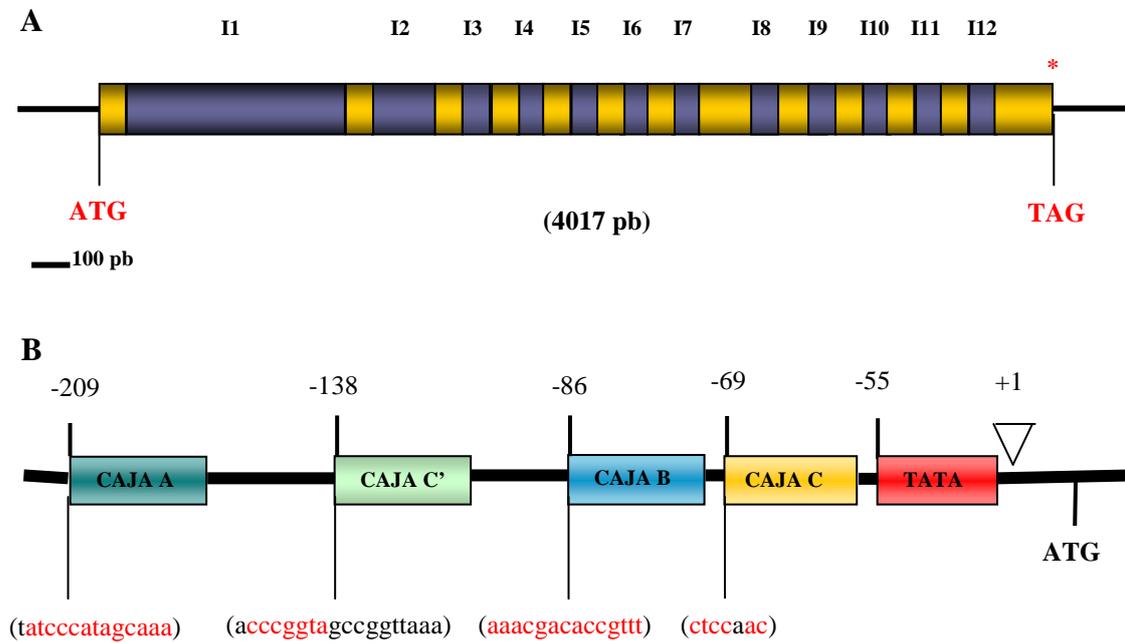


Figura 23. (A) Estructura del gen *ASI* de la leguminosa ureida *P. vulgaris*. I=intrón. En color azul claro se representan los exones. (B) Localización de motivos del promotor del gen *ASI* relacionados con la regulación por luz/oscuridad en el promotor del gen *ASI* de guisante (Ngai *et al.*, 1997). En color rojo se muestran los nucleótidos conservados en ambos promotores.

4.-Análisis de la expresión de los genes *PVAS1* y *PVAS2*

4.1.-Expresión específica de órganos

Considerando el hecho de que *PVAS1* y *PVAS2* pertenecen a una pequeña familia génica, decidimos investigar la especificidad de la expresión en órganos de estos genes. Para llevar a cabo el análisis de expresión de *PVAS1*, se utilizó como sonda un fragmento amplificado por PCR con los oligonucleótidos PVAS1-7 y PVAS1-8 (ver Materiales y Métodos, apartado 2.3). Este fragmento se empleó en la hibridación de una membrana que contenía ARN procedente de diferentes órganos de plantas de cinco semanas cultivadas en condiciones de fotoperíodo normal de día largo. Como muestra la Fig. 25, el transcrito de 2,2 kb coincide con el tamaño esperado para el ARNm de dicho gen. Este patrón de hibridación sugiere que *PVAS1* se expresa fuertemente en raíces y en mucho menor grado en frutos en desarrollo.

Para estudiar la expresión de *PVAS2*, se construyó por PCR un fragmento de ADN de 202 pb empleando los cebadores AS18 y AS21 (ver Materiales y Métodos, apartado 2.3). Este fragmento amplificado por PCR se usó como sonda para la hibridación de una membrana que contenía ARN procedente de diferentes órganos de plantas de cinco semanas cultivadas en condiciones de fotoperíodo normal de día largo. Como se muestra en la Fig. 25, se obtuvo una sola banda de hibridación de 2,2 kb con esta sonda específica. El patrón de hibridación observado sugiere que *PVAS2* se expresa mayoritariamente en raíces y, en un nivel menor, en nódulos y frutos en desarrollo, pero no en otras partes aéreas de la planta.

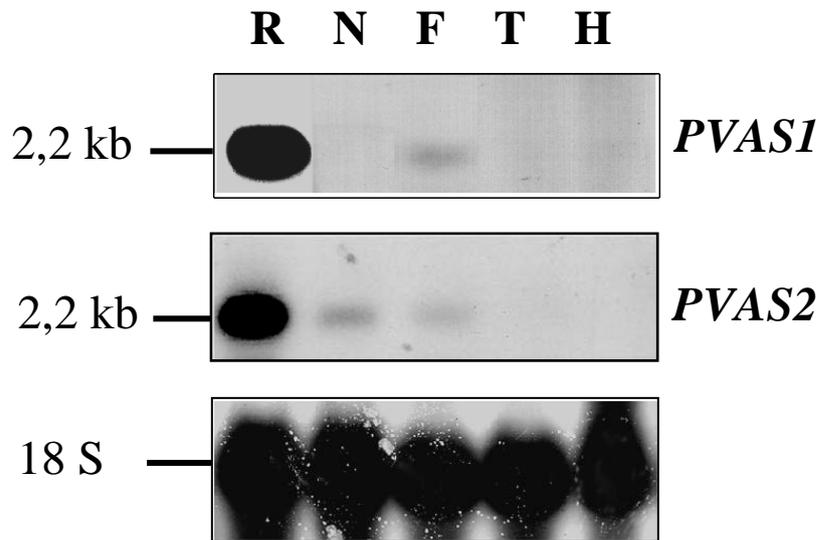


Figura 25. Análisis de la expresión de *PVAS1* y *PVAS2* en órganos de plantas noduladas de cinco semanas crecidas bajo un fotoperíodo normal de día largo. **R**, raíz; **N**, nódulo; **F**, fruto en desarrollo; **T**, tallo; **H**, hoja en desarrollo. Para detectar el ARNm de 2,2 kb correspondiente a *PVAS1*, se utilizó un fragmento de 445 pb (se trata de parte del extremo 3' de región codificante más 159 pb del extremo 3' de región no codificante) del ADNc del gen *PVAS1*. Para detectar el ARNm de *PVAS2*, se utilizó un fragmento de 202 pb correspondiente al extremo 3' de región no codificante del ADNc del gen *PVAS2*. Como control se hibridó ARNr 18 S.

Este patrón de expresión se asemeja al patrón encontrado en otras leguminosas, donde el mayor nivel de expresión de AS se localiza en raíz. No obstante, en soja, otra leguminosa ureida, ambos genes AS (*SAS1* y *SAS2*) se expresan en un nivel similar en tallo y raíz (Hughes *et al.*, 1997). Aún no hay datos disponibles sobre el nivel estacionario de ARNm de AS en nódulos de soja o frutos en desarrollo, aunque ha sido detectada y parcialmente purificada una asparragina sintetasa de nódulos radicales de soja (Huber y Streeter, 1985).

4.2.- Análisis de la expresión de *PVAS1* y *PVAS2* en cotiledones en germinación

Para estudiar la expresión de estos genes durante el proceso de germinación de los cotiledones, se procedió a la extracción de ARN de cotiledones del primer, tercer, sexto, octavo y décimo días de dicho proceso. Este ARN se transfirió a una membrana de nailon, y se hibridó a continuación con sondas específicas de *PVAS1* y *PVAS2*. El ARN se extrajo de un “pool” de cotiledones pertenecientes a cada etapa de dicho proceso germinativo. Como puede observarse en la Fig. 26, el máximo nivel de acumulación de transcrito de *PVAS1* y *PVAS2* ocurre a los seis días de la senescencia de los cotiledones.

Podemos afirmar que en esta etapa tiene lugar una mayor movilización de nitrógeno vía asparagina.

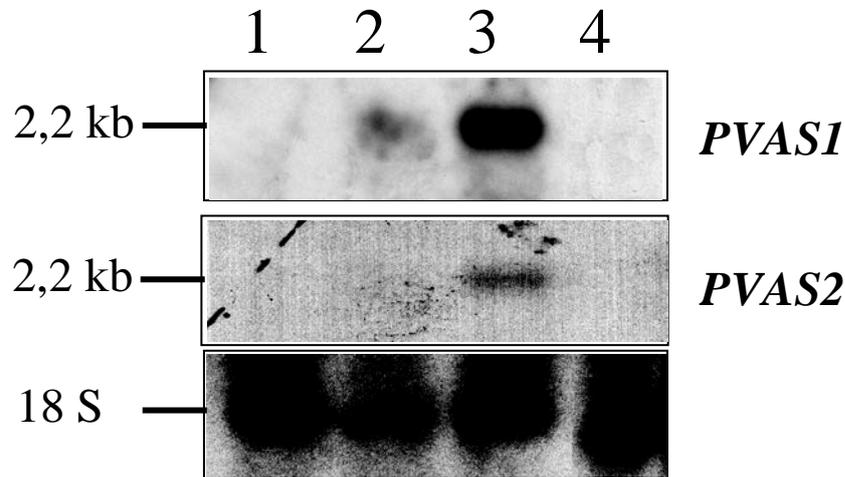


Figura 26. Análisis de la expresión de *PVAS1* y *PVAS2* en cotiledones en germinación. Calle 1: ARN de cotiledones tras un día del proceso germinativo; calle 2: ARN de cotiledones de tres días de germinación; calle 3: ARN de cotiledones de seis días; calle 4: ARN de cotiledones de 10 días. Para detectar el ARNm de 2,2 kb correspondiente a *PVAS1*, se utilizó un fragmento de 445 pb (se trata de parte del extremo 3' de región codificante más 159 pb del extremo 3' de región no codificante) del ADNc del gen *PVAS1*. Para detectar el ARNm de *PVAS2*, se utilizó un fragmento de 202 pb correspondiente al extremo 3' de región no codificante del ADNc del gen *PVAS2*. Como control se hibridó ARNr 18 S.

4.3.-Análisis de la expresión de *PVAS1* y *PVAS2* en plántulas

Se aisló ARN total de raíces, tallos y hojas de plántulas de 10 días cultivadas en condiciones de fotoperíodo normal de día largo, a las que le fueron aplicadas un inóculo de *Rhizobium* ISP14 con la incipiente salida del tallo al medio exterior, alrededor de una semana después de la siembra. Este ARN se transfirió a una membrana de nailon, y se hibridó con sondas específicas de ambos genes. Como se observa en la Fig. 27, sólo se detectó la presencia de transcrito de ambos genes en tejido de raíz. Esto es consistente con la progresiva conversión de la plántula desde un metabolismo heterótrofo a autótrofo, conforme van desapareciendo las reservas de nutrientes de los cotiledones. En plantas maduras, las raíces representarían la mayor fuente de N.

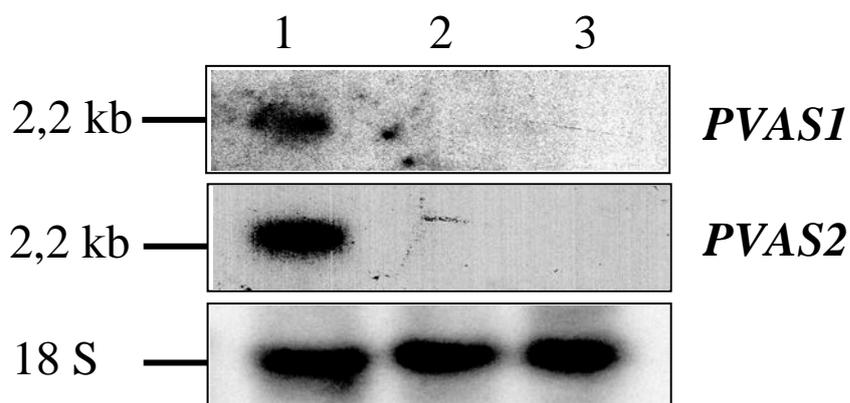


Figura 27. Análisis de la expresión de *PVAS1* y *PVAS2* en diferentes órganos de plántulas de diez días. Calle 1: ARN de raíz; calle 2: ARN de tallo; calle 3: ARN de hojas. Para detectar el ARNm de 2,2 kb correspondiente a *PVAS1*, se utilizó un fragmento de 445 pb (se trata de parte del extremo 3' de región codificante más 159 pb del extremo 3' de región no codificante) del ADNc del gen *PVAS1*. Para detectar el ARNm de *PVAS2*, se utilizó un fragmento de 202 pb correspondiente al extremo 3' de región no codificante del ADNc del gen *PVAS2*. Como control se hibridó ARNr 18 S.

4.4.- Análisis mediante RT-PCR de la expresión de *PVAS2* en nódulos en desarrollo

La detección de transcrito de *PVAS2* en nódulos diferenciados de cinco semanas mediante un análisis de *Northern blot* nos llevó a monitorizar la expresión de dicho gen en diversas etapas del desarrollo nodular. Debido a la dificultad de conseguir gran cantidad de tejido de cada etapa, se optó por utilizar la técnica de RT-PCR (ver Materiales y Métodos, apartado 17). Para ello, se aisló ARN de nódulos de 3, 4, 5, 6 y 7 semanas empleando los oligonucleótidos específicos ASN10 y ASN11, con los que se amplifica un fragmento de 321 pb. Como puede observarse en la Fig. 28, la cantidad de transcrito del gen *PVAS2* disminuye paulatinamente conforme avanza el proceso de diferenciación. El máximo nivel de expresión de *PVAS2* tiene lugar en las etapas más tempranas del desarrollo del nódulo, cuando éste aún no es competente para la fijación de nitrógeno. Es precisamente en el nódulo fijador de nitrógeno (nódulos de 4 y 5 semanas) cuando se observa el mayor nivel de transcrito de leghemoglobina (Taté *et al.*, 1994).

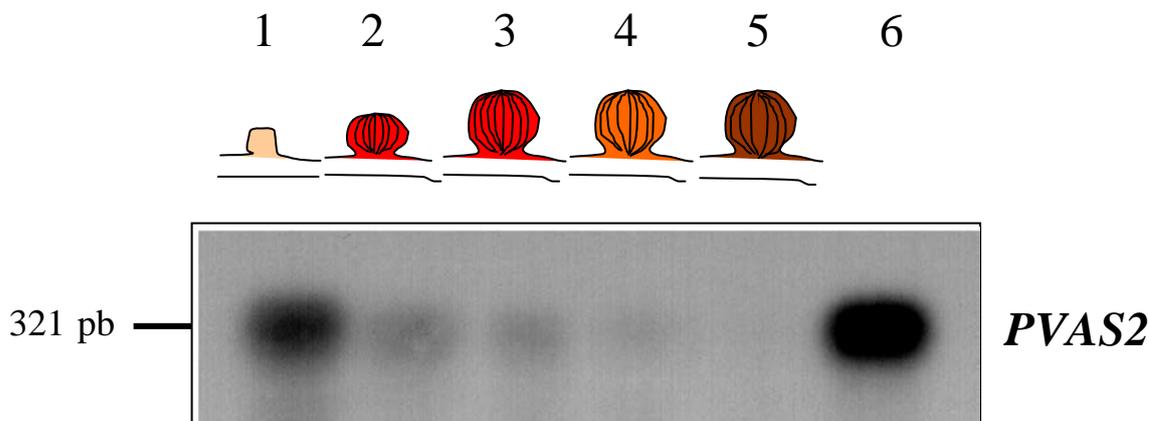


Figura 28. RT-PCR de nódulos en desarrollo de judía. En la calle 1 se utilizó 2 μ g de ARN de nódulos de 3 semanas; en la calle 2 : ARN de nódulos de 4 semanas; calle 3: ARN de nódulos de 5 semanas; calle 4: ARN de nódulos de 6 semanas; calle 5: ARN de nódulos de 7 semanas. En la calle 6 se empleó como control positivo 2 μ g de ARN de tejido de raíz de 5 semanas, donde se había detectado previamente el mayor nivel de expresión del gen.

4.5.-Efectos metabólicos del balance carbono-nitrógeno sobre la acumulación de ARNm de *PVAS1* y *PVAS2* en raíces de *P. vulgaris*

Para determinar cómo se afecta la acumulación de transcritos de *PVAS1* durante un tratamiento en oscuridad, se aisló ARN total de raíces de plantas de cinco semanas cultivadas bajo condiciones de luz continua y transferidas a la oscuridad diferentes períodos de tiempo. Como muestra la Fig. 29, aparece señal de hibridación tanto en condiciones de luz continua como en los distintos periodos de oscuridad, de modo que la expresión de *PVAS1* es prácticamente constitutiva.

Para estudiar si la acumulación de transcrito *PVAS2* fue inducida (o desreprimida) durante un tratamiento en oscuridad, se hibridó una sonda correspondiente al extremo 3' de región no codificante de este gen con la membrana empleada anteriormente. Como se muestra en la Fig. 29, el transcrito de *PVAS2* fue más abundante en plantas cultivadas en la oscuridad que en plantas cultivadas en luz continua, condiciones en las cuales el nivel de transcrito de *PVAS2* fue indetectable. La máxima acumulación de transcrito de *PVAS2* se observó tras un tratamiento de 24 h en oscuridad.

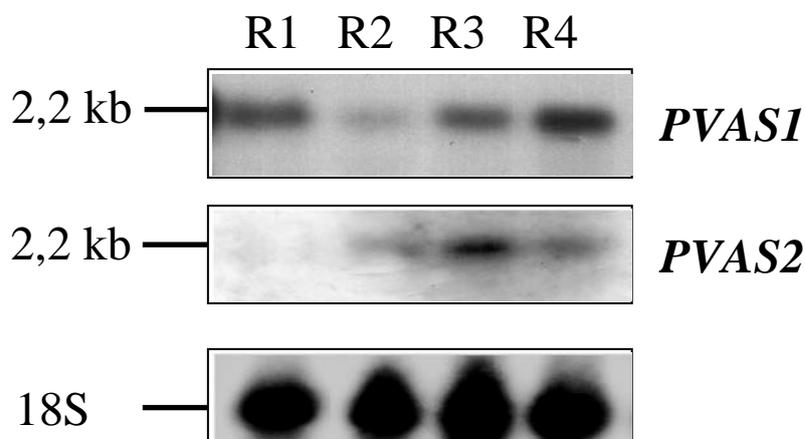


Figura 29. Análisis mediante Northern de la expresión de *PVAS1* y *PVAS2* en raíces después de tratamiento en oscuridad. Se purificó ARN total de raíces de plantas noduladas de 5 semanas cultivadas en luz continua (calle 1) y de plantas que habían crecido en oscuridad durante 12, 24 y 48 h (calles 2 a 4). Para detectar el ARNm de 2,2 kb correspondiente a *PVAS1*, se utilizó un fragmento de 445 pb (se trata de parte del extremo 3' de región codificante más 159 pb del extremo 3' de región no codificante) del ADNc del gen *PVAS1*. Para detectar el ARNm de *PVAS2*, se utilizó un fragmento de 202 pb correspondiente al extremo 3' de región no codificante del ADNc del gen *PVAS2*. Como control se hibridó ARNr 18 S.

También se analizó el efecto del aporte exógeno de una fuente de azúcar metabolizable. En la Fig. 30A podemos observar que el nivel estacionario de transcrito de *PVAS1* disminuyó significativamente tras el tratamiento de las plantas noduladas con sacarosa 10 mM durante 48 h. La adición de KNO_3 10 mM al medio de riego indujo considerablemente el nivel de expresión de *PVAS1* (Fig. 30B).

El nivel de transcrito *PVAS2* en raíces de judía cayó dramáticamente 48 h después de la adición de sacarosa 10 mM en el medio de riego de las plantas noduladas (Fig. 31A). Por el contrario, la adición al medio de riego de una fuente de nitrógeno inorgánico (10 mM de KNO_3) indujo significativamente la acumulación de ARNm de *PVAS2* en las raíces de plantas noduladas después de 48 h (Fig. 31B). Este comportamiento fue más acentuado respecto al observado para *PVAS1*.

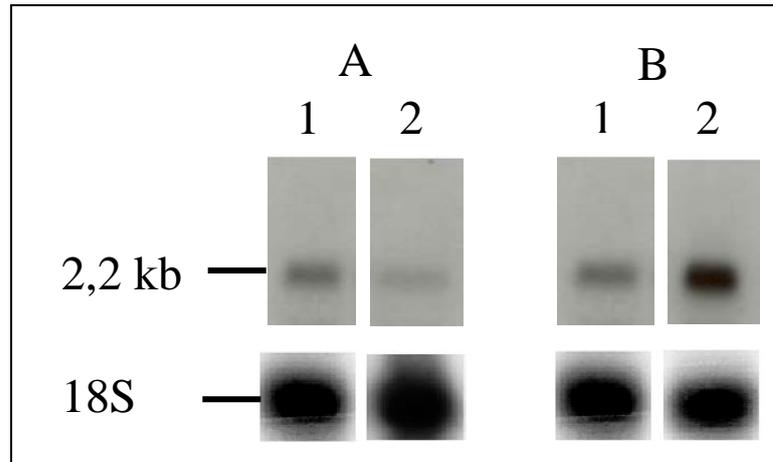


Figura 30. Análisis de la expresión mediante Northern de *PVAS1* en raíces de plantas tratadas con (A) sacarosa y (B) nitrato. (A) ARN total (15 μ g) fue extraído de plantas noduladas de cinco semanas cultivadas bajo condiciones normales (calle 1), y de raíces de plantas tratadas con sacarosa exógena (10 mM) durante 48 h (calle 2). (B) ARN total (15 μ g) fue extraído de raíces de plantas noduladas de cinco semanas cultivadas bajo condiciones normales (calle 1), y tratadas con 10 mM de KNO_3 durante 48 h (calle 2). Para detectar el ARNm de 2,2 kb correspondiente a *PVAS1*, se utilizó un fragmento de 445 pb (se trata de parte del extremo 3' de región codificante más 159 pb del extremo 3' de región no codificante) del ADNc del gen *PVAS1*. Como control se hibridó ARNr 18 S.

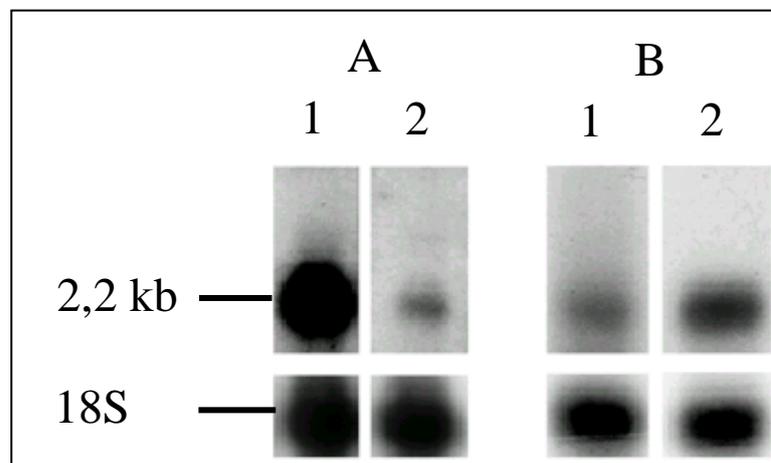


Figura 31. Análisis de la expresión mediante Northern de *PVAS2* en raíces de plantas tratadas con (A) sacarosa y (B) nitrato. (A) ARN total (15 μ g) fue extraído de plantas noduladas de cinco semanas cultivadas bajo condiciones normales (calle 1), y de raíces de plantas tratadas con sacarosa exógena (10 mM) durante 48 h (calle 2). (B) ARN total (15 μ g) fue extraído de raíces de plantas noduladas de cinco semanas cultivadas bajo condiciones normales (calle 1), y tratadas con 10 mM de KNO_3 durante 48 h (calle 2). Para detectar el ARNm de *PVAS2*, se utilizó un fragmento de 202 pb correspondiente al extremo 3' de región no codificante del ADNc del gen *PVAS2*. Como control se hibridó ARNr 18 S.

5.-Expresión y purificación de la proteína PVAS2

Para la clonación en fase del ADNc de PVAS2 en el vector de expresión pGEXKG, se diseñaron los oligonucleótidos AS22-5 (que contenía el sitio de unión a glutamina y un sitio 5' *EcoRI* para la clonación) y AS2-3 (que contenía región 3' hasta el codón de terminación y un sitio 5' *Sall* para la clonación). La PCR con estos oligonucleótidos rindió un ADNc de 1755 pb que fue aislado en un gel de agarosa y digerido con las enzimas *EcoRI* y *Sall*, para su posterior clonación en fase con el extremo C terminal de Sj26, una glutatión S-transferasa de 26 kDa (GST; EC 2.5.1.18). La expresión de la proteína de fusión se llevó a cabo según Smith y Johnson (1988). La proteína de fusión (GST-PVAS2) era soluble, encontrándose por tanto en el sobrenadante, asociada a una banda de 92 kDa en SDS-PAGE al 7,5% (Fig. 32).

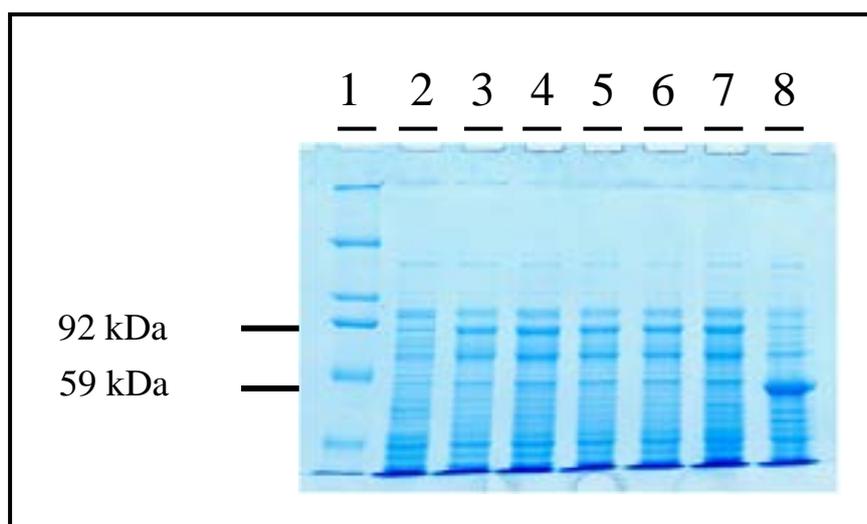


Figura 32. Detección de la proteína de fusión PVAS2-GST. Se indujo la proteína de fusión (92 kDa) con 0,2 mM de IPTG durante 3 h (calles 3 a 7). En la calle 8 se indujo, como control positivo, la asparraginasa de *Arabidopsis* (59 kDa). En la calle 2 se muestra un extracto de la estirpe BL 21 sin transformar.

Una vez comprobada la expresión de la proteína de fusión (PVAS2-GST), se procedió a su purificación mediante cromatografía de afinidad en glutatión-agarosa (Fig. 33). Para ello, el sobrenadante que contenía la proteína se mezcló con glutatión-agarosa, incubándose durante 30 min a 4°C. La elución de la proteína de fusión (PVAS2-GST) se realizó por competición con glutatión 10 mM, y posteriormente se incubó con trombina (2 mg de proteína de fusión se incubaron con 4 µg de trombina durante 20 min a temperatura ambiente). La GST y la proteína de fusión no lisada se

eliminaron mediante una segunda cromatografía en bath, añadiendo glutatión-agarosa a la reacción de rotura (ver Materiales y Métodos, apartado 20).

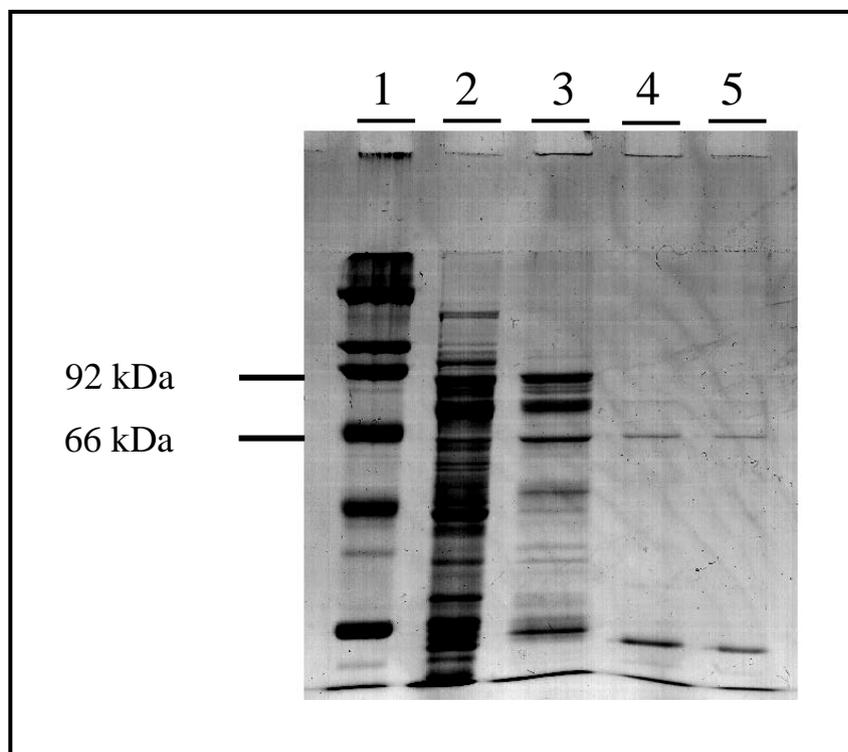


Figura 33. Proceso de purificación de la proteína PVAS2. En la calle 1 se cargó un marcador de peso molecular; en la 2 se cargó una parte alícuota del lisado obtenido tras la prensa de French; en la calle 3 se cargó una parte alícuota del extracto obtenido tras la primera cromatografía de afinidad y posterior elución con glutatión 10 mM; en la calle 4 se cargó una parte alícuota del sobrenadante obtenido tras la rotura con trombina y segunda cromatografía; como control positivo, se cargó en la calle 5 una parte alícuota de proteína pura obtenida en una purificación anterior.

6.-Análisis de expresión mediante *Western blot*

Una vez obtenida la proteína pura, se planteó la obtención de anticuerpos policlonales de conejo anti-PVAS2 con objeto de realizar un análisis del nivel total de proteína AS. El protocolo de inmunización seguido fue el descrito en Materiales y Métodos (apartado 22). El título 1/1000 se consideró el idóneo para estos experimentos.

6.1.- Estudios de la especificidad de los anticuerpos

Para comprobar si los anticuerpos anti-PVAS2 reconocían también otras AS o proteínas, se creció en medio mínimo la estirpe auxótrofa para la asparragina que contenía el ADNc de *PVAS1* clonado en fase en el vector pUC18. En la fase exponencial de crecimiento ($A_{550} = 0,5$) se cogieron las células y se añadió un volumen de tampón de Laemmli con SDS, lisando a continuación las células por calentamiento a 100 °C durante 10 min. Como control negativo se cogieron células en la misma fase de crecimiento de la estirpe auxótrofa para la asparragina transformada con pUC18 y, como control positivo, se cogieron células de la estirpe auxótrofa para la asparragina que contenía el ADNc de *PVAS2* clonado en fase en el vector pUC18. El resultado se muestra en la Fig. 34.

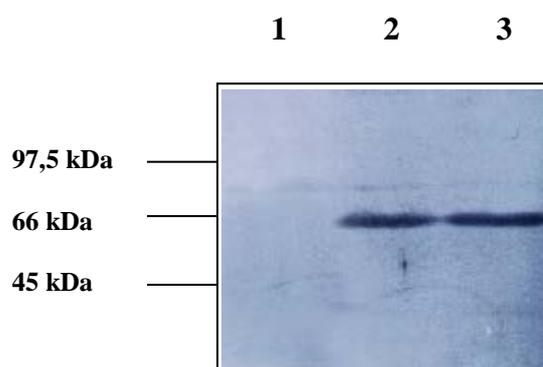


Figura 34. Inmunodetección de la proteína PVAS1 con anticuerpos policlonales anti-PVAS2. En la calle 1 se cargó proteína total procedente de un lisado de células de una estirpe auxótrofa para la asparragina (ER#4813) que contenían el plásmido pUC18. Estas células se cogieron en la fase exponencial de crecimiento ($A_{550}=0,5$) y se lisaron en tampón de Laemmli con SDS por calentamiento a 100 °C. En la calle 2 se cargó proteína total procedente de un lisado de células de la misma estirpe que contenía el ADNc de *PVAS1* clonado en fase en el vector plasmídico pUC18. En la calle 3 se cargó proteína total procedente de un lisado de células de la estirpe ya citada que contenían el ADNc de *PVAS2* clonado en fase en el vector plasmídico pUC18.

6.2.-Inmunodetección de AS en tejidos de *P. vulgaris*

En primer lugar, se analizó la presencia de AS en tejidos de plantas noduladas de cinco semanas cultivadas bajo un fotoperíodo normal de día largo. La extracción y cuantificación de la proteína se realizó como se ha descrito en Materiales y Métodos (apartado 23). Tras realizar la electroforesis en un gel de poliacrilamida desnaturalizante al 10%, se transfirió la proteína a una membrana de nailon y se detectó asparragina sintetasa utilizando los anticuerpos policlonales desarrollados contra PVAS2.



Figura 35. Análisis mediante Western en tejidos de *P. vulgaris*. N: nódulos; R: raíz; T: tallo; HD: hojas en desarrollo; HE: hojas expandidas; HS: hojas senescentes; F: flor; Fr: fruto.

Como se aprecia en la Fig. 35, se obtuvo la máxima acumulación de proteína PVAS2 en tejido de raíz, siendo mucho menor la cantidad detectada en hojas senescentes. Hay que señalar que, al tratarse de anticuerpos policlonales, la señal puede deberse a la existencia de ambas proteínas (PVAS1 y PVAS2). Si consideramos el patrón de expresión obtenido para estos genes mediante análisis Northern, vemos que en tejidos donde se da la máxima acumulación de transcrito también hay traducción a proteína. Es lógica la presencia de cierta cantidad de proteína en hojas senescentes, si consideramos que hay procesos de movilización de nitrógeno en dichos tejidos con objeto de reciclar la mayor cantidad posible de éste.

6.3.- Inmunodetección de AS en nódulos en desarrollo

Para estudiar el patrón de expresión de proteína AS a lo largo del proceso de desarrollo del nódulo hasta que adquiere funcionalidad con la fijación de nitrógeno, así como durante el proceso de senescencia del mismo, se aisló proteína total de tejido de nódulos de 3, 5, 7 y 9 semanas. Tras la cuantificación se realizó una SDS-PAGE al 10%, se transfirió la proteína a una membrana de nailon y se detectó asparragina sintetasa utilizando los anticuerpos policlonales desarrollados contra PVAS2.

Como puede observarse en la Fig. 36, el máximo nivel de proteína ocurre en nódulos en desarrollo de 3 semanas, mientras que resulta indetectable el nivel de proteína AS durante el período de senescencia nodular. Tampoco fue posible detectar proteína AS en nódulos funcionales de cinco semanas.

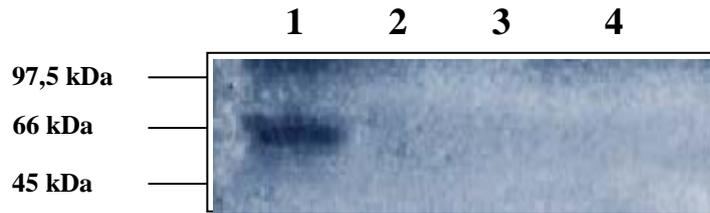


Figura 36. Análisis mediante Western en nódulos en desarrollo de *P. vulgaris*. En la calle número 1 se cargó proteína procedente de nódulos de 3 semanas a partir del día de inoculación del *Rhizobium*; en la calle número 2 se cargó proteína de nódulos de 5 semanas; en la calle número 3 se cargó proteína de nódulos de 7 semanas, y en la calle número 4 proteína de nódulos senescentes de 9 semanas.

6.4.-Efecto de la luz/oscuridad en la expresión de proteína AS

Para estudiar el efecto de la luz en la traducción de los genes *PVAS1* y *PVAS2*, plantas cultivadas en condiciones de luz continua durante cinco semanas fueron transferidas a oscuridad durante 12, 24 y 48 h, y luego se extrajo proteína de nódulos, raíz, tallo y hojas en cada punto. Tras la cuantificación se realizó una SDS-PAGE al 10%, se transfirió la proteína a una membrana de nailon, y se detectó asparagina sintetasa utilizando los anticuerpos policlonales desarrollados contra *PVAS2*. El resultado se muestra en la Fig. 37.



Figura 37. Análisis mediante Western del efecto de la luz/oscuridad sobre la expresión de la proteína *PVAS2* en nódulos y raíces de *P. vulgaris*. **N1:** proteína de nódulos de plantas sometidas a condiciones de luz continua durante cinco semanas; **N2:** proteína de nódulos transferidos a la oscuridad 12 h; **N3:** 24 h en oscuridad; **N4:** 48 h en oscuridad. **R1:** proteína de raíces de plantas sometidas a condiciones de luz continua durante cinco semanas; **R2:** proteína de raíces transferidas a la oscuridad 12 h; **R3:** 24 h en oscuridad y **R4:** 48 h en oscuridad.

En nódulos, no fue posible detectar expresión alguna de proteína *PVAS2* bajo ninguna de las condiciones de luz y oscuridad a que se sometieron las plantas. En raíces se pudo observar un cierto nivel de expresión de proteína AS en todos los estadios analizados, y resultó ligeramente menor el nivel de proteína total a las 12 h del

tratamiento de oscuridad, donde se observó precisamente el más bajo nivel de transcrito de los genes *PVAS1* y *PVAS2*. La regulación diferencial de *PVAS1* y *PVAS2* encontrada en el análisis transcripcional en el mismo experimento de luz/oscuridad podría responder a un mecanismo de respuesta rápida del cambio del nivel total de proteína. En el Western realizado con tallos y hojas de plantas sometidas a las mismas condiciones de luz/oscuridad, no fue posible detectar señal alguna de proteína en ninguna de las diferentes situaciones.

6.5.-Efecto de una fuente de carbono reducida y de nitrógeno inorgánico en la expresión de proteína AS

Para estudiar dicho efecto, plantas de cinco semanas cultivadas bajo un fotoperíodo normal de día largo se regaron con una solución de sacarosa 10 mM, y se tomaron muestras de tejido de nódulos y raíz a las 12, 24 y 48 h del tratamiento. De la misma forma, se llevó a cabo un tratamiento paralelo con una solución de KNO_3 10 mM, se tomaron muestras a las 12, 24 y 48 h del tratamiento, y se extrajo proteína de los mismos tejidos.

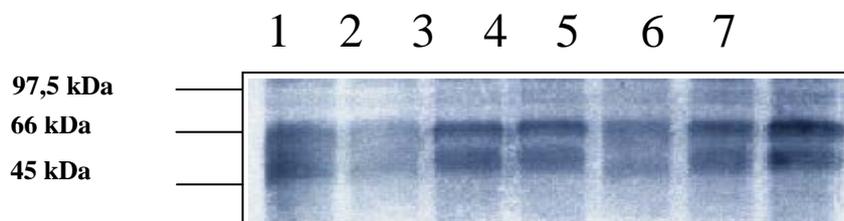


Figura 38. Análisis mediante Western de la regulación por sacarosa y nitrato de la expresión de PVAS2 en raíces de *P. vulgaris*. Se extrajo proteína de raíces de plantas noduladas de cinco semanas cultivadas bajo un fotoperíodo normal de día largo (calle 1), tratadas con una solución 10 mM de sacarosa durante 12 h (calle 2), 24 h (calle 3) y 48 h (calle 4). Del mismo modo, se realizó un tratamiento paralelo con una solución 10 mM de KNO_3 , y se tomaron muestras a las 12 h (calle 5), 24 h (calle 6) y a las 48 h (calle 7) del tratamiento.

Como se observa en la Fig. 38, hay un considerable incremento en la cantidad de proteína tras las 24 y 48 h del tratamiento con nitrato. Es una observación extendida que el aporte de una fuente de nitrógeno a una leguminosa ureida hace que ésta experimente un cambio de síntesis de ureidos a síntesis de amidas (Streeter *et al.*, 1988). Así pues, el nitrato provocaría un aumento significativo en la cantidad de enzima AS en raíces. La

adición de una fuente de carbono reducida afectaría en un menor grado al nivel de proteína total. La inmunodetección de una proteína de menor tamaño que responde de modo similar a la anterior a una fuente de carbono y nitrógeno hace pensar que se trate de un tercer tipo de proteína AS, aunque también podría tratarse de un producto de degradación.

7. Ensayo de actividad AS en geles nativos de poliacrilamida

Con objeto de detectar actividad AS, se obtuvieron extractos crudos de la estirpe de *E.coli* BL21 transformada con pGEXKG (como control) y de la misma estirpe transformada con el plásmido que expresaba la proteína de fusión GST-PVAS2. Una parte alícuota de cada extracto se cargó por triplicado en un gel nativo de poliacrilamida, dividiendo el gel en tres partes una vez desarrollada la electroforesis. Una parte se tiñó con azul de Coomassie, otra se incubó durante 1 h a 30 °C en una mezcla de reacción completa, y la última se incubó el mismo tiempo en una mezcla de reacción que no contenía ATP (ver Materiales y Métodos, apartado 24). Para detectar la actividad AS, se empleó el método del fosfomolibdato-ascorbato (Chen *et al.*, 1956). El resultado se muestra en la Fig. 39.

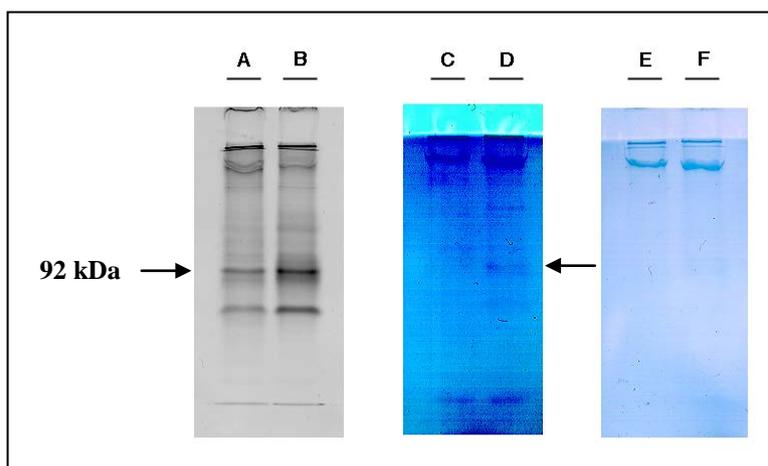


Figura 39. Detección de actividad AS en geles nativos de poliacrilamida por el método del fosfomolibdato-ascorbato. Se obtuvieron extractos de la estirpe transformada con pGEXKG (control) y de la estirpe transformada con el mismo plásmido que contenía clonado en fase el ADNc de PVAS2 con el extremo C terminal de Sj26, una glutatión S-transferasa de 26 kDa, expresando la proteína recombinante GST-PVAS2. Cada muestra se cargó por triplicado en un gel nativo de poliacrilamida al 7,5 %. Una parte (izquierda) se tiñó con azul de Coomassie; otra (central) se incubó en una mezcla completa de reacción, y la última (derecha) se incubó en una mezcla de reacción que no contenía ATP. En cada gel, las calles de la izquierda (A, C y E) contenían extractos control y las de la derecha (B, D y F) extractos con la proteína recombinante.

8.- Estudio de funcionalidad de PVAS1 y PVAS2

Con el fin de comprobar que las proteínas codificadas por los genes PVAS1 y PVAS2 son funcionales, se transformó la estirpe ER de *E. coli*, que es auxótrofa para la asparragina, con los plásmidos pUPVAS1 y pUPVAS2 (ver Materiales y Métodos, apartado 21) y pUC18, este último como control. Este auxótrofo presenta mutaciones en los dos genes de asparragina sintetasa de *E. coli* (*asnA* y *asnB*), por lo que ninguna de las dos asparragina sintetasa de la bacteria son funcionales. Esto hace que la estirpe ER necesite asparragina para crecer en medio mínimo. Como se muestra en la Fig. 40, la expresión de PVAS1 complementó la mutación, lo que significa que la proteína que produce *PVAS1* es una asparragina sintetasa funcional. La estirpe ER transformada con pUC18 creció suficientemente en medio suplementado con asparragina, mientras que en ausencia de dicho aminoácido el crecimiento fue muy pobre. Cuando esta estirpe se transformó con pUPVAS1 también creció, tanto en presencia como en ausencia de asparragina y/o IPTG. Por lo tanto, podemos concluir que se ha clonado la totalidad de la región codificante del ADNc del gen *PVAS1* y que la proteína es funcional en *E. coli*. Se puede observar que el crecimiento de UPVAS1 no se ve afectado por la presencia o ausencia de IPTG, ya que el sistema de represión no funciona debido a que la estirpe bacteriana no tiene el genotipo adecuado. En la Fig. 41 se observa que la estirpe ER transformada con pUPVAS2 también creció bien, tanto en presencia como en ausencia de asparragina y/o IPTG. Por lo tanto, se puede concluir que se ha clonado la totalidad de la región codificante del ADNc del gen *PVAS2* y que la expresión de PVAS2 complementó la mutación, lo que significa que la proteína que produce *PVAS2* es funcional en *E. coli*.

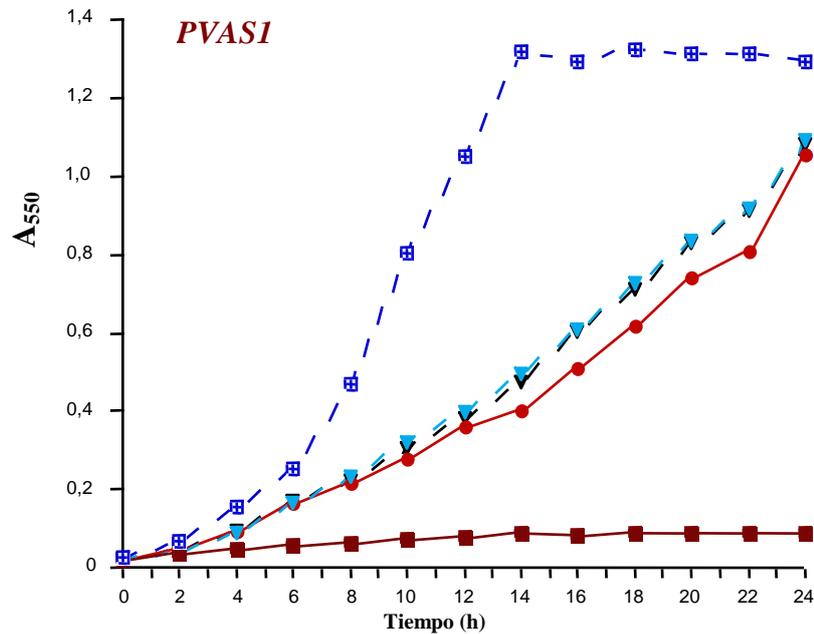


Figura 40. Estudio de complementación. Una estirpe auxótrofa para la asparagina (*E. coli* ER) se transformó con los plásmidos pUPVAS1 (UPVAS1) y pUC18 (ER/pUC18) como control. Se cultivaron en medio mínimo para bacterias con ampicilina, suplementado o no con IPTG (i) y/o asparagina (a). Estos cultivos se incubaron a 28 °C y se siguió su crecimiento midiendo la A_{550} a diferentes tiempos. UPVAS1-i-a (▼), UPVAS1+i-a (●), UPVAS1-i+a (▼), ER/pUC18-i-a (■), ER/pUC18-i+a (■).

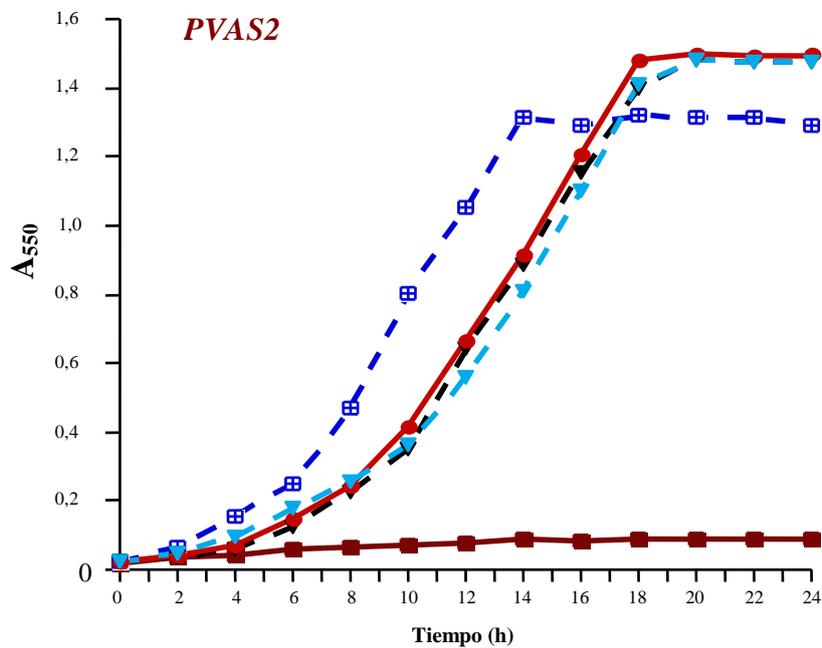


Figura 41. Estudio de complementación. La estirpe auxótrofa para la asparagina (*E. coli* ER) se transformó con los plásmidos pUPVAS2 (UPVAS2) y pUC18 (ER/pUC18) como control. Se cultivaron en medio mínimo para bacterias con ampicilina, suplementado o no con IPTG (i) y/o asparagina (a). Estos cultivos se incubaron a 28 °C y se siguió su crecimiento midiendo la A_{550} a diferentes tiempos. UPVAS2-i-a (▼), UPVAS2+i-a (●), UPVAS2-i+a (▼), ER/pUC18-i-a (■), ER/pUC18-i+a (■).

IV. DISCUSIÓN

En plantas superiores, la síntesis de asparragina a partir del ácido aspártico por la AS es la fuente más importante de asparragina, que tiene un papel fundamental en la movilización de nitrógeno. No obstante, una caracterización de la actividad AS resulta difícil debido a numerosos problemas derivados de la gran inestabilidad de la enzima *in vitro* (Huber y Streeter, 1985), y a la presencia de inhibidores y de actividad asparraginasa contaminante en extractos crudos (Joy y Ireland, 1983). A causa de las dificultades que conlleva un estudio bioquímico de la enzima, hemos decidido llevar a cabo una aproximación molecular y se han clonado y caracterizado los genes que codifican dicha enzima en judía.

Siguiendo una estrategia combinada de RT-PCR y escrutinio de genoteca genómica, se han podido aislar dos clones de ADNc completos, denominados pPVAS1 y pPVAS2, que contienen la región codificante de ambos genes. En pPVAS1, la presencia de un codón de terminación (TAG) localizado 21 nucleótidos secuencia arriba del codón de inicio y en el mismo marco de lectura, indica que la traducción no podría iniciarse más arriba y que pPVAS1 contiene la región codificante completa de un gen de AS (*PVAS1*). Del mismo modo, en pPVAS2, la presencia de un codón de terminación (TAA) localizado 12 nucleótidos secuencia arriba del codón de inicio y en el mismo marco de lectura, indica que pPVAS2 incluye la región codificante completa de un gen AS. Los parámetros moleculares de ambas proteínas son muy similares a los encontrados para otras asparragina sintetasas de plantas (Tsai y Coruzzi, 1990; Lam *et al.*, 1994; Waterhouse *et al.*, 1996; Hughes *et al.*, 1997; Kuester *et al.*, 1997).

En *E. coli* hay dos genes que codifican dos AS con diferente origen evolutivo: *asnA*, que codifica una AS dependiente de amonio (Nakamura *et al.*, 1981), y *asnB*, que codifica una AS dependiente de glutamina (Scofield *et al.*, 1990). En levaduras, la AS dependiente de amonio y la de glutamina son también codificadas por dos genes diferentes (Ramos *et al.*, 1980). Sin embargo, en plantas y animales, todas las AS que se han caracterizado a nivel bioquímico o molecular utilizan glutamina preferentemente (Sieciechowics *et al.*, 1988; Chevalier *et al.*, 1996). El análisis de la secuencia peptídica está de acuerdo con los datos bioquímicos, lo que revela que todas las AS clonadas de plantas son homólogas a la *asnB* de *E. coli*. Además, todas las AS dependientes de glutamina pertenecen a la clase Ntn de amidotransferasas, compartiendo una serie de residuos invariables con la glutamina fosforribosil amidotransferasa, la primera enzima

de la ruta de biosíntesis de purinas (Tso *et al.*, 1982; Zalkin *et al.*, 1998). Los motivos y residuos que han demostrado ser esenciales para la unión de aspartato y ATP en *asnB* de *E. coli* (Boehlein *et al.*, 1997; Richards, 1998) están conservados en *PVAS1*, *PVAS2* y otras AS de plantas, lo que aporta nuevas evidencias en apoyo de la función propuesta.

La conservación de todos los residuos importantes en *PVAS1* y *PVAS2* con una función conocida en la *asnB* de *E. coli*, junto con la elevada similitud de las secuencias aminoacídicas con otras AS de leguminosas ureidas, nos permite concluir que *PVAS1* y *PVAS2* representan asparragina sintetasas de tipo I y tipo II, respectivamente, ambas dependientes de glutamina.

La distinción llevada a cabo en dicotiledóneas entre genes AS de tipo I y de tipo II puede responder a varios factores como:

- Una diferente localización tisular. Estudios mediante hibridación *in situ* podrán confirmar o descartar esta posibilidad.

- Una diferente localización subcelular. Estudios realizados en nódulos de soja (Boland *et al.*, 1982) y en altramuz (Shelp *et al.*, 1984) demuestran que mientras la AS de soja se localiza en plastidios, la de altramuz es citosólica. Sin embargo, en la proteína no están presentes las secuencias correspondientes al péptido señal característico de proteínas cuyo destino final son orgánulos celulares.

- Una diferencia en los parámetros cinéticos de ambos tipos de AS que le permitiesen actuar diferencialmente en función de las concentraciones de sustrato, aunque se ha visto que las propiedades de la enzima de dos tipos de cotiledones de *lupinus* (Lea y Fowden, 1975; Rognes, 1975) y de nódulos de soja (Huber y Streeter, 1985) son bastante similares. En raíces de maíz, la enzima es capaz de usar amonio como sustrato, lo cual puede ser fisiológicamente importante en este tejido (Stulen *et al.*, 1979; Oaks y Ross, 1984). Una caracterización detallada de ambas enzimas permitirá conocer su funcionalidad.

El análisis mediante Southern de ADN genómico reveló que en *P. vulgaris* al menos dos genes formarían parte de la familia de genes AS, al igual que en soja (Hughes *et al.*, 1997), guisante (Tsai y Coruzzi, 1990), *Arabidopsis* (Lam *et al.*, 1994) y *lotus* (Waterhouse *et al.*, 1996). La búsqueda de un tercer gen AS en *P. vulgaris* se ha llevado a cabo sin éxito y, si existe, parece expresarse a niveles mucho menores que *PVAS1* y *PVAS2*. También es curioso que ninguno de los promotores de los genes *AS1* y *AS2* de

guisante se expresen en células del mesófilo de hojas maduras (Ngai *et al.*, 1997), donde se relacionó la asparragina con la fotorespiración (Lea y Miñin, 1980). Aunque estos genes constituyen los dos únicos para AS de guisante detectados mediante análisis Southern y análisis del ADNc (Tsai y Coruzzi, 1990), cabe la posibilidad de que en el guisante, así como en otras leguminosas, existan otros genes AS menos homólogos que se expresen en las células del mesófilo.

En *Arabidopsis* se han identificado tres genes que codifican asparragina sintetasas, dos de las cuales (*ASN2* y *ASN3*) parecen agrupados filogenéticamente con los de monocotiledóneas. Teniendo en cuenta que las AS de monocotiledóneas pueden utilizar como sustrato amonio, además de glutamina, *ASN2* y *ASN3* podrían codificar enzimas similares a éstas, que presentan mayor afinidad por el amonio que las AS de dicotiledóneas. Si esto fuese así, no podría descartarse que en el resto de las dicotiledóneas también existiesen asparragina sintetasas con esta capacidad.

El análisis de la expresión mediante Northern mostró que el nivel estacionario de ARNm de *PVAS1* y de *PVAS2* es mayor en tejido de raíz, mucho menor en frutos en desarrollo, e indetectable en tallo, hojas y flores de plantas noduladas de judía cultivadas bajo un fotoperíodo normal de día largo. Además se detectó un significativo nivel de expresión de *PVAS2* en nódulos de cinco semanas. Este patrón de expresión es similar al encontrado en otras leguminosas donde el mayor nivel de expresión AS se da en tejido de raíz. No obstante, en soja, otra leguminosa ureida, ambos genes AS (*SAS1* y *SAS2*) se expresan en un nivel parecido en tallo y raíz (Hughes *et al.*, 1997). Desafortunadamente, no se dispone de datos sobre el nivel de expresión de ARNm de AS en nódulos y frutos en desarrollo de soja, aunque se ha detectado actividad AS y se ha purificado parcialmente de nódulos radicales de soja (Huber y Streeter, 1985). El patrón de expresión encontrado en órganos es consistente con el papel fisiológico de la asparragina sintetasa, la cual es responsable de la síntesis de un aminoácido de almacenamiento y transporte. En frutos en desarrollo, el nitrógeno es conducido bajo la forma de asparragina desde la pared del ovario a la semilla en maduración, donde se sintetizan las proteínas de almacenamiento (Rouchat y Boutin, 1989). Sorprende detectar expresión de AS en nódulos de una leguminosa ureida, la cual exporta el nitrógeno fijado fundamentalmente en forma de ureidos (alantoína y ácido alantoico) (Lea y Miñin, 1991). La presencia de AS en nódulos fijadores de una planta ureida

podría interpretarse como una nueva evidencia a favor de la idea del carácter mixto de plantas ureidas y amidas. Esto también significaría que la abundancia relativa de ureidos y amidas en la savia xilemática está influenciada por factores nutricionales y ambientales, aparte de estar genéticamente determinada. Sin embargo, la máxima acumulación de transcrito *PVAS2* y de proteína *PVAS2* se detectó en nódulos en desarrollo de 3 semanas. En esta etapa del desarrollo nodular la expresión del gen de la asparragina sintetasa puede estar relacionada con el requerimiento de asparragina para el crecimiento nodular más que con el proceso de fijación de nitrógeno.

La expresión de *PVAS1* y *PVAS2* en cotiledones está relacionada con los procesos desencadenados durante la germinación. Durante esta etapa del ciclo de vida de la planta, se produce la movilización de nutrientes desde los cotiledones hasta los nuevos órganos en desarrollo. El nitrógeno almacenado en los cotiledones se moviliza principalmente en forma de asparragina o glutamina. A medida que la planta comienza a desarrollarse, avanzando hasta la etapa de madurez, los cotiledones van perdiendo su función como fuente de nutrientes, a la vez que van activándose numerosas enzimas en la planta. A los diez días ya se detecta la expresión de *PVAS1* y *PVAS2* en tejido de raíz.

PVAS1 y *PVAS2* están regulados por luz de forma diferente. En raíces de judía, se observó un nivel constitutivo de transcrito *PVAS1* en las diferentes etapas del tratamiento luz/oscuridad mientras que la acumulación de ARNm de *PVAS2* parece estar reprimida por luz. Se observó un incremento significativo en el nivel estacionario de ARNm de *PVAS2* 24 h después de transferir las plantas a condiciones de oscuridad. El análisis mediante Western, empleando anticuerpos policlonales, ha revelado un nivel constante de proteína en cada punto del tratamiento de luz-oscuridad en raíces de judía, lo que sugiere un nivel constante de actividad. Quizás esta regulación diferencial de *PVAS1* y *PVAS2* proporcione un mecanismo fino de regulación para mantener un nivel estacionario de actividad AS, en el caso de que ambos genes tengan funciones redundantes. Una regulación directa por luz de la expresión del gen AS se ha descrito en guisante y órganos aéreos de soja, así como en plántulas de *Arabidopsis*, donde parece ser que el fitocromo es un mediador del proceso de represión (Lam *et al.*, 1994). En *Arabidopsis* se ha estudiado recientemente el efecto de la luz sobre los niveles de ARNm *ASN1* y *ASN2* (Lam *et al.*, 1998), y se ha visto que el ARNm *ASN1* se acumula hasta unos niveles elevados en plantas adaptadas a la oscuridad, mientras que los

niveles de ARNm *ASN2* son mucho más bajos. La exposición a luz media un rápido y dramático descenso en los niveles de ARNm *ASNI*, los cuales son casi indetectables después de sólo dos horas de tratamiento de luz. En contraste, los niveles de ARNm *ASN2*, que son extremadamente bajos en plantas adaptadas a la oscuridad (48 h), se incrementan rápidamente después de tan sólo una hora de tratamiento de luz e incrementan a niveles máximos a las 16 h. La luz podría ejercer este efecto sobre la transcripción de *ASNI* directamente vía fotorreceptor y, alternativamente, también podría ejercer este efecto indirectamente, alterando el “pool” metabólico de esqueletos carbonados generados durante la fotosíntesis. No obstante, se ha comprobado que el efecto directo de la luz, vía fitocromo, sobre la transcripción de *ASNI* ocurre dentro de un pequeño período de tiempo (3-6 h) y, a partir de aquí, parece tener un significado fisiológico. Cómo el fitocromo media la regulación por luz de la expresión del gen es todavía una cuestión abierta para aquellos genes regulados positivamente por luz (por ejemplo *rbcS*) (Quail, 1991). Un reciente estudio sugiere que parece estar implicada una proteína que une nucleótidos de guanina (Romero y Lam, 1993).

La represión de *PVAS2* por luz en raíces no parece ser un proceso regulador directo. Además de los efectos mediados por fitocromo, se ha demostrado que la luz ejerce un efecto indirecto sobre la expresión del gen *AS* asociado a cambios en metabolitos de carbono. Bajo condiciones de luz, el nitrógeno se asimila en forma de glutamina y glutamato, metabólicamente activos a través del ciclo GS-GOGAT, y tanto la glutamina como el glutamato son transportados para su uso en reacciones anabólicas (Lam *et al.*, 1996). En la transición a oscuridad, la ausencia de fotosíntesis tiene un efecto dramático sobre la disponibilidad de carbono, que se extiende por toda la planta. Cuando los esqueletos carbonados llegan a ser limitantes, el almacenamiento de nitrógeno como asparragina vía *AS* se favorece sobre la base del mayor contenido de nitrógeno por molécula y la mayor solubilidad y estabilidad química de la asparragina comparada con la glutamina (Lea *et al.*, 1991).

En *L. japonicus* no hay evidencias que apoyen un modelo específico de acumulación de transcrito *AS* en condiciones de oscuridad, como se ha descrito para guisante (Waterhouse *et al.*, 1996). Esto sugiere que estos dos miembros de la familia de leguminosas, especies asimiladoras de N, pueden operar de diferentes maneras, a pesar del hecho de que los análisis de la secuencia de ADN mostraron un alto nivel de

identidad, en particular con las secuencias del gen *LJAS2* de *L. japonicus* y el gen *ASI* de guisante. En raíces de *L. japonicus* se detectaron altos niveles de ambos transcritos *LJAS1* y *LJAS2* a lo largo de todo el día, mientras que en raíces de guisante, aunque el transcrito *AS2* se expresa constitutivamente a lo largo de todo el día, sólo podía detectarse expresión del transcrito *ASI* en iluminación cuando se tomaban precauciones para que la luz no penetrase la superficie del suelo. Después de prolongados períodos de oscuridad (2-3 días), parece disminuir la abundancia relativa de transcrito *AS* en raíces de *L. japonicus*. En espárrago, los niveles de ARNm de *AS* aumentaron en ápices recolectados, un proceso independiente de la luz que va paralelo a una disminución del contenido en azúcar (Davies y King, 1993).

Resultados preliminares muestran cierto nivel de transcrito de *PVAS1* en hojas senescentes de *P. vulgaris* sometidas a condiciones de luz continua, hecho que puede deberse a una movilización de nitrógeno para su reciclaje más que a una consecuencia de procesos secundarios relacionados con la recuperación de amonio producido durante la fotorrespiración, ya que no se observa expresión alguna en hojas jóvenes sometidas a las mismas condiciones de luz. En hojas jóvenes se detectó un leve nivel de transcrito de *PVAS1* tras someter las plantas a un período de oscuridad de 48 h.

La expresión de ARNm de *PVAS2* detectada en tejido de tallo sometido a condiciones de oscuridad durante 24 h viene a confirmar que las propias células del tejido floemático sintetizan asparragina en un proceso de transporte a favor de gradiente, justo cuando se alcanzan los niveles máximos de expresión de transcrito *PVAS2* en raíces. Se ha observado que los promotores de los genes *ASI* y *AS2* de guisante presentan la capacidad de conferir expresión GUS en tejido vascular, principalmente en el floema de cotiledones, hojas, tallos y raíces (Ngai *et al.*, 1997). Este patrón de expresión específica de células, determinado por ambos promotores, proporciona evidencias sobre el mecanismo de la AS en plantas. Estudios fisiológicos han demostrado que la asparragina se transporta en el floema y este transporte sigue la regla de “fuente a sumidero” (Sieciechowicz *et al.*, 1988). La asparragina sintetizada en los tejidos que actúan como fuente se vierte a los elementos vasculares para su transporte hacia los tejidos sumidero como pueden ser hojas en desarrollo, raíces, frutos en desarrollo y semillas (Dilworth y Dure, 1978). Los estudios llevados a cabo mediante fusiones de los promotores de la *ASI* y *AS2* de guisante con el gen delator GUS han

demostrado que parte de la asparragina transportada por los elementos vasculares de la planta se sintetiza en las células del floema *in situ*.

La expresión de *PVASI* no parece reprimirse por la luz. No es extraño encontrar asparragina sintetasa en estas condiciones, ya que la asparragina también es necesaria durante el crecimiento en luz para la síntesis de proteínas y otros aspectos fisiológicos del desarrollo de la planta relacionados con la luz. Una de las posibles funciones de *PVASI* puede estar relacionada con la detoxificación de amonio. La síntesis de asparragina puede ser inducida en plantas cultivadas en luz cuando los niveles de amonio son elevados (Lam *et al.*, 1998), por lo que el almacenamiento de nitrógeno en forma de asparragina en estas condiciones podría ser un mecanismo de detoxificación de amonio análogo a la producción de urea en animales. Esta sugerencia ha sido propuesta para varias especies (Kanamori y Matsumoto, 1974; Givan *et al.*, 1979; Stewart, 1979).

Además de este papel propuesto en la detoxificación de amonio, se ha sugerido que la asparragina pueda jugar otro papel en el proceso fotorrespiratorio (Sieciechowics *et al.*, 1988). La asparragina actuaría como un donador de nitrógeno (alternativo al glutamato) en una reacción de transaminación que resultaría en la conversión de glioxilato a glicina en células del mesófilo de la hoja (Ta *et al.*, 1984).

Cuando a las plantas se les suministró una fuente de carbono reducido (10 mM de sacarosa), el nivel estacionario de ARNm de *PVASI* y *PVAS2* disminuyó en raíces noduladas de judía. En los últimos años se ha discutido acerca de la posible interrelación entre el control por luz de la expresión del gen y la regulación metabólica por azúcares (Jang y Sheen, 1994). De hecho, se sabe que la sacarosa simula el efecto de la luz sobre la expresión de otros genes del metabolismo del nitrógeno como nitrato reductasa (NR), glutamina sintetasa (GS2), glutamato sintasa (GOGAT) y glutamato deshidrogenasa (GDH) (Cheng *et al.*, 1992; Crawford y Arst, 1993; Lam *et al.*, 1996). El hecho de que la asimilación de nitrógeno esté regulada por el nivel de carbono implica la existencia de una estrecha interrelación entre el metabolismo del carbono y del nitrógeno. Tras varios estudios del control metabólico por azúcares de genes implicados en la fotosíntesis y el metabolismo del carbono (Sheen, 1990; Jang y Sheen, 1994; Sheen, 1994), se ha propuesto que la enzima hexoquinasa podría actuar como un sensor de la disponibilidad de carbono (Jang y Sheen, 1994).

La adición de una fuente de nitrógeno inorgánico (10 mM de KNO_3) al medio indujo significativamente la acumulación de ARNm de *PVAS1* y *PVAS2* en raíces de plantas noduladas tras 48 h. Se sabe que la fertilización con una fuente de nitrógeno inorgánico inhibe la fijación de N_2 en nódulos radicales. En estas condiciones, la disminución de la concentración xilemática de ureidos es paralela a la inhibición de la fijación de N_2 en leguminosas ureidas, incluida *P. vulgaris* (Rice *et al.*, 1990). En una leguminosa ureida como soja, la adición de nitrógeno inorgánico causó una disminución del 75% de la actividad PRAT (fosforribosil amidotransferasa), la enzima que cataliza el paso limitante en la biosíntesis de purinas, precursores de los ureidos (Reynolds *et al.*, 1984). Se ha observado que leguminosas ureidas tratadas con nitrato experimentan un cambio de síntesis de ureidos a síntesis de amidas (Schubert, 1986). El nitrato constituye una importante señal reguladora de la asimilación de nitrato, y las plantas responden a este nitrato con una inducción de la expresión de muchos genes, incluidos aquellos que codifican para la NR, GS y GOGAT. Aunque el estudio de la regulación por nitrato permitió la identificación de varios genes reguladores que intervienen en el proceso de inducción, ninguno de ellos se ha encontrado en plantas (Crawford, 1995). En la región promotora del gen *PVAS1* de *P. vulgaris*, se ha encontrado un motivo de secuencia que regula la transcripción dependiente de nitrato en plantas (Hwang *et al.*, 1997). Este motivo está presente en promotores de genes que codifican para la nitrato reductasa (NR) y nitrito reductasa (NiR) de diversas plantas como *Arabidopsis*, *Nicotiana*, maíz, espinaca, tomate, arroz y cebada.

La regulación metabólica de la expresión del gen *AS* por el balance C:N se ha estudiado en puntas de raíces en maíz (Chevalier *et al.*, 1996), plántulas de *Arabidopsis* (Lam *et al.*, 1994) y brotes de espárragos recolectados (Davies y King, 1993). El balance C:N se considera en la actualidad la llave en el estudio del metabolismo conjunto del carbono y del nitrógeno, y también en el estudio del sistema simbiótico *Rhizobium*/leguminosa. En diferentes contextos metabólicos donde se integran el metabolismo del carbono y del nitrógeno, la glutamina se ha propuesto como una señal metabólica clave. En guisante, se ha sugerido que la glutamina sintetizada por la GS actúa como un inductor de la expresión del gen de la *AS* en cotiledones de plántulas en germinación y en nódulos (Tsai y Coruzzi, 1990).

El análisis de la región promotora del gen de la asparragina sintetasa de tipo I nos ha conducido a la identificación de una serie de motivos responsables de la regulación de dicho gen cuando se somete a determinadas condiciones metabólicas (Fig. 23B). Ello nos permitirá también el estudio de los factores moleculares responsables de la integración y correulación de la biosíntesis de ureidos y amidas en raíces de leguminosas. Análisis histoquímicos de actividad GUS, realizados con construcciones del promotor de la *AS1* y *AS2* de guisante en plantas de tabaco transgénicas (Ngai *et al.*, 1997), han revelado que ambos promotores confieren el mismo patrón de expresión específica de órganos. No obstante, el promotor del gen *AS1* resultó ser más robusto en todos los transformantes estudiados. Los análisis de retardo en gel mostraron que los dos mayores complejos ADN/proteína implicaban las cajas B, C y C' de la región promotora y el fragmento de promotor que las contenía presentaba por sí mismo la capacidad de conferir regulación negativa por luz. Los factores de unión a las cajas B, C y C' están presentes en los extractos de plantas adaptadas tanto a la luz como a la oscuridad. No obstante, en condiciones de luz, se modifica la proteína(s) de unión a la caja B, observándose como el complejo B se altera en movilidad en plantas crecidas en luz comparado a aquéllas adaptadas a oscuridad. Esto sugiere que tiene lugar una modificación inducida por luz de la proteína que se une a la caja B, o bien que ocurre una modificación inducida por luz de una proteína que se une a la proteína de unión a la caja B. Además, pueden estar implicadas en el proceso de represión la proteína nuclear que se une a las cajas C y C', y compite por la unión con RE1, un elemento represor definido en un gen de fitocromo de la avena (Bruce *et al.*, 1991). La caja C está próxima en la región 5' de la caja TATA, situación típica para un represor clásico que interfiere con la unión de la ARN polimerasa en bacterias (McClure, 1985). En el promotor del gen *PVAS1* (*AS* de tipo I) de judía se encuentran conservadas la caja TATA (en la posición -55) y las cajas B y C, mostrando un considerable nivel de variabilidad la caja C'. La variabilidad en este elemento, que podría evitar el reconocimiento de los factores moleculares responsables de la represión por luz, así como la no modificación de la proteína(s) de unión a la caja B, podría ser responsable del efecto inductor o no represor de la luz. Además las cajas C y C' podrían competir en la unión de proteínas nucleares, dando una gran variabilidad en el modo de regulación. La caja A parece ser un elemento transcripcional implicado en la expresión basal, ya que una delección que abarcaba esta

caja (conservada en los promotores de la *AS1* y *AS2* de guisante, en el promotor de la *AS1* de *P. vulgaris*, así como en el promotor de un gen de fitocromo en guisante) afectó a los niveles de expresión de ambos genes (GUS) en condiciones tanto de luz como de oscuridad (Ngai *et al.*, 1997).

En un futuro se pretende llevar a cabo un análisis de la región promotora del gen *PVAS1*. Ello permitirá abordar el estudio de los factores moleculares responsables de la integración y correulación de las rutas de biosíntesis de ureidos y amidas en nódulos de judía. Asimismo, se realizará una caracterización físico-química y cinética del enzima.

V. CONCLUSIONES

I. Los genes *PVAS1* y *PVAS2* de *Phaseolus vulgaris* codifican asparragina sintetasas de tipo I y II, ambas dependientes de glutamina.

II. La complementación de una estirpe de *E. coli* auxótrofa para la asparragina con *PVAS1* o *PVAS2* confiere a las células la capacidad de crecimiento en medio mínimo sin asparragina; ello demuestra que *PVAS1* y *PVAS2* codifican sendas asparragina sintetasas.

III. El promotor de *PVAS1* contiene motivos de secuencias relacionadas con la regulación por luz también presentes en el promotor del gen *ASI* de guisante. Además contiene otros motivos necesarios relacionados con la regulación por nitrato.

IV. *PVAS1* y *PVAS2* se expresan mayoritariamente en raíces, y en mucha menor medida en plántulas, cotiledones en germinación y frutos en desarrollo.

V. *PVAS2* se expresa en nódulos en las etapas tempranas del desarrollo antes de que este adquiera capacidad fijadora de nitrógeno. Esto sugiere que la expresión de *PVAS2* está relacionada con la síntesis de asparragina necesaria para la formación y desarrollo nodular y no para la exportación de nitrógeno hacia las partes aéreas de la planta.

VI. La expresión de *PVAS2* en raíces de judía está fuertemente reprimida por la luz mientras que la *PVAS1* no. Esta diferente regulación por luz podría responder a un mecanismo fino de cambio rápido del nivel total de asparragina sintetasa.

VII. La expresión de *PVAS1* y *PVAS2* está regulada metabólicamente por la relación C/N.

VI. BIBLIOGRAFÍA

Alderson A, Sabelli PA, Dickinson JR, Cole D y Richardson M (1991) Complementation of *snf1*, a mutation affecting global regulation of carbon metabolism in yeast, by a plant protein kinase cDNA. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**, 8602-8605

Atkins CA, Ritchie A, Rowe PB, McCairns E y Sauer D (1982) *De novo* purine synthesis in nitrogen-fixing nodules of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) and soybean (*Glycine max* L. Merr). *Plant Physiol* **70**, 55-60

Bauer WD y Caetano-Anollés G (1991) Chemotaxis, induced gene expression and competitiveness in the rhizosphere. En *The Rhizosphere and Plant Growth*, (DL Keister y PB Cregan eds.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 155-162

Blumenthal-Goldschmidt S, Buttler GW y Conn EE (1963) Incorporation of hydrocyanic acid labelled with carbon-14 into asparagine in seedlings. *Nature* **197**, 718-719

Boehlein SK, Walworth ES, Richards NGJ y Schuster SM (1997a) Mutagenesis and chemical rescue indicate residues involved in beta-aspartyl-AMP formation by *Escherichia coli* asparagine synthetase B. *J Biol Chem* **272**, 12384-12392

Boehlein SK, Walworth ES y Schuster SM (1997b) Identification of cysteine-523 in the aspartate binding site of *Escherichia coli* asparagine synthetase B. *Biochemistry* **36**, 10168-10177

Boland MJ, Fordyce AM y Grennwood RM (1978) Enzymes of nitrogen metabolism in legume nodules: A comparative study. *Aust J Plant Physiol* **5**, 553-559

Boland MJ, Hanks JF, Reynolds PHS, Blevins DG, Tolbert NE y Schubert DR (1982) Subcellular organization of ureide biogenesis from glycolytic intermediates and ammonium in nitrogen-fixing soybean nodules. *Planta* **155**, 45-51

Bradley DJ, Wood EA, Larkins AP, Galfre G, Butcher GW y Brewin NJ (1988) Isolation of monoclonal antibodies reacting with peribacteroid membranes and other components of pea root nodules containing *Rhizobium leguminosarum*. *Planta* **173**, 149-160

Bruce WB, Deng XW y Quail PH (1991) A negatively acting DNA sequence element mediates phytochrome-directed repression of *phyA* gene transcription. *EMBO J* **10**, 3015-3024

Bustos MM, Guiltianan MJ, Jordano J, Begum D, Kalkan FA y Hall TC (1989) Regulation of β -glucuronidase expression in transgenic tobacco plant by an A/T-rich, cis-acting sequence found upstream of a french bean β -faseolin gene. *Plant Cell* **1**, 839-853

Castric PA, Farnden KJ y Conn EE (1972) Cyanide metabolism in higher plants. V. The formation of asparagine from cyanoalanine. *Arch Biochem Biophys* **152**, 62-69

Cedar H y Schwartz JH (1969) The asparagine synthetase of *Escherichia coli* I. Biosynthetic role of the enzyme, purification, and characterization of the reaction products. *J Biol Chem* **244**, 4112-4121

Cedar H y Schwartz JH (1969) The asparagine synthetase of *Escherichia coli* II. Studies on mechanism. *J Biol Chem* **244**, 4122-4127

Chen PS, Toribara TY y Warner H (1956) Microdetermination of Phosphorus. *Anal Chem* **28**, 1756

Cheng CL, Acedo GN, Cristinsin M y Conkling MA (1992) Sucrose mimics the light induction of *Arabidopsis* nitrate reductase gene transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**, 1861-1864

Chevalier C, Bourgeois E, Just D y Raymond P (1996) Metabolic regulation of asparagine synthetase gene expression in maize (*Zea mays* L.) root tips. *Plant J* **9**, 1-11

Chory J (1993) Out of darkness: mutants reveal pathways controlling light-regulated development in plants. *Trends Genet* **9**, 167-172

Church GM y Gilbert W (1984) Genomic sequencing. *Proc Natl Acad Sci USA* **81**, 1991-1995

Conn EE (1981) Cyanogenic glycosides. En *The Biochemistry of Plants*, (PK Stumpf y EE Conn, eds.), Academic Press, New York, 479-500

Crawford NM y Arst HN Jr (1993) The molecular genetics of nitrate assimilation in fungi and plants. *Annu Rev Genet* **27**, 115-146

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

Date RA (1973) Nitrogen, a major limitation in the productivity of natural communities, crops and pastures in the Pacific area. *Soil Biol Biochem* **5**, 5-18

Davies KM y King GA (1993) Isolation and Characterization of a cDNA Clone for a Harvest-Induced Asparagine Synthetase from *Asparagus officinalis* L. *Plant Physiol* **102**, 1337-1340

Dilworth MF y Dure L III (1978) Developmental biochemistry of cotton seed embryogenesis and germination. X. Nitrogen flow from arginine to asparagine in germination. *Plant Physiol* **61**, 698-702

Egeraat AWSM (1975) The possible role of homoserine in the development of *Rhizobium leguminosarum* in the rhizosphere of pea seedlings. *Plant Soil* **42**, 381-386

Ertel IJ, Nesbit MB, Hammon D, Weiner J y Sather H (1979) Effective dose of L-asparaginase for induction of remission in previously treated children with acute lymphocytic leukemia: a report from Childrens Cancer Study Group. *Cancer Res* **39**, 3893-3896

Evans HJ, Harker AR, Papen H, Russell SA, Hanus FJ y Zuber M (1987) Physiology, biochemistry, and genetics of the uptake hydrogenase in rhizobia. *Ann Rev Microbiol* **41**, 335-361

Forde BG, Freeman J, Oliver JE y Pineda M (1990) Nuclear factors interact with conserved A/T-rich elements upstream of a nodule-enhanced glutamine synthetase gene from French bean. *Plant Cell* **2**, 925-939

Givan CV (1979) Metabolic detoxification of ammonia in tissues of higher plants. *Phytochemistry* **18**, 375-382

Gong SS y Basilico C (1990) A mammalian temperature-sensitive mutation affecting G1 progression results from a single amino acid substitution in asparagine synthetase. *Nucleic Acids Res* **18**, 3509-3513

Groat RG y Vance CP (1981) Root nodule enzymes of ammonia assimilation in alfalfa (*Medicago sativa* L.). Developmental pattern and response to applied nitrogen. *Plant Physiol* **67**, 1198-1203

Guan KL y Dixon JE (1991) Eukaryotic Proteins Expressed in Escherichia coli: An Improved Thrombin Cleavage and Purification Procedure of Fusion Proteins with Glutathione S-Transferase. *Anal Biochem* **192**, 262-267

Guerrero MG, Vega JM y Losada M (1981) The assimilatory nitrate-reducing system and its regulation. *Ann Rev Plant Physiol* **32**, 169-204

Guerrini L, Gong SS, Mangasarian K y Basilico C (1993) Cis- and trans-acting elements involved in amino acid regulation of asparagine synthetase gene expression. *Mol Cell Biol* **13**, 3202-3212

Hardy RWF y Havelka UD (1975) Nitrogen fixation research: A key to world food. *Science* **188**, 633-643

Hinchman SK y Schuster SM (1992) Overproduction, preparation of monoclonal antibodies and purification of *E. coli* asparagine synthetase A. *Protein Eng* **5**, 279-283

Hinchman SK, Henikoff SA y Schuster SM (1992) A relationship between asparagine synthetase A and aspartyl tRNA synthetase. *J Biol Chem* **267**, 144-149

Horowitz B y Meister A (1972) Glutamine-dependent asparagine synthetase from leukemia cells: chloride dependence, mechanism of action and inhibition. *J Biol Chem* **247**, 6708-6719

- Huber TA y Streeter JG** (1984) Asparagine biosynthesis in soybean nodules. *Plant Physiol* **74**, 605-610
- Huber TA y Streeter JG** (1985) Purification and properties of asparagine synthetase from soybean root nodules. *Plant Sci* **42**, 9-17
- Hubert R y Simoni RD** (1980) Genetic and biochemical studies demonstrating a second gene coding for asparagine synthetase in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **142**, 212-220
- Hucklesby DP, Dowling MJ y Hewitt EJ** (1982) Cyanide formation from glyoxylate and hydroxylamine catalyzed by extracts of higher-plant leaves. *Planta* **156**, 487-491
- Hughes CA, Beard HS y Matthews BF** (1997) Molecular cloning and expression of two cDNAs encoding asparagine synthetase in soybean. *Plant Mol Biol* **33**, 301-311
- Hutson RG, Kitoh T, Moraga Amador DA, Cosic S, Schuster SM y Kilberg MS** (1997) Amino acid control of asparagine synthetase: relation to asparaginase resistance in human leukemia cells. *Am J Physiol* **272**, 1691-1699
- Hwang CF, Lin Y, D'Souza T y Cheng CL** (1997) Sequences necessary for nitrate-dependent transcription of *Arabidopsis* nitrate reductase genes. *Plant Physiol* **113**, 853-862
- Ireland RJ y Joy KW** (1985) Plant transaminases. En *Transaminases*, (P Christen y DE Metzler, eds.), John Wiley & Sons, New York, 376-384
- Jang JC y Sheen J** (1994) Sugar sensing in higher plants. *Plant Cell* **6**, 1665-1679
- Joy KW, Ireland RJ y Lea PJ** (1983) Asparagine synthesis in pea leaves and the occurrence of an asparagine synthetase inhibitor. *Plant Physiol* **73**, 165-168
- Kanamori T y Matsumoto H** (1974) Asparagine biosynthesis by *Oriza sativa* seedlings. *Phytochemistry* **13**, 1407-1412
- Kern R y Chrispeels MJ** (1978) Influence of the Axis on the Enzymes of Protein and Amide Metabolism in the Cotyledons of Mung Bean Seedlings. *Plant Physiol* **62**, 815-819
- Kijne JW, Díaz CL, de Pater BS, Smit G, Bakhuizen R y Lugtenberg BJJ** (1990) Surface interactions between rhizobia and legume root hairs. En *Nitrogen Fixation: Achievements and Objectives*, (PM Gresshoff, LE Roth, G Stacey y WE Newton eds.), Chapman y Hall, Nueva York, 239-244
- Kim JH, Delauney AJ y Verma DPS** (1995) Control of de novo purine biosynthesis genes in ureide-producing legumes: induction of glutamine phosphoribosylpyrophosphate amidotransferase gene and characterization of its cDNA from soybean and *Vigna*. *Plant J* **7**, 77-86

- King GA, Woollard DC, Irving DE y Borst WE** (1990) Physiological changes in asparagus spear tips after harvest. *Plant Physiol* **80**, 393-400
- Kornfeld R y Kornfeld S** (1985) Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Ann Rev Biochem* **54**, 631-664
- Kuester H, Albus U, Fruehling M, Tchetskova SA, Tikhonovitch IA, Puehler A y Perlick AM** (1997) The asparagine synthetase gene *VfASI* is strongly expressed in the nitrogen-fixing zone of broad bean (*Vicia faba* L.) root nodules. *Plant Sci* **124**, 89-95
- Lam HM, Peng SSY y Coruzzi GM** (1994) Metabolic Regulation of the Gene Encoding Glutamine-Dependent Asparagine Synthetase in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* **106**, 1347-1357
- Lam HM, Coschigano KT, Schultz C, Melo-Oliveira R, Tjaden G, Oliveira IC, Ngai N, Hsieh MH y Coruzzi GM** (1995) Use of Arabidopsis mutants and genes to study amide amino acid biosynthesis. *Plant Cell* **7**, 887-898
- Lam HM, Coschigano KT, Oliveira IC, Melo-Oliveira R y Coruzzi GM** (1996) The molecular genetics of nitrogen assimilation into amino acids in higher plants. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **47**, 569-593
- Lam HM, Hsieh M-H y Coruzzi GM** (1998) Reciprocal regulation of distinct asparagine synthetase genes by light and metabolites in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **16**, 345-353
- Lara C, Romero JM, Coronil T y Guerrero MG** (1987) Interactions between photosynthetic nitrate assimilation and CO₂ fixation in cyanobacteria. En *Inorganic Nitrogen Metabolism*, (WR Ullrich, PJ Aparicio, PJ Syrett y F Castillo, eds.), SpringerVerlag, New York, 45-52
- Lara M, Cullimore JV, Lea PL, Mifflin BJ, Johnston AWB y Lamb JW** (1983) Appearance of a novel form of plant glutamine synthetase during nodule development in *Phaseolus vulgaris* L. *Planta* **157**, 254-258
- Lara M, Porta H, Padilla J, Folch J y Sanchez F** (1984) Heterogeneity of glutamine synthetase polypeptides in *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Physiol* **76**, 1019-1023
- Larsson M, Ingemarsson B y Larsson C-M** (1982) Photosynthetic energy supply for NO₃⁻ assimilation in *Scenedesmus*. *Physiol Plant* **55**, 301-308
- Layzell DB, Gaito ST y Hunt S** (1988) Model of gas exchange and diffusion in legume nodules, 1. Calculation of gas exchange rates and the energy cost of N₂ fixation. *Planta* **173**, 117-127
- Le Guen L, Thomas M, Bianchi M, Halford NG y Kreis M** (1992) Structure and expression of a gene from *Arabidopsis thaliana* encoding a protein related to SNF1 protein kinase. *Gene* **120**, 249-254

- Lea PJ y Fowden L** (1975) The purification and properties of glutamine-dependent asparagine synthetase isolated from *Lupinus albus*. Proc Ray Soc Lond Ser B **192**, 13-26
- Lea PJ y Mifflin BJ** (1980) Transport and metabolism of asparagine and other nitrogen compounds within the plant. En *The Biochemistry of Plants*, (BJ Mifflin, ed.), New York, 569-608
- Lea PJ, Robinson SA y Stuart GR** (1990) The enzymology and metabolism of glutamine, glutamate and asparagine. En *The Biochemistry of Plants*, (BJ Mifflin y PJ Lea, eds.), Academic Press, San Diego **16**, 121-159
- Lever M y Butler GW** (1971) The relationship between cyanide assimilation and asparagine biosynthesis in lupinus. J Exp Bot **22**, 185-290
- Leyh TS, Vogt TF y Suo Y** (1992) The DNA sequence of the sulfate activation locus from *Escherichia coli* K-12. J Biol Chem **267**, 10405-10410
- Li HM, Washburn T y Chory J** (1993) Regulation of gene expression by light. Curr Opin Cell Biol **5**(3), pp. 455-460
- Li HM, Altschmied L y Chory J** (1994) Arabidopsis mutants define downstream branches in the phototransduction pathway. Genes Dev **8**, 339-349
- Mahon JD** (1983) Energy relationships. En *Nitrogen Fixation*, (WJ Broughton, ed.), Oxford Univ Press **3**, 299-325
- Mäntsäla P y Zalkin H** (1992) Cloning and sequence of *Bacillus subtilis* purA and guaA, involved in the conversion of IMP to AMP and GMP. J Bacteriol **174**, 1883-1990
- Maul DM y Schuster SM** (1986) Kinetic properties and characteristics of mouse liver mitochondrial asparagine aminotransferase. Arch Biochem Biophys **251**, 585-593
- McClure PR e Israel DW** (1979) Transport of nitrogen in the xylem of soybean plants. Plant Physiol **64**, 411-416
- McNeil DL y LaRue T** (1984) Effect of Nitrogen Source on Ureides in Soybean. Plant Physiol **74**, 227-232
- Mifflin BJ y Lea PJ** (1980) Ammonia assimilation. En *The Biochemistry of Plants*, (BJ Mifflin, ed.), Academic Press, Toronto, 169-202
- Miller AL, Raven JA, Sprent JI y Weisenseel MH** (1986) Endogenous ion currents traverse roots and root hairs of *Trifolium repens*. Plant Cell Environ **9**, 79-83
- Minchin FR, Summerfield RJ, Hadley P, Roberts EH y Rawsthorne S** (1981) Carbon and nitrogen nutrition of nodulated roots of grain legumes. Plant Cell Environ **4**, 5-26

- Mothes K** (1961) The metabolism of urea and ureides. *Can J Bot* **39**, 1785-1807
- Nahrstedt A** (1987) Recent developments in chemistry, distribution and biology of the cyanogenic glycosides. En *Biologically Active Natural Products*, (K Hostettmann y PJ Lea eds.), Oxford Clarendon Press, London, 213-234
- Nakamura M, Yamada M, Hirota Y, Sugimoto K, Oka A y Takanami M** (1981) Nucleotide sequence of the *asnA* gene coding for asparagine synthetase in *E. coli* K-12. *Nucl Acids Res* **9**, 4669-4676
- Ngai N, Tsai FY y Coruzzi G** (1997) Light-induced transcriptional repression of the pea *AS1* gene: identification of cis-elements and transactors. *Plant J* **12**, 1021-1034
- Oaks A y Hirel B** (1985) Nitrogen metabolism in roots. *Ann Rev Plant Physiol* **36**, 345-365
- Oaks A y Ross DW** (1984) Asparagine synthetase in *Zea mays*. *Can J Bot* **62**, 68-73
- Osuna D, Gálvez G, Pineda M y Aguilar M** (1999) RT-PCR cloning, characterization and mRNA expression analysis of a cDNA encoding a type II asparagine synthetase in common bean. *Biochim Biophys Acta* **1445**, 75-85
- Pate JS y Atkins CA** (1983) Nitrogen uptake, transport, and utilization. En *Nitrogen Fixation*, (W J Broughton, ed.), Oxford Univ Press **3**, 245-298
- Pate JS, Atkins CA, White ST, Rainbird RM y Woo KC** (1980) Nitrogen nutrition and xylem transport of nitrogen in ureide-producing grain legumes. *Plant Physiol* **65**, 961-965
- Pate JS, Atkins CA y Rainbird RM** (1981) Theoretical and experimental costing of nitrogen fixation and related processes in nodules of legumes. En *Current Perspectives in Nitrogen Fixation*, (A H Gibson y X E Newton. eds.), Camberra, Aust Acad Sci, 105-116
- Patterson TG y LaRue TA** (1983) N₂ fixation (C₂H₂) and ureide content of soybeans: Environmental effects and sources sink manipulations. *Crop Sci* **23**, 819-824
- Peiser G, Wang T-T, Hoffman N, Yang SF, Lin HW y Walsh CT** (1984) Formation of cyanide from carbon-1 of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid during its conversion to ethylene. *Proc Natl Acad Sci USA* **81**, 3059-3063
- Peoples MB, Pate JS y Atkins CA** (1985) The effect of nitrogen source on transport and metabolism of nitrogen in fruiting plants of cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.). *J Exp Bot* **36**, 567-582
- Peoples MB, Sudin MN y Herridge DF** (1987) Translocation of nitrogenous compounds in symbiotic and nitrate-fed amide-exporting legumes. *J Exp Bot* **38**, 567-579

Phillips DA, Hartwig UA, Maxwell CA, Joseph CM, Wery J, Hungría M y Tsai SM (1990) Host legume control of nodulation by flavonoids. En *Nitrogen Fixation: Achievements and Objectives*, (PM Gresshoff, LE Roth, G Stacey y WE Newton, eds.), Chapman and Hall, Nueva York, 331-338

Polayes DA y Schubert KR (1984) Purine synthesis and catabolism in soybeans seedlings. The biogenesis of ureides. *Plant Physiol* **75**, 1004-1010

Prianischnikow D (1922) Uber den aufbau un abbau des asparagins in den pflanzen. *Ver Bot Ges* **40**, 242-248

Quail PH (1991) Phytochrome: a light-activated molecular switch that regulates plant gene expression. *Ann Rev Genet* **25**, 389-409

Ramos F y Wiame JM (1980) Two asparagine synthetases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem* **108**, 373-378

Reynolds PHS, Blevins DG y Randall DD (1984) 5-Phosphoribosylpyrophosphate amidotransferase from soybean root nodules: kinetic and regulatory properties. *Arch Biochem Biophys* **229**, 623-631

Richards NGJ y Schuster SM (1998) Mechanistic issues in asparagine synthetase catalysis. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* **72**, 145-198

Rochat C y Boutin JP (1989) Carbohydrates and nitrogenous compounds changes in the hull and in the seed during the pod development of pea. *Plant Physiol Biochem* **27**, 881-887

Rognes SE (1975) Glutamine-dependent asparagine synthetase from *Lupinus luteus*. *Phytochemistry* **14**, 1975-1982

Rognes SE (1980) Anion regulation of lupin asparagine synthetase: chloride activation of glutamine utilizing reaction. *Phytochemistry* **19**, 2287-2293

Romero LC y Lam E (1993) Guanine nucleotide binding protein involvement in early steps of phytochrome-regulated gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**, 1465-1469

Saari LL y Ludden PW (1987) The energetics and energy cost of symbiotic nitrogen fixation. En *Plant Microbe Interactions*, (T Kosuge y EW Nester, eds.), Macmillan Publ Co, New York, 147-193

Schaffner W y Weissmann C (1973) A rapid, sensitive, and specific method for the determination of protein in dilute solution. *Anal Biochem* **56**, 502-514

Schlegel HG (1985) *General Microbiology*. 6ª ed. Cambridge University Press, 6-7

Schubert KR (1982) The Energetics of Biological Nitrogen Fixation. Workshop Summaries I, Ann Soc Plant Physiol, 1-30

Schubert KR y Boland MJ (1984) The cellular and intracellular organization of the reactions of ureide biogenesis in nodules of tropical legumes. En *Advances in Nitrogen Fixation Research*, (C Veeger, ed.), WE Newton, 445-451

Schubert KR (1986) Products of biological nitrogen fixation in higher plants: Synthesis, Transport, and Metabolism. Ann Rev Plant Physiol **37**, 539-574

Schubert KR y Boland MJ (1990) The Ureides. En *The Biochemistry of Plants*, (BJ Miflin y PJ Lea, eds.), Academic Press, San Diego, **16**, 238

Schuller KA, Day DA, Gibson AH y Gresshoff, PM (1986) Enzymes of ammonia assimilation and ureide biosynthesis in soybean nodules: Effect of nitrate. Plant Physiol **80**, 646-650

Schuller KA, Day DA y Gresshoff, PM (1988) Nitrogenase activity and ureide levels in a supernodulating soybean mutant: Effects of inoculum dose and nitrate treatment. Physiol Plant **74**, 64-71

Schuster SM (1982) En *Biochemistry of Metabolic Processes*, (DLF Lennon, FW Stratman y RN Zahlten eds.), Elsevier Biomedical, New York, 323-336

Scofield MA, Lewis WS y Schuster SM (1990) Nucleotide sequence of *Escherichia coli* asnB and deduced amino acid sequence of asparagine synthetase B. J Biol Chem **265**, 12895-12902

Sheng S, Moraga Amador DA, van Heeke G, Allison RD, Richards NG y Schuster SM (1993) Glutamine inhibits the ammonia-dependent activities of two Cys-1 mutants of human asparagine synthetase through the formation of an abortive complex. J Biol Chem **268**(22), 16771-16780

Sheen JY (1990) Metabolic repression of transcription in higher plants. Plant Cell **2**, 1027-1038

Shelp BJ y Atkins CA (1984) Subcellular location of enzymes of ammonia assimilation and asparagine synthesis in root nodules of *Lupinus albus* L. Plant Sci Lett **36**, 225-230

Shi L, Twary SN, Yoshioka H, Gregerson RG, Miller SS, Samac DA, Gantt JS, Unkefer PJ y Vance CP (1997) Nitrogen assimilation in alfalfa: isolation and characterization of an asparagine synthetase gene showing enhanced expression in root nodules and dark-adapted leaves. Plant Cell **9**, 1339-1356

Sieciechowics KA, Joy KW y Ireland RJ (1988) The metabolism of asparagine in plants. Phytochemistry **27**, 663-671

Smit G, Kijne JW y Lugtenberg BJJ (1987) Involvement of both cellulose fibrils and a Ca^{2+} dependent adhesin in the attachment of *Rhizobium leguminosarum* to pea root hair tips. *J Bacteriol* **169**, 4294-4301

Smith DB y Johnson KS (1988) Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene* **67**, 31-40

Smith RG, Vanlerberghe GC, Stitt M y Turpin DH (1989) Short-term metabolite changes during transient ammonium assimilation by the N-limited green alga *Selenastrum minutum*. *Plant Physiol* **91**, 749-755

Sprent JI (1980) Root nodule anatomy, type of export product and evolutionary origin in some Leguminosae. *Plant Cell Environ* **3**, 35-43

Sprent JI (1989b) Nitrogen fixation. En *Advanced Plant Physiology*, (MB Wilkins, ed.), 3ª impresión, Longman Scientific and Technical, Essex, 249-276

Stewart GR (1979) The effect of ammonium, glutamine, methionine sulfoximide and azaserine on asparagine synthetase in soybean leaves. *Plant Sci Lett* **14**, 269

Stewart GR y Larher F (1980) Accumulation of amino acids and related compounds in relation to environmental stress. En *The Biochemistry of Plants*, (BJ Mifflin, ed.), Academic Press, New York, 609-630

Streeter JG (1970) Asparagine biosynthesis in higher plants: Evidence for a reaction involving glutamine as the nitrogen donor. *Plant Physiol* **46**, 44

Streeter JG (1973) *In vivo* and *in vitro* studies on asparagine biosynthesis in soybean seedlings. *Arch Biochem Biophys* **157**, 613-624

Streeter JG (1988) Inhibition of legume nodule formation and N_2 fixation by nitrate. *CRC Crit Rev Plant Sci* **7**, 1-23

Stulen I, Israelstam GF y Oaks A (1979) Enzymes of asparagine synthesis in maize roots. *Planta* **146**, 237-241

Ta TC, Joy KW y Ireland RJ (1984) Amino acid metabolism in pea leaves. Utilization of nitrogen from amide and amino groups of [^{15}N] asparagine. *Plant Physiol* **74**, 822-826

Ta TC, MacDowall FDH y Faris MA (1989) Asparagine synthetase from root nodules of alfalfa. *Cell Biol* **67**, 455-459

Taté R, Patriarca EJ, Riccio A, Defez R y Iaccarino M (1994) Development of *Phaseolus vulgaris* Root Nodules. *Mol Plant Microbiol* **7**, 582-589

Tjaden G, Edwards JW y Coruzzi GM (1995) Cis elements and trans-acting factors affecting regulation of a nonphotosynthetic light-regulated gene for chloroplast glutamine synthetase. *Plant Physiol* **108**(3), 1109-1117

Tsai F-Y y Coruzzi GM (1990) Dark-induced and organ-specific expression of two asparagine synthetase genes in *Pisum sativum*. *EMBO J* **9**, 323-332

Tsai F-Y y Coruzzi GM (1991) Light repression transcription of asparagine synthetase genes in photosynthetic and non-photosynthetic organs of plants. *Mol Cell Biol* **11**, 4966-4972

Tso JY, Hermdsen MA y Zalkin H (1982) Glutamine phosphoribosylpyrophosphate amidotransferase from cloned *Escherichia coli* purF. NH₂-terminal amino acid sequence, identification of the glutamine site, and trace metal analysis. *J Biol Chem* **257**, 3532-3536

Turpin DH, Elrifi IR, Birch DG, Weger HG y Holmes JJ (1988) Interactions between photosynthesis, respiration, and nitrogen assimilation in microalgae. *Can J Bot* **66**, 2083-2097

Urquhart AA y Joy KW (1981) Use of phloem exudate technique in the study of amino acid transport in pea plants. *Plant Physiol* **68**, 750-754

Van Heeke G y Schuster SM (1990) Expression of human asparagine synthetase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Protein Eng* **3**, 739-744

Waterhouse RN, Smyth AJ, Massonneau A, Prosser IM y Clarkson DT (1996) Molecular cloning and characterization of asparagine synthetase from *Lotus japonicus*: Dynamics of asparagine synthesis in N-sufficient conditions. *Plant Molecular Biology* **30**, 883-897

Wong PP y Evans HJ (1971) Poly- β -hydroxybutyrate utilization by soybean (*Glycine max* Merr.) nodules and assessment of its role in maintenance of nitrogenase activity. *Plant Physiol* **47**, 750-755

Wurtele ES, Nikolav BJ y Conn EE (1984) Tissue distribution of β -cyanoalanine synthase in leaves. *Plant Physiol* **75**, 979-984

Wurtele ES, Nikolav BJ y Conn EE (1985) Subcellular and developmental distribution of β -cyanoalanine synthase in barley leaves. *Plant Physiol* **78**, 285-290

Zalkin H y Smith JL (1998) Enzymes utilizing glutamine as an amide donor. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* **72**, 87-144