

00551
1
2EJ.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE QUIMICA
UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y DE
POSGRADO DEL COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

ENERGIZACION DE LA MEMBRANA PERIBACTEROIDAL DE
NODULOS DE FRIJOL

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:

MAESTRIA EN CIENCIAS BIOQUIMICAS

PRESENTA:

ROSAURA APARICIO FABRE

CUERNAVACA, MOR.

1998

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

268759



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

Este trabajo se realizó en el departamento de Biología Molecular de Plantas, en el laboratorio del Dr. Omar Pantoja Ayala.

Comisión revisora:

Presidente: Dr. Federico Sánchez Rodríguez
Secretario: Dr. Omar Pantoja Ayala
Vocal: Dra. Marina Gavilanes Ruíz
Suplente: Dr. Mario Soberón Chávez
Suplente: Dr. Alberto Darzon Israel

INDICE GENERAL

Resumen	1
Introducción	3
Objetivos	20
Material y métodos	21
Resultados	29
Figuras y tablas	38
Discusión	56
Conclusiones	67
Referencias	68

RESUMEN

En la simbiosis establecida por *Rhizobium* y las leguminosas se desarrolla una estructura organizada llamada nódulo que se considera como un nuevo órgano en la raíz de la planta. La formación del nódulo involucra varias etapas de desarrollo. Una de ellas es la encapsulación de las bacterias por una membrana de origen vegetal, llamada membrana peribacteroidal (MPB). La MPB desempeña funciones muy importantes en la simbiosis, ya que protege al bacteroide de una posible respuesta de defensa de la planta y media el transporte de solutos entre los dos simbiosites. Estos solutos se mueven a través de la membrana acoplados a la generación de un gradiente electroquímico de H^+ ($\Delta\mu H^+$) producido por los transportadores activos primarios.

En este estudio, en la MPB de nódulos de frijol, el análisis de la actividad hidrolítica de ATP y la actividad de bombeo de H^+ dependiente de ATP, a diferentes pH y en presencia de inhibidores, indicó la presencia de una V-ATPasa. Por otra parte, la presencia de una V-ATPasa en la MPB se demostró mediante ensayos de inmunodetección en los cuales anticuerpos específicos contra las subunidades A y B de la V-ATPasa reconocieron éstas subunidades

Dado que, en el interior del nódulo existen condiciones de baja tensión de oxígeno es muy probable que la V-ATPasa no sea la única responsable de la energización de la membrana. Debido a que los niveles de PPi se mantienen constantes y existe baja tensión de oxígeno, la H^+ -PPasa también podría estar involucrada en la energización de la MPB de nódulos de frijol. Se encontró actividad hidrolítica y de bombeo de H^+ dependiente de PPi, mostrando actividades óptimas a pH 9.0 y 8.0 respectivamente y por análisis de inmunodetección con un anticuerpo anti H^+ -PPasa de *A. thaliana* se confirmó su presencia.

Durante la fijación de nitrógeno es necesario el transporte de compuestos de carbono del citoplasma de la célula infectada al bacteroide para la generación de energía y poder reductor requeridos para la fijación del nitrógeno atmosférico. En éste trabajo se analizó la permeabilidad de la MPB a ácidos dicarboxílicos a través de la estimulación de la actividad de bombeo de H^+ de la V-ATPasa en simbiosomas de nódulos de frijol. La

MPB presentó una permeabilidad a los ácidos dicarboxílicos en orden decreciente al maleato, succinato, malato y fumarato, indicando que el transporte de estos sustratos depende en gran parte de la energización de la MPB por la H⁺-ATPasa y que estos se utilizan como fuente de carbono por los bacteroides.

En suma, los datos de este estudio indican la presencia de una V-ATPasa y una H⁺-PPasa, las cuales pudieran estar involucradas en la energización de la MPB para regular el transporte del nitrógeno fijado por el endosimbionte hacia el citoplasma de la célula infectada, así como el transporte de ácidos dicarboxílicos del citoplasma de la célula infectada al bacteroide, entre otros.

INTRODUCCION

I. Características de los transportadores activos primarios.

Las células están rodeadas por una membrana, la cual define sus bordes y mantiene las diferencias esenciales entre el citosol y el ambiente extracelular. Las membranas del aparato de Golgi, del retículo endoplásmico, la mitocondria y otros organelos, mantienen las diferencias entre el contenido de cada organelo y el citosol. Estas membranas son barreras permeables altamente selectivas, ya que el flujo de iones y solutos no cargados es finamente regulado por sistemas de transporte específicos. Estos sistemas tienen como función regular el volumen celular, mantener el pH intracelular y la composición iónica, que en conjunto establecen las condiciones necesarias para el mantenimiento de las funciones metabólicas. También participan en la generación de gradientes iónicos necesarios para otros procesos, como concentrar algunos metabolitos en el interior, como aquellos que se utilizan como combustible, así como también para el desecho de sustancias tóxicas para la célula (Lodish, *et al.*, 1995).

Las propiedades específicas de las membranas permite a pequeñas moléculas hidrofóbicas como O_2 y CO_2 , y a moléculas pequeñas como H_2O y urea pasar rápidamente a través de éstas. Sin embargo las bicapas son altamente impermeables a moléculas cargadas. El paso de moléculas como iones o azúcares y aminoácidos, entre otras, lo hacen a través de proteínas acarreadoras o de canales selectivos. Los acarreadores unen al soluto específico sufriendo cambios conformacionales causando que éste atraviese la membrana. Los canales son proteínas que forman un poro que se extiende a través de

la bicapa. Cuando un canal está abierto, iones específicos pueden penetrar por difusión y la velocidad a la que se transportan, es de tres a cuatro órdenes de magnitud mayor que la de un ión que es transportado por un acarreador (Leshem, 1992). Los canales y los acarreadores catalizan pasivamente el paso de solutos a través de la membrana. Si la molécula no tiene carga, atravesará dependiendo de la diferencia de concentración en los dos lados de la membrana; si el soluto tiene carga neta, la influencia del gradiente de concentración y de la diferencia de potencial (gradiente electroquímico) definirán la dirección de su movimiento (Lodish, *et al.*,1995).

La célula también requiere de sistemas que permitan el paso de algunos solutos a través de la membrana en contra de su gradiente electroquímico, estos solutos son bombeados por procesos directamente relacionados al consumo de energía. Generalmente esto involucra la hidrólisis del ATP, o bien, la luz o el transporte de electrones en una reacción de oxido-reducción. Estos sistemas se conocen como transportadores activos primarios o bombas, que de acuerdo a la teoría quimiosmótica propuesta por Mitchell (Saier, 1997; Cooper, 1997), acoplan la hidrólisis o síntesis de ATP a la generación de un gradiente electroquímico de H^+ ($\Delta\mu H^+$), a través de la membrana, conocido como fuerza motora de protones (Nicholls y Ferguson,1992).

Este $\Delta\mu H^+$, generado a través de la membrana, se utiliza por los transportadores activos secundarios para mover solutos en contra de su gradiente electroquímico, acoplado al flujo de H^+ a favor de su gradiente electroquímico. Así, un simporte cataliza el cotransporte de H^+ y otro soluto en la misma dirección y un antiporte cataliza el

intercambio de H^+ y otro soluto en direcciones opuestas (Nicholls y Ferguson, 1992; Lodish, *et al.*, 1995; Cooper, 1997).

En las células vegetales el tipo de enzimas involucradas en la generación de este $\Delta\mu H^+$ a través de la membrana plasmática y la membrana vacuolar son ATPasas translocadoras de H^+ o H^+ -ATPasas. De acuerdo a su ubicación, estructura y función, las H^+ -ATPasas se han dividido en tres tipos: las ATPasas tipo P, las tipo V y las tipo F (Pedersen y Carafoli, 1987)(fig 1).

La característica principal de las F-ATPasas o también llamadas ATP sintasas, es la de catalizar la síntesis de ATP acoplada al gradiente electroquímico de H^+ generado por reacciones de oxido-reducción en las membranas internas de la mitocondria y el cloroplasto. En contraste, las ATPasas tipo P y tipo V principalmente hidrolizan el ATP. Por lo tanto, se puede considerar que las ATPasas tipo F son consumidoras del $\Delta\mu H^+$, mientras que las ATPasas tipo P y tipo V generan el $\Delta\mu H^+$ a expensas de la hidrólisis del ATP, que es utilizado para el transporte secundario de solutos (MacCarty, 1992).

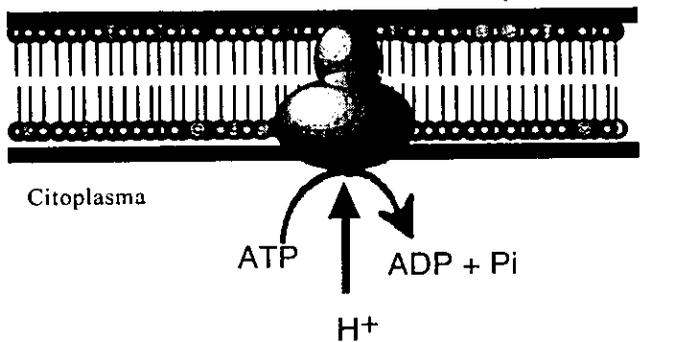
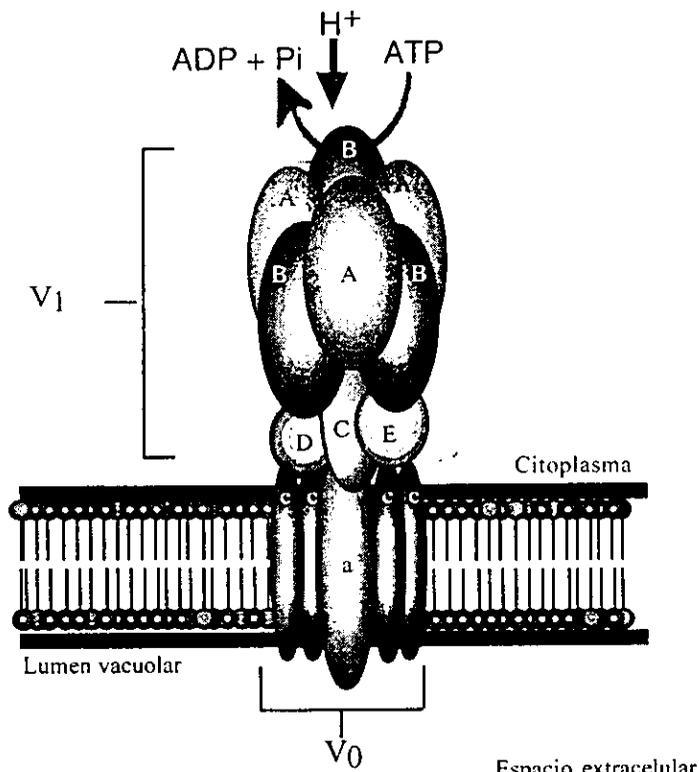
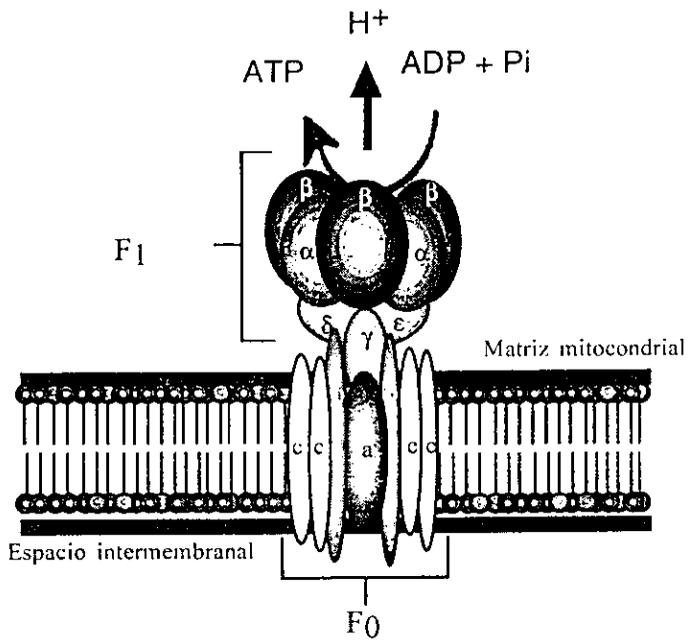


Figura 1. Esquemas de las H^+ -ATPasas.

A. Representación esquemática de la F-ATPasa donde F₁ corresponde al sector externo y F₀ al sector intramembranal.

B. Representación esquemática de la V-ATPasa donde V₁ corresponde al sector externo y V₀ al sector intramembranal.

C. Representación esquemática de la P-ATPasa.

Las ATPasas tipo F o F-ATPasas, se localizan en las membranas internas de las mitocondrias y cloroplastos, son multiméricas y su masa relativa es de aproximadamente 550 a 650 kDa; tienen un pH óptimo de actividad entre 8 y 9 y la estequiometría H^+/ATP es de tres. Varios reactivos entre los que destacan azida, dicitohexilcarbodiimida (DCCD) y oligomicina inhiben la síntesis de ATP. Las F-ATPasas están formadas por dos sectores, la región catalítica F_1 y el canal translocador de protones, F_0 . Se puede separar la F_1 por medios físicos o tratando las membranas con un medio de baja fuerza iónica que contenga EDTA. Estas características indican que la F_1 se encuentra expuesta al medio externo de la membrana. Dependiendo de la fuente, la F_1 tienen una masa relativa entre 365 a 400 kDa. La composición polipeptídica tanto en mitocondrias como en cloroplastos y bacterias es similar. Están presentes cinco subunidades llamadas $\alpha - \epsilon$ en orden decreciente de masa relativa. Existe un consenso de que estos polipéptidos están presentes en una estequiometría de 3:3:1:1:1. Por comparación de secuencias, la de la subunidad β está muy conservada en diferentes especies y contiene al sitio catalítico. Las subunidades α y β son muy parecidas y es probable que α provenga de una duplicación del gene, las subunidades pequeñas γ , δ y ϵ no son muy conservadas (Alfonzo y Racker, 1979).

El sector F_0 de la ATP sintasa permanece en la membrana después de quitar la F_1 . F_0 es hidrofóbico y solo puede aislarse de las membranas extrayendo con detergentes. Sus funciones son unir a F_1 y permitir el paso de los protones a través de la membrana. La velocidad de transporte de protones es alta, sugiriendo que F_0 es un canal selectivo a H^+ . El número de polipéptidos que componen a F_0 es diferente dependiendo de la fuente. El

sector F_0 de *E. coli* es el más simple y está compuesto por solo tres tipos de polipéptidos, nombrados a, b y c. El sector F_0 de cloroplastos de espinaca tiene cuatro polipéptidos denominados con números romanos I - IV; y al sector F_0 mitocondrial lo constituyen ocho polipéptidos. Todas las subunidades de F_0 contienen un pequeño polipéptido hidrofóbico de 8 kDa, llamado proteolípido o proteína que une al DCCD, están presentes de 6 a 12 copias por ATP sintasa (Alonzo y Racker, 1979; Deckers y Altendorf, 1996).

En la membrana plasmática de las células vegetales y de hongos se localiza una segunda clase de H^+ -ATPasas, conocidas como tipo P o P-ATPasas. Estas ATPasas juegan un papel muy importante en la fisiología de las células de las plantas y hongos, ya que controlan importantes funciones a nivel celular, incluyendo mantenimiento del pH intracelular, la división y el alargamiento celular. (Serrano, 1989b).

La P-ATPasa es una bomba electrogénica, modulada por K^+ . Tiene un pH óptimo de actividad ligeramente ácido de 6.5. Estudios electrofisiológicos indican que la estequiometría de esta enzima es de $1H^+/ATP$ en plantas y de $2H^+/ATP$ en algas (Serrano, 1985). Resultados obtenidos con preparaciones de membrana plasmática purificadas indican que el sustrato es el complejo Mg-ATP. Estructuralmente, estas P-ATPasas consisten de un péptido α de masa relativa de 70 a 100 kDa, el cual contiene el sitio de fosforilación y el sitio de unión a ATP. La P-ATPasa comparte un mecanismo de acción similar al de otras bombas como la Na^+,K^+ -ATPasa de la membrana plasmática de células animales; la Ca^{+2} -ATPasa del retículo sarcoplásmico; una H^+-K^+ ATPasa de la mucosa gástrica del estómago de mamíferos y la K^+ ATPasa de la membrana plasmática de *E. coli* (Serrano,

1985; Sze, 1985).

El mecanismo de acción de ésta enzima se caracteriza por la formación de un intermediario fosforilado covalente, que se forma con el fosfato γ del ATP y un residuo de ácido aspártico de la enzima. La actividad de ésta enzima se inhibe por orto-vanadato, un metal de transición que probablemente sustituye al fosfato, resultando en una unión estable del vanadato con la enzima y en consecuencia inhibiendo la reacción. Es insensible a la azida y al nitrato, inhibidores de la F-ATPasa y la V-ATPasa, respectivamente (Serrano, 1985; Sze, 1985; Al-Awqati,1986; Serrano, 1989b).

Las ATPasa tipo V o V-ATPasas son uno de los transportadores primarios del tonoplasto cuyo papel en la energización de ésta membrana es importante para algunas de las funciones de la vacuola, como el almacenamiento y transporte de iones y metabolitos, osmoregulación, transducción de señales, recambio de proteínas y regulación del pH citoplasmático (Forgac,1989; Barkla y Pantoja,1996).

La hidrólisis de ATP y las actividades de bombeo de las V-ATPasas inicialmente se analizaron usando vesículas de tonoplasto o vacuolas completas (Sze,1985), y posteriormente haciendo "patch clamp" con vacuolas completas (Hedrich y Shroeder,1989). El Cl^- estimula la actividad de la enzima. La estequiometría de esta enzima es $2\text{H}^+/\text{ATP}$ y tiene un pH óptimo de actividad de 8.0. Los inhibidores de ésta enzima son el nitrato y la bafilomicina, ésta última, un potente inhibidor específico perteneciente a la clase de antibióticos macrólidos, que actúa como un inhibidor del canal de protones (Crider *et al.*, 1994). Se estima que una molécula de bafilomicina es suficiente para inhibir

completamente a la ATPasa (Crider *et al.*, 1994). La V-ATPasa es insensible a inhibidores de la P-ATPasa como el vanadato o de la F-ATPasa como la azida y la oligomicina (Sze, 1985; Pedersen y Carafoli, 1987; Sze *et al.*, 1992).

Las V-ATPasas son enzimas multiméricas con una masa relativa de alrededor de 500 kDa. De manera similar a las F-ATPasas, las V-ATPasas se forman de un componente asociado a la membrana V_0 , y un componente externo V_1 (Stevens, 1997), que se disocia con agentes caotrópicos que inactivan las actividades de hidrólisis y de transporte de H^+ (Rea, *et al.*, 1987). El sector V_1 en la V-ATPasa de avena está compuesto de seis polipéptidos de 70, 60, 44, 42, 36 y 29 kDa (Ward y Sze, 1992; Lai *et al.*, 1988) mientras que en la V-ATPasa de betabel solo cinco polipéptidos de 67, 55, 52, 44, y 32 kDa se han descrito (Rea *et al.*, 1987; Parry *et al.*, 1989). A diferencia de las F-ATPasas, el sector externo se inactiva por la disociación y es incapaz de bombear protones (Sze, *et al.*, 1992). La subunidad mayor de aproximadamente 70 kDa tiene un sitio de unión a nucleótidos, y es probablemente el sitio de hidrólisis de ATP. La subunidad de alrededor de 60 kDa también tiene un sitio de unión a nucleótido y se considera como una subunidad regulatoria. La presencia de sitios de unión a nucleótidos en las subunidades de 70 y 60 kDa denotan que pueden participar en la hidrólisis del ATP, análogamente a las subunidades α y β de las F-ATPasas (Forgac, 1989; Sze *et al.*, 1992; Stevens, 1997).

El componente más abundante del sector membranal de todas las V-ATPasas es la subunidad c de 16 kDa que une DCCD. Existen alrededor de seis copias por holoenzima. Este polipéptido hidrofóbico se le conoce como el proteolípido, debido a su solubilidad en

cloroformo/metanol (Rea *et al.*, 1987b). La subunidad de 16 kDa junto con las de 32, 13 y 12 kDa se consideran parte del sector integral, ya que éstas no se solubilizan con agentes caotrópicos (Ward y Sze, 1992). La V-ATPasa del betabel incluye en el complejo integral a las seis subunidades de 16 kDa mas un polipéptido de 100 kDa (Parry *et al.*, 1989).

La inhibición de la actividad de las V-ATPasas por DCCD resulta de la modificación covalente del proteolípido de 16 kDa (Rea *et al.*, 1987b). Con base en la similitud entre el proteolípido de 16 kDa de la V-ATPasa y el proteolípido de 8 kDa de la F-ATPasa, se considera que el DCCD puede bloquear el transporte de H⁺ al modificar la interacción cooperativa entre los seis proteolípidos para formar un canal de protones funcional. A diferencia de la F-ATPasa, el sector V₀ de la V-ATPasa no conduce H⁺ después de remover el sector periférico (Sze *et al.*, 1992). El papel de las otras subunidades no es claro aún, algunas de ellas pueden requerirse para la unión del sector periférico a la membrana, mientras que otras pueden requerirse para la regulación y el ensamble de la enzima (Sze *et al.*, 1992).

En el tonoplasto de las células vegetales se encuentra otra bomba primaria capaz de energizar a ésta membrana, la pirofosfatasa translocadora de protones (H⁺-PPasa), que transporta protones electrogénicamente del citosol al lumen de la vacuola, usando PPi como fuente de energía (Rea *et al.*, 1992).

El K⁺ estimula la translocación de H⁺ dependiente de PPi, la hidrólisis de PPi se ha observado en la mayoría de las plantas vasculares, al igual que en un alga clorofita ancestral (Shimmen *et al.*, 1987a y 1987b) y en el alga marina unicelular *Acetabularia*

acetabulum (Ikeda *et al.*, 1991). La H⁺-PPasa es un componente mayoritario en el tonoplasto y es capaz de generar un $\Delta\mu\text{H}^+$ similar a la H⁺-ATPasa (Johannes *et al.*, 1989; Maeshima *et al.*, 1989). Así esta enzima constituye entre el 5 y 10% de la proteína total del tonoplasto de *Beta vulgaris* (Britten *et al.*, 1989; Rea *et al.*, 1992).

Estudios estructurales indican que la H⁺-PPasa se compone de un solo polipéptido de alrededor de 70 kDa, con un pH óptimo de actividad de 8.0 . La actividad de la H⁺-PPasa se puede inhibir de forma irreversible con N-etil maleimida (NEM) (Zhen, *et al.*, 1994) y por concentraciones micromolares de Ca⁺² (Rea *et al.*, 1992). La H⁺-PPasa presenta una estequiometría H⁺/PPi de uno y su sustrato específico es Mg₂PPi (Rea, 1993).

II. Interacción *Rhizobium* - Leguminosas

En la simbiosis establecida por *Rhizobium* y las leguminosas se desarrolla una estructura organizada que se considera como un nuevo órgano en la raíz de la planta llamado nódulo. La formación del nódulo involucra varias etapas de desarrollo.

Como primer paso, se establece un intercambio de señales químicas; la raíz de la planta exuda compuestos fenólicos del tipo de los flavonoides e isoflavonoides (Peters and Verma, 1990) y las bacterias muestran una quimiotaxis fuerte hacia estos compuestos. Los flavonoides inducen la transcripción de los genes de nodulación o genes *nod* de *Rhizobium* (Brewin, 1991; Sánchez *et al.*, 1991). Esta interacción es mediada por *nodD*, el único gen *nod* que se expresa constitutivamente (Long, 1989) y su producto génico NodD se asocia con la membrana citoplasmática de *Rhizobium* e interactúa con los

flavonoides (Schlaman *et al.*, 1989). Las especies diferentes de leguminosas exudan flavonoides característicos y las proteínas NodD de las especies diferentes de *Rhizobium* tienen preferencia por ciertos flavonoides (Brewin, 1991), lo cual establece un primer paso en la especificidad de esta interacción. Los factores de nodulación promueven las primeras respuestas de la planta y el desarrollo del nódulo que consisten en la deformación y encurvamiento de los pelos radiculares de la raíz. Posteriormente, existe una hidrólisis de la pared celular de los pelos radiculares, su membrana plasmática se invagina y se reinicia la síntesis de pared celular formando una estructura tubular, llamada el hilo de infección. El hilo de infección sirve como conducto por el cual las bacterias penetran hasta las células de la corteza. De manera simultánea a este proceso, las células de la corteza son reactivadas mitóticamente formando el primordio del nódulo. La división de las células de la corteza dependerá del tipo de planta hospedera. Las leguminosas de clima templado tales como chícharo, trébol y alfalfa forman nódulos indeterminados que tienen un meristemo apical permanente. En estas leguminosas, el nódulo se origina de las células localizadas en la corteza interna de la raíz, en la mayoría de los casos opuesto al xilema del sistema vascular. Una gran parte de las leguminosas de clima tropical, como soya y frijol forman nódulos determinados, donde no se presenta un meristemo y el inicio del desarrollo del nódulo ocurre en las células de la corteza externa de la raíz. (Nap y Bisseling, 1990; Hirsch, 1992; Mylona *et al.*, 1995; Cohn *et al.*, 1998).

El hilo de infección crece, permitiendo a las bacterias llegar a las células blanco; un vez ahí, las bacterias se liberan al citoplasma, por endocitosis, de esto surge la

encapsulación de las bacterias por una membrana de origen vegetal, llamada membrana peribacteroidal (MPB). A las bacterias y a la MPB que las rodea, se le conoce como simbiosoma, y las células que contienen a los simbiosomas se les conoce como células infectadas. Una vez que las bacterias invaden el citoplasma, las células dejan de dividirse y solo incrementan su tamaño por crecimiento celular (Nap y Bisseling, 1990; Verma y Hong, 1996; Whitehead y Day 1997; Mylona *et al.*, 1995).

En leguminosas de clima templado, la división de la bacteria se acompaña de la división de la MPB, por lo tanto cada simbiosoma contiene solo una bacteria. En contraste, en nódulos de leguminosas de clima tropical los simbiosomas contienen más de una bacteria ya que sólo ésta se divide (Goodchild y Bergersen, 1966). Una vez que la bacteria ha dejado de dividirse, sufre una diferenciación, se inducen los genes necesarios para el estado simbiótico, entre ellos el que codifica para la nitrogenasa. Con ello el nódulo madura y se crean las condiciones óptimas para la fijación biológica del nitrógeno (Whitehead y Day, 1997; Mylona *et al.*, 1995; Hirsch, 1992; Pueppke, 1996; Sánchez *et al.*, 1991)

La MPB desempeña funciones muy importantes en la simbiosis, protege al bacteroide de una posible respuesta de defensa de la planta y media el transporte de solutos entre los dos simbiosomas. Esta membrana es de origen vegetal, sin embargo existe cierta controversia sobre su composición y desarrollo. Inicialmente se decía que la MPB estaba formada por invaginaciones de la membrana del hilo de infección, que se origina de la membrana plasmática de la célula infectada (Evans y Stacey, 1989). Sin embargo estudios

recientes han demostrado que la composición de la MPB no es idéntica a la membrana del hilo de infección y que varios organelos participan en su síntesis (Mellor, 1989).

Estudios realizados con microscopía electrónica y técnicas de criofractura han mostrado la asociación estrecha de vesículas posiblemente derivadas del aparato de Golgi con la MPB. El origen de estas vesículas se asignó al aparato de Golgi debido a sus propiedades de tinción con plata (Robertson, *et al.*, 1978). La presencia de estas vesículas y los cuerpos de Golgi en el citoplasma de células infectadas refuerza la posible participación del aparato de Golgi en la síntesis de la MPB (Robertson, *et al.*, 1978). Además de compartir características con el aparato de Golgi, la MPB también comparte características en común con el tonoplasto. Se ha reportado que dos marcadores de la vacuola, la α -manosidasa y la termolisina, un inhibidor de proteasas, se encuentran en el espacio peribacteroidal de nódulos de *Glycine max* (Mellor, 1984; Mellor, 1989). También se sugiere que el microsimbionte contribuye a la biogénesis de la MPB de dos maneras (Robertson, *et al.*, 1978): ya sea proporcionando directamente proteínas o por la secreción de moléculas de señalización que controlen el flujo de las vesículas en la célula huésped hacia la MPB (Verma y Hong, 1996).

Es muy probable que la composición de la MPB no sea la misma en las diferentes etapas del desarrollo del nódulo. El papel de la MPB durante la etapa de proliferación, presumiblemente es mediar el intercambio de nutrientes a bacterias que están continuamente dividiéndose. En esta etapa los requerimientos nutricionales de la bacteria podrían ser diferentes, ya que aún no han sufrido la diferenciación a bacteroides capaces

de fijar nitrógeno. Consecuentemente, se piensa que la composición y la permeabilidad de la MPB difiere en esta etapa y cuando el simbiosoma ha madurado (Verma y Hong, 1996). Evidencias que apoyan esta hipótesis son los análisis del perfil de polipéptidos en la MPB de soya, los cuales mostraron diferencias claras entre nódulos jóvenes de 4 semanas y de nódulos maduros de 8 semanas (Udvardi *et al.*, 1990).

Peroto *et al.* (1995) han observado cambios en el contenido de proteínas y lípidos en la MPB de nódulos de chícharo durante su desarrollo. La expresión del epítotope JIM18, un antígeno glicolípido, se regula durante el desarrollo del nódulo. El anticuerpo contra JIM18 reaccionó con la MPB y la membrana plasmática de las células infectadas cercanas al meristemo del nódulo, que corresponde a la zona de invasión donde la bacteria se divide continuamente. Sin embargo, la reactividad del anticuerpo JIM18 se perdió en la MPB, pero no en la membrana plasmática de las células infectadas (Peroto *et al.*, 1995). Esta pérdida del epítotope JIM18 ocurrió en la zona donde la bacteria se ha diferenciado parcialmente a la forma de bacteriote, es decir el epítotope no está presente en la MPB madura, confirmando que la composición de la MPB es diferente según el estadio de desarrollo del nódulo (Peroto *et al.*, 1995).

Una característica importante de la MPB es la presencia de un grupo de proteínas específicas del nódulo, llamadas nodulinas. Entre éstas, una de las proteínas mayoritarias es la nodulina 26, una proteína integral de la MPB (Fortin, 1987; Weaver *et al.*, 1991; Miao y Verma, 1993). Basados en su secuencia de aminoácidos, se ha concluido que la nodulina 26 es un miembro de la familia de proteínas intrínsecas de la membrana (MIP),

que comparten de un 30 a un 40% de identidad de secuencia de aminoácidos y presentan seis dominios transmembranales, con los extremos carboxilo y amino terminal del lado citoplasmático (Reizer *et al.*, 1993). Las actividades funcionales de algunas de estas proteínas incluyen actividades de transporte como canales de agua semejantes a la proteína humana CHIP28 (Maurel *et al.*, 1993) y a facilitadores del transporte de glicerol como la proteína bacteriana Glp F (Johnson *et al.*, 1990).

La expresión heteróloga de la nodulina 26 de soya en ovocitos de *Xenopus* demostró que es una proteína que participa en el transporte de agua. Estudios en la MPB de nódulos de soya, la cual contiene altos niveles de esta proteína, mostraron que el agua se transportó a altas velocidades y que esta actividad se inhibió con compuestos mercuriales, sugiriendo que el movimiento de agua a través de esta membrana podría estar mediado por la nodulina 26. Sin embargo, la MPB también mostró altas velocidades de flujo de moléculas pequeñas sin carga como formamida y glicerol, resultados que indicaron que la nodulina 26 funciona como un canal de agua con moderada selectividad (Rivers *et al.*, 1997).

En la MPB también se han identificado otras proteínas de transporte, una H⁺-ATPasa, una canal selectivo a cationes y un transportador de ácidos dicarboxílicos (Udvardi y Day, 1997). En la MPB de nódulos de soya (Blumwald *et al.*, 1985; Bassarab *et al.*, 1986; Udvardi y Day 1989), de chícharo (Christiansen *et al.*, 1995; Szafran and Haaker, 1995) y lupino (Domingan *et al.*, 1988) se ha identificado una H⁺-ATPasa con características muy similares a la P-ATPasa, ya que es dependiente de Mg⁺², presenta un pH óptimo relativamente ácido de 6.5 y se estimula por cationes, particularmente K⁺ y

NH_4^+ . La actividad de la H^+ -ATPasa fue significativamente más alta en MPB de chícharo y de lupino que en MPB de soya (Whitehead y Day, 1997).

Utilizando simbiosomas intactos, naranja de acridina y microscopía de fluorescencia, se midió el transporte de H^+ en la presencia de ATP y se observó un aumento en la fluorescencia de la naranja de acridina comprobando que la H^+ -ATPasa de la MPB funciona como una bomba de H^+ que causa la acidificación del espacio peribacteroidal (Blumwald *et al.*, 1985). De manera similar, pero utilizando oxonol V, un colorante fluorescente sensible al voltaje, se observó que esta ATPasa forma un potencial de membrana más positivo en el espacio peribacteroidal (Udvardi y Day, 1989; Udvardi *et al.*, 1991). En otros estudios realizados con MPB de nódulos de soya se ha identificado una ATPasa tipo V (Dubovro *et al.*, 1992) o bien los dos tipos de ATPasas, una con características similares a la de la membrana plasmática y otra similar a la que se encuentra en el aparato de Golgi (Bassarab *et al.*, 1986)

En estudios realizados con la MPB de nódulos de soya se ha reportado la presencia de una H^+ -PPasa, con características similares a la encontrada en el tonoplasto de células vegetales ya que es dependiente de Mg^{+2} y presenta un pH óptimo de 9.0 (Bassarab *et al.*, 1986).

Empleando la técnica de "patch clamp" en simbiosomas aislados de nódulos de soya se ha identificado un canal de NH_4^+ dependiente de voltaje. La selectividad de este canal es baja, ya que es permeable a otros cationes monovalentes además del NH_4^+ . La presencia de este canal en la MPB puede mediar el movimiento de NH_4^+ hacia el citoplasma de las

células infectadas siguiendo su gradiente electroquímico, para posteriormente ser asimilado y distribuido al resto de la planta (Tyerman *et al.*, 1995).

Para que los bacteroides puedan realizar la reducción de N_2 es necesario que reciban un suministro constante de fuente de carbono. Los posibles compuestos utilizados por los bacteroides son los ácidos dicarboxílicos malato, succinato y fumarato (Streeter, 1995; Whitehead y Day, 1997). Estudios realizados utilizando técnicas radioactivas han demostrado que en el espacio peribacteriodal se acumulan ácidos dicarboxílicos C-4 como malato, fumarato y succinato (Ou Yang *et al.*, 1990), y que en la MPB está presente un transportador que tiene afinidad por malato y succinato que aparentemente actúa como un uniporte para el anión dicarboxilato monovalente (Udvardi *et al.*, 1988).

Con el fin de entender el papel de la MPB en la interacción microorganismo-planta del sistema *Rhizobium*-frijol, se propuso iniciar la caracterización de los transportadores activos primarios involucrados en la energización de ésta membrana, así como aquellos que participan en la acumulación de los ácidos dicarboxílicos, que sirven como fuente de carbono a los bacteroides. Adicionalmente, estos estudios pueden aportar datos de gran ayuda para elucidar la biogénesis de la MPB.

Objetivo General

Determinar los mecanismos de transporte involucrados en la energización de la MPB y su papel en la simbiosis *Rhizobium*-frijol.

Objetivo Particular

Caracterizar fisiológica y bioquímicamente el o los transportadores activos primarios que median el movimiento de solutos a través de la MPB de nódulos de frijol.

Objetivos Específicos

1. Caracterizar la actividad del o los transportadores activos primarios mediante los parámetros V_{max} , K_m y pH óptimo.
2. Determinar el perfil de inhibición del o los transportadores activos primarios de la MPB.
3. Definir el tipo de transportador activo primario por ensayos de inmunodetección.
4. Confirmar el bombeo del transportador activo primario y la dirección de esta actividad.
5. Estudiar la permeabilidad de aniones orgánicos a través de la MPB.

MATERIAL Y METODOS

Para el desarrollo de este estudio se utilizaron plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris*) de la variedad "Negro Jamapa" inoculadas con la cepa CFN 037 de *Rhizobium etli*.

Condiciones de crecimiento de *R. etli*. La cepa de *R. etli* se creció en un medio rico PY compuesto de 0.5% peptona de caseína, 0.3% extracto de levadura, 0.08% CaCl₂, 0.001% ácido nalidíxico y 0.001% kanamicina como antibióticos selectivos, incubando a 30 °C con agitación por 48 - 72 horas.

Nodulación. Inicialmente, las semillas de frijol se desinfectaron por 1 min con etanol al 96%, y posteriormente se lavaron de 3 a 5 min con agua destilada estéril. A continuación, las semillas se expusieron por 5 min a una solución de NaHClO₄ al 0.6% y se lavaron de 3 a 5 veces con agua estéril. Para su germinación, las semillas se colocaron en charolas estériles sobre una cama de papel húmedo cubiertas con papel aluminio por 72 horas a 25 °C. Una vez germinadas, se colocaron cinco semillas en cada maceta que contenía vermiculita estéril como sustrato y se inocularon con 1.5 mL de cultivo de *R. etli* previamente crecido. Las plantas se crecieron por 21 días en el invernadero regándose diariamente en forma alterna con agua y con solución nutritiva de Fahraeus (1.0% CaCl₂.2H₂O, 1.0% KH₂PO₄, 1.2% MgSO₄. 7H₂O, 1.5% Na₂HPO₄.7H₂O, 0.05% citrato férrico y solución de oligoelementos: 46 mM H₃BO₃, 9 mM MnSO₄.4H₂O, 0.76 mM ZnSO₄.7H₂O, 0.32 mM CuSO₄.5H₂O, 0.33 mM Na₂MoO₄.H₂O). Después de éste tiempo, los nódulos se colectaron para la obtención de la MPB o de simbiosomas intactos.

Obtención de membranas peribacteriodales. Este procedimiento se realizó a 4 °C.

Aproximadamente 20 g de nódulos se presionaron suavemente en un mortero conteniendo 25 mL de solución homogenizadora (400 mM sorbitol, 10 mM MgSO₄, 1% albúmina de suero bovino, 1% polivinil pirliridona [10,000], 20 mM ácido ascórbico, 1 mM benzamidina, 1 mM fluoruro de p-metil sulfonilo (PMSF), 0.5 mM de hidroxitolueno butilado (BHT), 5mM ditionitrosol (DTT), 25 mM ácido morfolino etano sulfónico/ 1,3 bis[tris-hidroximetil metil amino propano] (Mes/BTP) pH 7.5). El homogenizado se filtró a través de una malla de nylon con poro de 20 µm. El filtrado, conteniendo en su mayoría simbiosomas intactos, restos celulares y bacteroides, se centrifugó por 15 min a 700 g usando un rotor Sorvall SS34 y una centrífuga Sorvall RC-5B (Sorvall Instruments, Dupont, Boston, MA, USA) con la finalidad de remover fragmentos celulares. La pastilla así obtenida, conteniendo simbiosomas intactos y bacteroides se resuspendió en medio de choque osmótico (4% sacarosa, 5 mM amortiguador K₂HPO₄/KH₂PO₄ pH 7.8 y 1 mM DTT) y se agitó vigorosamente por 2 minutos para liberar los bacteroides de la MPB. Los bacteroides se eliminaron centrifugando 15 min a 3000 g en un rotor Sorvall SS34 y una centrífuga Sorvall RC-5B. El sobrenadante que contenía la MPB se centrifugó 1 h a 40 000 g usando un rotor Ti-55.2 en una ultracentrífuga L-80 (Beckman Instruments, Inc. Fullerton, CA, USA). Con la finalidad de purificar la fracción de MPB obtenida la pastilla resultante se resuspendió en 9 ml de medio de suspensión (330 mM sacarosa, 5 mM amortiguador K₂HPO₄/K H₂PO₄ pH 7.8 y 1 mM DTT) y se añadió a un tubo que contenía la mezcla fresca del sistema de dos fases con una composición de 6.0 % dextrán T 500 (Pharmacia Inc., Alameda, CA, USA) (p/p), 6.0 % polietilenglicol 3,350 (p/p), 330 mM

sacarosa, 5 mM K_2HPO_4/KH_2PO_4 pH 7.8 y 1 mM DTT con un peso final de 36 g. Este tubo se mezcló cuidadosamente por inversión y se centrifugó 20 min a 700 g en un rotor de ángulo variable (HB4), en una centrífuga Sorvall RC-5B. Posteriormente se recuperó la fase acuosa rica en polietilenglicol (fase superior), que contenía a la MPB (Christianssen *et al.*, 1995), y se colocó en un segundo tubo que contenía solo fase acuosa rica en dextran (fase inferior) y se centrifugó. Este paso se repitió una vez más para optimizar la purificación de la MPB (Larsson, 1983). Las vesículas de MPB se concentraron por centrifugación durante 1 h a 100,000 g utilizando un rotor Ti-55.2 en una ultracentrífuga L-80. Finalmente la pastilla que contenía la MPB se resuspendió en medio de suspensión y se almacenó a $-80^{\circ}C$, hasta antes de ser empleada.

Aislamiento de simbiosomas. Este procedimiento se realizó a $4^{\circ}C$. Para el aislamiento de simbiosomas intactos se emplearon de 6 a 8 g de nódulos de plantas entre 21 y 26 días de edad. Para liberar los simbiosomas de las células infectadas, los nódulos se presionaron suavemente en un mortero conteniendo 5 mL de solución homogenizadora (ver sección anterior). El homogenizado se filtró a través de una doble hoja de Miracloth (Calbiochem-Nova Biochem Intl, La Jolla, CA, USA) para eliminar restos de tejido y vermiculita. Para la purificación de los simbiosomas, el filtrado se colocó en la parte superior de un gradiente discontinuo (80- 60- 30%) de Percoll (Pharmacia Biotech Inc., Alameda, CA, USA). Los tubos se centrifugaron durante 15 min usando un rotor de ángulo variable HB4 a 3800 g en una centrífuga Sorvall RC-5B. Los simbiosomas intactos se recuperaron de la interfase 60 - 80% del gradiente de Percoll, y se lavaron

cuidadosamente con solución de lavado (400 mM sorbitol, 3 mM MgSO₄, 25 mM Mes/BTP pH 7.0 y 1 mM DTT). Los simbiosomas se concentraron por centrifugación con un pulso de 15 s en el rotor de ángulo variable HB4 a 3800 g en una centrifuga Sorvall RC-5B.

Cuantificación de proteína. La concentración de proteína de las preparaciones de MPB y de los simbiosomas se determinó de acuerdo al método de Bradford (Bradford, 1976) usando albúmina de suero bovino como estándar.

Electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS - PAGE) y electrotransferencia. Las proteínas de la MPB se precipitaron con 50 volúmenes de una solución de alcohol:acetona (1:1 v/v) por dos horas, para eliminar lípidos y carbohidratos. Posteriormente las muestras se centrifugaron por 30 min a 14,000 rpm utilizando un rotor F2402 en una centrifuga GS-15R (Beckman). Los concentrados de proteínas se diluyeron en un volumen de la solución de Laemmli al 2.5% (100 mM Tris pH 6.8, 4% dodecil sulfato de sodio [SDS p/v], 20% glicerol [v/v], 10 mM 2-mercaptoetanol, 0.2 % azul de bromofenol [p/v]) y se incubaron por 5 min a 65 °C para desnaturalizar las proteínas.

Las proteínas se separaron en un gel continuo de acrilamida al 12.5% (12.16% acrilamida [p/v], 0.33% bis-acrilamida [p/v], 390 mM tris pH 8.0, 0.1% SDS [p/v], 0.1% persulfato de amonio [APS][p/v] y 0.04% tetrametil etilendiamina [TEMED] [v/v]. La parte concentradora del gel estuvo compuesta de 4.95% [p/v] acrilamida, 0.14% [p/v] bis-acrilamida, 130 mM Tris pH 6.8, 0.1% SDS [p/v], 0.1% APS [p/v] y 0.04 % TEMED

[v/v]. La electroforesis se llevó a cabo a un voltaje constante de 200 V por 45 min a 4 °C. Después de la electroforesis, los geles se tiñeron con el colorante azul brillante de Coomassie R250 al 0.25% disuelto en una solución de metanol/ácido acético 50% / 7% (v/v).

Los geles que no se tiñeron se utilizaron para los ensayos de inmunodetección y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa de 0.45 µm (Hybond-ECL Amersham Life Science, Inc., Cleveland OH, USA) en una cámara de transferencia con solución de transferencia (190 mM glicina, 25 mM Tris, 20 % metanol [v/v]) a un voltaje constante de 30 mV a 4° C por 14 - 16 h (Laemmli, 1970; Sambrook *et al.*, 1989).

Inmunodetección. Las membranas de nitrocelulosa se bloquearon durante 2 h con 5 % de leche en polvo descremada (Carnation Nestlé Co., USA) a temperatura ambiente. Posteriormente, las membranas se incubaron 6 - 7 h a temperatura ambiente con los anticuerpos primarios específicos: contra la nodulina 26 de la MPB de soya, Nod 26 (dilución 1:100), donados por el Dr. D.P. Verma; contra la región carboxilo terminal de la P-ATPasa de *Arabidopsis thaliana* (dilución 1:5000), donados por el Dr. R. Serrano; contra la subunidad E de la V-ATPasa del tonoplasto de células de cebada (dilución 1:3000), donado por el Dr. K.J. Dietz; contra la subunidad A y la subunidad B de la V-ATPasa de *Vigna radiata* (dilución 1:3000) donados por el Dr. Masayoshi Maeshima; y contra el segmento citoplasmático XII que une los segmentos transmembranales XII y XIII de la H⁺-PPasa de *Arabidopsis thaliana* (dilución 1:3000), cedidos por el Dr. P. Rea. Estos anticuerpos se obtuvieron en conejo. Las membranas se lavaron tres veces por 15 min

cada vez con solución TBS-T pH 7.6 (20 mM Tris, 137 mM NaCl y 0.1% tween - 20), para incubarlos posteriormente con un anticuerpo anti Ig G de conejo conjugado con peroxidasa a una dilución 1:2500 por 2 h a temperatura ambiente. Los complejos antígeno anticuerpo se detectaron por el método de quimioluminiscencia ECL (Amersham, Life Science, Inc., Cleveland OH, USA). Este método permite detectar la emisión de luz sobre una película fotográfica producida por el producto de oxidación del luminol en condiciones alcalinas en presencia de la peroxidasa. Alternativamente, los complejos antígeno-anticuerpo se revelaron con nitro azul de tetrazolium (NBT) y 5-bromo-4 cloro-3-indolil fosfato (BCIP), los cuales son sustratos de la fosfatasa alcalina.

Ensayos enzimáticos. La actividad hidrolítica de la H⁺-ATPasa de la MPB se cuantificó empleando el método de Ames (1966) con las modificaciones descritas por Zingarelli *et al.*, (1994). La reacción se llevó a cabo en 200 µl de medio de reacción (6 mM MgSO₄, 50 mM KCl, 30 mM Mes/BTP pH 6.5 o pH 8.0, 1mM Na₂MoO₄ y 3 mM ATP/BTP pH 6.5 o pH 8.0) y agregando de 5 a 10 µg de proteína. Este medio se incubó 30 min a 37 °C y la reacción se detuvo agregando 800 µl de la solución de AMES (10 % ácido ascórbico y una solución de 0.42 % (NH₄)₂MoO₄ en ácido sulfúrico [1:6] [v/v]), e incubando durante 30 min. La cantidad de fosfato liberado se determinó en un espectrofotómetro Hewlett Packard 8452A a una longitud de onda de 820 nm, empleando una solución de KH₂PO₄ para obtener la curva de calibración.

La actividad hidrolítica de la H⁺-PPasa asociada a la MPB, se determinó de manera similar, la diferencia fue el medio de reacción que consistió de 50 mM KCl, 1.3 MgSO₄,

1 mM Na_2MoO_4 , 30 mM Mes/BTP pH 8.0 y 300 μM PPI/BTP pH 8.0).

La actividad citocromo oxidasa *c*, se determinó de acuerdo con la metodología propuesta por Wienecke *et al.* 1982. Se midió el cambio de absorbancia producido por la oxidación del citocromo, previamente reducido. La mezcla de reacción consistió en 0.6 mM de citocromo *c* reducido, 0.5% de Tritón X-100 al 10% y 100 μg de proteína. El ensayo se inició con la adición de proteína, y la disminución de la absorbancia a 550 nm se midió a 25°C durante 10 min.

Ensayos de actividad de transporte de H^+ de la H^+ -ATPasa y de la H^+ -PPasa. El bombeo de H^+ por la ATPasa se determinó empleando un método fluorimétrico que asocia los cambios en los niveles de fluorescencia de la quinacrina, un colorante sensible al gradiente de pH, con la acidificación del interior de las vesículas de membrana. La actividad de bombeo de H^+ se midió en un medio de reacción que contenía 25 mM Mes/BTP pH 6.5 ó pH 8.0, 400 mM sorbitol, 8 μM quinacrina, 50 mM cloruro de tetra metil amonio (TMA-Cl), 6 mM MgSO_4 y 30 μg de simbiosomas intactos, activando a la ATPasa con la adición de 3 mM de ATP/BTP pH 6.5 ó pH 8.0.

De manera similar, el bombeo de H^+ por la H^+ -PPasa asociada a la MPB se observó al adicionar 300 μM PPI/BTP pH 8, al medio de reacción que contenía 25 mM Mes/BTP pH 8, 400 mM sorbitol, 8 μM quinacrina, 50 mM KCl, 1.3 mM MgSO_4 y 100 μg de simbiosomas. En ambos casos la disminución de la fluorescencia de la quinacrina, indicó una acidificación del espacio peribacteroidal e indirectamente, la actividad de bombeo de H^+ de la H^+ -ATPasa, o bien, de la H^+ -PPasa . Esta disminución de fluorescencia se midió

en un fluorómetro LS 50 (Perkin Elmer Corp., Branchburg, NJ, USA), empleando una longitud de excitación de 427 ± 5 nm y una longitud de onda de emisión de 495 ± 5 nm.

RESULTADOS

La MPB que rodea a los bacteroides durante la simbiosis *Rhizobium*-leguminosas juega un papel muy importante. Esto se debe a que delimita al bacteriote y lo protege de una posible respuesta de defensa de la planta, además de regular el transporte del nitrógeno fijado por el endosimbionte hacia el citoplasma de la célula infectada, así como el transporte de ácidos dicarboxílicos, por ejemplo malato, del citoplasma de la célula al espacio peribacteroidal. En este trabajo, se caracterizaron los transportadores activos primarios presentes en ésta membrana, analizando su actividad de bombeo de H^+ , su actividad hidrolítica y se determinaron parámetros como pH óptimo, K_m , V_{max} y perfil de inhibición. Los resultados de estos estudios se relacionaron con aquellos obtenidos por ensayos de inmunodetección.

I. Obtención de la MPB de nódulos de frijol.

El uso de preparaciones de vesículas de membranas aisladas es muy útil para el análisis de procesos de transporte asociados con éstas, de esta manera se evitan posibles complicaciones relacionadas con la maquinaria metabólica de toda la célula. La metodología seguida en este trabajo presentó la ventaja de eliminar un porcentaje considerable de contaminantes de membrana plasmática o membranas intracelulares como la de la vacuola, el aparato de Golgi o de la mitocondria al aislar inicialmente simbiosomas intactos (Christiansen *et al.*, 1995).

La obtención de la MPB se realizó mediante la lisis de los simbiosomas por choque osmótico, lo cual permitió la separación de ésta y de los bacteroides por centrifugación

diferencial. La MPB se purificó realizando tres extracciones sucesivas con un sistema de partición de dos fases de dextran y polietilenglicol al 6.0% (p/p). Este método tiene como principio separar las membranas de acuerdo a sus propiedades de superficie, como la carga y la hidrofobicidad.

Una de las proteínas previamente identificadas en la MPB es la nodulina 26, una proteína intrínseca de ésta membrana que tiene homología con un gran número de proteínas que forman canales en la membrana de *Escherichia coli*, levadura, *Drosophila*, mamíferos y plantas (Miao y Verma, 1993). Con el objetivo de comprobar que las preparaciones obtenidas estaban enriquecidas con MPB, se realizaron ensayos de inmunodetección tipo "Western", utilizando el anticuerpo contra la nodulina 26 de la MPB de soya. En la figura 2A se muestran las proteínas totales de las diferentes preparaciones. En la figura 2B se presenta el resultado de un ensayo tipo "Western": en los carriles 1, 2, 3, y 4, que corresponden a 4 diferentes preparaciones de MPB, el anticuerpo reconoció un polipéptido de aproximadamente 26 kDa, que es el peso molecular de la nodulina 26. En contraste, el anticuerpo no reconoció polipéptido alguno en preparaciones de tonoplasto (carril 7), de membrana plasmática de raíz de frijol (carril 5) ni de membrana plasmática de tomate (carril 6), indicando que las preparaciones de membrana utilizando el sistema de partición de dos fases estaban enriquecidas con MPB. A estas preparaciones se les midió la actividad de la citocromo oxidasa *c*, con la finalidad de asegurar la eficiencia del método de purificación de dos fases. La contaminación con membrana plasmática de los bacteroides fue mínima. La actividad de esta enzima fue de 4.12 nmol de citocromo *c* min⁻¹

1 mg^{-1} de proteína (Christiansen *et al.*, 1995).

La MPB también se aisló empleando un gradiente continuo de sacarosa del 10 al 45% a partir de simbiosomas rotos. Este gradiente se fraccionó en alícuotas de 2ml, recolectándose así 17 fracciones, de las cuales se precipitaron las proteínas. La figura 3 muestra que la MPB se recuperó en las fracciones 4 a 9 que corresponden a una concentración entre un 21 y un 33% de sacarosa, ya que el anticuerpo contra la nodulina 26 reconoció una banda de aproximadamente 26 kDa en estas fracciones. Este anticuerpo también reconoció a un polipéptido de 26 kDa en la fracción 17 que correspondió a una concentración del 50% de sacarosa, donde probablemente quedaron algunos simbiosomas sin romper.

II. Propiedades de la ATPasa de la MPB.

Empleando preparaciones de MPB se determinó el pH óptimo de la H^+ -ATPasa entre los valores de 5.5. a 10.0. La actividad máxima se observó entre pH 8.5 y 9.0 como lo muestra la figura 4 y fue de $19.37 \mu\text{moles de Pi h}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína. .

La actividad hidrolítica de la ATPasa de la MPB a pH 8.0 se aproximó a una cinética de Michaelis-Menten con respecto a la concentración de ATP (fig 5A), obteniéndose una K_m de 0.53 mM ATP y una V_{max} de $39.49 \mu\text{moles de Pi h}^{-1} \text{ mg proteína}^{-1}$ a partir de una gráfica Linewaver-Burk (fig 5B).

III. Efecto de inhibidores específicos sobre la actividad hidrolítica de la ATPasa de la MPB.

Los diferentes tipos de H^+ -ATPasas se inhiben específicamente por ciertos

compuestos, lo que ayuda a identificarlas entre ellas. La actividad hidrolítica a pH 8 de las diferentes preparaciones de MPB se determinó en presencia de 100 μ M de vanadato, un inhibidor específico de la P-ATPasa; 50 nM de oligomicina o 1 mM de azida, inhibidores de la F-ATPasa; y 100 mM de nitrato y 1 nM de bafilomicina, inhibidores de la V-ATPasa. La tabla 1 muestra que el nitrato y azida inhibieron la actividad hidrolítica de la H⁺-ATPasa en forma similar, alcanzando niveles de 56 y 61% de disminución de ésta actividad respectivamente. La oligomicina causó una disminución del 52%, mientras que vanadato inhibió solo el 24% de la actividad hidrolítica. La bafilomicina provocó solo una inhibición del 10% sobre esta actividad.

IV. Actividad de bombeo de H⁺ de la H⁺-ATPasa en simbiosomas intactos

La actividad de las H⁺-ATPasas no solo involucra la hidrólisis del ATP, sino también la actividad de bombeo de H⁺, por lo tanto, se analizó esta actividad en simbiosomas aislados de nódulos de frijol.

En la figura 6 se muestra un trazo original del bombeo de H⁺ de la H⁺-ATPasa de la MPB. Durante los primeros dos minutos se estableció el equilibrio del colorante entre el medio de reacción y el interior de los simbiosomas. Una vez que el nivel de fluorescencia fue estable, se adicionó 3 mM de ATP para activar a la H⁺-ATPasa, observándose una disminución de la fluorescencia. La disminución de la fluorescencia de la quinacrina, un colorante sensible al Δ pH, se interpreta como una acidificación del espacio peribacteroidal, e indirectamente, de la actividad de la H⁺-ATPasa. Para confirmar que la disminución de la fluorescencia de la quinacrina fue ocasionada específicamente

por el establecimiento de un gradiente de pH, se adicionó 2.5 mM de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y se comparó el nivel de fluorescencia alcanzado con el nivel inicial. Si estos dos niveles eran muy similares, los experimentos podrían continuarse.

Al analizar la actividad de bombeo de la H^+ -ATPasa en respuesta a la adición de ATP a pH 6.5 y pH 8.0, se observó consistentemente una mayor velocidad inicial de acidificación del espacio peribacteroidal a pH 8.0. Como lo muestra la figura 7, a pH 8.0 la velocidad inicial de la disminución de la fluorescencia correspondió a $56.45 \text{ UF h}^{-1} \text{ mg proteína}^{-1}$, alrededor de dos veces más que la observada a pH 6.5 con una disminución de $29.03 \text{ UF h}^{-1} \text{ mg proteína}^{-1}$.

Cuando la actividad de bombeo de H^+ por la ATPasa de la MPB se analizó en la presencia de diferentes inhibidores específicos de las H^+ -ATPasas, no se observó una inhibición muy marcada de ésta actividad en presencia de vanadato y oligomicina, ya que tan solo inhibieron 13 y 8% respectivamente. De manera contraria, la bafilomicina inhibió un 91% esta actividad y la azida un 51%. En presencia de nitrato se observó una estimulación en la velocidad inicial de la disminución de la fluorescencia de la quinacrina al adicionar el ATP (fig 8 y tabla 2).

V. Propiedades de la H^+ -PPasa de la MPB.

El pH óptimo de la actividad hidrolítica de la H^+ -PPasa se determinó empleando valores de pH entre 6.0 y 10.0 obteniéndose un máximo de actividad a pH 9.0 (fig 9). La actividad hidrolítica a pH 9.0 fue de $20 \mu\text{moles Pi h}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ proteína}$.

La actividad hidrolítica de la H^+ -PPasa de la MPB a pH 8.0 mostró una cinética

tipo Michaelis-Menten con respecto a la concentración de PPI (fig 10A) y se obtuvo una K_m de 70.42 μM PPI y una V_{\max} de 25.25 $\mu\text{moles de Pi h}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ proteína a partir de una gráfica Linewaver-Burk (fig 10B).

VI. Actividad de bombeo de H^+ de la H^+ -PPasa de la MPB.

El comportamiento de la H^+ -PPasa en los ensayos de fluorescencia fue muy diferente al mostrado por la H^+ -ATPasa. Al analizar la actividad de bombeo de H^+ dependiente de pirofosfato se observaron dos disminuciones en la fluorescencia; en los primeros minutos, después de adicionar el PPI a simbiosomas intactos, una ligera disminución seguida de una segunda caída más pronunciada. La actividad total correspondió a $21.68 \pm 2.41 \text{ UF h}^{-1} \text{ mg proteína}^{-1}$. Al adicionar el $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ se disipaba el potencial de membrana, regresando la fluorescencia a un nivel muy cercano al inicial, lo que indicó que el gradiente de pH formado era debido a la actividad de la H^+ -PPasa detectada (fig 11).

VII. Identificación de los transportadores activos primarios presentes en la MPB por ensayos de inmunodetección.

Con el fin de corroborar los resultados obtenidos en el análisis de la actividad hidrolítica y de bombeo de H^+ dependientes de ATP o bien de PPI se realizaron ensayos de inmunodetección. Las proteínas de las preparaciones de MPB, aisladas y purificadas por el sistema de dos fases, se separaron en geles de poliacrilamida al 12.5%, se

transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se realizaron ensayos tipo "Western". Los anticuerpos utilizados fueron los siguientes: un anticuerpo que reconoce la región carboxilo terminal de la P-ATPasa de *Arabidopsis thaliana*; un anticuerpo que reconoce la subunidad E de la V-ATPasa de tonoplasto de células de cebada, los anticuerpos que reaccionan con la subunidad A y la subunidad B de la V-ATPasa de tonoplasto de *Vigna radiata* y el anticuerpo que reconoce el segmento citoplasmático XII que une los segmentos transmembranales XII y XIII de la H⁺-PPasa de tonoplasto de *Arabidopsis thaliana*.

Como se muestra en la figura 12B, el anticuerpo de la P-ATPasa, no reconoció ningún polipéptido de 100 kDa en las diferentes preparaciones de MPB (Carriles 1 al 4). Sin embargo éste reconoció un polipéptido que corresponde al peso molecular de la P-ATPasa en la preparación de membrana plasmática de raíz de frijol (carril 5) y en la preparación de membrana plasmática de células en suspensión de tomate (carril 6), usadas como controles positivos, debido a que en estudios previos realizados en el laboratorio se sabía que estos anticuerpos reconocían este polipéptido. La figura 12A representa el gel teñido con azul de Coomassie de las diferentes preparaciones.

Las figuras 13B y C muestran que los anticuerpos contra la subunidad A y la subunidad B de la V-ATPasa reconocieron en las diferentes preparaciones de MPB (carriles 1 al 3), polipéptidos de 67 y de 56 kDa, pesos moleculares de las subunidades A y B respectivamente. De manera similar, estos anticuerpos reconocieron polipéptidos del mismo peso molecular en las preparaciones de tonoplasto de raíz de frijol y del

tubérculo de betabel que fueron utilizadas como control (carriles 4 y 5). La figura 13A representa el gel teñido con azul de Coomassie de las diferentes preparaciones.

En contraste, cuando se probó el anticuerpo contra la subunidad E de la V-ATPasa (fig 14B), éste no reconoció polipéptido alguno en las diferentes preparaciones de MPB (carriles 1 al 3), pero si reconoció un polipéptido de 31 kDa, peso molecular de esta subunidad, en la preparación de tonoplasto del tubérculo de betabel (carril 4). La figura 14A representa el gel teñido con azul de Coomassie de las diferentes preparaciones.

El anticuerpo contra la H^+ -PPasa (fig 15B) reconoció un polipéptido de 66 kDa, peso molecular de esta enzima, tanto en las diferentes preparaciones de MPB (carriles 1 al 3), como en las preparaciones de tonoplasto de raíz de frijol y de tonoplasto del tubérculo de betabel (carriles 4 y 5) utilizadas como controles positivos. La figura 15A representa el gel teñido con azul de Coomassie de las diferentes preparaciones.

VI. Permeabilidad de la MPB a ácidos dicarboxílicos

Una de las funciones más importantes de la MPB es la de mediar el transporte de solutos entre los dos simbiosntes. Para que el bacteroide pueda llevar a cabo la fijación de nitrógeno es necesario que la planta proporcione de manera constante la fuente de carbono, principalmente ácidos dicarboxílicos, como el malato y el succinato.

Una manera indirecta de determinar la permeabilidad de la MPB a los ácidos dicarboxílicos es mediante el estudio de los efectos de éstos aniones en la velocidad inicial del bombeo de H^+ . Así, al adicionar a los simbiosomas, malato⁻², succinato⁻² o bien, fumarato⁻², éstos permearán la MPB disipando el potencial de membrana y activarán el

bombeo de H^+ por la H^+ -ATPasa.

Como se muestra en la figura 16 y en la tabla 4, el bombeo de H^+ por la H^+ -ATPasa fue mayor en presencia de maleato. La disminución de la velocidad inicial de la caída de fluorescencia fue similar cuando se emplearon malato, succinato o fumarato como iones principales, pero menor a la observada en presencia de maleato.

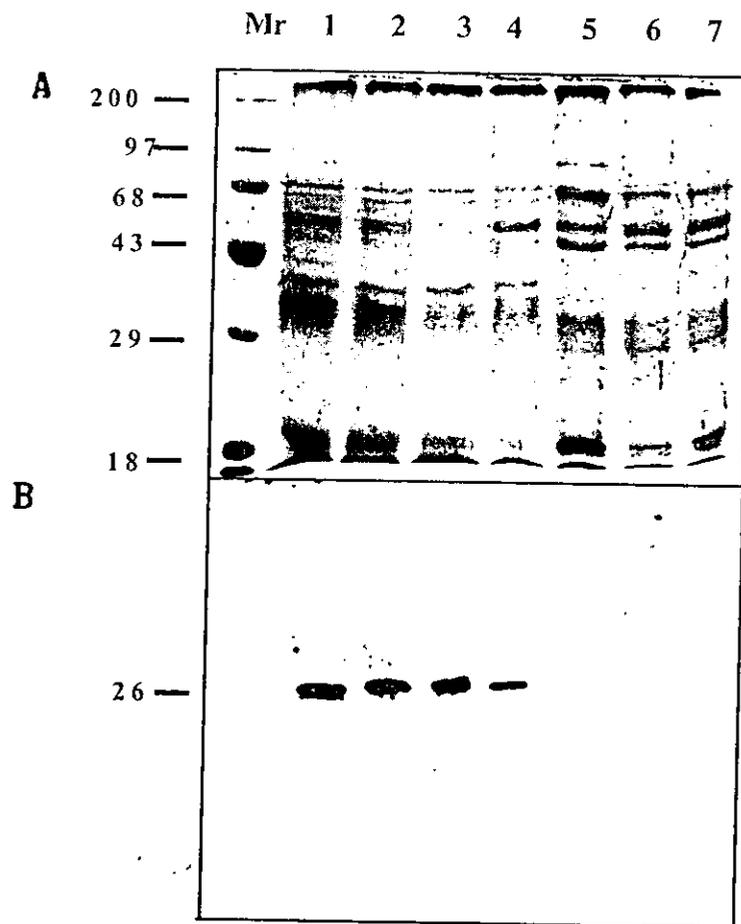


Figura 2: Purificación de la MPB de nódulos de frijol por el sistema de dos fases. A. Gel de poliacrilamida-SDS (12.5%) y teñido con azul de Coomassie. Las proteínas se obtuvieron de preparaciones de MPB de nódulos de frijol (carril 1 al 4); membrana plasmática de raíz de frijol (carril 5); membrana plasmática de tomate (carril 6); tonoplasto de raíz de frijol (carril 7). Mr corresponde a marcadores de peso molecular. **B.** Ensayos tipo "Western" empleando el anticuerpo contra la nodulina 26 de la MPB de soya. 26 corresponde al peso molecular estimado del polipéptido que reconoció este anticuerpo.

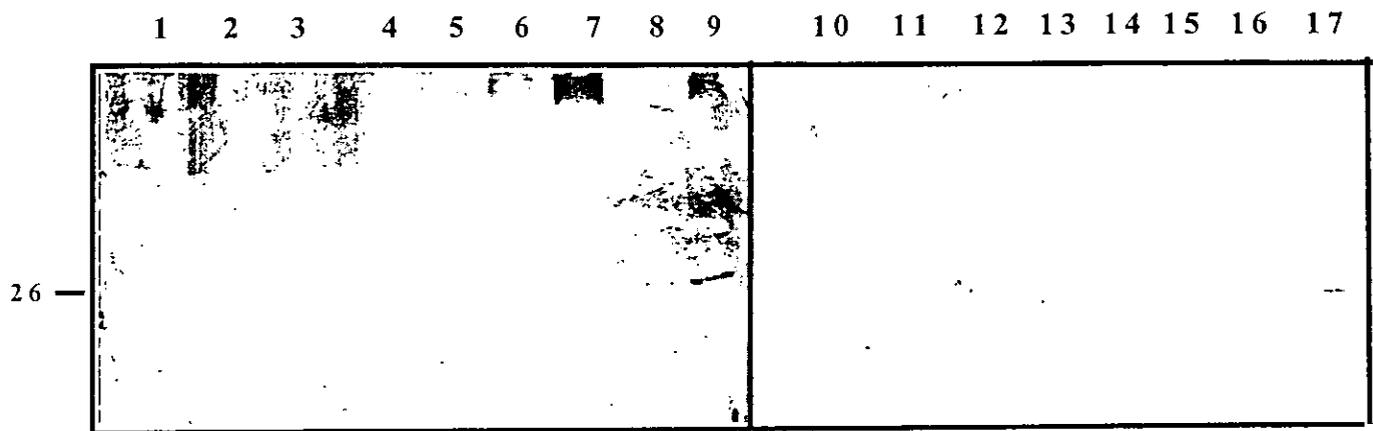


Figura 3: Purificación de la MPB de nódulos de frijol por gradientes continuos de sacarosa. Ensayos tipo "Western" de las diferentes fracciones recolectadas del gradiente continuo de sacarosa empleando el anticuerpo contra la nodulina 26 de la MPB de soya. El número 26 corresponde al peso molecular estimada del polipéptido que reconoce el anticuerpo. Cada carril corresponde a 50 μ g de proteína de las fracciones recolectadas cada 2 ml.

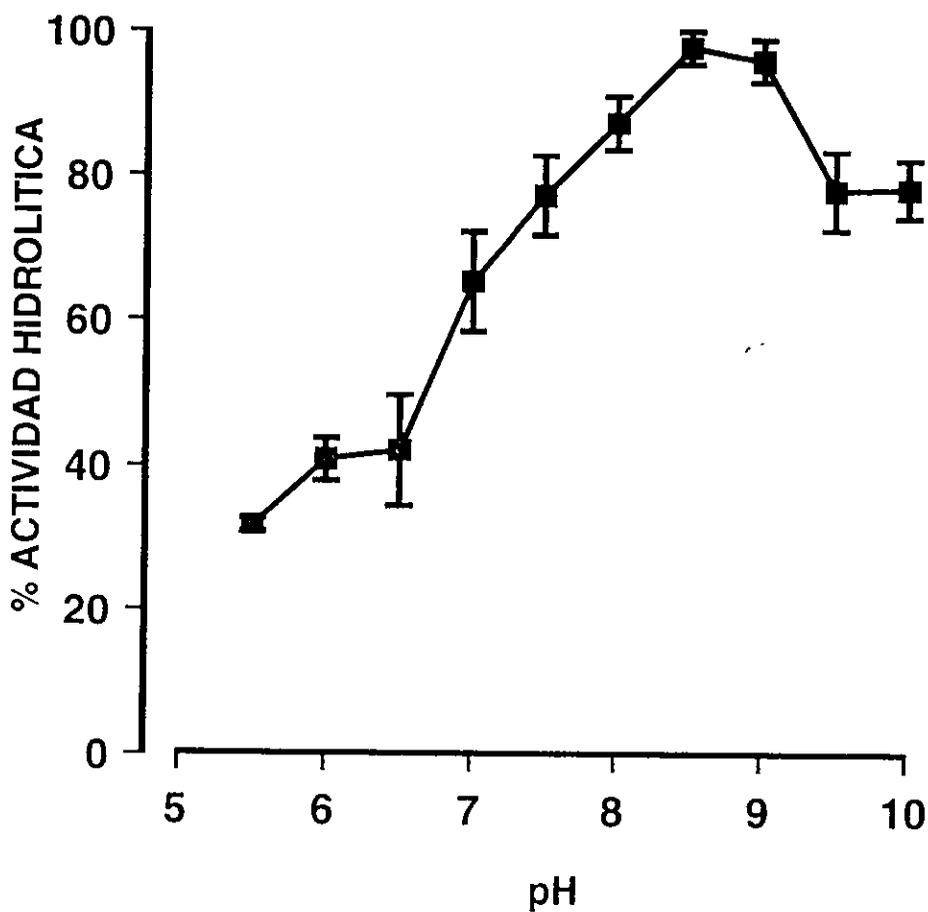


Figura 4: pH óptimo de la actividad hidrolítica de la H^+ -ATPasa de la MPB de nódulos de frijol. La actividad hidrolítica de la H^+ -ATPasa de la MPB mostró un pH óptimo entre 8.5 y 9.0. Se utilizaron 10 μ g de proteína de la MPB en un medio MES/BTP ajustando a los diferentes pH. Los valores son la media \pm SD de tres preparaciones diferentes.

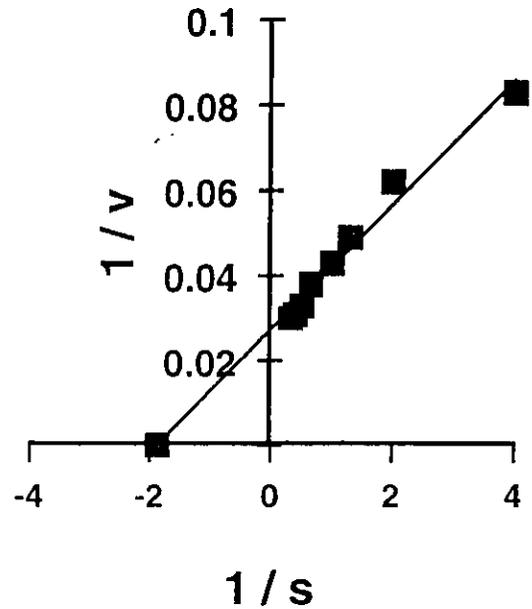
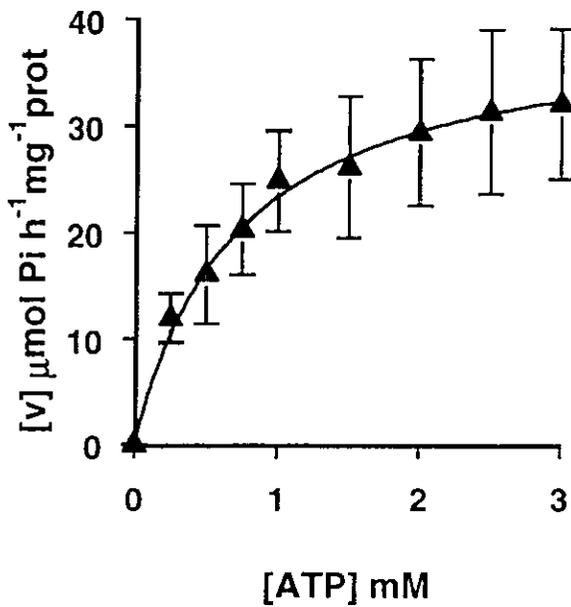


Figura 5: Cinética de la actividad hidrolítica de la H^+ -ATPasa de la MPB de nódulos de frijol. Se utilizaron 10 μg de proteína de MPB. **A.** Gráfica tipo Michaelis-Menten. **B.** Gráfica Lineweaver-Burk. Los valores de la K_m ($x=y-B/A$, 0.53 mM de ATP) y de la V_{max} [$y=A(0)+B$, 39.49 $\mu\text{moles de Pi h}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína] representan el resultado de tres experimentos.

Tabla 1. Efecto de inhibidores sobre la actividad hidrolítica de la ATPasa en preparaciones de MPB de nódulos de frijol.

	$\mu\text{moles Pi h}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{proteína}^a$	% de inhibición
Control	14.28 ± 3.78	
Nitrato (100 mM)	6.26 ± 1.82	56
Bafilomicina (1 nM)	12.85 ± 0.87	10
Vanadato (100 μM)	10.83 ± 2.79	24
Azida (1 mM)	5.55 ± 1.76	61
Oligomicina (50 nM)	6.82 ± 1.16	52

^a Representa la media \pm desviación estandar de por lo menos tres diferentes preparaciones de MPB.

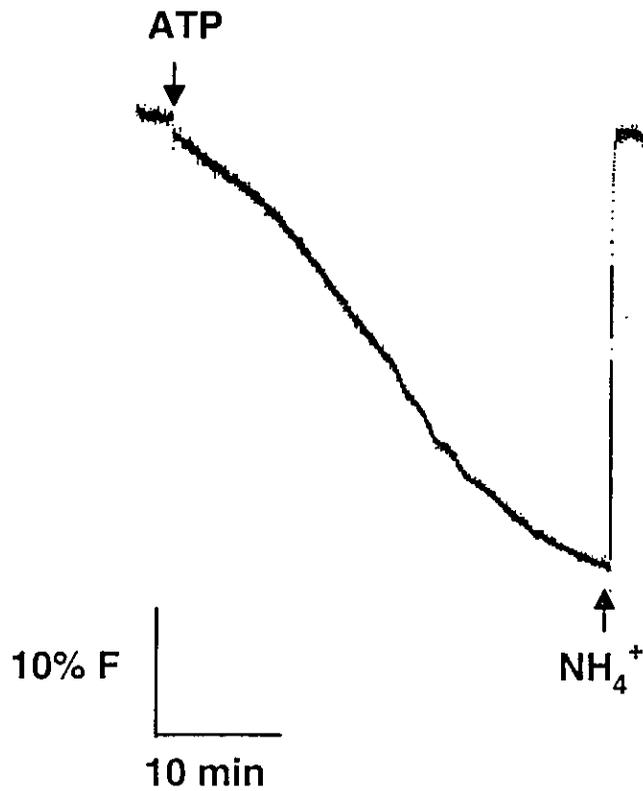


Figura 6 : Actividad de bombeo de la H^+ -ATPasa de la MPB de nódulos de frijol. La adición de 3 mM de ATP causó una disminución de la fluorescencia de la quinacrina debido a la acidificación en el espacio peribacteroidal por la actividad de bombeo de H^+ de la ATPasa. El gradiente de pH se disipó con la adición de 2.5 mM $(NH_4)_2SO_4$. Este registro es representativo de por lo menos 5 diferentes preparaciones.

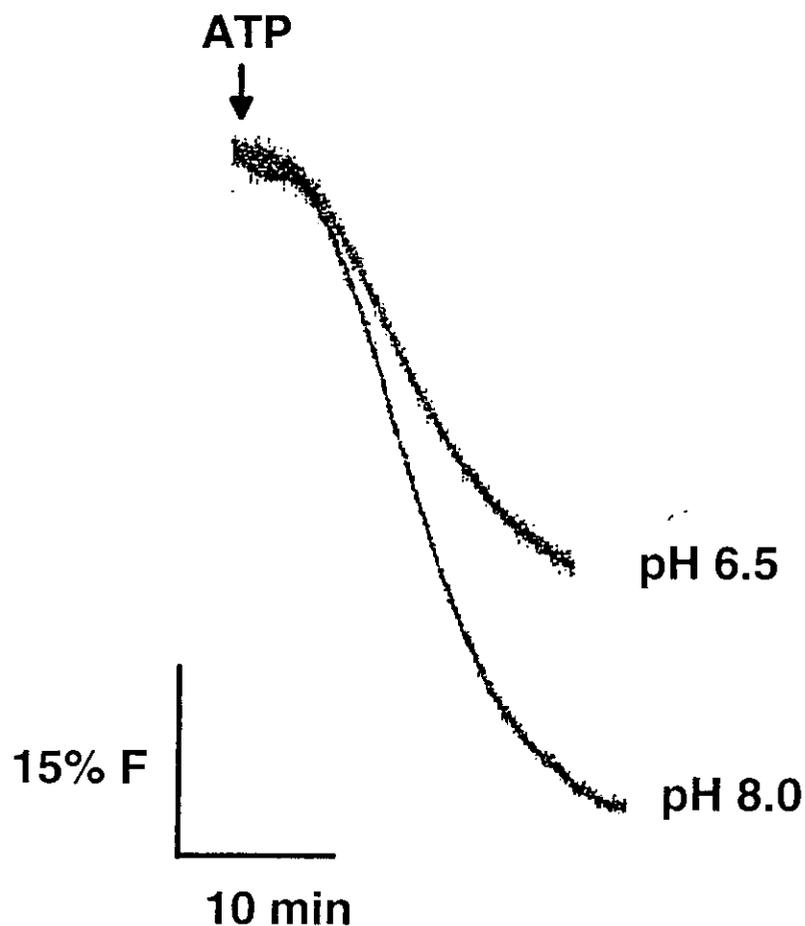


Figura 7: Actividad de bombeo de la H^+ -ATPasa de la MPB de nódulos de frijol a pH 6.5 y pH 8.0. La acidificación del espacio peribacteroidal por la actividad de bombeo de H^+ de la ATPasa a pH 6.5 y pH 8.0 se midió por la disminución de la fluorescencia de la quinacrina después de la adición de 3 mM de ATP. Para este ensayo se utilizaron 30 μ g de proteína de simbiosomas. Estos registros son representativos de por lo menos 5 diferentes preparaciones.

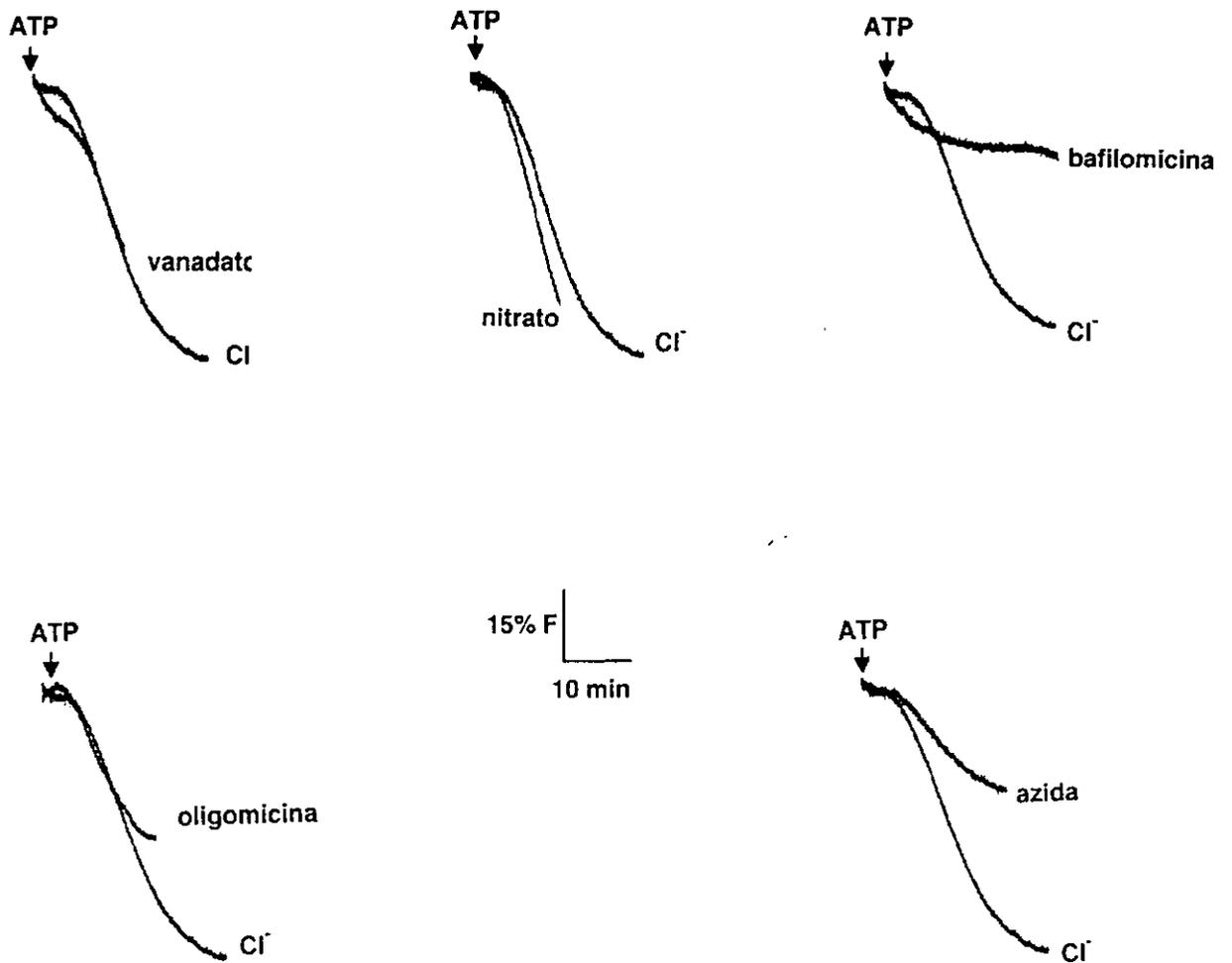


Figura 8: Efecto de inhibidores específicos en la actividad de bombeo de H^+ de la H^+ -ATPasa de la MPB de nódulos de frijol. Inhibición de la actividad de bombeo de H^+ de la ATPasa de la MPB por 50 nM de oligomicina, 1 mM de azida, 100 μ M de vanadato, 100 mM de nitrato y 1 nM de bafilomicina. En cada caso el potencial de membrana se dispó con Cl^- en ausencia del inhibidor. Cada reacción se realizó con 30 μ g de proteína de simbiosomas y fue iniciada con 3mM de ATP. Resultados similares se obtuvieron en por lo menos tres preparaciones de simbiosomas.

Tabla 2. Efecto de inhibidores específicos de las H⁺-ATPasas sobre la velocidad inicial del transporte de protones dependiente de ATP en simbiosomas intactos

	UF h ⁻¹ mg ⁻¹ proteína ^a	% de inhibición
Control	56.45 ± 1.52	
Nitrato (100 mM)	66.67 ± 0.92	(+ 18)
Bafilomicina (1 nM)	4.8 ± 2.56	91
Vanadato (100 μM)	49.21 ± 2.73	13
Azida (1 mM)	27.47 n.d.	51
Oligomicina (50 nM)	52.04 ± 6.59	8

^aRepresenta la media ± la desviación estandar de por lo menos tres preparaciones diferentes de MPB.

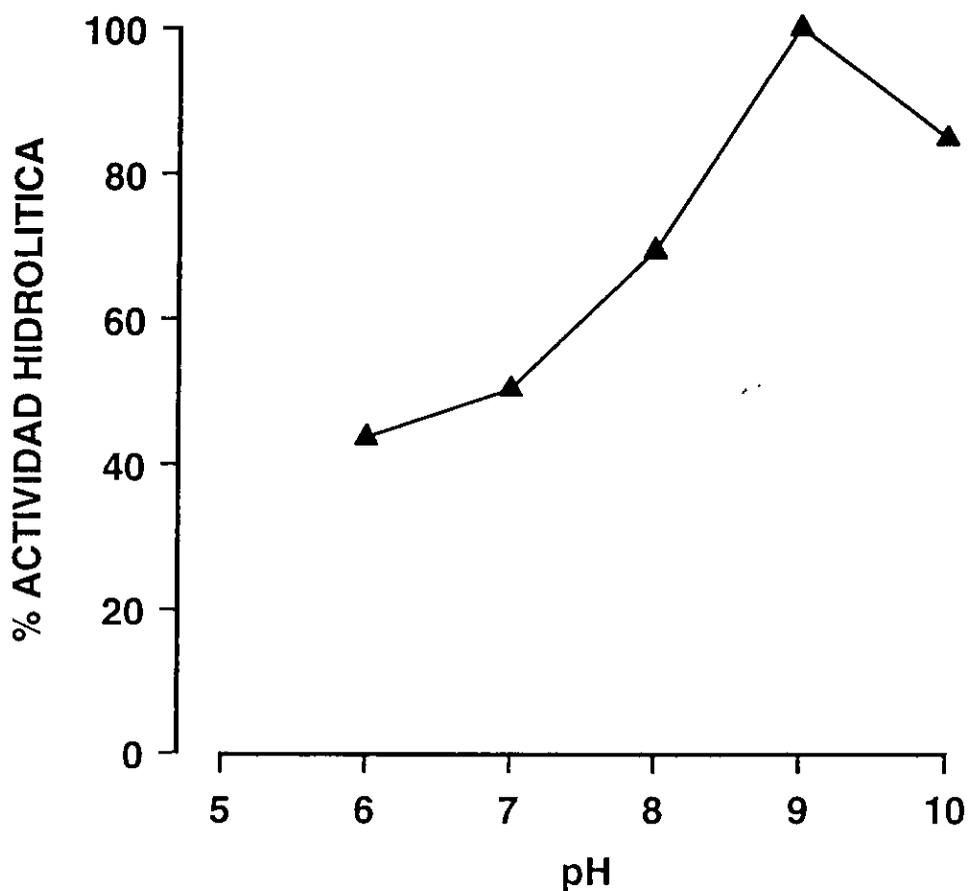


Figura 9: pH óptimo de la actividad hidrolítica de la H^+ -PPasa de la MPB de nódulos de frijol. La actividad hidrolítica de la H^+ -PPasa de la MPB mostró un pH óptimo a 9.0. Se utilizaron 10 μ g de proteína de la MPB en un medio MES/BTP ajustando a los diferentes pH. Los valores son la media de dos experimentos diferentes.

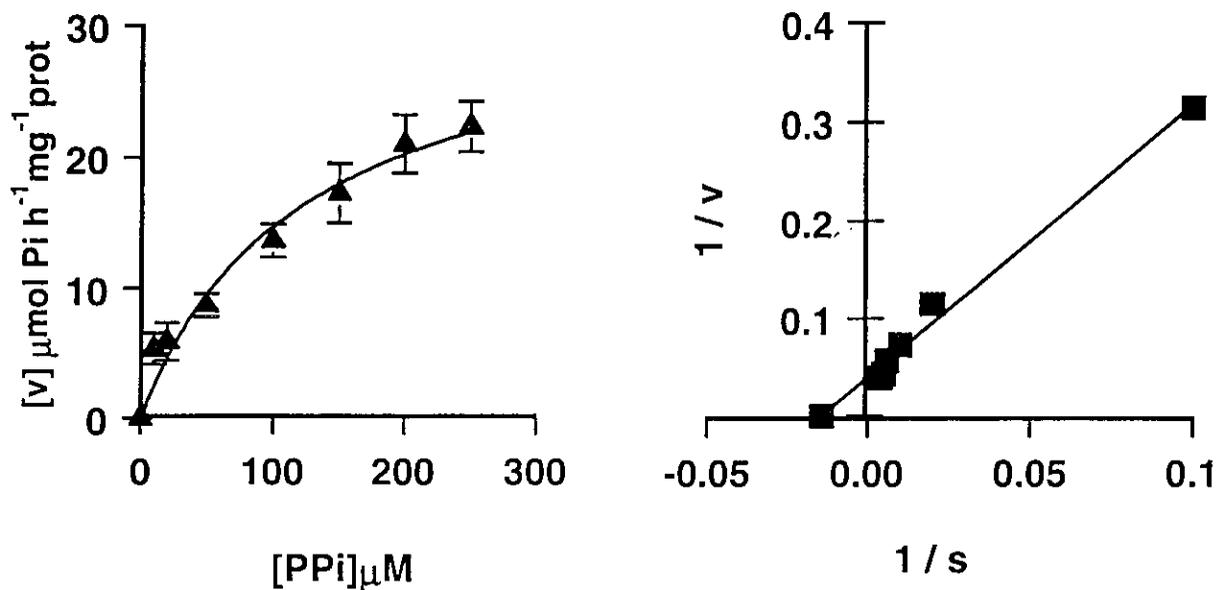


Figura 10: Cinética de la actividad hidrolítica de la H⁺-PPasa de la MPB de nódulos de frijol a diferentes concentraciones de PPI. Se utilizaron 10 μg de proteína de MPB. A. Gráfica tipo Michaelis-Menten. B. Gráfica Lineweaver-Burk. Los valores de la K_m ($x=y-B/A$, 70.42 μM de PPI) y de la V_{max} [$y=A(0)+B$, 25.25 $\mu\text{moles de Pi h}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína] representan el resultado de tres experimentos.

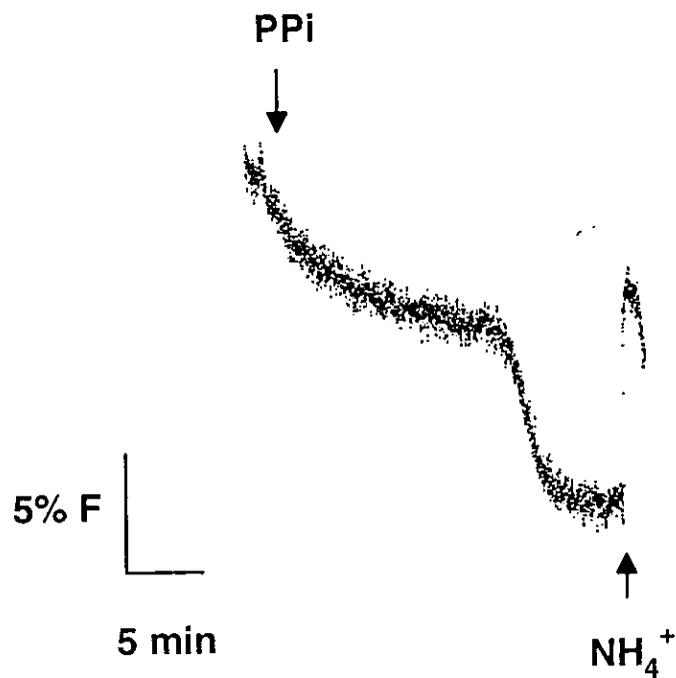


Figura 11: Actividad de bombeo de H⁺ de la H⁺-PPasa de la MPB en nódulos de frijol. La acidificación del espacio peribacteroidal por la actividad de bombeo de H⁺ de la H⁺-PPasa a pH 8.0 se midió por la disminución de la fluorescencia de la quinacrina después de la adición de 300 μM de PPI. Para este ensayo se utilizaron 100 μg de proteína de simbiosomas. Este registro es representativo de por lo menos 5 diferentes preparaciones.

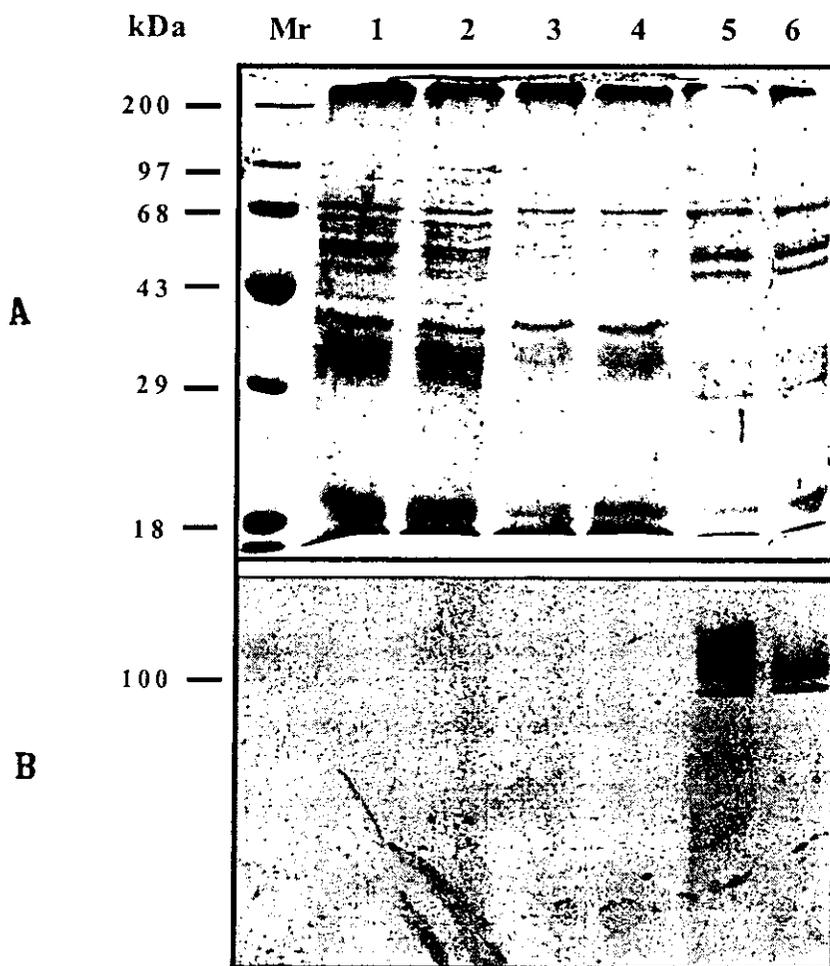


Figura 12: Ausencia de la P-ATPasa en la MPB de nódulos de frijol. A. Gel de poliacrilamida-SDS y teñido con azul de Coomassie. Las proteínas se obtuvieron de la MPB de nódulos de frijol (carriles 1 al 4), membrana plasmática de raíz de frijol (carril 5) y membrana plasmática de células en suspensión de tomate (carril 6). Mr corresponde a marcadores de peso molecular. B. Ensayo tipo "Western". empleando el anticuerpo contra la región carboxilo terminal de la P-ATPasa de *A. thaliana*. 100 corresponde al peso molecular estimado del polipéptido que reconoce el anticuerpo.

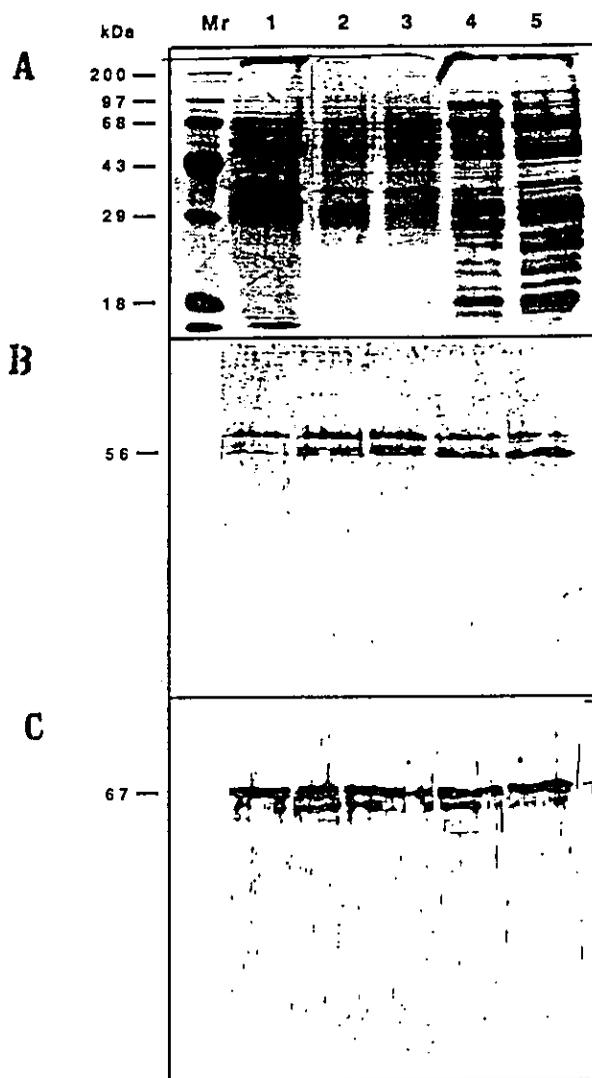


Figura 13: Presencia de las subunidades A y B de la V-ATPasa en la MPB de nódulos de frijol. A. Gel de poliacrilamida-SDS (12.5%) teñido con Azul de Coomassie. Las proteínas se obtuvieron de la MPB de nódulos de frijol (carriles 1 al 3); tonoplasto de raíz de frijol (carril 4); y del tonoplasto del tubérculo de betabel (carril 5). Mr corresponde a marcadores de peso molecular. B. Ensayo tipo "Western" empleando el anticuerpo policlonal contra la subunidad A de la V-ATPasa de *Vigna radiata*. 56 corresponde al peso molecular estimado del polipéptido que reconoce el anticuerpo. C. Ensayo tipo "Western", empleando el anticuerpo policlonal contra la subunidad B de la V-ATPasa de *Vigna radiata*. 67 corresponde al peso molecular estimado del polipéptido que reconoce el anticuerpo.



Figura 14: Ausencia de la subunidad E de la V-ATPasa en la MPB de nódulos de frijol.
A. Gel de poliacrilamida-SDS (12.5%) teñido con Azul de Coomassie. Las proteínas se obtuvieron de preparaciones de MPB de nódulo de frijol (carriles de 1 al 3); y del tonoplasto de la raíz de frijol (carril 4). Mr corresponde a marcadores de peso molecular.
B. Ensayo tipo "Western" empleando el anticuerpo policlonal contra la subunidad E de la V-ATPasa de células de cebada. 31 corresponde al peso molecular del polipéptido que reconoció el anticuerpo.

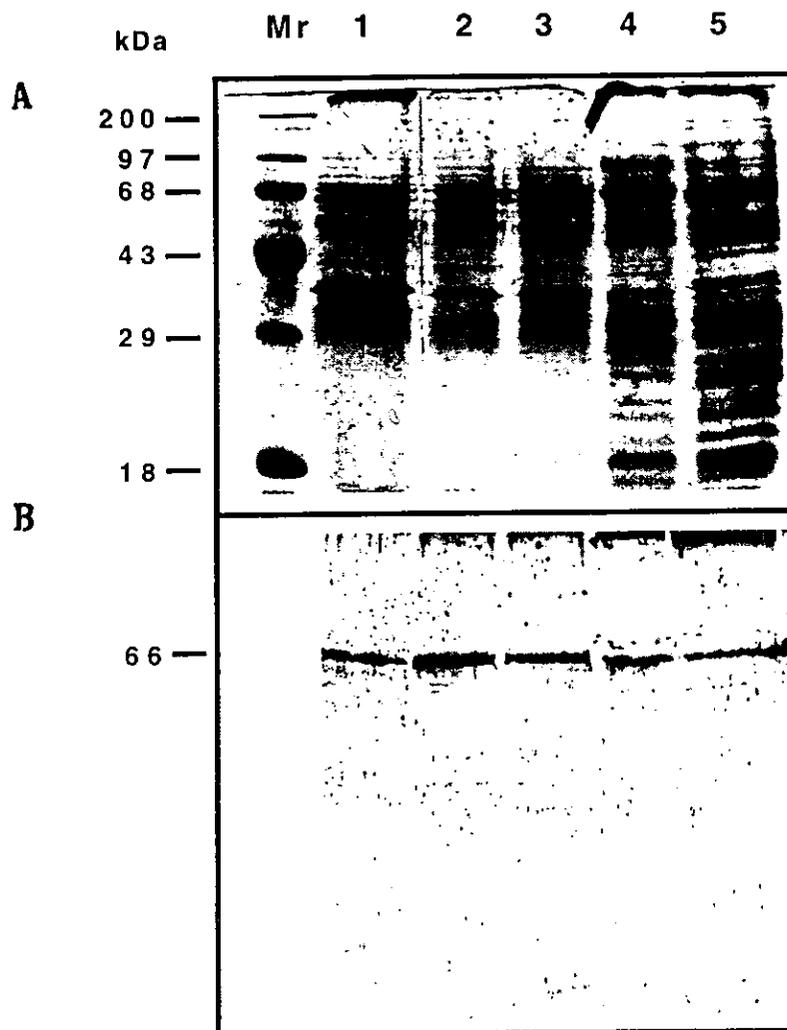


Figura 15: Presencia de la H⁺-PPasa en la MPB de nódulos de frijol. A. Gel de poliacrilamida-SDS (12.5%) teñido con Azul de Coomassie. Las proteínas se obtuvieron de preparaciones de MPB de nódulos de frijol (carriles 1 al 3); del tonoplasto de la raíz de frijol (carril 4) y del tonoplasto del tubérculo de betabel (carril 5). Mr corresponde a marcadores de peso molecular. B. Ensayo tipo "Western" empleando el anticuerpo policlonal contra la H⁺-PPasa de *Arabidopsis thaliana*. 66 corresponde al peso molecular del polipéptido que reconoció el anticuerpo.

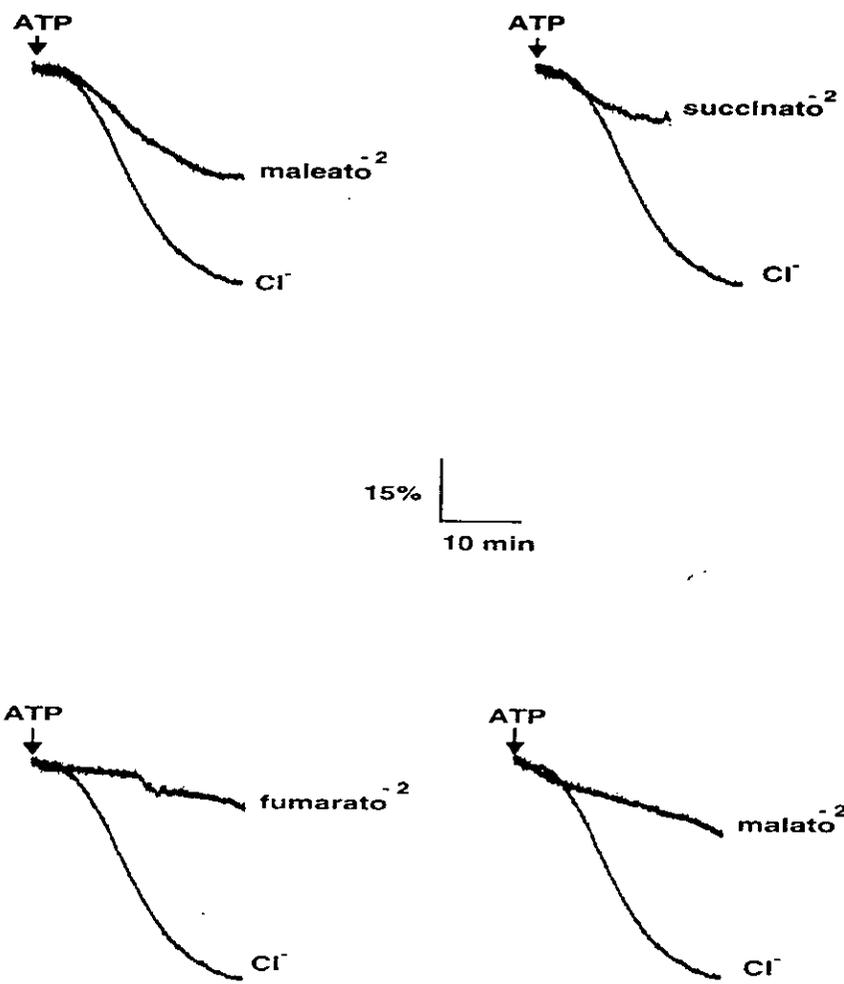


Figura 16: Permeabilidad de la MPB a diferentes ácidos dicarboxílicos. Actividad de bombeo de H⁺ de la ATPasa de la MPB en presencia de 50 mM de maleato, 50 mM de succinato, 50 mM de malato y 50 mM de fumarato. Como control se muestra la actividad de bombeo de H⁺ en presencia de Cl⁻. Esta reacción se realizó con 30 μg de proteína de simbiosoma y se inició por la adición de 3 mM de ATP. La rapidez de la disminución de la fluorescencia de la quinacrina indica la permeabilidad de la MPB a los diferentes aniones.

Tabla 3. Efecto de diferentes ácidos dicarboxílicos sobre la velocidad inicial del transporte de protones dependiente de ATP en simbiosomas intactos a pH 8.

	UF h ⁻¹ mg ⁻¹ proteína ^a
Maleato	42.18 ± 4.62
Succinato	24.48 ± 4.47
Malato	18.29 ± 2.02
Fumarato	15.38 n.d.

^aRepresenta la media ± desviación estandar de por lo menos tres preparaciones diferentes de MPB.

DISCUSION

El transporte activo de solutos a través de las membranas de las células vegetales se lleva a cabo en contra de un gradiente de concentración utilizando energía proporcionada por los transportadores primarios, tales como las H^+ -ATPasas y la H^+ -PPasa.

La MPB es de origen vegetal y se forma durante el desarrollo del nódulo simbiótico y a través de ella se realiza, principalmente, el transporte del amonio y de los ácidos dicarboxílicos. El amonio, resultante de la reducción de N_2 atmosférico por los bacteroides, es exportado hacia el citoplasma de la célula infectada. Por otro lado, los ácidos dicarboxílicos proporcionados por la planta se mueven en dirección opuesta para servir como fuente de carbono a los bacteroides.

En este trabajo se presenta la caracterización bioquímica de los transportadores activos primarios responsables de la energización de la MPB que pudieran mediar el transporte de solutos en nódulos de frijol.

Uno de los principales problemas asociados con el estudio de los transportadores en la MPB es la contaminación con fracciones de membrana plasmática, del tonoplasto o de la mitocondria, por lo tanto, la selección del método para purificar la MPB fue muy importante. En este trabajo, inicialmente se purificaron simbiosomas intactos por centrifugación diferencial, eliminando con esto la membrana plasmática, el tonoplasto y las mitocondrias. Posteriormente, se utilizó el sistema de separación de dos fases para purificar la MPB a partir de simbiosomas rotos, eliminando la membrana plasmática de

los bacteroides. Empleando este sistema, se recuperaron fracciones con alto contenido de MPB como lo indica la presencia de la nodulina 26 (Fortin *et al.*, 1987), mediante ensayos de inmunodetección. El anticuerpo anti nodulina 26 reconoció un polipéptido de alrededor de 26 kDa confirmando la riqueza de MPB en nuestras preparaciones (fig 2 y 3). Por otra parte, se confirmó la ausencia de contaminación con membrana plasmática del bacteroide midiendo la actividad de citocromo oxidasa *c*. Los valores de 4.12 nmol de citocromo *c* min⁻¹ mg⁻¹ de proteína obtenidos en las diferentes preparaciones analizadas, indicaron niveles muy bajos de contaminación con membranas plasmáticas de bacteroides, ya que en éstas, la actividad de la enzima presenta valores de alrededor de 510 ± 20 nmol de citocromo *c* min⁻¹ mg⁻¹ de proteína (Christiansen *et al.*, 1995).

El análisis de la actividad hidrolítica de ATP y la actividad de bombeo de H⁺ dependiente de ATP indicó la presencia de una V-ATPasa. Ambas actividades mostraron consistentemente valores de 2 a 4 veces mayores a pH 8.0 que los mostrados a pH 6.5. Además, el perfil de inhibición a bafilomicina, inhibidor específico de V-ATPasa (Crider *et al.*, 1994), mostró que la actividad de bombeo de H⁺ se inhibió drásticamente hasta niveles del 10% de la actividad mostrada sin inhibidor (fig 8). En contraste, la actividad hidrolítica en presencia de bafilomicina solo se vio levemente afectada (10% de inhibición, tabla 1). La discrepancia de estos resultados podría explicarse porque la bafilomicina actúa bloqueando el poro, que forma el sector V₀, por donde son transportados los protones a través de la membrana (Crider *et al.*, 1994), razón por la cual la actividad hidrolítica pudo no haber sido afectada.

Por otra parte, la actividad hidrolítica se inhibió al 56% en presencia de 100 mM de nitrato, otro inhibidor de las V-ATPasas (tabla 1). La reducción de la actividad hidrolítica, no fue tan drástica, probablemente debido a que, en el procedimiento de aislamiento de la MPB se utilizó DTT como agente reductor, evitando así la formación de enlaces disulfuro causado por el nitrato, disminuyendo así la sensibilidad de la H⁺-ATPasa a este inhibidor. El nitrato, además de actuar como agente caotrópico (Rea, *et al.*, 1987), probablemente promueve la formación de enlaces disulfuro entre los residuos de cisteínas de las subunidades A y B de las V-ATPasas (Taiz *et al.*, 1994; Dschida y Bowman, 1995).

El perfil de inhibición de la actividad hidrolítica por nitrato es una evidencia que indica la presencia de una V-ATPasa en la MPB de nódulos de frijol. El 56% de inhibición observado en nuestro estudio concuerda con reportes que analizan la actividad de la V-ATPasa del aparato de Golgi y tonoplasto (Smith *et al.*, 1984), y otros que sugieren la presencia de una V-ATPasa en MPB de soya (Bassarab *et al.*, 1986), donde se reportó un 30% de inhibición por nitrato.

Por otra parte, la actividad hidrolítica de la H⁺-ATPasa de la MPB presentó un comportamiento diferente a la mayoría de las V-ATPasas en presencia de oligomicina y a azida, debido a que la actividad se vio inhibida entre un 50 y un 60% por estos inhibidores (tabla 1 y tabla 2). Es probable que la concentración de azida (1mM) utilizada para estos ensayos fue muy elevada (Sze, 1985), provocando una inhibición inespecífica de ambas actividades. De acuerdo a estos resultados se sugiere que en la MPB existe una

V-ATPasa con sensibilidad a oligomicina.

Se obtuvieron resultados adicionales que sugieren la presencia de una V-ATPasa en la MPB de nódulos de frijol mediante ensayos de inmunodetección en los cuales los anticuerpos reconocieron polipéptidos con un peso molecular correspondiente a las subunidades A y B de la V-ATPasa (fig. 13). Esto concuerda con la identidad significativa existente entre las respectivas subunidades A y B de las V-ATPasas de *Arabidopsis*, betabel, avena, zanahoria y otros sistemas eucariotes (McCarty, 1992; Sze *et al.*, 1992; Stevens y Forgac 1997). Sin embargo, no se detectó la presencia de la subunidad E, con el anticuerpo anti subunidad E de la V-ATPasa de *Vigna radiata* (fig.14). Este dato indicaría la ausencia de esta subunidad en la V-ATPasa de MPB de nódulos de frijol, o que se encuentra presente pero con una secuencia de aminoácidos diferente a la de la subunidad E de la V-ATPasa de *Vigna radiata*. Esto podría explicarse por la heterogeneidad propuesta para las otras subunidades, diferentes de A y B, que no están involucradas en los sitios de catálisis y regulación de las V-ATPasas (Hemken *et al.*, 1992; Stevens y Forgac, 1997).

Con base en éstos resultados se sugiere que el transportador activo primario involucrado en la energización de la MPB de nódulos de frijol podría ser una V-ATPasa con características diferentes a las ya reportadas para este tipo de enzimas (Pedersen y Carafoli, 1987; Sze *et al.*, 1992).

Estos resultados son similares a los reportados por Bassarab *et al.* (1986) en nódulos de soya, donde se demostró que la actividad hidrolítica presentó un pH óptimo

a 8.0 y se inhibió con nitrato. Otro estudio que apoya los resultados de este trabajo es el realizado por Campos *et al.* (1996) donde se clonó el gene de la P-ATPasa. En dicho trabajo usando ensayos de hibridación *in situ* e inmunocitoquímicos en secciones de nódulos de frijol se demostró, que la expresión de la P-ATPasa estaba limitada solo a las células no infectadas, indicando que en la energización de la MPB de frijol estaba involucrada muy probablemente una H⁺-ATPasa diferente.

De manera similar a los resultados obtenidos por Campos *et al.* (1996), en este trabajo no se observó la presencia de la P-ATPasa. La ausencia de esta bomba en la MPB de frijol está apoyada por la baja inhibición causada por el vanadato, tanto de la actividad hidrolítica (tabla 1) como la actividad de bombeo de H⁺ (tabla 2). Corroborando estos resultados, el anticuerpo anti P-ATPasa no reconoció un polipéptido de 100 kDa en las diferentes preparaciones de MPB (fig 12). Sin embargo, en la MPB de leguminosas como chícharo, siratro, y soya se ha demostrado que la energización de la membrana está dada por una P-ATPasa (Christiansen *et al.*, 1995, Szafran *et al.*, 1995; Ouyand y Day, 1992 Udvardi y Day, 1989; Blumwald *et al.*,1985), aunque en ninguno de éstos estudios se realizaron análisis de inmunodetección.

Es probable que exista diferencia en cuanto a la composición de la MPB de frijol con respecto a las otras leguminosas y por ello esté presente una ATPasa diferente, como lo sugiere el aislamiento de la MPB de nódulos de frijol entre un 21 y 33% de sacarosa (fig 3) y de nódulos de soya a concentraciones de 30 y 40% de sacarosa (Blumwald *et al.*,1985). Sin embargo, cabe señalar que en algunos de los trabajos reportados no se

muestra la evidencia experimental suficiente para concluir la presencia de una P-ATPasa o de otra ATPasa en la MPB. En los trabajos realizados en soya, siratro y frijol (Blumwald *et al.*, 1985; Udvardi y Day, 1989; Herrada *et al.*, 1989), solo se midió la actividad hidrolítica en presencia de algunos inhibidores y iones que estimulan esta actividad, y no se utilizó ningún marcador que asegurara que las preparaciones estaban enriquecidas con MPB y carentes de contaminación con otras membranas. Blumwald *et al.*, (1985) determinaron, por microscopía de fluorescencia, la formación de un gradiente de pH en el espacio peribacteroidal utilizando naranja de acridina, sin embargo este método no permite discriminar entre una P-ATPasa o una V-ATPasa, debido a que las dos enzimas acidificarían el espacio peribacteroidal. En contraste, nosotros determinamos la acidificación del espacio peribacteroidal por la actividad de bombeo de H^+ de la ATPasa, método que nos permite diferenciar por el pH óptimo de actividad entre una P-ATPasa (pH 6.5) y una V-ATPasa (pH 8.5) (fig. 7).

Aún cuando Szafran *et al.* (1995) concluyen que una P-ATPasa es la responsable de la energización de la MPB de nódulos de chícharo, los resultados que allí se presentan no apoyan esta conclusión. Esto se debe a que se determinaron las actividades hidrolítica y de bombeo de H^+ a pH 7.4, siendo el pH óptimo de actividad de la P-ATPasa 6.5.

En los trabajos que sugieren la presencia de una P-ATPasa mediante la inhibición de la actividad de bombeo de H^+ y de la actividad hidrolítica, se utilizaron concentraciones muy elevadas de vanadato; 500 μM en siratro (Ouyang y Day, 1992), 500 μM en frijol (Herrada *et al.*, 1989), 400 μM en chícharo (Szafran *et al.*, 1995), 500 μM en soya

(Udvardi y Day, 1989), contrastando con la concentración de 100 μM utilizados en nuestro estudio (tabla 1 y 2). Es muy probable que la inhibición observada en los estudios previos haya sido inespecífica, ya que el I_{50} para vanadato, sobre la ATPasa de la membrana plasmática de células vegetales, es de 50 μM (Serrano 1989b).

Por otra parte, nuestros resultados se apoyan en el análisis de inmunodetección de dos de las subunidades de la V-ATPasa, a diferencia de los reportes previos (Blumwald *et al.*, 1985; Herrada *et al.*, 1989; Udvardi y Day, 1989; Ouyand y Day, 1992; Szafran *et al.*, 1995) en diferentes leguminosas, donde se sugiere la presencia de una P-ATPasa en la MPB sin realizar este tipo de análisis.

Por otra parte, un hecho que apoya nuestros resultados es que de los tres tipos de H^+ -ATPasas en células vegetales, únicamente la V-ATPasa tiene un mecanismo de regulación de oxido-reducción, ya que la cisteína₂₅₄ forma enlaces disulfuro con la cisteína₅₃₂, en un ambiente oxidante, inactivando a la enzima (Harvey y Wieczorek, 1997). Dado que, en el interior del nódulo existen bajas tensiones de oxígeno, y por lo tanto un ambiente reductor, se evita la formación de los puentes disulfuro permitiendo que la enzima sea activa.

En este trabajo se reporta que la energización de la MPB estaría dada por una V-ATPasa. Sin embargo, en condiciones de baja tensión de oxígeno como las presentes en el nódulo, es muy probable que la V-ATPasa no sea la única responsable de la energización de la membrana, debido a que las concentraciones de ATP en el citoplasma de la célula infectada (Oresnik y Layzell, 1994), y en general en todas las células

vegetales, disminuyen bajo condiciones de anoxia (Dancer *et al.*, 1990).

La presencia de una H⁺-PPasa en la MPB de nódulos de frijol representaría una ventaja, debido a que los niveles de PPi se mantienen constantes y no se afectan por las bajas tensiones de oxígeno (Dancer *et al.*, 1990); así, la H⁺-PPasa también podría estar involucrada en la energización de ésta membrana..

De esta manera, y con el fin de obtener evidencias acerca de la presencia de la H⁺-PPasa en la MPB, medimos la actividad hidrolítica y la actividad de bombeo de H⁺, y se determinó su presencia en esta membrana por análisis de inmunodetección con un anticuerpo anti H⁺-PPasa de *A. thaliana*. Observamos una actividad hidrolítica y actividad de bombeo de H⁺ a pH 8.5 y 8.0 respectivamente (tabla 3 y Fig 11). La actividad hidrolítica de la H⁺-PPasa de MPB de nódulos de frijol fue 20 $\mu\text{moles Pi h}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína, actividad semejante a las H⁺-PPasa de tonoplasto de *Beta vulgaris* (Rea y Poole, 1985) y de arroz (Carystinos *et al.*, 1995) (tabla 3). Además, el anticuerpo anti H⁺-PPasa reconoció una proteína correspondiente al peso molecular de ésta enzima (fig 15). Interesantemente, la H⁺-PPasa de MPB de nódulos de frijol (este estudio) y de tonoplasto de arroz (Carystinos *et al.*, 1995) muestran una gran actividad (20 y 30 $\mu\text{moles Pi h}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína repectivamente). Dado que el arroz es un cultivo que se mantiene primordialmente en condiciones de anoxia, esto podría tener un significado biológico acerca del papel de la H⁺-PPasa en la energización de la MPB, bajo las condiciones en las cuales se lleva a cabo la fijación de nitrógeno en el nódulo.

Tabla 4. Actividad hidrolítica de la H⁺-PPasa en fracciones de MPB de nódulos de frijol comparada con la actividad hidrolítica de la H⁺-PPasa del tonoplasto de otras especies.

Tejido	Actividad H ⁺ -PPasa ($\mu\text{mol Pi mg prot}^{-1} \text{ h}^{-1}$)	Referencia
<i>Phaseolus vulgaris</i> PBM	20	Este trabajo
Tonoplasto de semillas de arroz	30	Carystinos et al. 1995
Tonoplasto de hipocotilos de <i>Vigna radiata</i>	9	Darley et al. 1995
Tonoplasto de <i>Beta</i> <i>vulgaris</i>	14	Rea and Poole 1985

Los datos obtenidos en este trabajo sugieren la presencia de una H⁺-PPasa y una V-ATPasa en la MPB de nódulos de frijol y concuerdan con los obtenidos por Mellor (1989) quien mostró la existencia de semejanzas entre el simbiosoma con la vacuola, como son la presencia en el espacio peribacteroidal de enzimas como la α -manosidasa y la termolisina, que comunmente están presentes en el interior de la vacuola.

La presencia de una V-ATPasa y una H⁺-PPasa en MPB de nódulos de frijol también está apoyada por evidencias de microscopía que demuestran que los elementos estructurales de la MPB provienen de un proceso de flujo de vesículas del aparato de Golgi (Robertson, 1978; Brewin *et al.*, 1985; Perotto *et al.*, 1991; Roth y Stacey, 1989; Mellor, 1989), de manera análoga a la formación de las vacuolas. Características adicionales comunes a la MPB y la membrana vacuolar es la composición de fosfolípidos, ácidos grasos y glicoproteínas, las cuales son también similares a las de retículo endoplásmico (Brewin *et al.*, 1985; Mellor, 1989; Perotto *et al.*, 1991; 1995; Hernández y Cooke, 1996).

Uno de los procesos de transporte más importantes durante la fijación de nitrógeno es la importación de compuestos de carbono del citoplasma de la célula infectada al espacio peribacteroidal a través de la MPB, para la generación de energía y poder reductor requeridos por el bacteroide para la fijación del nitrógeno atmosférico (Streeter, 1995; Verma y Hong, 1996; Whitehead y Day, 1997). En este trabajo se analizó la permeabilidad de la MPB a ácidos dicarboxílicos a través de la estimulación de la actividad de bombeo de H⁺ en simbiosomas de nódulos de frijol. La MPB mostró una

permeabilidad en orden decreciente al maleato, succinato, malato y fumarato; de éstos, es probable que el malato sea el principal sustrato debido a su alta concentración en homegenizados de nódulo (Stumpf y Burris,1979). De manera muy similar, los estudios de transporte con simbiosomas aislados de soya (Ouyang *et al.*,1990), siratro (Ouyang y Day,1992), chícharo (Rosendahl *et al.*,1992) y frijol (Herrada *et al.*,1989) han demostrado que los ácidos dicarboxílicos, principalmente malato y succinato, son la mayor fuente de carbono transportada a través de la MPB para soportar la fijación biológica de nitrógeno.

Con base en los resultados obtenidos en el presente trabajo y la información discutida en esta sección, se propone que probablemente solo en la etapa inicial de su biogénesis, la MPB sea un continuo de la membrana plasmática. Posteriormente, durante la maduración del nódulo y la división de las bacterias, la MPB se sintetiza a través de un flujo de vesículas provenientes del aparato de Golgi, de forma similar a la formación de la vacuola. La presencia de una V-ATPasa y una H⁺-PPasa en la MPB de nódulos de frijol refuerzan esta conclusión.

La similitud del simbiosoma con la vacuola, se debe probablemente a que el proceso celular encargado de la formación de la vacuola en la célula vegetal no infectada sea el mismo que el que participa en la biogénesis de la MPB, ya que en las células infectadas la vacuola desaparece.

CONCLUSIONES

En la MPB de nódulos de frijol, el análisis de la actividad hidrolítica de ATP y la actividad de bombeo de H^+ dependiente de ATP indicó la presencia de una V-ATPasa.

La bafilomicina inhibe la actividad de bombeo de H^+ y no la actividad hidrolítica, que se inhibe con nitrato. Esta actividad mostró un perfil atípico de inhibición por oligomicina.

Los ensayos de inmunodetección con anticuerpos en contra de las subunidades A y B de la V-ATPasa de *Vigna radiata*, confirmaron la presencia de una V-ATPasa en las preparaciones de MPB de nódulos de frijol.

El análisis de las actividades hidrolíticas y de bombeo de H^+ dependientes de PPI, y los ensayos de inmunodetección indicaron la presencia de una H^+ -PPasa que pudiera estar involucrada en la energización de la MBP de nódulos de frijol bajo las condiciones fisiológicas de baja tensión de oxígeno.

La actividad de bombeo de H^+ en simbiosomas en presencia de ácidos dicarboxílicos mostró que la permeabilidad de la MPB a estos fue: maleato \succ succinato = malato \succ fumarato, indicando que el transporte de estos sustratos depende de la energización de la MPB por la H^+ -ATPasa y que éstos se utilizan por el bacteroide como fuente de carbono.

REFERENCIAS

- Al-Awqati, Q.** 1986. Proton-translocating ATPases. *Ann. Rev. Cell Biol.* 2:179-199.
- Alfonzo, M. y Racker, E.** 1979. Components and mechanism of action of ATP-driven proton pumps. *Can. J. Biochem.* 157:1351-1358.
- Ames, B. N.** 1966. Assay of inorganic phosphate, total phosphate and phosphatases. *Methods Enzymol.* 8: 115-118.
- Barkla, B. J., y Pantoja, O.** 1996. Physiology of ion transport across the tonoplast of higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47: 159-184
- Bassarab, S., Mellor, R. B. y Werner D.** 1986. Evidence for two types of Mg^{++} -ATPase in the peribacteroid membrane from *Glycine max* root nodules. *Endocyt C. Res.*3:189-196.
- Blumwald E., Fortin, M.G., Rea, P.A., Verma, D. P. y Poole, R.J.** 1985. Prescence of host-plasma membrane type ATPase in the membrane envelope enclosing the bacteroids in soybean root nodules. *Plant Physiol.* 78: 665-672.
- Bradford, M. M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Brewin, N. J., Robertson, J. G., Wood, E. A., Wells, B., Larkins, A. P., Galfre, G. y Butcher, G. W.** 1985. Monoclonal antibodies to antigens in the peribateroid membrane from *Rhizobium*-induced root nodules of pea cross-react with plasma membranes and Golgi bodies. *EMBO J.* 4: 605-611.
- Brewin N. J.** 1991. Development of the legume root nodule. *Anu. Rev.Cell Biol.* 7:191-226.
- Britten C. J., Turner J. C., y Rea P. A.** 1989. Identification and purification of substrate-binding subunit of higher plant H^{+} -translocating inorganic pyrophosphatase. *FEBS Lett.* 256: 200-206.
- Campos, F., Perez-Castiñeira, J. R., Villalba, J. M., Culiañez-Marcia, F. A., Sanchez, F. y Serrano, R.** 1996. Localization of plasma membrane H^{+} -ATPase in nodules of *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Mol. Biol.* 32: 1043-1053.

Carystinos, G. D., MacDonald, H. R., Monroy A. F., Dhindsa, R. S. y Poole R. J. 1995. vacuolar H⁺-translocating pyrophosphatase is induced by anoxia or chilling in seedlings of rice. *Plant Physiol.* **108**: 641-649.

Christiansen, J. H., Rosendahl, L. y Widell, S. 1995. Preparation and characterization of sealed inside-out peribacteroid membrane vesicles from *Pisum sativum* L. and *Glycine max* L. root nodules by aqueous polymer two-phase partitioning. *J Plant Physiol.* **147**: 175-181.

Cohn, J., Bradley, R. y Stacey, G. 1998. Legume nodule organogenesis. *Trends in Plant Science.* **3**: 105-110.

Cooper, G. M. 1997. Bioenergetics and Metabolism of mitochondria, chloroplasts, and peroxisomes. *The Cell.* Eds. ASM Press. Chapter 10. pgs 389-421

Crider, B. P. Xie, X. S. y Stones, D. K. 1994. Bafilomycin inhibits proton flow through the H⁺ channel of vacuolar proton pumps. *J Biol Chem.* **269**: 17379-17381.

Dancer, J.E. y Rees, T. 1989. Effects of 2,4-dinitrophenol and anoxia on the inorganic pyrophosphate context of the spadix of *Arum maculatum* and the root apices of *Pisum sativum*. *Planta.* **178**: 421-424.

Deckers-Hebestreit, G., & Altendorf, K. 1996. The F₀-F₁-type ATP synthases of bacteria: structure and function of the F₀ complex. *Annu. Rev. Microbiol.* **50**: 791-824.

Domingan, N. M., Farnden, K. J. F., Robertson, J. G., y Monk, B. C. 1988. Characterization of the peribacteroid membrane ATPase of lupin root nodules. *Arch Biochem and Biophys.* **264**: 564-573.

Dschida, W. J. A. y Bowman, B. J. 1995. The vacuolar ATPase: sulfite stabilization and mechanism of nitrate inactivation. *J Biol Chem.* **270**: 1557-1563.

Dubrovo, P. N., Krylova, V. V., Livanova, G. i., Zhiznevskaya, G. Y., y Izmailov, S. F. 1992 Properties of ATPases of the peribacteroid membrane in root nodules of yellow lupin. *Sov. Plant Physiol.* **39**: 318-324

Evans, L. R. y Stacey, G. 1989. Bacterium release into host cells of nitrogen-fixing soybean nodules: the symbiosome membrane comes from three sources. *Eu J Cell Biol.* **49**: 13- 23.

Forgac, M. 1989. Structure and function of the vacuolar class of ATP-driven proton pumps. *Physiol. Rev.* **69**: 765-796.

Fortin, M. C., Morrison, N. A., y Verma, D. P. S. 1987. Nodulin-26, a peribacteroid membrane nodulin is expressed independently of the development of the peribacteroid compartment. *Nu Ac Res.* **15**: 813-824.

Goodchild, D. J. y Bergersen, F. J. 1966. Electron microscopy of the infection and subsequent development of soybean nodule cells. *J. Bacteriol.* **92**: 204-213.

Harvey, W. R. y Wieczorek, H. 1997. Animal plasma membrane energization by chemiosmotic H⁺-ATPases. *J Exp Biol.* **200**: 203-216.

Hedrich, R. y Schroeder, J. I. 1989. The physiology of ionic channels and electrogenic pumps in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **40**: 539-569.

Hemken, P. Guo, X. L., Wang, Z. Q., Zhang, K. y Gluck, S. 1992. Immunologic evidence that V-ATPases with heterogeneous forms of 31 kDa subunit have different membrane distributions in mammalian kidney. *J. Biol. Chem.* **267**: 9948-9957.

Hernandez, L. E. y Cooke, D. T. 1996. Lipid composition of symbiosomes from pea root nodules. *Phytochem.* **42**: 341-346.

Herrada, G., Puppo, A., y Rigaud, J. 1989. Uptake of metabolites by bacteroid-containing vesicles and by free bacteroid from french bean nodules. *J Gen Microbiol.* **135**: 3165-3171.

Hirsch, A. 1992. Developmental biology of legume nodulation. *The New Phytologist.* **122**: 211-237.

Ikeda, M., Satoh, S., Maeshima, M., Mukohata, Y., Moritani, C. 1991. A vacuolar ATPase and pyrophosphatase in *Acetabularia acetabulum*. *Biochim. Biophys. Acta* **1070**: 77-82.

Johannes, E. y Felle, H. 1989. The role of Mg⁺² in proton transport by the tonoplast pyrophosphatase in *Riccia fluitans* vacuoles. *Physiol. Plant.* **77**: 326-331.

Johnson, K. D., Hofte, H. y Chrispeels, M. J. 1990. An intrinsic tonoplast protein of protein storage vacuoles in seeds is structurally related to a bacterial solute transporter(GlpF). *Plant Cell.* **2**: 525-532.

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

Lai, S., Randall, S. K., & Sze, H. 1988. Peripheral and integral subunits of the tonoplast H⁺-ATPase from oat root. *The Journal of Biological Chemistry* **263**: 16731-16737.

Larsson, C. 1983. Partition in aqueous polymer two-phase systems: A rapid method for separation of membrane particles according to their surface properties Isolation of membranes and organelles from plant cells. Eds Hall, J.L.; Moore, A. L. Academic Press. pgs 277-309.

Leshem, Y. Y. 1992. Membrane Proteins Plant Membranes: A biophysical approach to structure, development and senescence. Eds Leshem, Y. Y. Kluwer Academic Publishers pgs 65-102.

Lodish, H., Baltimore, D., Berk, A., Zipursky, S. L., Matsudaira, P. y Darnell, J. 1995. Molecular cell biology. Eds. Scientific American Books.

Long, S. R. 1989. Rhizobium-legume nodulation: life together in the underground. *Cell*. **56**: 203-214.

Maeshima, M., Yoshida, S. 1989. Purification and properties of vacuolar membrane proton-translocating inorganic pyrophosphatase from mung bean. *J. Biol. Chem.* **264**: 20068- 20073.

Maurel, C., Reizer, J., Schroeder, J. I., y Chrispeels, M. J. 1993. The vacuolar membrane protein γ -TIP creates water specific channels in *Xenopus oocytes*. *EMBO J.* **12**: 2241-2247.

McCarty, R. E. 1992. A plant biochemist's view of H⁺-ATPases and ATP synthases. *J Exp Biol.* **172**: 431-441

Mellor, R.B., Morschel, E. y Werner, D. 1984. Legume root response to symbiotic infection: Enzymes of the peribacteroid space. *Z. Naturforsch.* **39c**: 123-125.

Mellor, R.B. 1989. Bacteroids in the *Rhizobium*-legume symbiosis inhabit a plant internal lytic compartment: implications for other microbial endosymbioses. *J Exp Bot.* **40**: 831-839.

Miao, G. H. y Verma, P.S. 1993. Soybean nodulin-26 gene encoding a channel protein is expressed only in the infected cells of nodules and is regulated differently in roots of homologous and heterologous plants. *Plant Cell* **5**: 781- 794.

Mylona, P., Pawlowsky, K. y Bisselin, T. 1995. Symbiotic Nitrogen Fixation. *Plant Cell*. **7**: 869-885.

Nap, J. P. y Bisseling, T. 1990. Developmental Biology of a plant-prokaryote symbiosis: The legume root nodule. *Science*. **250**: 948-954.

Nelson, N. y Taiz, L. 1989. The evolution of H⁺-ATPases. *TIBS*. **15**: 113-116.

Nicholls, D. G. y Ferguson, S. 1982. Chemiosmotic energy transduction. *Bionergetics*. Eds. Academic Press pgs. 3-19.

Oresnik, I. J. y Layzell, D. B. 1994. Composition and distribution of adenylates in soybean (*Glycine max* L) nodule tissue. *Plant Physiol*. **104**: 217-225.

Ou Yang, L.J. Udvardi, M. K. and Day, D. A. 1990. Specificity and regulation of the dicarboxylate carrier on the peribacteroid membrane of soybean nodules. *Planta*. **182**: 437-444.

Ouyang, L.J. y Day, D.A. 1992. Transport properties of symbiosomes isolated from siratro nodules. *Plant Physiol Biochem*. **30**: 613-623.

Parry, R. V., Turner, J. C., Rea, P. A. 1989. High purity preparations of higher plant vacuolar H⁺-ATPase reveal additional subunits. *J Biol Chem*. **264**: 20025-20032.

Pedersen, P. L., y Carafoli, E. 1987. Ion motive ATPases. I. Ubiquity, properties, and significance to cell function. *TIBS* **12**: 146-150.

Perotto, S., Vandenbosch, K. A., Butcher, G. W. y Brewin, N. J. 1991. Molecular composition and development of the glycocalyx associated with the peribacteroid membrane of pea root nodules. *Development*. **112**: 763-773

Perotto, S., Donovan, N., Drobak, B. K., y Brewin, N. J. 1995. Differential expression of a glycosyl inositol phospholipid antigen on the peribacteroid membrane during pea nodule development. *Mol Plant-Microbe Interac*. **8**: 560-568.

Peters, N. K. y Verma, D. P. S. 1990. Phenolic compounds as regulators of gene expression in plant-microbe interactions. *Mol. Plant-Microbe Inter.* **3**: 4-8.

Plaxton, W.C. 1996 The organization and regulation of plant glycolysis. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol.* **47**: 185 - 214.

Pueppke, S. G. 1996. The genetic and Biochemical basis for nodulation of legumes by rhizobia. *Critical Rev Biotech.* **16**: 1-51.

Rea, P. A. y Poole, R. J. 1985. Proton-translocating inorganic pyrophosphatase in red beet (*Beta vulgaris* L) tonoplast vesicles. *Plant Physiol.* **77**: 46-52.

Rea, A. P., Griffith, C. J. Manolson, M. F., y Sanders, D. 1987. Irreversible inhibition of H⁺-ATPase of higher plant tonoplast by chaotropic anions: evidence for peripheral location of nucleotide-binding subunits. *Biochimica et Biophysica Acta* **904**: 1-12.

Rea, P. A., Griffith, C. J. y Sanders, D. 1987b Plant vacuoles: Their importance in plant cell compartmentation and Biotechnology. Marin, B., ed. pp 179-186. Plenum New York.

Rea, P. A., Kim, Y., Sarafian, V., Poole, R. J., Davies, J. M. y Sanders, D. 1992. Vacuolar H⁺-translocating pyrophosphatases: a new category of ion translocase. *TIBS* **17**: 348-353.

Rea, P. A. 1993. Vacuolar H⁺-translocating pyrophosphatase. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **44**: 157-180.

Rivers, R. L., Dean, R. M., Chandy, G., Hall, E. J., Roberts, D. M. and Zeidel, M. L. 1997. Functional analysis of nodulin 26, an aquaporin in soybean root nodule symbiosomes. *J Biol Chem.* **272**:16256- 16261.

Robertson, J. G., Lyttleton, P., Bullyvant, S. y Grayston. 1978. Membranes in lupin root nodules I. The role of Golgi bodies in the biogenesis of infection threads and peribacteroid membranes. *J Cell Scien.* **30**: 129-149.

Rosendahl, L., Dilworth, M.J. and Gleen, A.R. 1992. Exchange of metabolites across the peribacteroid membrane in pea root nodules. *J. Plant Physiol.* **139**: 635 -638.

Saier, M. H. 1997. Peter Mitchell and his chemiosmotic theories. *ASM News.* **63**: 13-21.

Sambrook, J.; Fritsch, E. F.; y Maniatis, T. 1989. Molecular cloning: A laboratory Manual, Ed. 2. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Sánchez, F., Padilla, J. E., Pérez, H. y Lara, M. 1991. Control of nodulin genes in root-nodule development and metabolism. *Annu. Rev. Plant Physiology.* **42**: 507-528.

Schlaman, H. R., Spaink, H. P., Okker, R. J. H., Lugtenberg, B. J. J. 1989. Subcellular localization of the *nodD* gene product in *Rhizobium leguminosarum*. *J. Bacteriol.* **171**: 4686-4693.

Serrano, R. 1985. Plasma membrane ATPase of plants and fungi. CRC Press, Inc. Boca raton, FL. pg 174 .

Serrano, R. 1989. Structure and function of plasma membrane ATPase. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **40**: 61-94.

Serrano, R. 1989b. Plasma Membrane ATPase. Structure, function and molecular biology, ed. C. Larsson, I. M. Moler, Chap 6. Berlin: Springer-Verlag.

Shimmen, T., MacRobbie, E. A. C. 1987. Demostration of two proton translocating systems in tonoplast of permeabilized *Nitella* cells. *Protoplasma.* **136**: 205-207.

Shimmen, T., MacRobbie, E. A. C. 1987. Characterization of two proton transport systems in the tonoplast of plasmalemma-permeabilized *Nitella* cells. *Plant Cell Physiol.* **28**: 1023-1031.

Smith, J. A. C., Uribe, E. G., Ball, E., Heuer, S. y Luttge, U. 1984. Characterization of the vacuolar ATPase activity of the crassulacean acid metabolism plant *Kalanchoe daigremontiana* receptor modulating. *Eur. J. Biochem.* **141**: 415-420.

Stevens, T. H. y Forgac M. 1997. Structure, funtion and regulation of the vacuolar (H⁺)-ATPase. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* **13**: 779-808.

Streeter, J.G. 1995. Recent developments in carbon transport and metabolism in symbiotic systems. *Symbiosis.* **19**: 175 -196.

Stumpf, D. K. Burris, R. H. 1979. A micromethod for the purification and quantification of organics acids of the tricarboxylic acid cycle in plant tissues. *Anal. Biochem.* **95**: 311-315.

Sussman, M. R. y Surowy, T. K. 1987. Physiology and molecular biology of membrane ATPases. *Oxford Surveys of Plant Mol and Cell Biol.* **4**: 47- 70.

Szafran, M. M. and Haaker, H. 1995. Properties of the Peribacteroid membrane ATPase of Pea root nodules and its effect on the nitrogenase activity. *Plant Physiol.* **108**: 1227-1232.

Sze, H. 1985. H⁺-translocating ATPases: advances using membrane vesicles. *Ann Rev. Plant Physiol.* **36**: 175-208.

Sze, H., Ward, J. M. y Lai, S. 1992. Vacuolar H⁺-translocating ATPases from plants: structure, function, and isoforms. *J Bioener Biomemb* **24**: 371-381.

Taiz, L., Nelson, H., Maggert, K., Morgan, L. y Yatabe, B. 1994. Functional analysis of conserved cysteine residues in the catalytic subunit of the yeast vacuolar H⁺-ATPase. *Biochem. Biophys. Acta* **1194**: 329-334.

Tyerman, S., Whitehead L. F. y Day D. A. 1995. A channel-like transporter for NH₄⁺ on the symbiotic interface of N₂-fixing plants. *Nature.* **378**: 629-632.

Udvardi, M. K., Price, G. D., Gresshoff, P. M. y Day, D. A. 1988. A dicarboxylate transporter on the peribacteroid membrane of soybean nodules. *FEBS Lett.* **231**: 36-40.

Udvardi, M. K., Ouyang, L. J. Young, S. y Day, D. 1990. Sugar and amino acid transport across symbiotic membranes from soybean nodules. *Mol Plant-Microbe Interac.* **5**: 334-340.

Udvardi, M. K., Lister, D. L. y Day, D. A. 1991 ATPase activity and anion transport across the peribacteroid membrane of isolated soybean symbiosomes. *Arch Microbiol.* **156**: 362-366.

Udvardi, M.K. y Day, D. A. 1997. Metabolite transport across symbiotic membranes of legume nodules. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **47**: 493-523.

Udvardi, M.K. y Day, D. A. 1989. Electrogenic ATPase activity on the peribacteroid membrane of soybean (*Glycine max* L.) root nodules. *Plant Physiol.* **90**: 982-987.

Verma, D. P. S. and Hong, Z., 1996. Biogenesis of the peribacteroid membrane in root nodules. *Trends in Microbiol.* **4**: 364- 368

Verma, D. P. S. 1992. Signals in root nodule organogenesis and endocytosis of *Rhizobium*. *Plant Cell.* **4**: 373 -382.

Ward, J. M., & Sze, H. 1992. Subunit composition and organization of the vacuolar H⁺-ATPase from oat roots. *Plant Physiol.* **170**: 170-179.

Waver, C. D., Crombie, B., Stacey, G., y Roberts, D. M. 1991. Calcium- dependent phosphorylation of symbiosome membrane proteins from nitrogen-fixing soybean nodules. *Plant Physiol.* **95**: 222-227.

Whitehead, L. F. and Day, D. 1997. The peribacteroid membrane. *Physiologia Plantarum.* **100**: 30- 44.

Wienecke, K., Glas, R y Robinson, D.G. 1982. Organelles involved in the synthesis and transport of hydroxyproline-containing glycoproteins in carrot root discs. *Planta* **155**: 58-63.

Zhen, R. G., Kim, E. J., y Rea, P. A. 1994. Localization of cytosolically maleimide-reactive oriented domain of vacuolar H⁺-Pyrophosphatase. *J Biol Chem.* **269**: 23342-23350.

Zingarelli, L.; Anzani, P.; Lado, P. 1994. Enhanced K⁺-stimulated pyrophosphatase activity in NaCl adapted cells of *Acer pseudoplatanus*. *Physiol. Plant.* **91**: 510-516.