

00581

2
20j.

RECIBO EN
LIBRERIA AL

Fosforilación de la calmodulina durante la germinación de maíz. Purificación y caracterización de una proteína cinasa específica para calmodulina (PK-CaM).

TESIS

Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Química

M en C Alicia Gamboa de Buen
Doctorado en Ciencias Químicas
(Bioquímica)

TESIS CON
FOLLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está 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.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fué posible gracias al apoyo de las siguientes instituciones:

Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Química
División de Estudios de Posgrado
Dirección Nacional de Asuntos del Personal Académico
Beca

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología
Beca: 53239
Proyecto: 0666-N9108

Universidad Nacional Autónoma de México
Dirección General de Asuntos del Personal Académico
Programa de Apoyo a las Divisiones de Posgrado de la UNAM
Proyecto: DFQ9009
Proyecto: DFQ92242

Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Química
Seminario Humberto Estrada

Secretaría de Educación Pública
Sistema Nacional de Investigadores
11563

Este trabajo fué realizado en las instalaciones del departamento de Bioquímica Vegetal de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México bajo la dirección de la Dra Estela Sánchez de Jiménez y aceptado como requisito parcial para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas (Bioquímica) por el siguiente jurado:

Presidente	Dr. Adolfo Garcia Sáinz
Primer Vocal	Dra. Rosario Muñoz Clares
Segundo Vocal	Dr. Mario Calcagno Montans
Tercer Vocal	Dra. Marina Gavilanes Ruiz
Secretario	Dr. Luis González de la Vara
Primer Suplente	Dr. Rafael Moreno Sánchez
Segundo Suplente	Dr. Alejandro Zentella Dehesa

ABREVIATURAS

ABA	Acido Abscisico
ATP	Adenosin trifosfato
BAPTA	1,2-bis(2-aminofenoxi)etano N,N,N',N',-ácido tetracético
DG	Diacilglicerol
D.O.	Densidad óptica
EGTA	Acido etilen bis-(oxietilenonitrilo) tetracético)
GTP	Guanosin trifosfato
His	Histona
HEPES	n-2-hidroxiethylpiperazina-n-ácido etanosulfónico
IP ₂	Inositol 4,5 trifosfato
IP ₃	Inositol 3,4,5 difosfato
NAD	Nicotin adenin dinucleótido
nm	Nanómetro
PIP	Fosfoinosítidos
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sodio
TRIS	Tri (hidroximetil) aminometano

INDICE

Introducción	1
	3
Antecedentes	
I. Calcio, Segundo Mensajero	3
II. Proteínas que unen calcio	8
III. Proteínas cinasas	12
	14
Materiales y Métodos	
	15
Resultados	
Artículo I	16
Artículo II	34
Resultados no publicados	51
	56
Discusión	
	61
Anexo I	
I. Purificación de una cinasa que fosforila calmodulina	62
II. Determinación del residuo fosforilado	69
III. Purificación de Calmodulina a partir de ejes embrionarios de maíz.	70
IV. Obtención de anticuerpos contra calmodulina de maíz.	73
	76
Referencias	

Fosforilación de la calmodulina durante la germinación de maíz. Purificación y caracterización de una proteína cinasa específica para calmodulina (PK-CaM).

Resumen

Existen evidencias que sugieren la participación de la calmodulina en la germinación. Se han reportado tanto cambios en los niveles de calmodulina como en sus modificaciones postraduccionales a lo largo de este proceso. El objetivo de este trabajo fué estudiar la fosforilación de calmodulina durante el proceso de germinación de maíz. La primera parte del trabajo corresponde a la purificación de una proteína cinasa que fosforila específicamente a la calmodulina, denominada PK-CaM, a partir de ejes embrionarios de maíz de tres horas de imbibición. La segunda parte incluye tanto la fosforilación *in vivo* de calmodulina como los cambios en la actividad de PK-CaM durante el proceso germinativo.

La purificación de PK-CaM se llevó a cabo por medio de dos pasos subsecuentes de cromatografías de afinidad: fenil-sefarosa y CaM-agarosa, y una cromatografía de exclusión molecular: TSKG 4000 en un aparato de cromatografía líquida de alta presión. La enzima purificada por medio de este procedimiento se autofosforila y fosforila a la calmodulina en ausencia de calcio. La histona y la caseína pueden ser fosforiladas por esta enzima si se añade calcio al sistema. En todos los sustratos, la serina es el aminoácido que se fosforila. La proteína cinasa purificada presenta una estructura oligomérica de alto peso molecular, la cual fué detectada por la columna de exclusión molecular y por electroforesis nativa, formada probablemente por la asociación de dos péptidos de 49 y 21 kDa.

La fosforilación *in vivo* e *in vitro* de la calmodulina durante la germinación se determinó midiendo la incorporación de ^{32}P a calmodulina en periodos tempranos y tardíos. La fosforilación *in vivo* de la calmodulina se presentó, con mayor intensidad, a las tres horas de germinación. La enzima presentó una mayor actividad para fosforilar calmodulina en el mismo período correlacionándose este incremento con una mayor estabilidad de la estructura oligomérica de la enzima.

Estos resultados permiten establecer un modelo de la regulación de la actividad de PK-CaM y considerarla como un elemento más del proceso de transducción de señales.

Abstract

Changes in calmodulin concentration as well as posttranslational calmodulin modifications have been reported to be associated with seed germination, suggesting that these events are relevant in this process. The objective of this research was to study calmodulin phosphorylation during maize germination and its relationship to an oligomeric enzyme that phosphorylates calmodulin (PK-CaM). First, we isolated a maize protein kinase specific for phosphorylating calmodulin. This was accomplished through a rapid purification method based on two consecutive affinity column chromatographies followed by size exclusion chromatography (HPLC). The isolated enzyme showed autophosphorylation and specificity for calmodulin phosphorylation in the absence of calcium. Calmodulin phosphorylation was confirmed by gel electrophoresis and autoradiography of the reaction products. Histone and casein were also phosphorylated but in a calcium dependent manner. For all substrates, serine was the target amino acid residue. This enzyme showed an oligomeric structure of high molecular mass probably formed by association of two peptides of 49 and 21 kDa, which is disrupted by freezing, or long storage at 4° C. Autophosphorylation and calmodulin phosphorylation activities were lost by disruption of the oligomeric form, whereas the protein kinase activity was still detectable with histone or casein as substrates. *In vitro* and *in vivo* calmodulin phosphorylation during germination was assessed by measuring rates of ³²P-incorporation into calmodulin at early and late germination steps. Calmodulin synthesis was detected as early as 3 h of germination. This process was found to be auxin regulated. *In vivo* calmodulin phosphorylation occurred at early germination but decreased as germination proceeds. PK-CaM oligomeric form which differ in specificity for calmodulin recognition changes during germination. Together, these results suggest that phosphorylation of calmodulin could be an important mechanism for calmodulin activity and signal transduction amplification during maize germination process. The changes in PK-CaM activity together with calmodulin *in vivo* phosphorylation results provide new insight for understanding signal transduction mechanisms involved in seed germination.

INTRODUCCION

El calcio es un segundo mensajero de múltiples funciones celulares, que en plantas parece estar también involucrado en la germinación. La germinación, definida como el periodo que tarda en producirse la protrusión de la radícula en la semilla en imbibición, puede ser alterada por los compuestos que cambian la disponibilidad de calcio en el sistema. La participación del calcio extracelular en la germinación de semillas de girasol (Lenomard *et al.*, 1993) y de *Onoclea sensibilis* (Wayne y Hepler, 1984) ha sido demostrada utilizando EGTA y lantano. Estos compuestos causan una importante inhibición de la germinación que puede ser revertida al añadir calcio en las dos especies. Además, el ionóforo de calcio A23187 acelera la germinación de las semillas de girasol.

La calmodulina (CaM) es una proteína ubicua que media las acciones de calcio intracelular. Esta proteína ha sido considerada como uno de los factores limitantes del efecto del calcio (Roberts *et al.*, 1985). La síntesis de esta proteína puede estar regulada tanto por factores externos como por fitoreguladores; los niveles del mRNA que codifica para calmodulina en los frutos de fresa se mantienen elevados cuando son tratados con auxinas (Jenna *et al.*, 1990). Los niveles de calmodulina se incrementan de manera considerable durante las primeras horas de la germinación en semillas de rábano. Este incremento no se observa cuando la germinación es inhibida por ABA (Coccuci y Negrini, 1988). La participación de CaM en el proceso de germinación también ha sido determinada indirectamente utilizando sus inhibidores trifluoperazina y W7, los cuales retrasan la germinación tanto de las semillas de girasol como de *O.sensibilis* (Lenomard *et al.*, 1993; Wayne y Hepler, 1984). Sin embargo, dado que la CaM actúa sobre diferentes proteínas blanco en una misma célula, la inhibición global de la función de CaM no explica completamente los mecanismos moleculares de su acción fisiológica. Las modificaciones postraduccionales que presenta la molécula de CaM han sido asociadas a su capacidad de regulación de los diferentes eventos fisiológicos en que participa. Así, la metilación de CaM determina su capacidad para activar específicamente a la NAD-proteína cinasa purificada de tejidos vegetales y se lleva a cabo preferentemente durante la fase estacionaria de las células vegetales en cultivo en suspensión (Oh y Roberts, 1989). La fosforilación reduce la capacidad de calmodulina para interactuar con la fosfodiesterasa pero incrementa la afinidad de esta proteína por calcio (Sacks *et al.*, 1992). Estas modificaciones, que específicamente alteran la interacción de CaM con ciertas proteínas, no provocan cambios en la interacción de CaM con otras proteínas, dando así un grado importante de especificidad a CaM en la regulación.

La fosforilación y la defosforilación de proteínas son mecanismos de regulación metabólica que han sido asociados a los diferentes procesos fisiológicos que pueden estar involucrados en la transducción de señales (Cohen, 1983). En la germinación de maíz tiene lugar la fosforilación de algunas proteínas citoplásmicas y ribosomales, reacciones que responden tanto a estímulos ambientales como a fitoreguladores (Pérez *et al.*, 1990,

Pérez-Méndez *et al.*, 1994), por lo que se considera que están de alguna manera ligadas a la transducción de señales.

Se ha considerado que las semillas en germinación representan un sistema interesante para el estudio de los mecanismos de transducción de señales y de los elementos que los componen en plantas, puesto que tiene lugar una activación del metabolismo de las células quiescentes y a su vez, una reactivación de la división celular, todo ello generado por la penetración del agua a los tejidos (Coccuci, 1984).

Con estos antecedentes, se plantea la posibilidad de que CaM participe en procesos de regulación y/o transducción de señales que se lleva a cabo durante la germinación de maíz, la cual puede estar más precisamente regulada por fosforilación y defosforilación de esta molécula. Por lo tanto, se consideró importante purificar y caracterizar una proteína cinasa de ejes embrionarios de maíz que fosforilara a la CaM en forma específica y analizar su relación con el proceso de germinación.

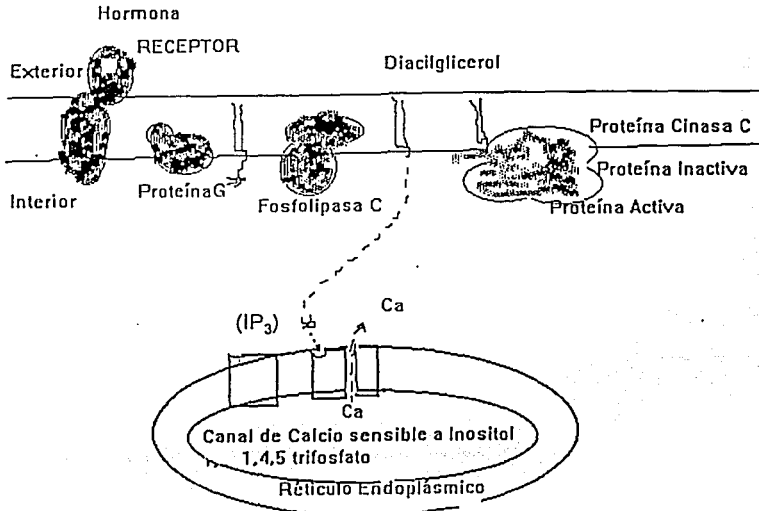
Objetivos

- I. Determinar los cambios en la síntesis *de novo* y el estado de fosforilación de CaM a lo largo de la germinación.
- II. Purificar y caracterizar una enzima que fosforile a la calmodulina a partir de extractos postribosomales de ejes embrionarios de maíz de 3 h de germinación.
- III. Determinar cambios de actividad de esta proteína cinasa a lo largo del proceso de germinación
- IV. Establecer un modelo de regulación de la actividad de la enzima.

I. CALCIO, SEGUNDO MENSAJERO EN PLANTAS.

El sistema de transducción de señales que involucra al calcio como segundo mensajero ha sido ampliamente descrito en animales (Figura 1). En este sistema, el receptor celular, al ser estimulado por un factor químico o físico, interactúa con una proteína formada por tres polipéptidos, $\alpha\beta\gamma$, denominada proteína G. La subunidad α se activa intercambiando GDP por GTP y, al liberarse del complejo que forma con las otras subunidades, estimula la actividad de la fosfolipasa C. La actividad GTPásica intrínseca de la subunidad α le permite reintegrar el complejo subunidad α -GDP y por tanto retornar a su conformación original. La fosfolipasa C activada utiliza como sustrato a los fosfoinosítidos (PIP_2) que integran a la membrana plasmática generando como producto al inositol 1,3,5 trifosfato (IP_3) y diacilglicerol (DG). El IP_3 generado por esta reacción interactúa con un receptor ubicado en la membrana del retículo endoplásmico abriendo un canal que permite la salida de los iones calcio de este compartimento. Como consecuencia, los niveles de calcio citoplásmico pueden incrementarse de 10^{-7} a 10^{-6}M . El DG a su vez activa a la proteína cinasa C, cuando esta se transloca a la membrana activada por calcio y al mismo tiempo disminuyendo sus requerimientos de calcio (Berridge, 1993).

El calcio, de manera directa o a través de calmodulina (CaM), interactúa con diferentes proteínas incluyendo proteínas cinasas, generando cambios en el metabolismo celular. La regulación de los niveles de calcio citoplásmico se lleva a cabo por medio de proteínas transportadoras de calcio que lo compartimentalizan en retículo endoplásmico o en mitocondria o lo transportan al exterior de la célula. La actividad de algunas de estas proteínas está regulada por CaM.



En plantas, se producen cambios en las concentraciones de calcio citoplásmico en respuesta a diferentes estímulos (Tabla 1). Así, la participación de algunas fitohormonas como ácido abscísico (ABA) y auxinas en la movilización de calcio en diferentes procesos fisiológicos ha sido ampliamente descrito (Mac Robbie, 1990).

ESTIMULO	RESPUESTA DE CALCIO	FUENTE DE CALCIO
Mecánico	Incremento transitorio	*
Temperatura	Incremento transitorio	*
Luz		
Roja	Incremento	intracelular
Ultravioleta	Incremento	intracelular
Hormonas		
Acido absísico	Incremento transitorio	intracelular
Auxina	oscilaciones	*
Acido giberélico	Incremento	extracelular
Citocinina	Incremento	extracelular

* No se ha determinado

Tabla 1. Resumen de los estímulos que inducen cambios en los niveles de calcio citoplásmico en células vegetales (Bush, 1993)

La fuente de calcio indica si el ión proviene del almacenamiento intracelular o del calcio extracelular en solución.

Los diferentes elementos del sistema de transducción de señales que involucran al calcio como segundo mensajero han sido descritos también en tejidos vegetales (Figura 2).

I.1 Receptores. Dentro del sistema de transducción de señales en plantas se ha sugerido la presencia de un receptor a auxinas ubicado en la membrana citoplásmica. El receptor membranal de auxinas que media la elongación celular es una proteína ácida de 43 kDa, un dímero de 22 kDa. (Barbier-Brygoo *et al*, 1989).

I. 2 Proteínas G. La presencia de proteínas G ha sido determinada utilizando anticuerpos generados contra la proteína G de *Volvox* (Thompson, 1993). En *Arabidopsis* se ha

descrito un gen que codifica para la subunidad α de esta proteína (Mah *et al*, 1990). Las corrientes de K^+ , generadas en las células guardia de *Vicia faba* se inhiben en presencia de GTP γ S, análogo no hidrolizable del GTP, sugiriendo que la activación de las proteínas G inhibe la apertura de los estomas (Fairley-Grenot y Assmann, 1991). El efecto inhibitorio del GTP γ S no se observa en presencia de altas concentraciones del quelante de calcio 1,2-bis(2-aminofenoxi)etano-N,N,N',N'-ácido tetraacético (BAPTA). Por lo tanto, el efecto inhibitorio de la activación de la proteína G sobre las corrientes de K^+ puede ser resultado de un concomitante incremento de Ca^{2+} (Kearns y Assmann, 1993).

I.3 Fosfolipasa C. La actividad de la fosfolipasa C ha sido detectada en diferentes tejidos vegetales (Murray e Irvine, 1988; Melin *et al*, 1987; Pfaffmann *et al*, 1987; Tate *et al*, 1989). Esta enzima, específica para PIP_2 , es activada por calcio. Los requerimientos de calcio y la especificidad de PIP_2 para la fosfolipasa C que se han determinado en diferentes tejidos y especies de vegetales varían, por lo que se sugiere la existencia de isoformas de esta enzima (Tate *et al*, 1989).

I.4 Inositoles de Fosfato. Las concentraciones de PIP_2 son hasta diez veces menores en las células vegetales que en las células animales (Ferguson, 1990). La alta actividad de la PIP cinasa sugiere que existe un recambio rápido de estos fosfoinosítidos (Drobak *et al*, 1988). La hidrólisis de los fosfoinosítidos como respuesta a fitorreguladores ha sido descrita en diversos tejidos vegetales. En células de *Catharanthus*, las auxinas provocan cambios transitorios en los niveles de inositol 3,4,5 trifosfato (IP_3) e inositol 4,5 difosfato (IP_2) (Ettlinger y Lehle, 1988).

El metabolismo de IP_3 también difiere entre las plantas y animales. Estudios *in vitro* han demostrado que existe defosforilación de IP_3 por enzimas vegetales vía $I(1,4)P_2$, pero las plantas también pueden defosforilarlo dando lugar a $I(2,4)P_2$ (Drobak *et al*, 1991)

I.5 Canales de Calcio. A diferencia de las células animales, en células vegetales el calcio intracelular liberado inducido por IP_3 proviene de vacuolas (Figura 3) (Drobak y Ferguson, 1985, Schumaker y Szeh, 1987). Los estudios bioquímicos y electrofisiológicos llevados a cabo en vacuolas aisladas han demostrado que la vacuola es la mayor fuente de calcio liberado a través de canales acoplados a receptores o canales dependientes de voltaje (Alexandre *et al*, 1990). Las vacuolas pueden contener hasta 10 mM de calcio en su interior, pero en respuesta a IP_3 sólo se moviliza el 40% del calcio aproximadamente (Canut *et al*, 1993). Asimismo, la movilización del catión a citoplasma por estímulos luminosos proviene también de compartimentos intracelulares, muy probablemente de la vacuola (Chae *et al*, 1990; Russ *et al*, 1991). Por otro lado, los cloroplastos pueden captar calcio en respuesta a un estímulo luminoso y presentar concentraciones de 2.6 a 40 mM (Melkonian *et al*, 1990)

En los sistemas vegetales, la eficiencia para regular los niveles de calcio citoplásmico después de un estímulo, es semejante a la de animales (Figura 3). El principal transportador que regula los niveles de calcio citoplásmico es la ATPasa de calcio localizada en membrana citoplásmica (Evans *et al*, 1991). En retículo endoplásmico de células en suspensión de zanahorias se ha reportado la actividad de una ATPasa de calcio sensible a CaM (Hsieh *et al*, 1991).

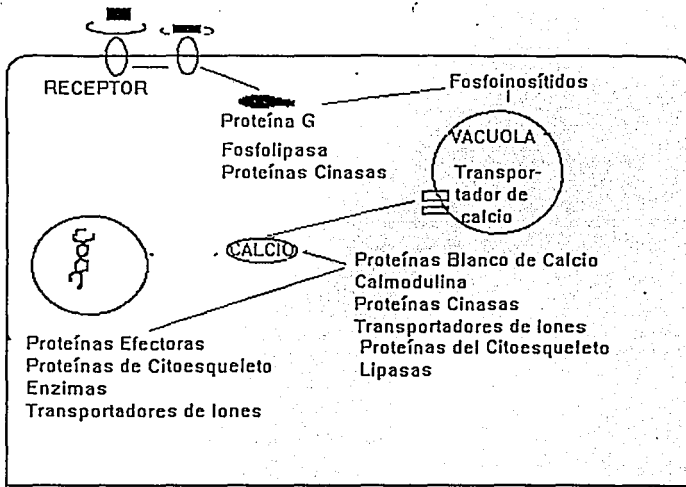


Figura 2. Modelo hipotético del sistema de calcio como segundo mensajero usando los componentes descritos en plantas (Bush , 1993).

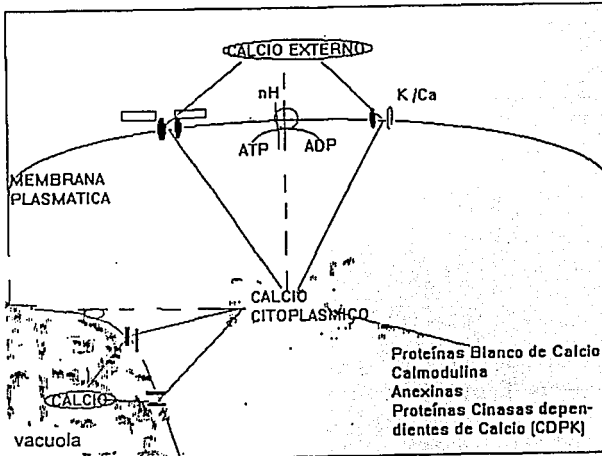


Figura 3. Transportadores que regulan los niveles de calcio citoplásmico en células vegetales (Bush, 1993).

I.6 Participación del calcio en procesos fisiológicos. La participación del calcio ha sido demostrada en procesos fisiológicos tan diversos como crecimiento polar, mitosis, generación de corrientes citoplásmicas, regulación del volumen celular, apertura de estomas, germinación, gravitopismo de raíces, etc (Hepler and Wayne, 1985). Asimismo, el calcio regula la fosforilación de proteínas en distintos procesos fisiológicos (Veluthambi y Poovaiah, 1984).

La participación del calcio en los procesos fisiológicos puede ser determinada por:

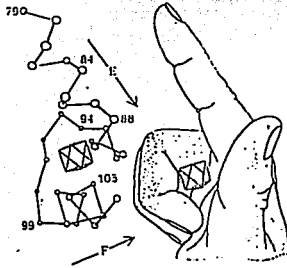
- a) La respuesta fisiológica debe estar precedida o acompañada de cambios en los niveles de calcio citoplásmico y/o las proteínas que lo utilizan.
- b) El proceso debe ser inhibido por medio de los compuestos que bloquean la disponibilidad de calcio.
- c) El proceso debe ser estimulado por la generación experimental de un incremento en los niveles intracelulares de calcio.

En las células vegetales, la medición de calcio citoplásmico se ha llevado a cabo utilizando marcadores fluorescentes sensibles a calcio, particularmente Fura 2 e Indo 1 y de fotoproteínas como la aquorina (Bush y Jones, 1990; Knight *et al.*, 1991). Sin embargo, la pared celular, la presión de turgencia y la presencia de la vacuola dificultan la medición del calcio citoplásmico (Bush y Jones, 1990).

La disponibilidad del calcio en el sistema puede ser alterada con diferentes compuestos a varios niveles. El EGTA es un compuesto quelante de calcio, el lantano y el rojo de rutenio impiden la entrada del calcio extracelular desplazando al calcio unido a membrana (Dos Remedios, 1981). Estos tres compuestos no penetran fácilmente al interior de la célula, por lo que su efecto es principalmente a nivel del calcio extracelular. La interacción del calcio con las proteínas que pueden mediar sus acciones como la calmodulina puede ser alterada con los fármacos trifluoperazina y W7. Un incremento en los niveles de calcio citoplásmico puede ser provocado utilizando el ionóforo A23187. El efecto de estos compuestos, aunado a las mediciones de los niveles de las proteínas que unen calcio, provee de información determinante para esclarecer la función del ión calcio en un proceso fisiológico dado.

II. Proteínas que unen calcio

Se han caracterizado alrededor de 150 proteínas diferentes que son moduladas por calcio, lo cual permite explicar la gran diversidad de efectos fisiológicos de este ión. Estas proteínas presentan de 2 a 8 copias de un dominio denominado "EF hand" (Figura 4) (Strynad y James, 1989).



La estructura de este dominio permite que el calcio se una a dichas proteínas en forma reversible presentando constantes de disociación de orden submicromolar. La unión de calcio a la proteína provoca un cambio en actividad como resultado de la modificación conformacional que sufre la macromolécula. La mayoría de las proteínas moduladas por calcio han sido descritas en animales incluyendo una gran cantidad de cinasas dependientes tanto de calcio como de calcio y calmodulina. En plantas las proteínas mejor caracterizadas que unen calcio son la calmodulina (Allan y Hepler, 1989), la calsecuestrina (Chou *et al.*, 1989) y una cinasa dependiente de calcio pero independiente de calmodulina (CDPK) (Harmon *et al.*, 1987; Putnam-Evans *et al.*, 1990).

Aunque la presencia del gen que codifica para una cinasa dependiente de CaM ha sido descrita en *Arabidopsis*, la actividad de una enzima con sus características no ha sido determinada en ningún tejido vegetal. Por otro lado, se ha descrito la purificación de una cinasa membranal de bajo peso molecular (18,000) a partir de células de chicharo cuya actividad de autofosforilación es estimulada hasta tres veces por CaM siendo serina el residuo fosforilado (Blowers y Trewavas, 1989). Esta cinasa se fosforila y defosforila rápidamente y la estimulación por CaM es menor a la determinada en las cinasas dependientes de CaM en tejidos animales. Dadas estas características, Harrington ha sugerido que esta enzima es una NDP cinasa y ha descrito una proteína con características similares purificada de células de caña de azúcar (Moisyadi *et al.*, 1994).

La CDPK se encuentra en gran variedad de tejidos y de especies vegetales (Tabla 2) (Roberts y Harmon, 1992). Esta enzima tiene un dominio con un 50% de homología con

CaM (Harper *et al.*, 1991; Roberts, 1993), el cual también interactúa con los compuestos derivados de fenotiazinas. La proteína es monomérica; de 40 a 90 kDa según la fuente de purificación y fosforila generalmente residuos de serina ubicados en la secuencia consenso: residuo básico, X, X, Ser donde X puede ser cualquier aminoácido (Roberts y Harmon, 1992). Esta secuencia ha sido descrita en diferentes proteínas incluyendo a la proteína ribosomal S6 y a la nodulina 26, lo que ha dificultado la determinación de su sustrato fisiológico (Weaver y Roberts, 1992). La CDPK que se localiza en la membrana puede ser estimulada por lípidos y podría fosforilar a la ATPasa de protones (Schaller *et al.*, 1988).

ORGANISMO	TEJIDO	Localización Intracelular	TAMAÑO (kDa)	Efecto de Calcio (activación, veces)
Alfalfa	cultivo celular	citoplasma	50-56	
avena	hojas	citoplasma	79	80
cebada	hojas etioladas	citoplasma y membrana	37-45	
<i>Dunaliella</i>		citoplasma	40	
maíz	coleóptilos etiolados	citoplasma	51-58	2-5
<i>Paramecium</i>		citoplasma	50-55	300
trigo	embriones	citoplasma	90	4
soya	nódulo	citoplasma	52-55	10-30

Tabla 2. Propiedades de las cinasas dependientes de calcio descritas en tejidos vegetales (CDPK) (Roberts y Harmon, 1992)

II. 1 Calmodulina. La CaM es una proteína ácida de bajo peso molecular (16,790) que se encuentra presente en todos los organismos vivos en forma altamente conservada. La CaM contiene cuatro dominios funcionales "EF hand" con constantes de disociación de 10^{-6} a 10^{-5} M para los iones calcio en condiciones fisiológicas de pH y fuerza iónica (Vanaman *et al.*, 1977; Teo y Wang, 1973). La figura 5 muestra la secuencia de aminoácidos de la CaM de cerebro de bovino y los sitios de unión a calcio numerados del I al IV a partir del extremo amino terminal (Watterson *et al.*, 1980)

La CaM de espinaca tiene un 90% de identidad en relación a la CaM de vertebrados mientras, que la identidad de esta proteína entre plantas es de un 92 a un 99% (Roberts y Harmon, 1992). Sin embargo, a pesar de la alta identidad en la secuencia y la función de CaM entre plantas y vertebrados, hay diferencias de gran importancia. La comparación entre la secuencia de CaM de diferentes plantas y de vertebrados se establece en la figura 6. Las diferencias entre la CaM de plantas y la de vertebrados consisten en la presencia de una cisteína en el residuo 26 en lugar de una treonina, el cambio de una tirosina por una fenilalanina en el residuo 99, ambos ubicados en dos de los sitios que unen calcio, y de asparagina por treonina en el residuo 70. La secuencia de la calmodulina de maíz ha sido obtenida recientemente a partir de cDNA encontrándose un 99% de homología con respecto a la CaM de otras plantas (Griess *et al.*, 1994). Sin embargo, la CaM de maíz presenta un residuo de leucina en sustitución de la fenilalanina cercana al segundo sitio de unión a calcio. Las características de la CaM de maíz, deducidas de su secuencia de aminoácidos, son las siguientes: Es un polipéptido de 149 aminoácidos con una masa molecular de 16,812 D y un punto isoeléctrico de 3.81. El 25% de la proteína está constituida por ácidos glutámico y aspártico (Griess *et al.*, 1994). El dominio de CDPK homólogo a CaM presenta un mayor grado de homología con las CaMs derivadas de vertebrados que de las mismas en plantas (Figura 6).

La CaM interactúa con diferentes enzimas y con proteínas del citoesqueleto (Tabla 3). La especificidad de esta interacción puede ser explicada por los cambios conformacionales de CaM producidos por modificaciones posttraduccionales como acetilación, carboximetilación, trimetilación y fosforilación. La acetilación de los residuos de lisina da lugar a una inhibición de la afinidad de CaM por la calcineurina (Manalan y Klee, 1987). La reducción de la activación de la AMP_c-fosfodiesterasa es consecuencia de la carboximetilación de CaM (Gagnon *et al.*, 1981) y la trimetilación de la lisina 115 reduce hasta tres veces los niveles de activación de la NAD-cinasa en plantas (Oh y Roberts, 1990). La serina y la tirosina son los residuos de aminoácidos fosforilables en la molécula de CaM. En cerebro de pollo, el 50% de la CaM se encuentra fosforilada en residuos de serina. El receptor de insulina y las tirosinas-cinasas de la familia *src* fosforilan *in vitro* al residuo 99 de tirosina, en ausencia de calcio. Sin embargo, este residuo no está presente en la CaM de plantas. La fosforilación en tirosina estimula la capacidad de CaM para activar a la fosfodiesterasa y aumenta su afinidad por calcio (Williams *et al.*, 1991). La fosforilación *in vitro* de serina 81 se lleva a cabo por la Casein Cinasa II, en presencia de EGTA 1 mM. Esta fosforilación reduce la capacidad de CaM para activar a la cinasa que fosforila la cadena ligera de miosina y a la fosfodiesterasa. La fosfocalmodulina incrementa la $K_{0.5}$ para CaM de la fosfodiesterasa mientras que disminuye la V_{max} para la cinasa de la cadena ligera de miosina (Sacks *et al.*, 1992). El cambio de la actividad de CaM provocado por fosforilación, no ha sido estudiado para la CaM de plantas.

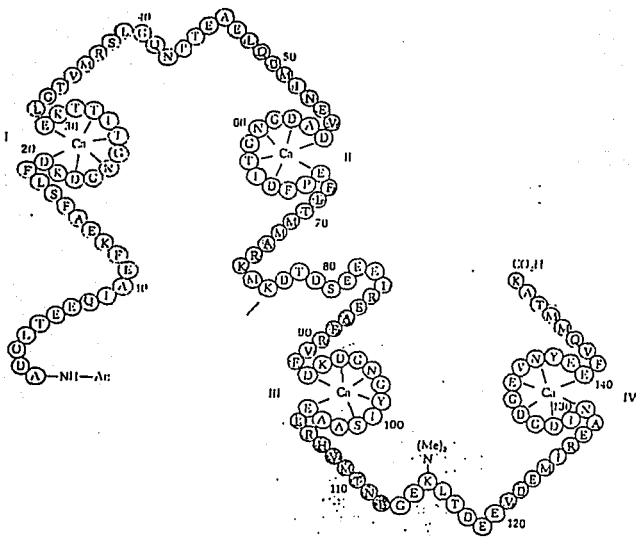


Figura 5. Estructura de calmodulina purificada de cerebro de bovino. Estan señalados los cuatro dominios que unen calcio (Cheung, 1980).

Tabla 3. Enzimas y proteínas que interactúan con calmodulina

- NAD Cinasa
- Adenilato ciclasa
- Fosfodiesterasa
- Oxido nítrico sintasa
- Calcineurina
- Cinasa de la cadena ligera de miosina
- Cinasa dependiente de calmodulina (I,II)
- Nitrato reductasa
- Actina
- Subunidad α del Factor de elongación
- Proteína L19 del ribosoma

```

1                               * * * * *                39
CaM de espinaca                AZZLTDEO&IAEFKEAFSLFDKDGDCITTKELGTYMRSL
CaM de maiz                    =====
CaM de alfalfa                  =DQ===== &=S=====
CaM de trigo                    =DQ===== N=====
CaM de cebada                   =DQ===== D=&=====
CaM de papa                     =EQ===== E=&=====
CaM de vertebrado              =DQ===== E=&=====
CDPK                            =ER=SE=E=&=GGL=L=KMI=T=NS=T=FD=KDGLKRV

```

```

40                               * * * * *                75
CaM de espinaca                CQNPTAELODMINEYDADGNGTIDFPEFLNLMARK
CaM de maiz                    =====L=====
CaM de alfalfa                  =====
CaM de trigo                    =====
CaM de cebada                   =====
CaM de papa                     =====S=A=Q=====
CaM de vertebrado              =====TM=====
CDPK                            =SELM=S=IK=LMDAA=I=KS=YG=IAATVH&

```

```

76                               * * * * *                112
CaM de espinaca                MKDTDSEEELKEAFRVFDKQNGFISAAELRHYMTNL
CaM de maiz                    =====
CaM de alfalfa                  =====
CaM de trigo                    =====D=====
CaM de cebada                   =====
CaM de papa                     =====K=====
CaM de vertebrado              =====IR=====G=Y=====
CDPK                            LNKLER=N=VS=SY=GS=Y=TLD=IQQACKDF

```

```

113                              * * * * *                148
CaM de espinaca                GFKLTDEEYDEMIREADVDDGQINYEYFVKYMMAK
CaM de maiz                    =====
CaM de alfalfa                  ==K=====
CaM de trigo                    ==K=====
CaM de cebada                   ==K=====
CaM de papa                     ==K=====I=====V=====QM=L==
CaM de vertebrado              =&&=D=IHI=D=K=I=Q=N=====D=G=A&A=R=

```

FIGURA 6. Comparación de las secuencias de algunas proteínas moduladas por calcio de origen vegetal y animal.

Los asteriscos corresponden a los aminoácidos involucrados en los sitios de unión a calcio (Roberts y Harmon, 1992) & significa que no está presente un residuo.

III. Proteínas Cinasas

Las proteínas cinasas son enzimas que transfieren el grupo fosfato δ del ATP a un residuo aminoácido de una proteína que funciona como sustrato. El mecanismo de regulación de la actividad de las proteínas por defosforilación/fosforilación está ampliamente distribuido entre los organismos vivos (Krebs y Beavo, 1979). Las proteínas cinasas y las proteínas fosfatasa son reguladas por fosforilación reversible, tanto en respuesta directa de las señales celulares, como a través de los mecanismos de transducción de señales (Gilman, 1987). Se considera que el 30% de las proteínas totales de una célula son posibles blancos de estas enzimas, y se han descrito por lo menos 200 proteínas con una posible actividad catalítica de cinasa (Hunter, 1991). El dominio catalítico es similar en estas enzimas especialmente en la región de unión al nucleótido. La región regulatoria varía y presenta una gran diversidad (Hanks y Quinn, 1991). Estas enzimas pueden fosforilar residuos de Ser/Thr, Tyr, Asp o Glu e His o Lis, siendo las dos primeras las mejor descritas (Hunter, 1991). La actividad de estas cinasas puede ser regulada por nucleótidos cíclicos, por calcio, por CaM, por lípidos y otros metabolitos. A pesar de que ha sido difícil establecer el sustrato fisiológico para cada una de estas enzimas, se han establecido secuencias consenso, presentes en las proteínas utilizadas como sustrato, que son reconocidas de manera específica (Pearson y Kemp, 1991).

III. Proteínas cinasas que fosforilan calmodulina. La CaM presenta la secuencia SEEE, reconocida por la Casein Cinasa II (CKII). La fosforilación de CaM en el residuo de serina se ha descrito tanto *in vitro* como *in vivo*. La CKII es una enzima independiente de nucleótidos, de calcio y de calmodulina que fosforila en Ser/Thr a una gran cantidad de proteínas, algunas involucradas en la síntesis de proteínas (Kuenzel y Krebs, 1985). Esta enzima puede usar ATP y GTP como donadores del grupo fosfato y su actividad es inhibida por heparina e incrementada por poliaminas (Hathaway y Traugh, 1982). Esta proteína es oligomérica, compuesta de dos subunidades diferentes: α y β que forman un tetrámero $\alpha_2\beta_2$ de 130 a 150 kDa. A la autofosforilación, que tiene lugar en la subunidad β , no se le ha asignado una función. La CK-II de células vegetales ha sido parcialmente purificada de células en cultivo de tabaco y caracterizada bioquímicamente (Erdmann *et al.*, 1985), de endospermo de maíz (Grasser *et al.*, 1989), de plántulas de maíz (Dobrowolska *et al.*, 1987), de núcleos de células de chícharo (Li y Roux, 1992) y de células en cultivo de *Marchantia polymorpha* (Kanekatsu y Ohtsuki, 1993). La CK-II de células vegetales presenta características de la enzima descrita en células animales. En maíz, se ha descrito que esta proteína cinasa solo presenta la subunidad α (Dobrowolska *et al.*, 1987).

La CaM también puede ser fosforilada en los residuos de tirosina. El receptor de insulina, con actividad de tirosina cinasa, fosforila a la CaM específicamente en el residuo de tirosina 99 de CaM y se ha relacionado esta fosforilación con la translocación de CaM a núcleo (Graves *et al.*, 1986). Sin embargo, la CaM de plantas no presenta este residuo de tirosina en su estructura y las tirosinas-cinasas han sido poco estudiadas en plantas. A pesar de que la presencia de proteínas con residuos de tirosina fosforilados ha sido

demonstrada en extractos crudos de hojas de chícharo, no se ha descrito ninguna proteína que tenga esta actividad (Toruella *et al.*, 1986).

Materiales y Métodos

Los materiales y los métodos están descritos en los dos artículos y algunos métodos con mayor detalle en el Anexo I que está compuesto de los siguientes capítulos:

- I. Purificación de una proteína cinasa que fosforila a la calmodulina.
- II. Determinación del residuo de aminoácido fosforilado.
- III. Purificación de la calmodulina de ejes embrionarios de maíz.
- IV. Obtención de anticuerpos contra la calmodulina de maíz.

Resultados

Este capítulo comprende los siguientes manuscritos:

Oligomeric protein kinase from maize embryonic tissues with specificity for calmodulin.

Enviado para su publicación a *Plant Physiology*

Calmodulin phosphorylation during maize seed germination

Enviado para su publicación a *Physiologia Plantarum*

También consta de una sección de resultados no publicados.

**OLIGOMERIC PROTEIN KINASE FROM MAIZE EMBRYONIC TISSUES
WITH SPECIFICITY FOR CALMODULIN.**

Alicia Gamboa and Estela Sánchez de Jiménez (*)

Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México. 04510 México, D.F. MEXICO.

ABSTRAC

A maize protein kinase specific for phosphorylating calmodulin was isolated through a rapid purification method based on two consecutive affinity column chromatographies followed by HPLC. The isolated enzyme showed autophosphorylation and specificity for calmodulin phosphorylation in the absence of calcium. Calmodulin phosphorylation was confirmed by gel electrophoresis and autoradiography of the reaction products. Histone and casein were also phosphorylated but after calcium addition to the system. Serine was the target aminoacid residue. This enzyme showed an oligomeric structure of high molecular mass probably formed by the association of two peptides of 49 and 21 kDa, which is disrupted by divalent cations, freezing, or long storage at 4°C. Autophosphorylation and calmodulin phosphorylation were lost by disruption of the oligomeric form, whereas the protein kinase activity was still detectable with histone or casein as substrates. The remarkable change on substrate specificity of this maize protein kinase suggests a possible regulatory role for this enzyme.

Protein phosphorylation and the kinases responsible for this process have been recognized as important mechanisms for coordinating intermediate metabolism regulation in living cells (Cohen, 1982; Traugh, 1989). Calmodulin (CaM) is an ubiquitous and multifunctional protein highly preserved through evolution (Roberts and Harmon, 1992), which is known to modulate -alone or in combination with calcium- the activity of a group of enzymes including protein kinases and, by this mean, to regulate several biological pathways (Sacks *et al.*, 1992). CaM itself has also been reported to be phosphorylated either in Ser/Thr residues by Casein Kinase II or in Tyr by the insulin receptor (Graves *et al.*, 1986; Meggio *et al.*, 1987).

In plants, protein phosphorylation and calcium are known to regulate unique processes such as photosynthesis, photomorphogenesis, gravitropism, and germination, in addition to pathways common to other eukaryotes. During seed germination, changes of CaM levels by auxin treatment (Jenna *et al.*, 1989) and its phosphorylation during this process (Polya and Chandra, 1990) have also been reported. A plant enzyme with characteristics similar to animal Casein Kinase II that phosphorylates CaM *in vitro* has been described (Dobrowolska *et al.*, 1992). On the other hand, translation of stored mRNA present in dry seed axes -one of the most relevant events early in germination (Thompson and Lane, 1980; Datta *et al.*, 1983)- is known to be related to phosphorylation/dephosphorylation of ribosomal proteins that occurs during this process (Pérez-Méndez *et al.*, 1994). In this regard, it is interesting to mention that CaM has been reported to specifically bind to *Dicystostelium* ribosomes through a protein homologous to the mammalian L19 counterpart (Sonnemann *et al.*, 1991), suggesting a possible CaM role on translational regulation.

Due to the relevance that the effect of CaM phosphorylation might have for the regulation of plant specific metabolic processes such as those mentioned above, the present research was undertaken to look for a protein kinase specific for CaM phosphorylation in axes tissues of germinating maize seeds. We describe an oligomeric protein kinase that autophosphorylates and recognizes CaM as substrate.

MATERIAL AND METHODS

Biological Material

Embryonic axes of maize (*Zea mays* L) seeds var. Chalqueño, a Mexican commercial variety, were used for protein kinase purification. Seeds were germinated in darkness at 25°C for 3 h. The embryonic axes were excised and frozen in liquid nitrogen until used.

Methods

Enzyme purification: Twenty g of frozen maize axes (324 mg of protein) were ground in extraction buffer (20 mM TRIS-HCl, pH 7.8). The extract was centrifuged at 53,000 x g for 3.5 h to obtain a postribosomal fraction (Sharff and Nover, 1982). The supernatant was calcium-saturated and applied to a 20-ml phenyl-sepharose (Sigma Chemicals) bed previously equilibrated with buffer A (Buffer A: 20 mM TRIS-HCl, pH 7.0, 1 mM Mg acetate, 0.1 mM CaCl₂) in a 2 x 10 cm column. The column was washed with 200 ml of the same buffer and then eluted with buffer B (Buffer B: 20 mM TRIS-HCl, pH 7.0, 1 mM Mg acetate, 0.1 mM EGTA). The eluted fraction (3 mg of protein) contains kinase activity for CaM. This fraction was calcium-saturated again and then applied to another affinity chromatography column of 0.5 ml CaM-agarose (Sigma Chemicals), previously equilibrated with buffer A, washed with the same buffer and eluted again with buffer B. Kinase activity was found in the fraction eluted with EGTA (250 µg of protein). All purification steps were done fast and at 4°C, except for the affinity chromatographies performed at room temperature (22°C) (modification of Gopala Krishna and Anderson, 1982; Sharma *et al.*, 1992).

Size exclusion chromatography. Protein kinase purified after CaM-agarose column was further resolved by a HPLC procedure. A filtration column, TSKG4000, of a HPLC equipment from LKB was used. The protein fraction, 100 µg, was loaded into this column previously equilibrated with buffer A. The same buffer at a flow rate of 0.5 ml/min was applied for elution and 0.5 ml fractions were collected.

Denaturation procedure. Eluted protein from CaM-agarose was precipitated with acetone (10 v/v) at -20°C for at least 2 h. The pellet was dissolved with 20 µl of 10 mM DTT for 30 min and then 100 µl of 8 M urea was added. This solution was shaken at 40°C during 24 h, and precipitated with 5 ml acetone. Protein fractions were analyzed by SDS gel-electrophoresis (Laemmli, 1970).

Protein Kinase Assay: Routine enzymatic assay contained: 10 µg of spinach CaM (Sigma Chemicals), 100 nm (γ -³²P) ATP/GTP (1000-3000 cpm/pmol) (6000 Ci/mmol, New England Nuclear), 5 mM Mg acetate, 25 mM HEPES, pH 7.4, with or without 1 mM EGTA, and varying amounts of enzyme in a final volume of 50 µl. The reaction was performed at 0°C for 15-30 s and stopped with 1 ml acetone. Samples were centrifuged and the pellet was resuspended in 20 µl SDS-sample buffer. Reaction products were resolved by electrophoresis on 15% polyacrylamide gels and phosphorylated substrates were detected by autoradiography (modification after Blowers and Trewavas, 1989).

Histone IIS , CaM, and casein (Sigma Chemicals)(10 µg) were also tested as substrates for enzyme phosphorylation under the conditions described above, in absence and presence of EGTA. For autophosphorylation, 2 µg of the enzyme fraction were used for the assay and no substrate was added to the system.

Phosphoamino acid Analysis. Either 20 µg of autophosphorylated kinase or purified phosphorylated calmodulin (30 µg) (Gopala Krishna and Anderson, 1982) by phenyl-sepharose column chromatography were acid hydrolyzed (6 N HCl, 110°C, 2 h) (Bylund and Huang, 1976). The hydrolyzates were analyzed by one-dimensional electrophoresis at pH 3.5 (5% acetic acid and 5mM EDTA) at 500 V for 1.5 h on thin-layer cellulose plates (0.1-mm thickness, Merck) (Hunter and Sefton, 1980). Phosphoamino acid standards (phosphoserine, phosphothreonine, and phosphotyrosine, Sigma Chemicals) were detected by spraying ninhydrin, and labelled amino acid residues were detected by autoradiography.

Western blot Analysis: A 12% SDS-electrophoresis of 10 µg of fraction III protein kinase was done. Electrophoretic transfer of proteins to Immobilon sheets (Millipore) and immunodetection with antibodies against CaM was done as in Towbin *et al.* (1979). Rabbit CaM antibodies were produced against Spinach CaM (Sigma Chemicals) as described by Eldik and Watterson (1981); 4-chloro-1-naphtol (Sigma Chemicals) was used as the peroxidase substrate.

RESULTS

The purification procedure of the maize protein kinase specific for CaM (PK-CaM) was based on two consecutive affinity chromatography steps, to accomplish rapid purification.

Twenty g of germinating axes were used to prepare the postribosomal extract (Fraction I), for phenyl-sepharose chromatography. After washing this column, the bound material (Fraction II) represented approximately 1% from the total protein originally applied. Further purification of this fraction by CaM-agarose column chromatography yielded fraction III of approximately 50 µg of protein, which corresponds to 0.08% of the total postribosomal protein (Fig. 1A). Fraction III resolved in three main peptide bands of 70, 42 and 21 kDa in the stained PAGE gel (Fig. 1A, column III). After endogenous phosphorylation, however, this fraction showed by SDS-PAGE and autoradiography labelled peptides of 120, 49, and 21 kDa (Fig. 1B).

The capability of this enzyme to phosphorylate other proteins was examined with histone (II-S), casein, and CaM. Enzymatic assay was performed for Fraction III by applying 10 µg of each substrate and allowed to react with (γ - 32 P) ATP for 15 s. Either casein or histone were found to undergo phosphorylation in presence of calcium (Fig. 2B). CaM, however, required addition of EGTA to be phosphorylated (Fig. 2A). Under this last condition, the other two substrates were only slightly phosphorylated (Fig. 2B). These reactions could be equally accomplished using ATP or GTP as phosphate donor and repeated with different preparations of purified enzyme with the same results. Different sources of CaM (bovine brain, spinach, and maize) were tested to confirm the enzymatic reaction with identical results. To check if a CaM-like domain was present within this enzyme, as reported for members of the CDPK family, Western blot analysis was performed with Fraction III peptides vs CDPK antibodies, kindly provided by Dr. Alice Harmon (University of Florida) with negative results (data not shown).

In vitro CaM phosphorylation has been reported to occur either in serine/threonine or tyrosine residues depending on the enzyme source used (Graves *et al.*, 1986, Meggio *et al.*, 1987). These target residues seem to be highly conserved in CaM molecules from both plant and animal tissues. To determine the amino acid residue(s) phosphorylated by the maize PK-CaM, hydrolyzates of *in vitro* phosphorylated maize CaM were analyzed by thin layer cellulose electrophoresis and autoradiography. Results showed that serine is the only phosphorylated residue in this protein (Fig. 3). Analysis of the autophosphorylated kinase yielded the same results (Fig. 3).

Further purification of the enzymatic Fraction III was performed by HPLC (Fig. 4A). This fraction was resolved in three main peaks, each analyzed by SDS-PAGE and stained with Coomassie blue. Peak a showed four main bands of 70, 49, 42 and 21 kDa, whereas peaks b and c showed predominantly the 42 kDa band and the 21 kDa (Fig. 4B). Kinase activity was also determined on each peak. Table I shows that the enzyme from peak a is able of autophosphorylate and phosphorylates CaM as well; peaks b and c, however, were still able to phosphorylate histone or casein, in the presence of calcium, but not to be autophosphorylated nor to phosphorylate CaM.

These results might be explained by either the presence of two different enzyme activities in the enzyme preparation (Fraction III), which were resolved by HPLC or by

differential oligomeric arrangements of the same enzyme producing changes in kinase characteristics. To differentiate between these possibilities and to determine the actual peptide composition of the kinase, enzyme Fraction III was analyzed in a native gel. Coomassie blue stain of this gel shows a predominant band of high molecular mass correspondent to the native enzyme (N) (Fig. 5A), whereas the same fraction, after autophosphorylation, showed three labelled bands, one corresponding to the same position of the original band (N), another of approximately 540 kDa (Na) and a small band of 21 kDa (Nb) (Fig. 5B). The N labelled band was removed from the native gel by urea treatment to be fully denaturated, and then analyzed by SDS-PAGE. The band from the native gel showed, after Coomassie blue stain, the 21kDa band and another of 17 kDa band not always visible in this type of experiment (Fig. 5C). These data strongly suggest that the kinase isolated by the above procedure is an oligomeric protein made of peptides capable of different association degrees. To analyze further this interpretation, the advanced purified kinase on peak a from the HPLC column, were autophosphorylated and then urea disrupted followed by -SH reduction and SDS-PAGE analysis. This procedure has been successfully applied to oligomeric protein kinases reluctant to fully dissociate by other mild methods (Hemmerich and Pecht, 1992). The final products, obtained after application of this procedure to kinase samples, were again the two 21 and 17 kDa bands, both appearing phosphorylated on the autoradiography (Fig. 6). These small peptides could, however, be the result of proteolysis from larger peptides by the urea treatment. Since CaM molecular mass (15-18 kDa) is close to the mass range shown by the protein kinase peptides, it was considered necessary to differentiate the enzyme peptides from possible CaM contamination by the CaM-agarose column. To this end, EGTA (1 mM) was added to peak a sample after the urea and -SH treatment and then SDS-PAGE analysed. A mobility change of the 17 kDa peptide was observed whereas the 21 kDa remained unaltered (Fig. 7A). Further, results from Western blot analysis of the EGTA sample showed that the 17 kDa but not the 21 kDa peptide was recognized by an antibody against spinach CaM (Fig. 7B).

DISCUSSION

Protein kinases are among the most abundant enzymes in animal as well as plant organisms, widely spread on different tissues (Hanks *et al*, 1988). The actual functional role of many of these enzymes remains, however, still unknown. In this paper, purification of an oligomeric plant protein kinase able to phosphorylate CaM (PK-CaM) has been described for the first time. The relevance of PK-CaM enzyme resides on the central role that CaM plays in cell transduction signalling pathways (Sacks *et al*, 1992). Phosphorylation of this second messenger implies structural modifications that might alter CaM-protein interaction.

The active form of PK-CaM seems to be an oligomeric structure of high molecular mass as revealed by the native gel analysis of the enzyme Fraction III as well as by the results of HPLC analysis (Figs. 5 and 4). Indeed, the remarkable rapid autophosphorylation shown by this enzyme as well as its capability to specifically phosphorylate CaM are observed only when this enzyme is in an oligomeric form (Table 1 and Fig. 4). If the quaternary structure is disrupted by the presence of divalent cations, freezing, or prolonged cold storage, the enzyme changes its substrate specificity whereas it phosphorylates other proteins in the presence of calcium, such as histone or casein (Table 1). Function and oligomeric structure relationship have been described for other enzymes in different systems. The oligomeric form seems to be related to cell needs for differential physiological regulation. In culture cells from liverwort, Kanekatsu and Ohtsuki (1993) described an oligomeric form of Casein Kinase II showing several specific regulatory properties, whereas its monomeric form behaves as a Casein Kinase I, losing its former characteristics. Similarly, PK-CaM might have specific physiological roles in maize tissues depending on its oligomeric form since its substrate specificity depends on its structural organization (Fig. 4 and Table 1). This possibility is also supported by observations in our laboratory where the HPLC distribution pattern for PK-CaM changes during the germination process: peak a diminishes whereas peaks b and c increase (data not shown).

The basic peptide composition of PK-CaM is, at present, difficult to be defined with certainty. The oligomeric constitution of PK-CaM has been revealed by SDS-PAGE analysis of HPLC fractions. Peak a showed four clear bands of 21, 42, 49 and 70 kDa whereas peaks b and c, from the same chromatography, were lacking the larger bands, but presented bands of 42 and 21 kDa (Fig. 4) and some times 17 kDa. The last band was also frequently observed after urea treatment of the enzyme (Fig. 6) and most probably corresponds to CaM contamination. It showed calcium-dependent mobility on SDS-gels (Fig. 7A), as reported for proteins with EF-hand domain, such as CaM, as well as EGTA requirement for its phosphorylation by PK-CaM and recognition by antibodies against spinach CaM by Western blot analysis (Fig 7B). The rest of the peptides could result from an oligomeric association of both, the phosphorylated and non-phosphorylated peptide forms, which might cause some changes in their electrophoretic mobilities. Indeed, if one assumes that the 49 and 21 kDa bands are the basic monomers of this enzyme, the 70 and 120 bands (Fig. 1) might be the result of oligomeric association of these peptides. The 49 kDa peptide seems, however, to be unstable in the system since it only appears on the SDS gels when the oligomeric form of the enzyme is preserved (Figs. 1B and 4). After prolonged cold storage or freezing, this band readily

dissappears from the gel pattern. The 42 kDa band, found mainly on peaks b and c from the HPLC chromatogram (Fig. 4), might correspond to a degradation product of the unstable 49 kDa. Indeed, when strong urea treatment is applied to either Fraction III or peak a the 49 and very often also the 42 kDa are not present in the PAGE-analysis (Fig. 6), suggesting that 42 kDa might be the peptide left after the first degradation step of the 49 kDa peptide. Alternatively, the possibility of a tight dimeric aggregation of 21 kDa peptide, banding at 42 kDa, cannot be excluded. Further research is, however, required to better define PK-CaM structural organization.

There are some characteristics that PK-CaM shares with other kinases. A pea membrane-bound 18 kDa protein kinase is capable of very fast autophosphorylation in serine residues in a CaM dependent reaction (Blowers and Trewavas, 1989). This enzyme also forms polypeptide aggregations of high molecular mass as PK-CaM. Other characteristics of this enzyme are, however, more related to the nucleoside diphosphate kinase described in cultured sugarcane cells (Moisyadi *et al*, 1994), than to PK-CaM. CKII *in vitro* phosphorylates CaM in about 4 min on serine and threonine residues (Meggio *et al.*, 1987) whereas PK-CaM phosphorylates CaM only on serine residues, and this in 15 s (Fig. 3). In plants, a calcium dependent kinase activity has also been described in an ubiquitous family of enzymes named CDPK (Roberts and Harmon, 1992). PK-CaM phosphorylates histone, as the members of this family, in a calcium dependant manner but does not cross react with anti-CDPK antibodies.

To conclude, PK-CaM seems to be a new enzyme with distinctive characteristics not reported before for a plant kinase. Further research is in process to fully characterize this enzyme and to determine its functional role on the germination process.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was partially supported by grants: CONACyT No. 0666-N9108 and PADEP, No. DFQ92242. AG held a fellowship from DGAPA, UNAM. Authors acknowledge technical advice of Dra. Rosario Muñoz Clares and technical assistance of Carlos Mújica on HPLC experiments.

LITERATURE CITED

- Blowers D, Trewavas AJ (1989) Rapid cycling of autophosphorylation of a Ca²⁺-calmodulin regulated plasma membrane located protein kinase from pea. *Plant Physiol* 90: 1279-1285.
- Bylund DB, Huang TS (1976) Decomposition of phosphoserine and phosphothreonine during acid hydrolysis. *Anal Biochem* 73: 477.
- Cohen P (1982) The role of protein phosphorylation in neural and hormonal control of cellular activity. *Nature* 296: 613-620.
- Datta K, Marsch L, Marcus A (1983) Early growth of wheat embryonic axes and the synthesis of RNA and DNA. *Plant Physiol* 72: 394-397.
- Dobrowolska G, Meggio F, Szczegielniak J, Muszynska G, Pinna LA (1992) Purification and characterization of maize seedling casein kinase IIB, a monomeric enzyme immunologically related to a α subunit of animal casein kinase-2. *Eur J Biochem* 204: 299-303.
- Eldik LJ, Watterson DM (1981) Reproducible production of antisera against vertebrate calmodulin and determination of the immunoreactive site. *J Biol Chem* 256: 4205-4210.
- Gopala Krishna R, Anderson WB (1982) Ca²⁺-induced hydrophobic site on calmodulin: application for purification of calmodulin by phenyl-sepharose affinity chromatography. *Biochem. Biophys Res Comm* 104: 830-836.
- Graves CB, Gale RD, Laurino JP, McDonald JM (1986) The insulin receptor and calmodulin. Calmodulin enhances insulin-mediated receptor kinase activity and insulin stimulates phosphorylation of calmodulin. *J Biol Chem* 261: 10429-10438.
- Hanks SK, Quinn AM, Hunter T (1988) The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science* 241: 42-52.
- Hemmerich S, Pecht I (1992) Oligomeric structure and autophosphorylation of nucleoside diphosphate kinase from rat mucosal mast cells. *Biochemistry* 31: 4580-4587.
- Hunter T, Sefton BM (1980) Transforming gene product of Rous sarcoma virus phosphorylates tyrosine. *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 1311.
- Jenna PK, Reddy ASN, Poovaiyah BW (1989) Molecular cloning and sequencing of a cDNA for plant calmodulin. Signal-induced changes in the expression of calmodulin. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 3644-3648.
- Kanekatsu M, Ohtsuki K (1993) Biochemical characterization of casein kinases II (CK-II) from cultured cells of the liverwort, *Marchantia polymorpha*. *Plant Cell Physiol* 34: 627-631.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Meggio F, Brunati AM, Pinna LA (1987) Polycation-dependent, Ca²⁺-antagonized phosphorylation of calmodulin by casein kinase-2 and a spleen tyrosine protein kinase. *FEBS* 215: 241-246.
- Moisyadi S, Dharmasiri S, Harrington MH, Lukas TJ (1994) Characterization of a low molecular mass autophosphorylating protein in cultured sugarcane cells and its identification as a nucleoside diphosphate kinase. *Plant Physiol* 104: 1401-1409.
- Pérez-Méndez A, Aguilar R, Briones E, Sánchez de Jiménez E (1994) Characterization of ribosomal protein phosphorylation in maize axes during germination. *Plant Sci* 94: 71-79.

- Polya GM, Chandra S** (1990) Ca⁺⁺-dependent protein phosphorylation in plants: regulation, protein substrate specificity and product dephosphorylation. In: DR Randall, DG Blevins, eds, Current Topics in Plant Biochemistry and Physiology. Vol. 9, University of Missouri-Columbia, Columbia, St Louis Missouri, pp 164-180.
- Roberts DM, Harmon AC** (1992) Calcium-modulated proteins: targets of intracellular signals in higher plants. *Annu Rev Plant Physiol Mol Biol* 43: 375-414.
- Sacks DB, Davis HW, Williams JP, Sheehan EL, Garcia JGN, McDonald JM** (1992) Phosphorylation by casein kinase II alters the biological activity of calmodulin. *Biochem J* 283: 21-24.
- Scharf KD, Nover L** (1982) Heat-shock induced alterations of ribosomal protein phosphorylation in plant cell cultures. *Cell* 30: 427-437.
- Sharma R, Taylor W, Wang JH** (1992) Use of calmodulin-affinity chromatography for purification of specific CaM-dependant enzymes In: AR Means, BW O'Malley, eds, *Methods of Enzymology* 102, Academic Press, New York, pp 210-219.
- Sonnemann J, Bauerle A, Wincker T, Mutzel R** (1991) A ribosomal calmodulin-binding protein from *Dyctostelium*. *J Biol Chem* 266: 23091-23096.
- Thompson EW, Lane BG** (1980). Relation of protein synthesis in imbibing wheat embryos to the cell-free translational capacities of bulk mRNA from dry and imbibing embryos. *J Biol Chem* 255: 5965-5970.
- Towbin H, Staehlein T, Gordon J** (1979) Electrophoretic transfer of proteins from acrylamide gels to nitrocellulose sheets procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 4350-4354.
- Traugh JA** (1989) Approaches to examine the role of multiple serine protein kinases in the coordinate regulation of cell growth. In: J Monod, JC Cambier, A Weiss, eds, *Advances in Regulation of Cell Growth Vol.1* Raven Press, New York, Chapter 8, pp 173-202.

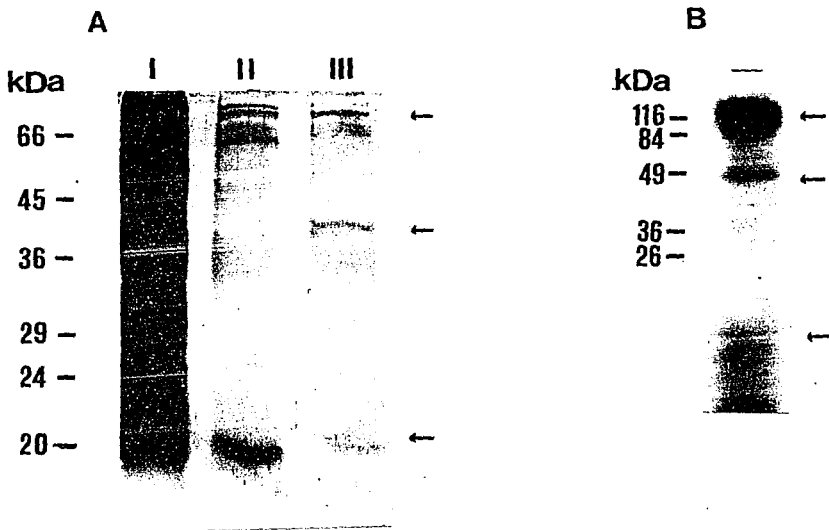


Figure 1. Enzyme purification.

PK-CaM was purified as indicated in Materials and methods. Post ribosomal fraction (I) was calcium saturated and applied in a phenyl-sepharose column previously equilibrated with buffer A. The column was eluted with 0.1 mM EGTA (II). This fraction was calcium saturated again and then applied to CaM-agarose previously equilibrated with buffer A and eluted again with 0.1 mM EGTA (III). Kinase activity was found in the fraction eluted with EGTA (III). All purification steps were done quickly and in a continuous manner at 4°C except for the affinity chromatographies. All fractions (I, II, and III) were resolved on SDS-PAGE 12% polyacrylamide and stained with Coomassie blue (A).

Protein kinase assay was routinely performed in fraction III. The reaction products were resolved by electrophoresis on 12% polyacrylamide gels and the phosphorylated proteins were detected by autoradiography (B).

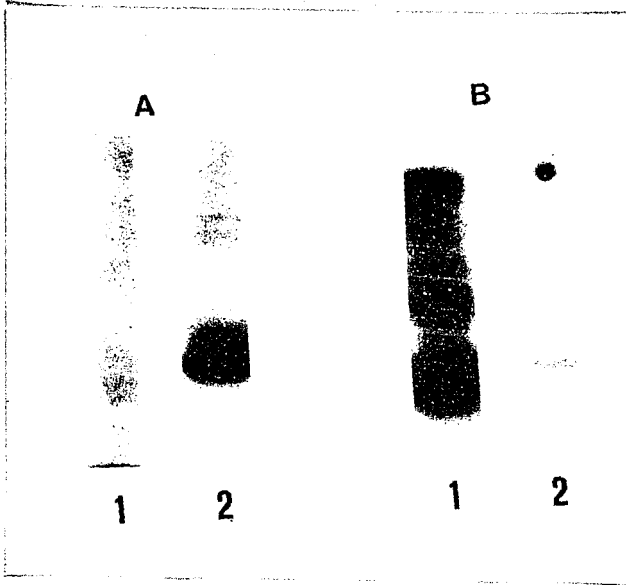


Figure 2. *In vitro* phosphorylation of CaM and Histone.

In vitro phosphorylation of 10 μ g of either CaM (A) or histone IIS (B), in the presence of either calcium (100 nM) (1) or EGTA (1mM) (2) by Fraction III enzyme source were detected by autoradiography. In both instances, phosphorylation was performed under the conditions described in methods. CaM from different origin: maize, spinach, bovine brain, and *Dyctiostelium* were used with same results. This figure shows representative results from several independent repetitions.

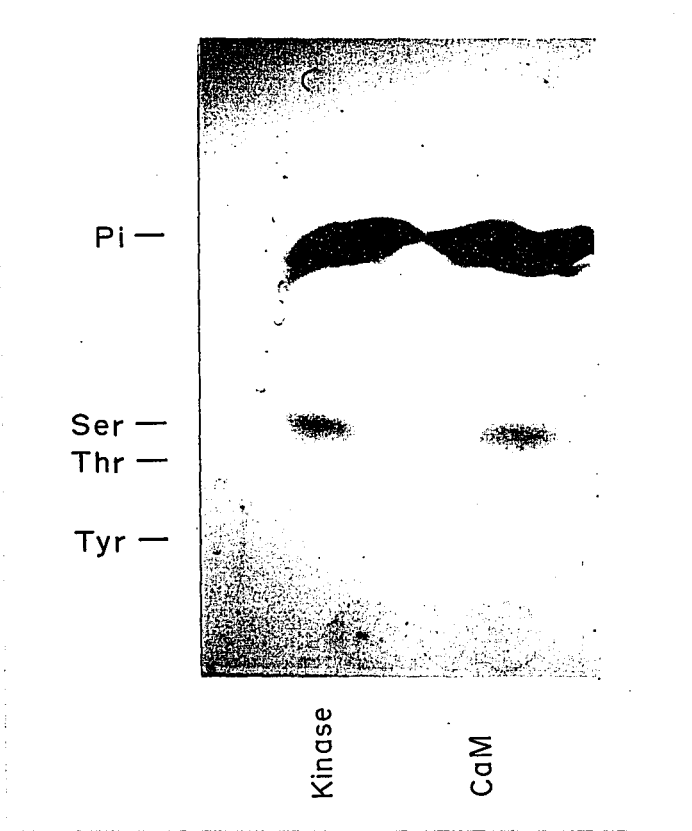


Figure 3. Phosphorylated amino acid residue.

Autophosphorylation of 30 μg of fraction III was performed by applying 100 nM (γ ^{32}P)ATP (1000-3000 cpm/pmol). Phosphorylated protein was purified in a CaM-agarose column and acid hydrolyzed (6 N HCl, 110 $^{\circ}\text{C}$, 2 h). The hydrolyzate was analyzed by thin-layer electrophoresis at pH 3.5 (5% acetic acid and 5 mM EDTA). Phosphorylated residues were detected by autoradiography. Standards of the correspondent amino acids were simultaneously separated by the same procedure as controls (data not shown). Similar experiments were performed with spinach CaM (30 μg). PhosphoCaM was purified through a phenyl-sepharose column.

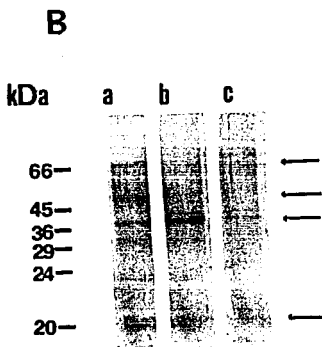
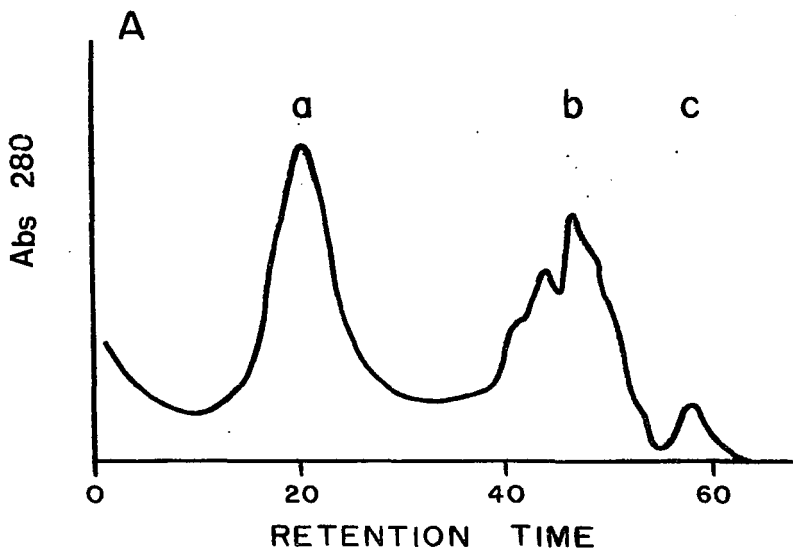


Figure 4. HPLC analysis.

One hundred μg of the eluted protein from CaM-agarose (Fraction III) were fractionated by HPLC in a TSKG4000 column (A). The enzyme resolved in three peaks (a, b and c). The collected fractions from each peak were concentrated by Amicon 10 and further analyzed by 12% SDS-PAGE and Coomassie blue stained (B). Arrows indicate main bands from each fraction. The analysis of Fraction III by HPLC gave reproducible profiles and SDS-PAGE patterns of the peaks only when the enzyme fraction was processed without previous storage.

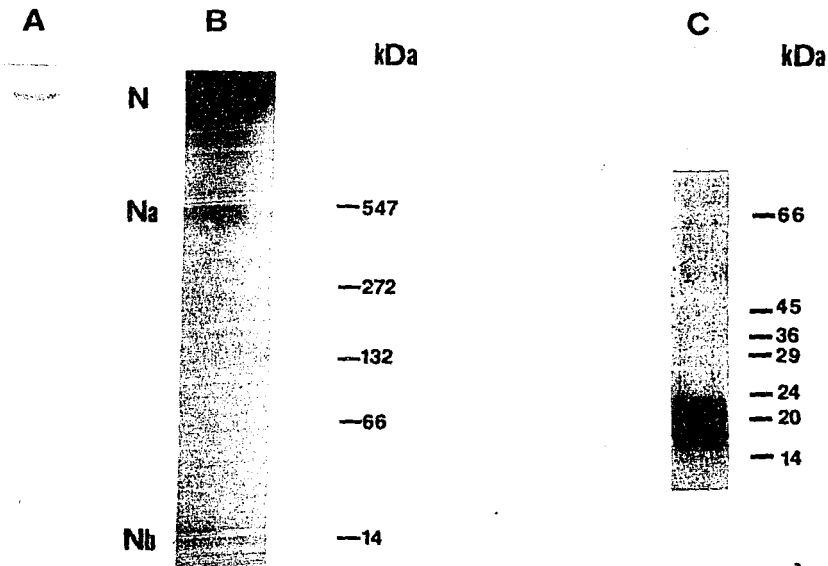


Figure 5. Electrophoretic analysis of native enzyme.

Forty μg of the eluted protein from the CaM-agarose column (Fraction III) was allowed to autophosphorylate and analyzed by electrophoresis in a native gradient 4-8% gel stained with Coomassie blue (A). The corresponding autoradiography of the native electrophoretic plate (B). Each of the three phosphorylated bands (N, Na, Nb) were removed from the gel, denatured with 8 M urea, 40 $^{\circ}\text{C}$ during 24 h and again resolved in an SDS-PAGE 12% gel. Stained plate with Coomassie blue of N band (C). Arrows point to 17 and 21 kDa bands.

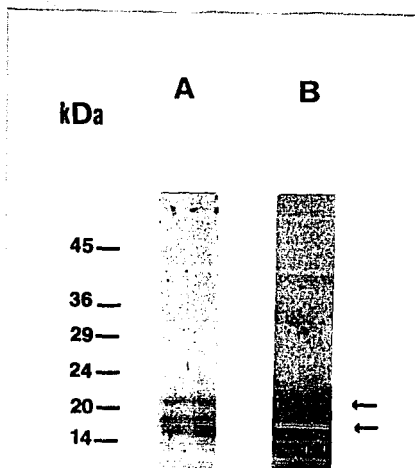


Figure 6. Protein kinase peptide composition.

Peak a sample from HPLC was autophosphorylated as indicated under Methods. The precipitated protein was dissolved in 20 μ l of 10 mM DTT allowed to stand for 30 min at room temperature and then 100 μ l of 8 M urea was added. This solution was shaken at 40°C during 24h and further analyzed by SDS-PAGE. Coomassie stained plate (A). Autoradiography (B). Arrows point to 17 and 21 kDa bands

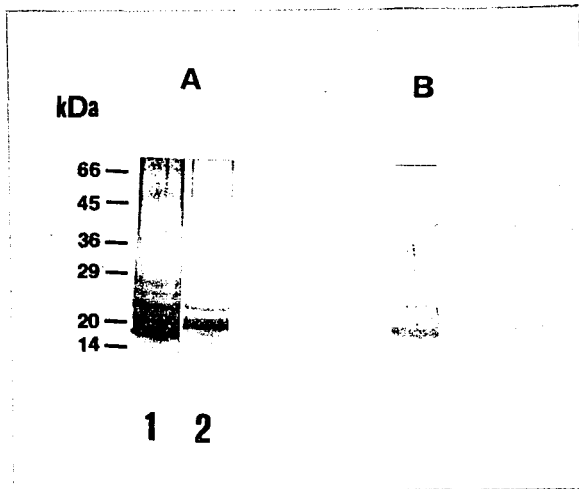


Figure 7. Identification of phosphorylated CaM.

Peak a (20 μ g of protein) was treated by 8 M urea and 10 mM DTT, as in figure 6 and further analyzed in a SDS-PAGE without (lane 1) and with 1 mM EGTA (lane 2) in the sample buffer. Western blot analysis of the EGTA sample was performed using an antibody against spinach CaM (1:500). Coomassie blue (A). Western blot analysis (B).

Table 1. Kinase Activity from HPLC column fractions.

* Fractions a, b and c from Fig. 4 were tested for kinase activity according to Methods. Autophosphorylation and CaM phosphorylation were tested adding 1mM EGTA to the reaction mixture. Histone phosphorylation was performed with 100nM CaCl₂

SUBSTRATE FRACTION*	AUTOPHOSPHORYLATION	CaM	His
a	+	+	+
b	-	-	+
c	-	-	+

CALMODULIN PHOSPHORYLATION DURING MAIZE SEED GERMINATION

Gamboa Alicia, Mellado María-Elena and Sánchez de Jiménez Estela (*)

Gamboa, A., Mellado, M.E. & Sánchez de Jiménez E. 1995. Calmodulin phosphorylation during maize seed germination.

Abstract

Changes in calmodulin concentration as well as postranslational calmodulin modifications have been reported to be associated to seed germination, suggesting that these events are relevant in this process. The objective of this research was to study calmodulin phosphorylation during maize germination and its relation to an oligomeric enzyme that phosphorylates calmodulin (PK-CaM).

In vitro and *in vivo* calmodulin phosphorylation was assessed by measuring rates of ³²P-incorporation into calmodulin at early and late germination steps. Calmodulin synthesis is detected as early as 3 h of germination. This process is found to be auxin regulated. *In vivo* calmodulin phosphorylation occurs at early germination but decreases as germination proceeds. HPLC analysis of PK-CaM showed several oligomeric forms of the enzyme that differ in specificity for calmodulin recognition as well as in its capability for autophosphorylation. PK-CaM distribution between these forms changes during germination. These results suggest that phosphorylation of calmodulin could be an important mechanism for calmodulin activity and signal transduction amplification during maize germination process. The changes in PK-CaM activity together with calmodulin *in vivo* phosphorylation results provide new insight for understanding signal transduction mechanisms involved in seed germination.

Key words: Calmodulin, Germination, Phosphocalmodulin, Protein-kinase, *Zea mays* L. (maize).

Introduction

Calcium and calmodulin (CaM) are involved in many physiological processes in plant and animal cells (Hepler and Wayne, 1985; Roberts and Harmon, 1992). In seed germination, the role of these molecules has been proved indirectly by use of calcium chelators (EGTA), calcium competitors (La and verapamil), and CaM antagonists (TFP and W7) (Lenomard *et al.*, 1993). CaM, as a calcium target protein that is involved in signal transduction, presents regulatory mechanisms at different levels. Recent evidences suggest that the germination of seed embryos of *Cicer arietinum* is accompanied by an increase in CaM concentrations (Hernández-Nistal *et al.*, 1990). In radish embryos, CaM concentrations increased 5-fold upon germination. This increase is suppressed by the addition, to the seed embryos, of abscisic acid, an inhibitor of germination (Coccuci and Negrini, 1988). Treatment of plants with growth substances, such as abscisic acid and auxin, can apparently change CaM homeostasis. By using potato CaM cDNA as a probe, Jenna *et al.*, (1989) monitored CaM mRNA changes in response to auxin treatments. Results indicated maintenance of high CaM mRNA levels in auxin-treated fruits whereas a decline in the hybridization signal occurred within 24 h in non-treated fruits. Further, posttranslational modifications (methylation, phosphorylation) of CaM are known to be involved in metabolic regulation, particularly by specific interaction with some CaM regulating enzymes. Extreme differences in CaM methylation have been observed in plant cells in culture depending upon their growth state (Oh and Roberts, 1990). During early exponential phase, the level of posttranslational methylation of CaM is low, and the predominance of trimethylated CaM increases in late exponential and stationary phases.

On the other hand, CaM phosphorylation has been reported to stimulate phosphodiesterase activity (Williams *et al.*, 1991) whereas the myosin light chain kinase is less active in the presence of phosphocalmodulin (Sacks *et al.*, 1992). It has been described that CaM can be *in vitro* phosphorylated by several kinases, including a casein kinase II that has also been described in plants (Dobrowolska *et al.*, 1987; Traugh, 1989). A kinase that specifically phosphorylates CaM (PK-CaM) has also been isolated from maize seeds. This enzyme shows specificity for CaM phosphorylation in the absence of calcium only if its oligomeric structure is maintained (Gamboa, 1994). This specific characteristic of PK-CaM and its presence in germinating tissues suggest that it is possible that CaM phosphorylation plays a role in germination, by increasing CaM capacity to coordinate molecular events that are taking place during this process or by signal transduction amplification. To understand CaM's role in germination, it was considered relevant to investigate quantitative and qualitative changes in CaM occurring within the physiological period of the emerging seedling.

Abbreviations. CaM, calmodulin; MS, Murashige and Skoog medium, PK-CaM, protein-kinase from maize embryo axes that phosphorylates calmodulin; TFP, trifluoperazine; W7, N-(6-aminohexyl)-5-chloronaphthalene-1-sulfonamide.

Materials and methods

Biological Material

Embryonic axes of maize (*Zea mays* L.) seeds var. Chalqueño, a Mexican commercial variety, were used for protein kinase purification and CaM isolation. Seeds were germinated in darkness at 25°C for 1 h, 3 h or 24 h. The embryonic axes were excised and frozen in liquid nitrogen until used.

Maize CaM purification

CaM purification was performed starting with 20 g of 3-h germinating axes by differential ethanol precipitation and phenyl sepharose chromatography (modification of Oh and Roberts, 1990, and Gopala Krishna and Anderson, 1982). Frozen maize axes were ground in extraction buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.0; 10 mM EDTA). The extract was centrifuged at 14,000 x g for 30 min. A high CaM concentration pellet was obtained by differential ethanol protein precipitation (50 to 90 %) of the supernatant. The pellet was resuspended in 10 ml of 20 mM Tris-HCl, pH 7.0, calcium-saturated during 2 h and applied to a 10 ml phenyl-sepharose bed previously equilibrated with buffer A (Buffer A: 20 mM Tris-HCl, pH 7.0; 1 mM CaCl₂). The column was washed with 100 ml of the same buffer and then eluted with buffer B (Buffer B: 20 mM Tris-HCl, pH 7.0; 1 mM EGTA). This fraction contains a highly pure maize CaM, as demonstrated by its electrophoretic mobility (in presence or absence of Ca⁺⁺) and Western blot analysis.

CaM antibodies

Rabbit CaM antibodies were produced against spinach CaM as in Eldik and Watterson (1981). Spinach CaM (Sigma Chemical Co. St Louis, MO) was modified by treatment with performic acid as reported (Hirs, 1967). The titer against maize CaM was tested by dot blot.

Calmodulin *de novo* synthesis

One gram of dry axes was germinated in MS solid medium. A 3-h pulse with 400 µCi ³⁵S-methionine (specific activity: 1203 Ci/mmol, New England Nuclear) was applied to every germination time (0, 9, 21 h). The germinated embryonic axes were washed and frozen in liquid nitrogen until used.

The embryonic axes were ground in extraction buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.8). The extracts were centrifuged at 14,000 x g for 30 min. A high CaM concentration fraction was obtained by differential ethanol protein precipitation of the

supernatant as in Oh and Roberts (1990). The pellet containing CaM was resuspended in 10 ml of extraction buffer and enough CaCl_2 was added to obtain a final concentration of 1 mM. Protein content and volume of each extract were standardized. Immunoprecipitation of this extract was performed as in Durán *et al.* (1984) using a 1:500 CaM antiserum dilution overnight at 4°C. CaM was separated by antibody bound to Protein A-Sepharose (Sigma Chemical Co. St Louis, MO) at room temperature during 2 h. After washing the resin, the immunoprecipitate was eluted from the column with SDS-sample buffer and the solubilized labeled antigen was analyzed by 12% SDS-electrophoresis (Laemmli, 1970), and fluorography.

***In vivo* CaM phosphorylation**

Dry axes (one gram) were germinated in MS solid medium as above. One-hour pulse of 500 μCi of ^{32}P -orthophosphate (specific activity: 9129 Ci/mmol, New England Nuclear) was applied to the axes at each stated germination time. The germinated embryonic axes were washed and frozen in liquid nitrogen until used. ^{32}P -CaM was isolated by ethanol precipitation; immunoprecipitation and electrophoresis were performed as described above. For autoradiography, a Kodak X-Omat film was exposed to the dry gels for 7-10 days.

Enzyme purification

Enzyme purification was performed starting with 20 g of axes at each germination time, based on two subsequent affinity chromatographies: phenyl sepharose and CaM-agarose resins (Sigma Chemical Co. St Louis MO). Frozen maize axes were ground in extraction buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.8; 0.25 M sucrose). The extract was centrifuged at 53,000 x g for 3.5 h to obtain postribosomal fraction (Scharff and Nover, 1982). The supernatant was calcium-saturated and applied to a 20 ml phenyl-sepharose bed previously equilibrated with buffer A (Buffer A: 20 mM Tris-HCl, pH 7.0, 1 mM Mg acetate, 0.1 mM CaCl_2) in a 2 x 10 cm column. The column was washed with 200 ml of the same buffer and then eluted with buffer B (Buffer B: 20 mM Tris-HCl, pH 7.0, 1 mM Mg acetate, 0.1 mM EGTA). This fraction was calcium-saturated again and then applied to another affinity chromatography column of 0.5 ml CaM-agarose, previously equilibrated with buffer A, washed with the same buffer and eluted again with buffer B. Kinase activity was found in the fraction eluted with EGTA. All purification steps were done fast and at 4°C, except for the affinity chromatographies performed at room temperature (22°C) (modification of Gopala Krishna and Anderson, 1982; Sharma *et al.*, 1992).

Size exclusion chromatography

Protein kinase purified after CaM-agarose column was further resolved by HPLC procedure. A filtration column TSKG4000 of a HPLC equipment from LKB was used. For every different germination time, 100 μg of protein was loaded into this column previously equilibrated with buffer A. Same buffer at a flux of 0.5 ml/min

was applied for elution and 0.5 ml fractions were collected. Protein was determined at 280 nm.

Protein Kinase Assay

Routine enzymatic assay contained: 10 µg of maize purified CaM, 100 nm (γ -³²P) ATP-Mg (specific activity: 6000 Ci/mmol, New England Nuclear) (3000 cpm/pmol), 5 mM MgCl₂, 25 mM HEPES, pH 7.4, with 1 mM EGTA and 20 ng of enzyme. ATP-Mg complex final concentration and free calcium were calculated with a computer program developed by Rodríguez-Sotres and Muñoz-Clares (1990). The reaction was carried out at 0 °C for 15 s and stopped with 1 ml acetone. Samples were centrifuged and the pellet was resuspended in 20 µl SDS-sample buffer. Reaction products were resolved by electrophoresis on 12% polyacrylamide gels (Laemmli, 1970) and phosphoCaM was detected by autoradiography. The X-Omat film was exposed to the dry gel for 2-4 days (Gamboa and Sánchez de Jiménez, submitted). For some assays, Histone (HII-S, Sigma Chemical Co. St Louis MO) was used as substrate under the same conditions as CaM, but with addition of 1 mM CaCl₂ instead of EGTA.

For enzyme autophosphorylation, 2 µg of the protein preparation were used and no substrate was added to the reaction.

Results

CaM increment during germination has been detected in several plants by using either enzymatic assays or RIA analysis (Coccuci and Negrini, 1988; Hernández-Nistal *et al.*, 1990). Rough estimates of CaM levels in maize embryonic axes did not show important changes during germination. Synthesis of CaM, however, was found to vary within this period. Indeed, *de novo* synthesis of CaM was followed during maize seed germination as described in Figure 1. ³⁵S-methionine incorporation into immunoprecipitated proteins by anti CaM antibodies was quantified (Table 1). Further, electrophoretic analysis and fluorography of these proteins showed that CaM was the only labeled protein in the plates. Fast rates of ³⁵S methionine incorporation into CaM were found particularly at 3 h of germination; although *de novo* CaM synthesis continued over all the germination process at slower rates. Auxin treatment to axes at early germination periods inhibit CaM synthesis whereas addition of this hormone caused increase in CaM synthesis at 24 h of germination (Fig.1). CaM *in vivo* phosphorylation was analyzed within this period (Fig. 2). Labeled phosphocalmodulin (17-19 kDa) was clearly detected at 3 h germinating axes in the autoradiography of the ethanol precipitated protein electrophoresis, whereas little ³²P-CaM incorporation, if any, was observed at 12 and 24 h (Fig. 2A). Since another main phosphorylated protein (24 kDa) was also observed in the 3-h fraction, an immunoprecipitation with the CaM-antibody was performed and further analyzed by autoradiography.

A phosphorylated band, corresponding to the ^{32}P -CaM indicated in figure 2A, was found by this analysis (Fig. 2B).

The isolation of a specific kinase (PK-CaM) from maize embryonic axes that phosphorylates CaM has previously been accomplished in our laboratory (Gamboa, 1994). This enzyme has an oligomeric structure that determines its specificity for CaM in the absence of calcium. Other substrates are, however, phosphorylated when this structure conformation is disrupted and calcium is added to the system. *In vitro* CaM phosphorylation was performed using this purified enzyme either from 1 h or 24 h germinating axes. The enzyme activity using CaM as substrate is present at both germination times (Fig. 3, lanes 3 and 4). However, CaM is more intensely phosphorylated by the 1-h-axes enzyme, than by the enzyme from axes at later stages of germination, under the same experimental conditions. In accordance to previous studies, when histone were the added substrate, 1-h-axes enzyme preparation barely phosphorylated the histone, whereas the 24-h one had a clear effect (Fig. 3, lanes 1 and 2).

To test the oligomeric stability of PK-CaM during the germination period, an analyses by size exclusion chromatography of the enzyme at 1, 3, and 24 h of germination were performed (Fig. 4). Three main protein peaks can be observed on the HPLC profiles from the 3- and 24-h-axes enzyme preparations. The ratios between them, however, are different since peak a predominates over the other two (b and c) on the 3-h-axes enzyme profile, whereas the opposite was found for the 24-h-axes enzyme. The profile for 1-h-axes enzyme preparation showed only peaks a, and b. Although peaks a and b are present in this preparation, peak b predominates largely.

SDS-PAGE analyse of each peak of the two profiles were performed (Fig. 5). The analysis of the a and b peaks from 1-h-axes enzyme showed a main peptide of 49 kDa, another of 42 kDa and a slight band of 70 kDa (Fig. 5A). The same peptide composition, although in different proportions, was found in peak a from the 3-h-axes enzyme plus another band of 21 kDa (Fig. 5B). Peaks b and c from the same period were, however, composed only by two peptides of 42 and 21 kDa. Analysis of peaks a, b, and c from 24-h enzyme revealed the presence of these two bands of 42 and 21 kDa (Fig. 5C).

It has been described that this protein kinase can perform autophosphorylation preserving its oligomeric structure, a characteristic that might be involved in the regulation of PK-CaM substrate specificity (Gamboa, 1994). Therefore, since HPLC profiles showed changes in the oligomeric structure of this enzyme during germination, this characteristic was tested on the 1-h and 24-h-axes enzyme preparations. Peptide 21 kDa from PK-CaM was phosphorylated as previously reported (Gamboa and Sánchez de Jiménez, submitted). However, differential autophosphorylation activity of PK-CaM was found for purified PK-CaM from 1-h germination axes as compared to the 24-h one. Stronger ^{32}P incorporation into PK-CaM was found for the 1-h PK-CaM sample than for the 24-h one, which only showed slight incorporation (Fig. 6).

Discussion

Calmodulin synthesis and phosphorylation were analyzed in maize axes at different periods of germination. Results indicate that both processes are active during this physiological period of the plant, suggesting that CaM might be involved in regulating maize germination, similarly described for other plants (Roberts and Harmon, 1992). An important increase of CaM levels has been documented for radish and *Cicer* seeds at 24 h of germination (Coccuci, 1986; Hernández-Nistal *et al.*, 1989). In maize seeds, the most important CaM *de novo* synthesis was found to occur at early germination periods (3 h) (Fig. 1, lane 1), followed by a steady state of synthesis, which might indicate an overall CaM accumulation at late germination periods as reported to occur for radish (Coccuci and Negrini, 1988). Auxin treatment of the germinating seeds, however, delayed this early synthesis but highly increased it at 24 h (Fig. 1, lanes 2, 4 and 6). It is interesting to note that late axes' responses to auxin action has been detected in maize axes, coincident with appearance of the first cellular division (Baíza *et al.*, 1986). Indeed, some processes such as total protein synthesis or protein phosphorylation are sensitive to auxin action only at late stages of germination (Pérez *et al.*, 1987; Pérez *et al.*, 1990).

Most interesting, however, seems to be the temporal course of CaM phosphorylation found during germination (3 h) (Fig. 2). It has previously been reported (Gamboa and Sánchez de Jiménez, submitted) that a protein kinase specific for CaM phosphorylation (PK-CaM) is found in 3-h germinating maize axes, and confirmed and extended here to other stages of the germination period (Fig. 4). The substrate specificity for this enzyme is tightly correlated to its oligomeric structure, in agreement with the data presented here (Figs. 3 and 4). The HPLC analysis of PK-CaM from axes at different germination periods (Fig. 4) showed a tendency to disaggregate the full oligomeric enzyme form (peak a) concomitantly with loss of its CaM phosphorylation activity (Fig. 3). These results suggest that CaM structural conformation might have a regulatory function within the germination period, which seems to be related to the *in vivo* CaM phosphorylation status (Fig. 2). This suggestion has supported further by the observations of *in vivo* CaM phosphorylation along the germination period, which showed large ^{32}P -CaM incorporation at early germination but a steady phosphorylation decrease at later periods. Since phosphoCaM seems to modulate different reactions than those modulated by non-phosphoCaM (Williams *et al.*, 1991; Sacks *et al.*, 1992), changes of PK-CaM activity during seed germination might indicate differential regulation of specific metabolic pathways. Reintegration of the translational apparatus and reinitiation of protein synthesis is most relevant in germination to assure for the new seedling establishment. Although very little is known about the specific role of phosphoCaM, particularly

during this period, a tight CaM association to the basic L19 ribosomal protein has been reported in *Dyctostelium* (Sonnemann *et al.*, 1991), which might be altered by CaM phospho/dephosphorylation. The meaning of this phenomenon is, however, not yet known.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was partially supported by grants: CONACyT No. 0666-N9108 and PADEP, No. DFAQ92242. AG held a fellowship from CONACyT. Authors acknowledge technical assistance of Carlos Mújica on HPLC experiments and of Jorge Loyo on *in vivo* phosphorylation assays.

REFERENCES

- Baíza, A. & Sánchez de Jiménez. 1986. Histones and the first cell cycle of maize seed germination. - *Physiol. Plant.* 68: 259-264.
- Coccuci, M. 1984. Increase in calmodulin level in the early phases of radish seed (*Raphanus sativus L.*) germination. - *Plant Cell Environ.* 7:215-221.
- & Negrini, N. 1988. Changes in the levels of calmodulin and of a calmodulin inhibitor in the early phases of radish (*Raphanus sativus L.*) seed germination. - *Plant Physiol.* 88: 910-914.
- Durán, N., Bach, M., Puigdoménech, P. & Palau, J. 1984. Characterization of antigenic polypeptides of the RNP, Sm and SS-B nuclear antigens of calf thymus. - *Mol. Immun.* 21: 731.
- Dobrowolska, G., Meggio, F., Szczegieliński, J., Muszynska, G. & Pinna, L.A. 1992. Purification and characterization of maize seedling casein kinase IIB, a monomeric enzyme immunologically related to an α subunit of animal kinase-2. - *Eur. J. Biochem.* 204: 299-303.
- Eldik, L.J. & Waterson, D.M. 1981. Reproducible production of antisera vertebrate calmodulin and determination of the immunoreactive site. - *J. Biol. Chem.* 256: 420-4210.

- Hernández-Nistal, J., Rodríguez, D., Nicolas, G. & Aldasoro, J.J. 1989. Abscic acid and temperature modify the levels of calmodulin in embryonic axes of *Cicer arietum*. - *Physiol. Plant.* 75: 255-260.
- Heppler, P.K. & Wayne R.O. 1985. Calcium and plant development. - *Annu. Rev. Plant Physiol.* 36: 397-439.
- Hirs, C.H.W. 1967. Performic acid oxidation In: *Methods of Enzymology* 11, Enzyme structure, (C.H.W. Hirs ed), pp. 197-199. Academic Press, NY. ISBN 54-9119.
- Gamboa, A. 1994. Fosforilación de la calmodulina durante la germinación de maíz: Purificación y caracterización de una cinasa específica para calmodulina (PK-CaM). PhD thesis, Facultad de Química-UNAM, México.
- Gamboa, A. & Sánchez de Jiménez, Estela. Oligomeric protein kinase from maize embryonic tissues with specificity for calmodulin. *Plant Physiol.* Submitted.
- Gopala Krishna, R. & Anderson, W. 1982. Ca²⁺-induced hydrophobic site on calmodulin: application for purification of calmodulin by phenyl sepharose affinity chromatography. - *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 104: 830-836.
- Jenna, P.K., Reddy, A.S.N. & Poovaiah, B.W. 1989. Molecular cloning and sequencing of a cDNA for plant calmodulin. Signal-induced changes in the expression of calmodulin. - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 3644-3648.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. - *Nature* 227: 680-685.
- Lenomard, C., Martini, F. & Balangé, A.P. 1993. Germination of sunflower seeds: involvement of calcium. - *Plant Physiol. Biochem.* 31: 437-445.
- Oh, S.H. & Roberts, D.M. 1990. Analysis of the state of posttranscriptional calmodulin methylation in developing pea plants. - *Plant Physiol.* 93: 880-887.
- Pérez, L., Aguilar, R. & Sánchez de Jiménez E. 1987. Effect of exogenous auxin on maize tissues. Alteration of protein synthesis and phosphorylation. - *Physiol. Plant.* 69: 517-522.
- Pérez, L., Aguilar, R., Pérez-Méndez, A. & Sánchez de Jiménez. 1990. Phosphorylation of ribosomal proteins induced by auxin in maize embryonic tissues. - *Plant Physiol.* 94: 1270-1275.
- Roberts, D.M. & Harmon, A.C. 1992. Calcium-modulated proteins: targets of intracellular signals in higher plants. - *Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.* 43: 375-414.
- Rodríguez-Sotres, R. & Muñoz-Clares, R. 1990. Kinetic evidence of the existence of a regulatory phosphoenolpiruvate binding site in maize leaf phosphoenolpiruvate carboxilase. - *Arch. Biochem. Biophys.* 276: 180-190.

- Sacks, D.B., Davis, H.W., William, J.P., Sheehan, E.L., Garcia, J.G.N., McDonald, J.M. 1992. Phosphorylation by casein kinase II alters the biological activity of calmodulin. - *Biochem. J.* 283: 21-24.
- Scharf, K.D. & Nover, L. 1982. Heat-shock induced alterations of ribosomal protein phosphorylation in plant cell cultures. - *Cell* 30, 427-437.
- Sharma, R., Taylor, W. & Wang, J.H. 1992. Use of calmodulin-affinity chromatography for purification of specific CaM-dependent enzymes. In: *Methods of Enzymology* 102 (Means, A.R. and O'Malley eds) pp 210-219. Academic Press, New York. ISBN 0-12-182002-5.
- Sonnemann, J., Bauerle, A., Wincker, T. & Mutzel, R. 1991. A ribosomal calmodulin binding protein from *Dyctiostelium*. - *J. Biol. Chem.* 266: 23901-23906.
- Traugh, J.A. 1989. Approaches to examine the role of multiple serine protein kinases in the coordinate regulation of cell growth. In: *Advances in Regulation of Cell Growth*. Vol. 1. (Monod, J., Combier, J.C., Weiss, A., eds.), Raven Press, New York, Chapter 8, pp. 173-202.
- Williams, J., Jo, H., & McDonald, J.M. 1991. Phosphotyrosyl calmodulin (CaM-P) has increased affinity for cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE). - *FASEBJ* 5: A448.

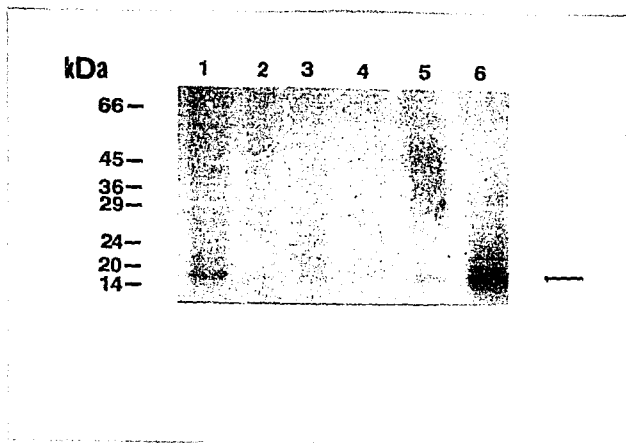


Figure 1. CaM *de novo* synthesis during maize germination.

Six groups of maize embryonic axes (1 g each) were incubated for 3, 12 and 24 h. The embryonic axes were pulse-labeled with 400 μCi of ^{35}S -methionine during the last three hours of incubation. CaM was immunoprecipitated with anti-CaM-antibodies, electrophoresed and autoradiographed as indicated in Materials and methods. Lanes 1, 3, and 5: CaM immunoprecipitated from 3, 12, and 24 h incubated embryonic axes, respectively. Lane 2, 4 and 6: CaM immunoprecipitated from 3, 12 and 24 h incubated embryonic axes after IAA treatment (25 μM). Arrow indicates CaM position. The Kodak X-Omat film was exposed to the dry gel for 15 days.

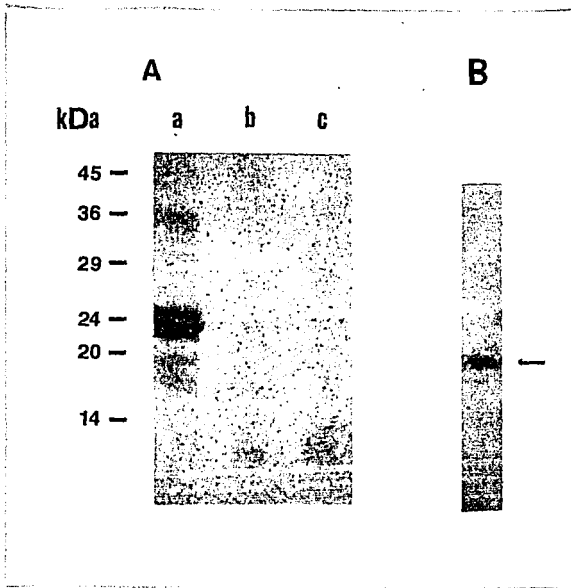


Figure 2. *In vivo* phosphorylation of CaM during germination.

Three groups of embryonic axes were incubated for 3, 12 and 24 h. The embryonic axes were pulse labeled with 250 μ Ci of (32 P)orthophosphate during the last hour of incubation. Proteins were ethanol precipitated, electrophoresed, and autoradiographed as indicated in Materials and methods (A), lane a: Proteins from 3 h; lane b: 12 h; lane c: 24 h germinating axes. Ethanol fraction from the 3 h germinating embryonic axes was immunoprecipitated, electrophoresed and autoradiographed as indicated in Materials and methods (B). Arrows indicate CaM position. The Kodak X-Omat film was exposed to the dry gel for 7 days.

Figure 3. PK-CaM activity during germination.

Histone IIS (10 μg) was phosphorylated using PK-CaM derived from 1-h (lane 1) or 24-h (lane 2) germinating axes adding CaCl_2 1 mM to the reaction medium. Spinach CaM (10 μg) was phosphorylated in a calcium free medium (EGTA 1 mM) using also PK-CaM from 1-h (lane 3) and 24-h (lane 4) germinating axes. Phosphorylation reaction, electrophoresis and autoradiography of the products were performed as described in Materials and methods. This figure shows representative results from several independent repetitions. Arrows indicate CaM position.

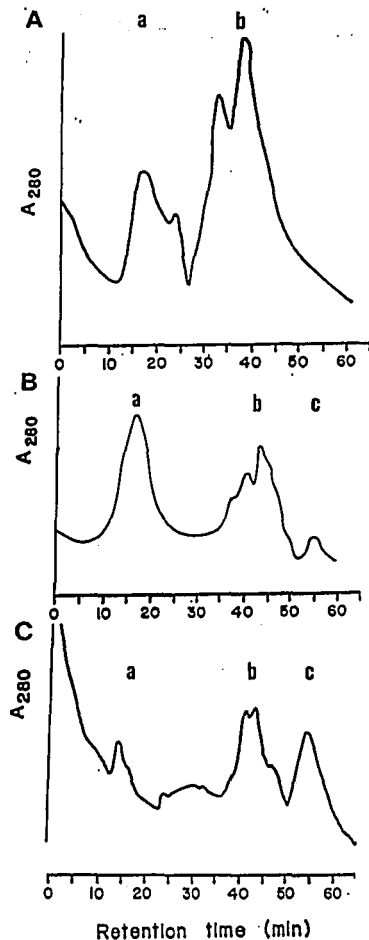


Figure 4. Size exclusion chromatography (HPLC) of PK-CaM. PK-CaM (100 μ g) (CaM-agarose eluted fraction) purified from 1-h (A), 3-h (B), and 24-h (C) germinating axes was fractionated by HPLC on a TSKG4000 column. Retention times for the main three eluted peaks as well as their ratio for each stated period were reproducible when the enzyme fraction was processed without previous storage.

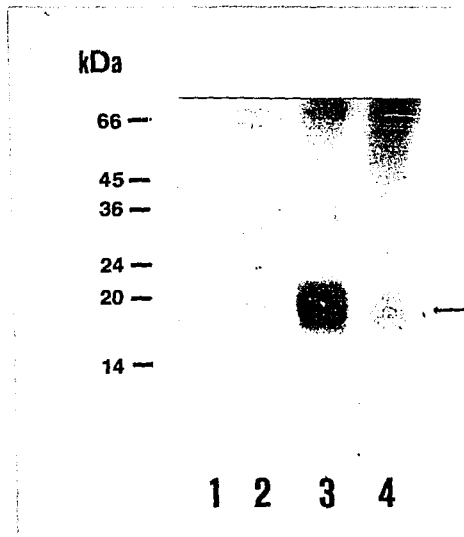


Figure 5. SDS-PAGE patterns of the peaks protein derived from the HPLC analysis.

The collected fractions from either peaks a, b or c from the HPLC profile were concentrated by Amicon 10 and further analyzed by 12% SDS-PAGE and Coomassie blue stained. Arrows indicated main band of each fraction. A: Peaks a, and b from the HPLC profile of 1-h-axes enzyme. B and C: Peaks a, b, and c from the HPLC profile 3- and 24-h-axes enzyme respectively.

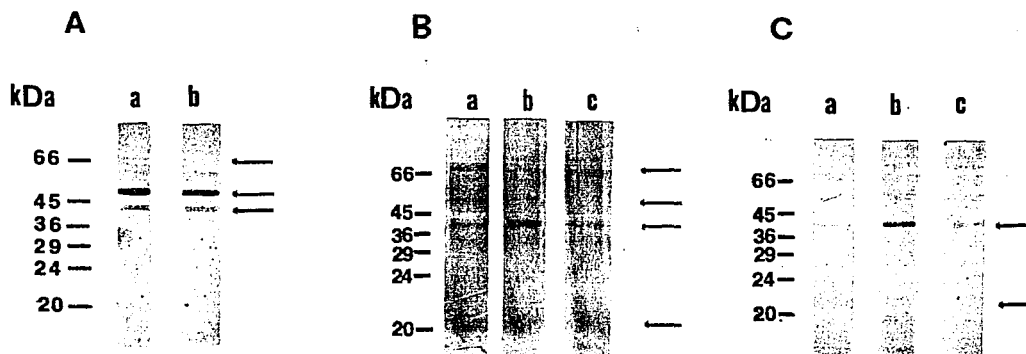


Figure 5. SDS-PAGE patterns of the peaks protein derived from the HPLC analysis.

The collected fractions from either peaks a, b or c from the HPLC profile were concentrated by Amicon 10 and further analyzed by 12% SDS-PAGE and Coomassie blue stained. Arrows indicated main band of each fraction. A: Peaks a, and b from the HPLC profile of 1-h-axis enzyme. B and C: Peaks a, b, and c from the HPLC profile 3- and 24-h-axis enzyme respectively.

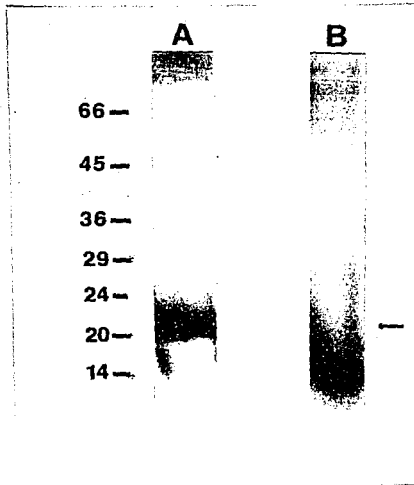


Figure 6. Autophosphorylation activity of PK-CaM at early and late germination.

Twenty μg of either PK-CaM derived from 1 h (A) or 24 h (B) germinating axes were allowed to autophosphorylate followed by product electrophoresis as described in Material and methods. The Kodak X-Omat film was exposed to the dry gel for 2 days. Arrow indicates phosphorylated 21 kDa PK-CaM peptide.

Resultados no publicados

Los siguientes resultados corresponden a algunos datos que se encuentran incluidos en los manuscritos como datos no mostrados:

La actividad de la proteína cinasa que se purificó a partir de ejes embrionarios de maíz de 3 h de germinación no se pudo cuantificar porque se presenta a tiempos muy cortos. La figura 1 muestra la actividad de PK-CaM desde los 15 segundos de reacción, observándose la mayor incorporación de ^{32}P tanto a la proteína cinasa (A) como a la calmodulina (B) a los 30 segundos.

Con el objeto de determinar si el grado de metilación de CaM afecta la capacidad de PK-CaM para fosforilarla, se utilizaron CaM no metilada (*Dyctiostelium*) y trimetilada (Cerebro de Bovino) como sustratos de la enzima. La figura 2 muestra que PK-CaM utiliza CaM de *Dyctiostelium* (1), de maíz (2), de espinaca (3) y de cerebro de bovino (4) como sustrato.

El número de péptidos que componen a la PK-CaM ha sido muy difícil de determinar, por lo que se llevó a cabo un análisis de isoelectroenfoque de los productos fosforilados de PK-CaM. El análisis de isoelectroenfoque mostró PK-CaM presenta dos grupos de péptidos que presentan puntos isoeléctricos de 6.2 y 4.7 (Fig. 3A). La calmodulina fosforilada por esta enzima presenta un punto isoeléctrico de 3.9 que corresponde al reportado (Fig. 3B).

Las enzimas purificadas a partir de ejes embrionarios de 1 hora y de 24 horas de germinación también presentaron al menos diferentes picos de proteína cuando se colocaron en la columna de exclusión molecular del HPLC. La actividad de proteína cinasa se determinó en cada pico y se encontró que sólo el pico de alto peso molecular para cada uno de las fracciones presenta actividad de proteína cinasa específica para CaM (Tabla 1).

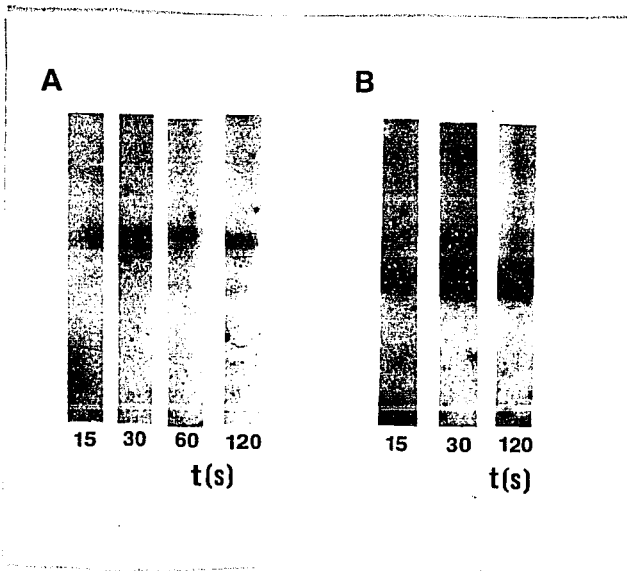


Figura 1. Cinética de la reacción de autofosforilación y fosforilación de CaM. Autoradiografía de los productos de reacción utilizando $2\mu\text{g}$ de PK-CaM purificada a partir de ejes embrionarios de 3 horas de germinación (A). Autoradiografía de CaM de espinaca fosforilada por PK-CaM (3 h) según lo descrito en métodos (B).

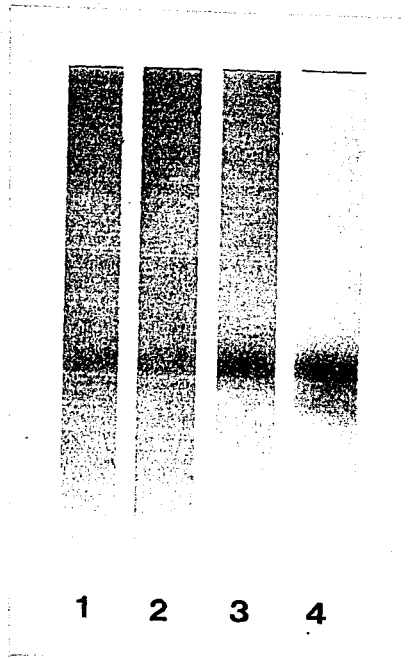


Figura 2. Fosforilación de CaM de diferentes orígenes.

Diez microgramos de CaM de *Dyctostelium* (1), de maíz (2), de espinaca (3) y de cerebro de bovino (4) fueron fosforilados utilizando PK-CaM purificada a partir de ejes embrionarios de 3 horas de germinación. La autoradiografía se llevó a cabo según lo descrito en métodos.

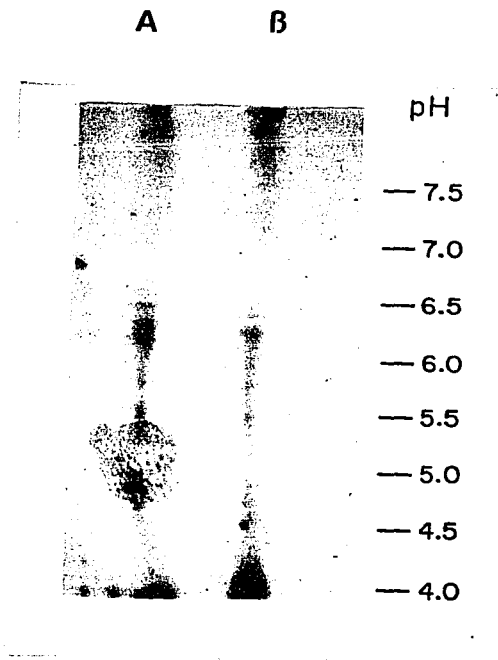


Figura 3. Determinación del punto isoeléctrico de los péptidos que conforman PK-CaM.

Autoradiografía de los productos de reacción utilizando 2 μ g de PK-CaM purificada a partir de ejes embrionarios de 3 horas de germinación (1).

Autoradiografía de CaM de espinaca (2)

Tabla 1. Actividad de proteína cinasa de los picos a, b y c obtenidos a partir del fraccionamiento de PK-CaM de diferentes tiempos de germinación por medio de una columna de exclusión molecular.

Horas de germinación	Pico a		Pico b		Pico c	
	CaM	His	CaM	His	CaM	His
1	*	*	-	*	-	-
3	*	*	-	*	-	*
24	*	*	-	*	-	*

* Actividad

Se utilizó Calmodulina de mnlz como sustrato.

DISCUSION

En plantas la fosforilación de ciertas proteínas se ha relacionado con diferentes eventos fisiológicos tales como gravitropismo, respuesta a luz, germinación, etc. Sin embargo, se han purificado y caracterizado pocas proteínas cinasas a partir de tejidos vegetales. En este trabajo se describe la purificación de una proteína cinasa que fosforila a la calmodulina, y su posible relación con la fosforilación *in vivo* de esta proteína durante la germinación de la semilla de maíz.

A partir de ejes embrionarios de maíz, se purificó una proteína cinasa que se autofosforila y fosforila CaM en presencia de EGTA; sin embargo, en presencia de calcio pierde esta capacidad y cambia su especificidad por otros sustratos como histonas (Fig. 1 y 2, ms 1). Esta fosforilación se lleva a cabo en residuos de serina tanto en CaM, como en histona o la propia PK-CaM en la reacción de autofosforilación (Fig. 3, ms 1). Esta actividad es muy rápida (Fig 1, resultados no publicados). Puede utilizar tanto ATP como GTP como donadores de grupos fosfato y puede fosforilar CaM de diferentes fuentes tales como *Dyctostelium*, maíz, espinaca y cerebro de bovino (Fig. 2, sección de resultados no publicados) las cuales varían significativamente en el nivel de metilación de la lisina 115 (Roberts y Harmon, 1992): Esto indica que esta modificación postraduccional no afecta significativamente a la acción de PK-CaM.

El análisis de la actividad de PK-CaM en relación al proceso de germinación mostró que la máxima actividad para fosforilar CaM ocurre durante la primera hora de germinación mientras que la capacidad de fosforilar histona fue aumentando a lo largo del proceso (Fig. 3, ms 1). Por otra parte es importante resaltar que PK-CaM presenta una estructura oligomérica inestable (Fig. 2 Anexo: Métodos) cuya integridad correlaciona con la capacidad para fosforilar CaM (Fig. 3, Anexo: Métodos). Esta estructura presenta diferencias en cuanto a la estabilidad de dicha oligomerización en relación al tiempo de germinación (Fig. 4, ms 2). Así, puede observarse que la capacidad de fosforilar CaM sólo está presente en el pico a del perfil proteico del HPLC, que corresponde a la estructura oligomérica de mayor peso molecular en todos los casos (Tabla 1, resultados no publicados). Este pico es proporcionalmente mayor en las preparaciones provenientes de las primeras horas de germinación y asimismo, la enzima presenta una mayor actividad al usar CaM como sustrato. Por lo tanto, la forma activa de PK-CaM parece ser el oligómero de alto peso molecular el cual se va disgregando o presentando una menor cohesión, a medida que avanza el proceso de germinación, lo cual podría estar determinado por el tipo y concentraciones de iones en los ejes, ya que *in vitro* éstos mostraron ser determinantes en la pérdida de la cohesión del oligómero (Fig. 3 Anexo. Métodos). Es importante aclarar que no se descarta la posibilidad de que esta estructura oligomérica sea un agregado sin papel fisiológico de los péptidos que conforman la enzima y consecuencia de la purificación. La concentración de sales, que promueven la formación de agregados, en la preparación de la enzima es muy baja y la formación de los complejos parece estar determinada por la presencia de iones Mg^{++} durante el proceso de purificación (Fig. 2, anexo). La concentración de magnesio utilizada durante el proceso

se encuentra en el intervalo fisiológico (1 mM) por lo que se sugiere que el complejo de alto peso molecular de la enzima puede tener una relevancia fisiológica.

La relación entre la función de proteína cinasa y la estructura oligomérica ha sido descrita para otras enzimas. La estructura oligomérica de la Caseína Cinasa II de células en cultivo de hepática presenta, además de la actividad de fosforilación, ciertas características regulatorias de esta enzima, mientras que la forma monomérica de esta enzima sólo conserva la actividad de proteína cinasa (Kanakatsu y Ohtsuki, 1993). La pérdida de la capacidad de regulación de esta enzima parece estar asociada a alguna subunidad ausente en la forma monomérica. En este contexto, se pretendió establecer la composición básica de los péptidos que conforman PK-CaM. Sin embargo, no ha sido fácil definir este concepto ya que, aparentemente, estos péptidos tienden a agregarse fácilmente aún en condiciones desnaturalizantes. Este problema ha sido especialmente señalado para las NTP cinasas (Hemmerich *et al.*, 1990) y también para la de CaM purificada de espinaca. PK-CaM de 1 h de germinación presenta los péptidos de 70, 49 y 42 kDa en los dos únicos picos obtenidos en la cromatografía de exclusión molecular (HPLC) (Fig. 5, ms 2). La PK-CaM de 3 h ya presentó diferencias en la composición de péptidos de los diferentes picos; el pico a está compuesto de péptidos de 70, 49, 42 y 21 kDa mientras que los picos b y c sólo presentan las bandas de 42 y 21 kDa (Fig 5, ms 2). Estos dos péptidos, de 42 y 21 kDa, son los que predominan en los picos de la enzima purificada a partir de ejes embrionarios de 24 horas (Fig 5, ms 2). En algunos casos, fue posible detectar un péptido de 17 kDa. Por otro lado, el tratamiento de desnaturalización con urea 8 M y DTT tanto de la banda que conforma el gel nativo como del pico a muestran la presencia de 2 péptidos que corresponden a 21 y 17 kDa (Fig. 6 ms 1). Este procedimiento es muy drástico y puede generar péptidos que sean producto de degradación de la proteína original. Sin embargo, y con estas reservas en mente, se podría considerar que el péptido de 21 kDa es realmente uno de los monómeros de la oligoenzima, puesto que se puede observar también en las preparaciones no tratadas con urea y DTT (Figs. 1 y 4, ms 1; Figs. 3). En cuanto al péptido de 17 kDa, parece corresponder a CaM ya que presenta un cambio de movilidad electroforética en presencia de EGTA y es reconocido por el anticuerpo contra CaM de espinaca con análisis de Western blot (Fig. 7, ms 1). Los demás péptidos pueden corresponder a diferentes asociaciones de los monómeros que constituyen PK-CaM. Así, considerando que los péptidos básicos son el 49 y el 21 kDa, el péptido de 70 kDa puede estar constituido por uno de 49 kDa y uno de 21 kDa. El péptido de 42 kDa puede ser resultado de la degradación del péptido de 49 kDa, que parece ser inestable, o de la agregación de dos monómeros de 21 kDa. Esta interpretación se apoya también en resultados preliminares que indican la existencia de dos grupos de péptidos de diferente punto isoeléctrico: 6.2 y 4.7, que conforman a la enzima mientras que la CaM fosforilada presenta el punto isoeléctrico de 3.9 reportado para la CaM (Fig 3, sección de resultados no publicados)

PK-CaM comparte algunas características con otras proteínas cinasas descritas en células vegetales. La proteína cinasa de chícharo descrita por Blowers y Trewavas (1989) se autofosforila en residuos de serina en forma rápida y utilizando ATP o GTP como donador de grupos fosfato, características que comparte con PK-CaM. Sin embargo, en este caso CaM es un activador de la enzima la cual presenta características de NTP-

cinasa. La Caseína Cinasa II fosforila CaM en residuos de serina utilizando tanto ATP como GTP. Sin embargo, la cinética de esta fosforilación es más lenta comparada con la de PK-CaM y es totalmente independiente de calcio. Además, se ha reportado que la presencia de EGTA en el ensayo de actividad de la CKII favorece la exposición de los residuos de aminoácidos blanco del sustrato de la enzima (Meggio *et al.*, 1988).

CDPK es una familia de enzimas, en su mayoría monoméricas y que fosforilan residuos de serina de histonas, excepto histona II-S, en presencia de calcio. Sin embargo, los anticuerpos producidos en contra de esta enzima no reaccionan contra la PK-CaM, aunque en los extractos postribosomales de ejes embrionarios si se detectó su presencia. Estos resultados, aunados a la diferencia en el tiempo de reacción y el tipo de histona que fosforilan ambas proteínas, sugieren que PK-CaM no pertenece a la familia de CDPKs

La comparación de las características de PK-CaM con las otras enzimas descritas en plantas, indica que hay similitudes con ellas. Sin embargo, las diferencias que muestra se pueden considerar suficientes para proponer que PK-CaM constituye un diferente tipo de proteína cinasa no descrito aún en plantas. El establecimiento de un método que permita cuantificar la actividad de esta enzima a pesar de la alta velocidad de reacción permitirá conocer sus requerimientos específicos de iones y seguir la cinética de la reacción, lo cual permitiría concluir más acertadamente en relación a esta propuesta.

La germinación es un proceso caracterizado por la activación del metabolismo celular y requiere de una gran coordinación entre los diferentes eventos bioquímicos para llevar a cabo la primera división celular. El incremento en los niveles de calmodulina es uno de los eventos reportados durante la germinación (Roberts y Harmon, 1992). En semillas de maíz, la síntesis *de novo* de CaM es mayor a las tres horas de germinación (Fig. 1, ms 2). Estos resultados apoyan lo reportado para semillas de rábano, donde los niveles de CaM se incrementan notablemente durante las primeras horas de germinación (Coccuci y Negrini, 1989). Coccuci sugiere que la CaM puede ser, durante la germinación temprana, un factor límite de la acción de calcio. Asimismo, considera que en las primeras etapas de la germinación, la CaM puede estar involucrada en la reactivación del metabolismo regulando los niveles de NADP al activar la NADP-cinasa (Coccuci, 1986). En semillas de maíz, la síntesis de CaM varía a lo largo de la germinación (Fig 1, Ms 2). Como se indicó anteriormente, la mayor síntesis de CaM tiene lugar en las 3 primeras horas de la germinación, cuando esta proteína puede actuar regulando el inicio de la actividad metabólica. A las 24 h, sin embargo, se observa que la síntesis de CaM puede ser fuertemente estimulada por auxinas, al mismo tiempo que se inicia la primera división celular (Baiza *et al.*, 1986). De esta manera, la diferencia temporal en la síntesis de CaM podría estar relacionada con dos eventos primordiales para el establecimiento de la plántula: la reactivación del metabolismo celular incluyendo al aparato traduccional y la preparación para la primera división celular, en apoyo a lo reportado por Sasaki y Hidaka (1983) en relación a los requerimientos de CaM para el inicio de la división celular en células animales.

Por otra parte, la fosforilación *in vivo* de CaM ocurre también en forma diferencial durante la germinación, siendo mayor durante las tres primeras horas de la germinación de maíz y prácticamente estando ausente a las 24 horas (Fig. 2 ms 2). Este resultado sugiere que la calidad de la proteína puede determinar diferencias en la función específica de CaM en los diferentes momentos de la germinación. Así, considerando que la fosfoCaM presenta una mayor afinidad por calcio (Williams *et al.*, 1991), es posible que esta modificación posttraduccional permita una respuesta más eficiente al o los estímulos que promueven la germinación y una mayor eficiencia en su interacción con las proteínas blanco durante los eventos tempranos del proceso.

Además, la fosforilación de CaM también puede mediar una interacción mayor con enzimas relacionadas con el metabolismo intermediario cuya actividad se incrementa en las fases tempranas de la germinación como la NAD-cinasa (Roberts y Harmon, 1992) o determinar su participación en el proceso de síntesis de proteínas a través de su interacción con la proteína ribosomal L19 la cual se conoce que presenta un dominio que une CaM (Sonnemann *et al.*, 1992)

La mayor afinidad de CaM fosforilada por calcio, su capacidad para activar enzimas relacionadas con las fases tempranas de la germinación como la NAD-Cinasa y su interacción con las proteínas ribosomales sugieren fuertemente la relevancia fisiológica de fosfoCaM en la germinación. Por otro lado, la relación directa que existe entre la fosforilación *in vivo* de CaM y la actividad de la enzima que la fosforila durante el proceso de germinación apoya asimismo esta sugerencia.

Con base en lo anterior y considerando las limitaciones antes expuestas, se concluye que:

- I. La forma activa de la enzima para fosforilar CaM y autofosforilarse (PK-CaM) corresponde a una estructura oligomérica de alto peso molecular.
- II. Los monómeros que conforman PK-CaM corresponden a los péptidos de 49 y 21 kDa.
- III. La síntesis y la fosforilación de CaM son eventos tempranos en la germinación y ambos están regulados durante este proceso.

Estas conclusiones permiten la elaboración de un modelo que explique la regulación de la actividad de la enzima en relación a su estructura oligomérica y su cambio de actividad a lo largo de la germinación.

Dependiendo de la etapa de germinación, PK-CaM se encuentra presente en la semilla en, al menos dos formas diferentes: una que presenta una gran actividad para fosforilar CaM presente en las etapas tempranas de la germinación y otra cuya actividad para fosforilar CaM es menor y está presente en las etapas tardías. Se propone que la estructura oligomérica de alto peso molecular de la enzima esta relacionada con el grado de fosforilación de la misma, por lo que:

Enzima no fosforilada
Estructura oligomérica estable
Fosforila CaM eficientemente

Enzima parcialmente fosforilada
Estructura oligomérica inestable
Fosforila CaM ineficientemente

1h

24 h

De esta manera, PK-CaM constituye una herramienta para el estudio de la función de CaM en la germinación y del significado fisiológico de la fosforilación de calmodulina.

ANEXO I

- I. Purificación de una proteína cinasa que fosforila a la calmodulina.**
- II. Determinación del residuo del aminoácido fosforilado.**
- III. Purificación de la calmodulina de ejes embrionarios de maíz.**
- IV. Obtención de anticuerpos contra la calmodulina de maíz.**

I. Purificación de una proteína cinasa que fosforila a CaM a partir de ejes embrionarios de maíz.

Los métodos generales para la purificación de cinasas sugieren que este proceso se lleve a cabo en el menor tiempo posible. Considerando esto y las características de la cinasa que se quería purificar, se diseñó un método basado en la existencia de posibles dominios de unión a calcio y reconocimiento de CaM en la proteína a purificar. Por lo tanto, se utilizó una columna de interacción hidrofóbica donde se promueve la unión de las proteínas que quelan calcio y se eluyen selectivamente con EGTA (fenil-sefariosa) y una columna de afinidad para unir a las proteínas que poseen un dominio que reconoce a CaM, interacción calcio-dependiente (CaM-Agarosa). El método global de purificación esta basado en los métodos de Gopala-Krishna (1982) y de Sharma *et al* (1992) y consiste en lo siguiente:

A: Congelar el tejido a -70 °C

B: Preparación del extracto posribosomal (Solución amortiguadora de extracción, fracción I)

C: Añadir 0.1M de CaCl₂ al sobrenadante (extracto posribosomal) hasta ajustar la concentración de calcio a 1mM. Agitar a 4°C durante 2h

D: Equilibrar la columna de Fenil-Sefariosa con solución amortiguadora A

E: Pasar el extracto posribosomal por la columna con un flujo de 20ml/h, a temperatura ambiente.

F: Lavar la columna con 10 volúmenes de la solución amortiguadora A.

G: Eluir las proteínas retenidas que unen calcio con la solución amortiguadora B (fracción II).

H: Añadir 0.1M de CaCl₂ al eluido hasta ajustar a la concentración de calcio a 1mM. Agitar a 4°C durante 2h.

I: Equilibrar la columna de CaM agarosa con la solución amortiguadora A.

J: Pasar el extracto con un flujo de 20 ml/h a temperatura ambiente.

K. Lavar la columna con 5 volúmenes de la solución amortiguadora A.

L. Eluir las proteínas con la solución amortiguadora B (fracción III).

M. Concentrar en un filtro Amicon 10 ó 30.

N. Colocar 200 µl de muestra con mínimo 100 µg de proteína en la columna TSKG 4000, previamente equilibrada en la solución amortiguadora A, de un aparato de cromatografía de alta presión.

O. Colectar los tubos que presentan proteína con el objeto de determinar la actividad.

Los detalles del proceso se presentan a continuación:

A. Se utilizaron ejes embrionarios secos, 1h, 3h, 12h y 24 h de imbibición.

B. El extracto posribosomal se preparó según Scharf-Novel (1982)

Los ejes se pulverizaron con N₂ y el polvo se colocó en un tubo de centrifuga, agregándose la solución amortiguadora de extracción en una relación 10 ml/3.5 g.

Se centrifugó a 5,000 rpm durante 2 min. El sobrenadante se centrifugó a 15,000 rpm durante 10 min y se filtró al vacío a través de Miracloth. El sobrenadante se colocó en un colchón de sacarosa (3ml sobrenadante/5ml de colchón) y se centrifugó a 250,000g (53,000rpm Rotor 75Ti) durante 3 h 45 min.

C. La cantidad de proteína de los diferentes extractos se midió por medio del método de Bradford, utilizando albúmina bovina como patrón (Bradford, 1976).

D. Columna de Fenil- Sefarosa (Sigma Chemicals).- Se colocó 1 ml de resina en la columna por cada 20 mg de proteína del extracto. La resina se reactivó lavando con 10 volúmenes de agua, dos volúmenes de urea 8 M y enjuagar con 10 volúmenes de agua (Goppala-Krishna, 1982) E.

Columna de CaM- agarosa (Sigma Chemicals). Se colocó 1 ml de resina por cada 3 mg de proteína. La resina se reactivó lavando con 3-5 volúmenes de Tris 10 mM, pH 7.5, Urea 6 M, NaCl 1 M, CaCl₂ y posteriormente con la solución amortiguadora A. (Boletín 1112, BIORAD).

SOLUCIONES AMORTIGUADORAS

Solución amortiguadora de Extracción

TRIS-HCl 20 mM pH 7.0

MgAc 5 mM

Sacarosa 0.25 M

Solución Amortiguadora A

TRIS-HCl 20 mM pH 7.0

MgAc 1 mM

CaCl₂ 0.1 mM

Solución Amortiguadora B

TRIS-HCl 20 mM pH 7.0

MgAc 1 mM

EGTA 0.1 mM

Condiciones de la cromatografía líquida de alta presión.

A. Equilibrar la columna de filtración TSKG 4000 con la solución amortiguadora A.

B: Aplicar 100 µg de la proteína obtenida a partir de la CaM-agarosa

C: Flujo de Corrida: 0.5 ml/min, coleccionar fracciones de 0.5 ml.

D: Determinar actividad en cada uno de los picos que presentan proteína.

E. Curva de calibración (pesos moleculares contra tiempo de retención) en la columna equilibrada con la solución amortiguadora A (Figura 1)

Estándares de pesos moleculares utilizados: β-galactosidasa (E. coli), Mr 465 000; Inmunoglobulina (IgG, borrego), Mr 150 000; Fragmento Fab de inmunoglobulina G (IgG borrego) Mr 50 000; Mioglobulina de músculo esquelético (caballo) Mr 17 000 (Boehringer Mannheim Biochemica)

IMPORTANTE. Para obtener la estructura nativa de la enzima no se debe congelar ninguno de los extractos y se debe usar resina nueva (Figura 2 y 3). La actividad de la cinasa, específicamente la autofosforilación y la fosforilación de CaM, se va perdiendo durante el proceso de congelación por lo que es importante no congelar antes de medir actividad.

ENSAYO DE LA ACTIVIDAD DE PROTEINA CINASA

Modificación del método de Blowers y Trewavas (1989)

Fosforilación de Calmodulina (CaM de espinaca, Sigma Chemicals) e Histona (HIII-S, Sigma Chemicals):

Mezcla de reacción: CaM 10 μg , (γ - ^{32}P) ATP/GTP 100 nM (1000-3000 cpm/pmol) (Actividad específica: 6000 Ci/mmol, Dupont, New England Nuclear), MgAc 5 mM, HEPES 25 mM pH 7.4 y con o sin EGTA 1 mM y aproximadamente 20 ng de enzima en un volumen final de 50 μl .

- A) Iniciar la reacción añadiendo el ATP
- B) Llevar a cabo la reacción a 0°C durante 15 a 30 s.
- C) Parar con 1 ml de acetona.
- D) Dejar las muestras durante 2 h a -20°C.
- E) Centrifugar las muestras y resuspender el precipitado en 20 μl de solución amortiguadora de carga para electroforesis desnaturalizante (SDS).
- F) Resolver los productos de reacción en una electroforesis de poliacrilamida al 15% (Laemmli, 1970)
- G) Detectar los sustratos por autoradiografía. Los geles se secaron y, posteriormente se colocaron en contacto con una película Kodak X-Omat durante 2 a 4 días.

Autofosforilación

Mezcla de reacción: Enzima 2 μg , (γ - ^{32}P) ATP/GTP (1000-3000 cpm/pmol) 20 nm, MgAc 5 mM, HEPES 25 mM pH 7.4 con o sin EGTA 1 mM.

Los siguientes pasos de la reacción son equivalentes a los descritos para CaM

La figura 4 muestra la actividad de la enzima utilizando calmodulina e histona como sustrato. El panel A corresponde a la enzima obtenida en condiciones control y el B corresponde a la enzima congelada. La actividad de la proteína cinasa para fosforilar calmodulina disminuye mientras que la capacidad de fosforilar histona aumenta con el proceso de congelación.

Para establecer las concentraciones fijas de los siguientes complejos y especies libres se utilizó el programa desarrollado por el Dr. Rogelio Rodríguez-Sotres (Rodríguez-Sotres, 1991)

MgATP

Ca libre

Las constantes de estabilidad empleadas, valores dados a pH 7.0, fueron las siguientes:

Complejo ATPH	8.9×10^6
complejo ATPHMg	4.45×10^9
complejo ATPMg	7.30×10^4
Complejo ATPHCa	3.59×10^9
Complejo ATPCa	3.5×10^4
complejo EGTaH	2.49×10^{10}
complejo EGTAMg	1.995×10^6
complejo EGTACa	1.259×10^{11}
complejo CaMCa	3.2×10^5

Para determinar la constante de estabilidad de CaM, dado que tiene cuatro sitios de unión a calcio con diferentes constantes de disociación (Klee, 1980), se llevó a cabo un promedio de los cuatro valores.

Los demás valores se determinaron a partir de los valores reportados en: Stability constants of metal-ion complexes. Part B. Organic Ligands. IUPAC Chemical Data Series No. 22 Pergamon press.

Klee C.B. Interaction of CaM with Ca^{++} and target proteins En: Calmodulin, Capitulo 3. P Cohen and CB Klee eds. Molecular Aspects of Cellular Regulation. Vol.5

Log P_M

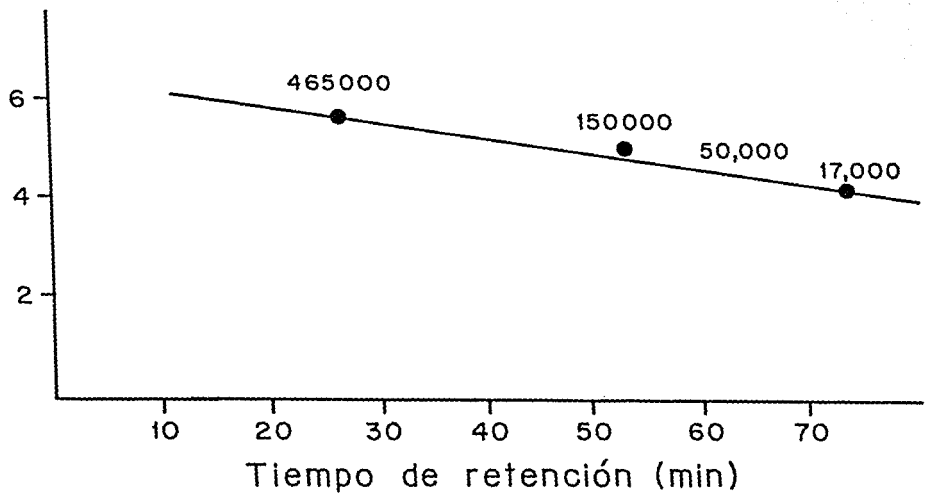


Figura 1. Curva de calibración para la columna TSKG 4000 del HPLC. Cien microgramos de proteínas estándares de peso molecular conocido se colocaron en la columna TSKG 4000 previamente equilibrada con la solución amortiguadora A. Las proteínas son las siguientes: β -galactosidasa (*E. coli*) Mr 465 000; Inmunoglobulina (IgG de borrego) Mr 150 000; Fragmento Fab de IgG (IgG de borrego) Mr 50 000; Mioglobulina de músculo esquelético (de caballo) Mr 17 000

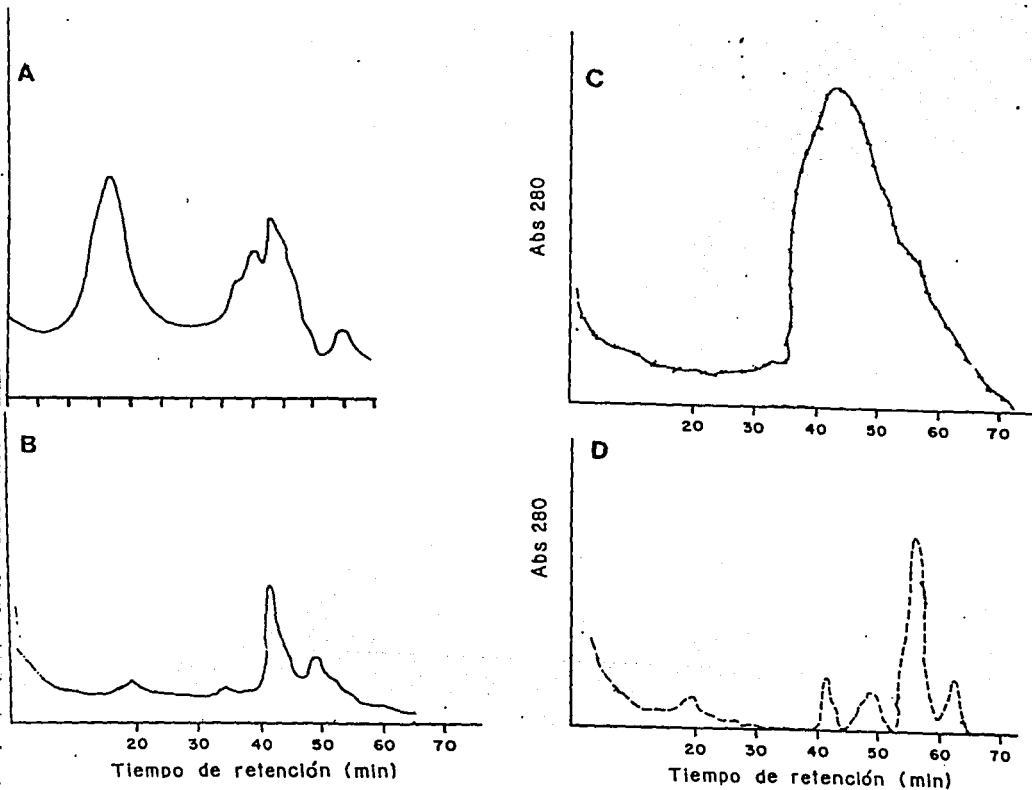


Figura 2. Efecto de las condiciones de purificación de la proteína cinasa que fosforila a calmodulina sobre el perfil de elución de la columna TSKG 4000. La enzima se purificó a partir de ejes embrionarios de 3 horas de germinación. Cien microgramos de la enzima se colocaron en la columna TSKG 4000 previamente equilibrada con la solución amortiguadora A.

(A) Control

(B) Proteína congelada durante 7 días después de su congelación.

(C) Enzima desnaturalizada con urea 8 M. La enzima purificada se precipitó con acetona y se resuspendió en una solución de urea 8 M y DTT 1 mM.

(D) Proceso de purificación sin magnesio. La proteína se purificó utilizando las soluciones amortiguadoras antes descritas pero sin $MgCl_2$.

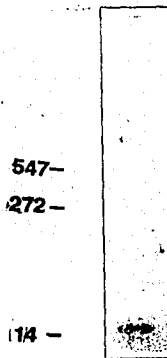


Figura 3. Gel nativo de la proteína desnaturalizada con urea 8M.

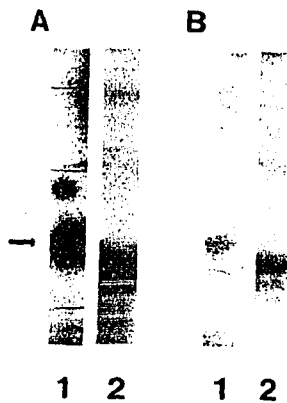


Figura 4 Efecto de la congelación de la proteína sobre la actividad de la proteína cinasa. La determinación de la actividad de proteína cinasa de las diferentes fracciones se llevó a cabo según lo descrito.

(A) Control. Actividad de una fracción purificada a partir de ejes embrionarios de 3 horas de germinación. CaM (1) Histona (2).

(B) Actividad de una fracción equivalente a A, congelada durante 7 días. CaM (1) Histona (2).

Los otros tratamientos descritos presentaron el mismo comportamiento. La fecha señala la posición de CaM en presencia de EGTA.

II Determinación del residuo fosforilado

El método de hidrólisis de la proteína es el descrito por Bylund and Huang (1976) y la electroforesis en una dimensión de los productos formados esta basada en el método descrito por Hunter and Sefton, 1980

- A) Poner 20-40 μ g de la fracción de enzima que eluye de CaM-Agarosa a autofosforilar
- B) Resuspender el precipitado en 100 μ l de la solución amortiguadora A.
- C) Pasar por una columna de CaM-Agarosa y lavar con la solución amortiguadora A hasta que no se detecte el 32 P .
- D) Eluir con la solución amortiguadora B
- E) Precipitar la proteína con acetona
- F) Resuspender en HCl 6N (200 μ l)
- H) Hidrolizar la proteína durante 2 horas a 110°C en una ampolleta en atmósfera sin oxígeno y sellada .
- I) Evaporar a sequedad.
- J) Resuspender la muestra en 20 μ l de la solución de fosfoaminoácidos.
- K) Colocar la muestra en la placa de sílica gel previamente saturada con ácido acético 5% y EDTA 5mM
- L) Correr la electroforesis en forma horizontal durante 1.5h a 500V
- M) Secar la placa con calor
- N) Asperjar la placa con una solución de ninhidrina al 5% disuelta en acetona
- O) Localizar los aminoácidos con lápiz
- Q) Autoradiografía (Exponer la placa de sílica gel de 7 a 9 días)

Solución de Fosfoaminoácidos

Fosfoserina (Sigma Chemicals) 20mg/ml

Fosfotirosina (Sigma Chemicals) 20mg/ml

Fosfotreonina (Sigma Chemicals) 20mg/ml disueltos en agua

III. Purificación de calmodulina.

El método de purificación de calmodulina a partir de ejes embrionarios de maíz es una modificación de los métodos descritos de Heung Oh y Roberts (1990) y de Gopala-Krishna (1982).

A. Congelar el tejido a -70°

B. Pulverizar los ejes con N_2 .

C. Añadir la solución amortiguadora I, relación p/v 1:3

D. Centrifugar a 27,000 xg (15,000 rpm rotor JA20, Beckman) a $4^{\circ}C$ durante 20 min

E. Agregar etanol al sobrenadante hasta una concentración final del 50 %

F. Agitar durante 20 min a $4^{\circ}C$.

G. Centrifugar a 27,000 xg a $4^{\circ}C$ durante 20 min

H. Agregar etanol al sobrenadante para una solución final del 80 %

I. Agitar durante 40 min a $4^{\circ}C$

J. Centrifugar durante 30 min a $4^{\circ}C$.

L. Liofilizar el precipitado.

M. Resuspender el liofilizado en el menor volumen posible de la solución amortiguadora II.

N. Centrifugar a 15,000 rpm durante 5 min. para remover lo que no se disolvió.

O. Añadir una solución de $CaCl_2$ 0.1 M hasta ajustar el sobrenadante a una concentración final de $CaCl_2$ 5 mM.

P. Aplicar en una columna de fenil sefarosa previamente equilibrada con la solución amortiguadora III.

Q. Lavar la columna con 10 volúmenes de la solución amortiguadora III.

R. Eluir la proteína con dos volúmenes de la solución amortiguadora IV.

T. Concentrar la proteína en un filtro Amicon 10.

Para comprobar la pureza de la preparación se llevó a cabo una electroforesis SDS-PAGE al 12 % (Figura 5) y una cromatografía de exclusión molecular utilizando la columna Superdex 75 instalada en un aparato de FPLC (Pharmacia)

equilibrada con la solución amortiguadora V. La velocidad de flujo fué de 0.5 ml/min y se colectaron fracciones de 0.5 ml (Figura 6). La Calmodulina de maíz presenta un cambio en lo movilidad electroforética en presencia de $CaCl_2$ (carril 2) con respecto a la proteína en ausencia de este ión (EGTA 1mM, carril 1) como ha sido descrito para todas las proteínas que presentan un dominio que une calcio. La Figura 6 muestra que la preparación de proteína obtenida a partir de la precipitación diferencial con etanol y la columna de fenil-sefarosa tiene un alto grado de pureza ya que el perfil proteico presenta practicamente un solo pico.

Solución Amortiguadora I

TRIS-HCl 75 mM pH 7.0

EDTA 10 mM

Solución Amortiguadora II

TRIS HCl 20 mM pH 7.0

Solución Amortiguadora III
TRIS-HCl 50 mM pH 7.0
CaCl₂ 1 mM

Solución Amortiguadora IV
TRIS-HCl 50 mM pH 7.0
EGTA 1 mM

Solución Amortiguadora V
KHPO₄ 100 mM pH 7.0

Notas: Evitar poner NaOH para ajustar el pH de las soluciones amortiguadoras porque los iones monovalentes alteran la afinidad de la calmodulina por el calcio (Crouch y Klee, 1980).

La precipitación con etanol debe ser estrictamente a 4 °C porque a temperaturas menores empiezan a precipitar los ácidos nucleicos.

La cromatografía de afinidad deber ser a temperatura ambiente.

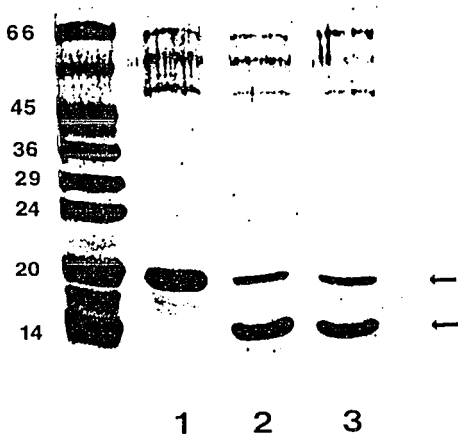


Figura 5. Calmodulina de ejes embrionarios de maíz. La calmodulina de ejes embrionarios de 3 horas de germinación se purificó por medio de precipitaciones diferenciales con etanol y de una cromatografía de fenil-sefariosa. La calmodulina se cluyó con EGTA 1 mM. Electroforesis: SDS-PAGE al 12% (1) EGTA 1 mM (2) CaCl₂ 1 mM (3) Control.

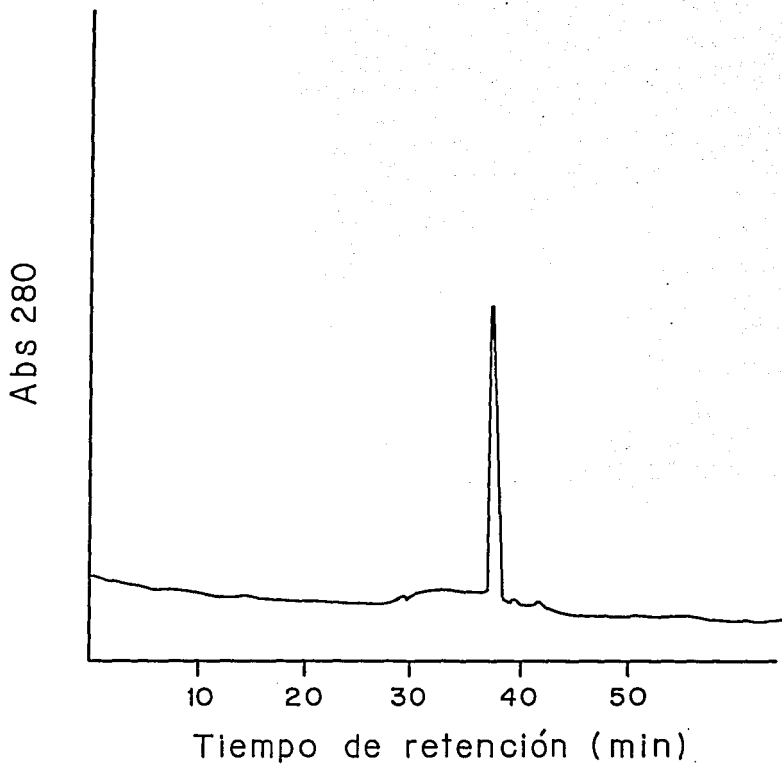


Figura 6 . Cromatografía de exclusión molecular (Superdex 75, FPLC). Doscientos microgramos de calmodulina se colocaron en una columna Superdex 75 equilibrada con la solución amortiguadora V.

IV. Obtención de anticuerpos contra calmodulina purificada de ejes embrionarios de 24 horas de germinación.

El método para la obtención de anticuerpos de CaM esta basado en el descrito por Eldik y Watterson (1981).

- A. Oxidación de calmodulina con ácido per fórmico.
- B. Liofilizar la calmodulina oxidada
- C. Inyectar 200µg de CaM -oxidada en adyuvante de Freund completo vía intramuscular a un conejo.
- D. Inyectar cada dos semanas durante dos meses y medio la misma cantidad de CaM

Oxidación de CaM (Hirs, 1967)

Preparar el reactivo de ácido per fórmico añadiendo 0.5 ml de 30% (v/v) de peróxido de hidrógeno a 9.5ml de ácido fórmico. Incubar la solución cubierta por 2h a temperatura ambiente y congelar durante 30min.

Disolver la calmodulina (4mg) en 200 µl de ácido fórmico e incubar en hielo durante 30 min. Añadir 600µl del reactivo de ácido per fórmico e incubar durante 150min en hielo. Resuspender la mezcla en agua y evaporar en rotavapor. Redisolver el residuo en agua y liofilizar.

WESTERN Transferencia semi-seca (semy-dry electroblot) de proteínas a membranas de immobilon-P y revelado con IS-peroxidasa.

(Towbin, H., Staehlein, T., Gordon J., 1979)

- A. Electroforesis SDS-PAGE al 12% de la calmodulina.
- B. Lavar el gel de acrilamida en la solución de transferencia
- C. Recortar una membrana de immobilon-P del mismo tamaño del gel y lavar levemente en metanol, lavar con agua y pasar a la solución amortiguadora de transferencia 2.
- D. Preparar los papeles filtros según el siguiente esquema

(-)

3 en la solución 3

gel en la solución 2

Immobilon-p en solución 2.

3 en solución 2

3 en solución 1

(+)

Mojar perfectamente con agua las placas de grafito.

E. Aplicar un voltaje de 1 mA/cm² gel durante 1.5h

F. Teñir el papel con solución de Rojo de Ponceau de 1 a 3 min. Decolorar con agua y marcar los diferentes pesos moleculares con lápiz. Se deja secar y se almacena o se procede a la saturación.

G. Fijar las proteínas a la membrana con una solución de glutaraldehido al 0.2% en TBS durante 45 min a temperatura ambiente.

H. Saturar la membrana con la solución de saturación durante 1h a temperatura ambiente y con agitación.

J. Lavar dos veces con TBS (15 min)

K. Incubar la membrana con el anticuerpo (dilución 1:100 para el anticuerpo contra CaM) en solución de saturación, en bolsa sellada, durante 4°C toda la noche y con agitación.

L. Lavar con TBS (15 min).

M. Lavar con TBS NaCl 1M

N. Lavar con TBS normal

M. Incubar en bolsa sellada y con agitación durante 2h a temperatura ambiente con inmunoglobulinas conjugadas con peroxidasa en la solución de saturación (Dilución 1:1000 a 1:3000).

O. Lavar dos veces con PBS

P. Revelar con el sustrato insoluble de la peroxidasa.

Q. Parar con agua la reacción cuando se formen precipitados azules sobre las bandas de proteínas reconocidas por el anticuerpo.

R. Guardar a oscuras en frío

Soluciones Amortiguadoras:

Solución anódica 1

TRIS 0.3M pH 10.4

20% v/v MeOH

Solución anódica 2

TRIS 25mM pH 10.4

20% MeOH

Solución catódica 3

10mM 6-amino-n-hexano caproico

20% MeOH pH 7.2

TBS

TRIS 50mM pH 7.4

NaCl 0.5M

Solución de saturación:

Tween 0.05% v/v

Leche descremada 5% w/v

TBS

Sustrato insoluble de peroxidasa

22mg de 4-cloro-1-naftol (Merck 11952)

11ml de metanol

33ml de TBS

44µl de agua oxigenada al 30%

Solubilizar el 4-cloro-1-naftol previamente en el metanol.

Determinación del título del anticuerpo contra calmodulina obtenido por la Dra Ma. Elena Mellado.

Se llevó a cabo una electroforesis al 12% de acrilamida de 10 mg de CaM de espinaca (Sigma). La transferencia de la proteína a la membrana y el revelado se llevaron a cabo según el protocolo anterior utilizando diferentes diluciones (1:150, 1:200, 1:300 y 1:500) del suero producido en conejo contra CaM de espinaca. Se considero que la dilución 1:500 era adecuada.

Determinación de la especificidad del anticuerpo contra CaM.

Se llevó a cabo una electroforesis al 12% de acrilamida de 120µg de proteínas totales extraídas a partir de ejes embrionarios de diferentes horas de germinación. La transferencia y el revelado se llevaron a cabo según el protocolo anterior. Se utilizó una dilución de 1:500 de suero antiCaM. La Figura 7 muestra que este anticuerpo reconoce al menos cuatro bandas de diferente peso molecular, que no corresponden a la calmodulina y con una mayor eficiencia que a CaM. Es posible que se trate de proteínas que cuentan con un dominio semejante a CaM.

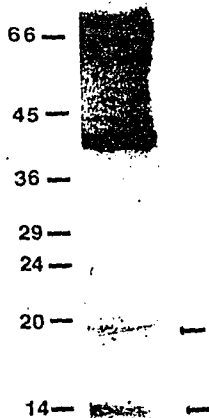


Figura 7. Determinación de la especificidad del anticuerpo contra calmodulina.

Western blot de una electroforesis al 12% de acrilamida de 120µg de proteínas totales extraídas de ejes embrionarios de 3 horas de germinación. Las flechas señalan a la calmodulina.

REFERENCIAS

- Alexandre J, Lassales JP, Kado RT (1990) Opening of Ca²⁺ channels in isolated red beet root vacuole membrane by inositol-1,4,5-triphosphate. *Nature* 343: 567-570.
- Barbier-Brygoo H, Ephritikhine G, Klämbt D, Glustian M, Guern J (1989) Functional evidence for an auxin receptor at the plasmalemma of tobacco mesophyll protoplasts. *PNAS USA* 86: 891-895.
- Berridge MJ (1993) Inositol triphosphate and calcium signalling. *Nature* 361: 315-325.
- Blowers DP, Trewavas AJ (1989) Rapid cycling of autophosphorylation of a Ca²⁺-calmodulin regulated plasma membrane located protein kinase from pea. *Plant Physiol* 90: 1279-1285.
- Busch DS, Jones RL (1990) Measuring intracellular Ca⁺⁺ levels in plant cells using the fluorescent probes, Indo 1 and Fura 2. *Plant physiol.* 93, 841-845.
- Bush DS (1993) Regulation of cytosolic calcium in plants. *Plant Physiol* 103: 7-13.
- Bylund DB, Huang TS (1976) Decomposition of pihosphoserine and phosphothreonine during acid hydrolysis. *Annal Biochem.* 73, 477.
- Coccuci M, Negrini N (1988) Changes in the levels of calmodulin and of calmodulin inhibitor in the early phases of radish (*Raphanus sativus* L) seed germination. Effects of ABA and fusicoccin. *Plant Physiol* 88: 910-914.
- Crouch TH, Klee CB (1980) Positive cooperative binding of calcium to bovine brain calmodulin. *Biochemistry* 19, 3692-3698.
- Dobrowolska G, Meggio F, Szczegielniak J, Muszynska G, Pinna LA (1992) Purification and characterization of maize seedling casein kinase IIB, a monomeric enzyme immunologically related to a α subunit of animal casein kinase-2. *Eur. J. Biochem.* 204: 299-303.
- Dos Remedios CG (1981) Lanthanide ion probes of calcium-binding sites on cellular membranes. *Cell Calcium* 2: 29-51.
- Drobak BK, Ferguson IB (1985) Release of Ca²⁺ hypocotyl microsomes by inositol 1,4,5 triphosphate. *Biochem Biophys Res Commun* 130: 1241-1246
- Drobak BK, Ferguson IB, Dawson AP, Irvine RF (1988) Inositol containing lipids in suspension cultured plant cells. *Plant Physiol* 87: 217-222.
- Drobak BK, Walkins PAC, Chattaway JA, Roberts K, Dawson AP (1991). Metabolism of Inositol (1,4,5) triphosphate by a soluble enzyme fraction from pea roots. *Plant Physiol* 95: 412-419.
- Drobak, BK (1993) Plant Phosphoinositides and intracellular signaling. *Plant Physiol.* 102: 705-709.
- Eldik LJ, Watterson DM (1981) Reproducible production of antisera vertebrate calmodulin and determination of the immunoreactive site. *J.of Biol. Chem.* 256: 4205-4210.
- Erdmann H, Bücher M, Wagner KG (1985) The acidic peptide-specific protein kinases from suspension-cultured tobacco cells: a comparison of the enzymes from whole cells isolated nuclei. *Plant Sci* 41: 81-89.
- Ettlinger C, Lehle L (1988) Auxin induces hydrolysis in phosphatidylinositol metabolites. *Nature* 331, 176-178.
- Evans DE, Briars SA, Williams LE (1991) Active calcium transport by cell membranes. *J. Exp Bot* 42: 285-303.

- Fairley-Grenot KA, Assmann SM (1991)** Evidence for G-protein regulation of inward K^+ channel current guard cells of fava bean. *Plant Cell* 3: 1037-1044.
- Fairley-Grenot KA, Assmann SM (1992)** Permeation of Ca^{2+} through K^+ -selective channels in the plasma membrane of *Vicia faba* guard cells. *J Membr Biol* 128: 103-113.
- Ferguson IB (1990)** Calcium nutrition and cellular response. En: *Calcium in Plant Growth and Cellular Development*. R.T. Leonard and P.K. Hepler Eds., The American Society of Plant Physiologists Symposium Series, Vol. 4, 1-8.
- Gagnon C, Kelly S, Manganiello V, Vaughan M, Ody A, Strittmatter W, Harmon AC, Putnam-Evans C, Cormier MJ (1987)** A calcium-dependent but calmodulin-independent protein kinase from soybean. *Plant Physiol* 83:830-837.
- Gilman AG (1987)** G Proteins: transducers of receptor-generated signals. *Annu Rev Biochem* 56: 615-649.
- Gopala-Krishna R, Anderson WB (1982)** Ca^{2+} -induced hydrophobic site on calmodulin: application for purification of calmodulin by phenyl-sepharose affinity chromatography. *Biochem and Biophys Res Comm*: 830-836.
- Grasser KD, Maier UG, Feix G (1989)** A nuclear casein kinase type II kinase from maize endosperm phosphorylating HNG proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 162: 456-463.
- Graves CB, Gale RD, Laurino JP, McDonald JM (1986)** The insulin receptor and calmodulin. Calmodulin enhances insulin mediated receptor kinase activity and insulin stimulates phosphorylation of calmodulin. *J Biol Chem* 261: 10429-10438.
- Griess EA, Igloi GL, Feix G (1994)** Isolation and sequence comparison of a maize calmodulin cDNA. *Plant Physiol* 104: 1467-1468.
- Hanks SK, Quinn AM (1991)** Protein kinase catalytic domain sequence data base structure and classification of family members. En: *Protein phosphorylation part A*. Hunter and Sefton, eds. *Methods in Enzymology*, vol 200. Academic Press. pp 38-61.
- Harper JF, Sussman MR, Schaller EG, Putnam-Evans C, Charbonneau H, Harmon AC (1991)** A calcium-dependent protein kinase with a regulatory domain similar to calmodulin. *Science* 252: 951-954.
- Hepler PK, Wayne RD (1985).** Calcium and plant development. *Ann. Rev. Plant Physiol* 36: 397-439.
- Hepler PK, Zhang D, Callahan DA (1990)** Calcium and the regulation of mitosis. En: *Calcium in Plant Growth and Cellular Development*. R.T. Leonard and P.K. Hepler Eds. The American Society of Plant Physiologists Symposium Series, Vol. 4, 1-8.
- Hepler PK, Wayne RO (1985)** Calcium and plant development. *Ann. Rev. Plant Physiol* 36: 397-439.
- Hernández-Nistal J, Rodriguez D, Nicolas G, Aldasoro JJ (1989)** Abscisic acid and temperature modify the levels of calmodulin in embryonic axes of *Cicer arietinum*. *Physiol Plant* 75: 255-260.
- Hirs CHW (1967)** Performic acid oxidation In: *Methods in enzymology* 11 (Enzyme structure), pp:197-199
- Hsieh W, Pierce WS, Sze H (1991)** Calcium-pumping ATPases in vesicles from carrot cells. Stimulation by calmodulin or phosphatidyl-serine, and formatipon of a 120-kilodalton phosphoenzyme. *Plant Physiol* 97:1535-1544.

- Hunter T, Sefton BM** (1980) Transforming gene product of Rous sarcoma virus phosphorylates tyrosine. *Proc Natl Acad Sci USA* 77, 13
- Hunter T** (1991) Protein kinase classification. En: Protein phosphorylation, Part A. Hunter and Sefton, eds. *Methods in Enzymology*, vol 200. Academic Press. pp 3-37.
- Jenna PK, Reddy ASN, Pooovaiiah BW** (1989) Molecular cloning and sequencing of a cDNA for plant calmodulin. Signal-induced changes in the expression of calmodulin. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:3644-3648.
- Kanekatsu M, Ohtsuki K** (1993) Biochemical characterization of Casein Kinases II (CK-II) from cultured cells of the liverwort, *Marchantia polymorpha*. *Plant Cell Physiol* 34: 627-631.
- Kearns EV, Assmann SM** (1993) The guard cell-environment connection. *Plant Physiol.* 102: 711-715.
- Knight MR, Campbell AK, Smith SM, Trewavas AJ** (1991). Transgenic plant aequorin reports the effects of touch and cold shock and elicitors in cytoplasmic calcium. *Nature* 352: 524-529
- Krebs EJ, Beavo J** (1979) Phosphorylation-dephosphorylation of enzymes. *Annu Rev Biochem* 48: 923-959.
- Kuenzel EA, Krebs EJ** (1985) A synthetic peptide substrate specific for casein kinase II. *PNAS USA* 82, 737-741.
- Lenormand C, Martini F, Balangé AP** (1993) Germination of sunflower seeds: involvement of calcium. *Plant Physiol Biochem* 31: 447-455.
- Lew RR, Brislin DP, Wyse RE** (1986) Ca⁺⁺ uptake by endoplasmic reticulum from *Zucchini* hypocotyls. The use of chlorotetracycline as a probe for Ca⁺⁺ uptake. *Plant Physiol* 82, 47-53.
- Li H, Roux SJ** (1992). Purification and characterization of a casein kinase 2-type protein kinase from pea nuclei. *Plant Physiol* 99: 686-692.
- Li W, Assmann SM** (1993) Characterization of a G-protein regulated outward K⁺ currents in mesophyll cells of *Vicia faba*. *PNAS* 90; 262-266.
- Ma H, Yanofsky MF, Meyerowitz EM** (1990) Molecular cloning and characterization of GPA1, a G-protein α -subunit gene from *Arabidopsis thaliana*. *PNAS USA* 87; 3821-3825.
- Manalan AS Klee CB** (1987) Affinity selection of chemically modified proteins. Role of Lysil residues binding of calmodulin to calcineurin. *Biochemistry* 26, 1382-1390.
- Melin PM, Sommarin M, Sandelius AS, Jergil B** (1987) Identification of a Ca²⁺-stimulated polyphosphoinositide phospholipase C in isolated plant plasma membranes. *FEBS Lett* 223: 87-91.
- Moisyadi S, Dharmasiri S, Harrington MH, Lukas TJ** (1994) Characterization of a low molecular mass autophosphorylating protein in cultured sugarcane cells and its identification as a nucleoside diphosphate kinase. *Plant Physiol* 104: 1401-1409.
- Oh SH, Roberts DM** (1990) Analysis of the state of posttranscriptional calmodulin methylation in developing pea plants. *Plant Physiol* 93: 880-887.
- Pearson RB, Kemp BE** (1991) Protein kinase phosphorylation site sequences and consensus specificity motifs tabulation. En: Protein phosphorylation part A. Hunter and Sefton, eds. *Methods in Enzymology*, vol 200. Academic Press. pp 62-84.

- Pfaffmann H, Hartmann E, Brightman AO, Morré DJ (1987)** Phosphatidylinositol specific phospholipase C of plant stems. Membrane associated activity concentrated in plasma membranes. *Plant Physiol* 85: 1151-1155.
- Pérez-Méndez A, Aguilar R, Briones E, Sánchez de Jiménez E (1994)** Characterization of ribosomal protein phosphorylation in maize axes during germination. *Plant Sci* 94: 71-79.
- J.R.E.(1987)** Regulation of calpactin I phospholipid binding by calpactin I light-chain binding and phosphorylation by p60 ^{v-src}. *Biochem. J.* 247: 321.
- Putnam-Evans CL, Harmon AC, Cormier MJ (1990)** Purification and characterization of a novel calcium-dependent protein kinase from soybean. *Biochemistry* 29:2488-2495.
- Roberts DM, Harmon AC (1992)** Calcium-modulated proteins: Targets of intracellular signals in higher plants. *Ann Rev Plant Physiol Mol Biol* 43: 375-414.
- Roberts DM (1993)** Protein kinases with calmodulin-like domains: novel targets of calcium signals in plants. *Curr Op Cell Biol* 5: 242-246.
- Rodríguez-Sotres Rogelio (1990)** Tesis doctoral
- Russ U, Grolig F, Wagner G (1991)** Changes of cytoplasmic free Ca²⁺ in the green alga *Mougeotia scalaris* as monitored with indo-1, and their effect on the velocity of chloroplast movements. *PLanta* 184: 105-112.
- Sacks DB, Davis HW, Williams JP, Sheehan EL, Garcia JGN, McDonald JM (1992)** Phosphorylation by casein kinase II alters the biological activity of calmodulin. *Biochem J.* 283, 21-24.
- Schaller EG, Sussmann MR (1988)** Phosphorylation of the plasma membrane H⁺-ATPase of oat roots by a calcium-stimulated protein kinases. *Planta* 173: 509-518.
- Scharf KD, Nover L (1982)** Heat-shock induced alterations of ribosomal protein phosphorylation in plant cell cultures. *Cell* 30, 427-437.
- Schumaker KS, Sze H (1987)** Inositol 1,4,5-triphosphate releases Ca²⁺ from vacuolar vesicles from oat roots. *J Biol Chem* 262: 3944-3946.
- Sharma R, Taylor W, Wang JH (1992)** Use of CaM-affinity chromatography for purification of specific CaM-dependant enzymes. *En: Methods of Enzymology* 102: 210-219.
- Tate BF, Schaller GE, Sussman MR, Crain RC (1989)** Characterization of a polyphosphoinositide phospholipase C from the plasma membrane of *Avena sativa*. *Plant Physiol* 91: 1275-1279.
- Teo TS Wang JH (1973)** Purification and properties of a cyclic adenosine 3': 5'-monophosphate phosphodiesterase from rat cerebral cortex by the modulator protein and Ca²⁺. *J.Biol. Chem.* 248, 588-595.
- Thompson GA (1993)** GTP-binding protein function in environmentally stressed *Dunaliella salina* cells. *En: Plant Protein Phosphorylation, Plant Protein Kinases and Phosphatases, Plant G Proteins.* pp 80-81.
- Torruella M, Casano LM, Vallejos RM (1986)** Evidence of the activity of tyrosine kinase(s) and of presence of phosphotyrosine proteins in pea plantlets. *J. Biol Chem* 251: 6651-6653.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979)** Electrophoretic transfer of proteins from acrylamide gels to nitrocellulose sheets procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 76, 4350-4354.

- Vanaman TC, Sharief F, Watterson DM (1977)** Structural homology between brain modulator protein and muscle TnCs. In: Calcium Binding Proteins and Calcium Function. (R. Wasserman, ed.), pp63-72. Am. Elsevier, New York.
- Veluthambi K, Poovaiah BW (1984)** Calcium promoted protein phosphorylation in plants. *Science* 223: 167-169.
- Wayne R, Hepler PK (1984)** The role of calcium ions in phytochrome-mediated germination of spores of *Onoclea sensibilis* L. *Planta* 160: 12-20.
- Weaver CD, Roberts DM (1992)** Determination of the site of phosphorylation of nodulin 26 by the calcium-dependent protein kinase from soybean nodules. *Biochemistry* 31: 8954-8959.
- Weisenberg RC (1972)** Microtubule formation *in vitro* in solutions containing low calcium concentrations. *Science (Washington, D.C.)* 177: 1104-1105.
- Williams J, Jo H, McDonald JM (1991)** Phosphotyrosyl calmodulin (CaM-P) has increased affinity for cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) FASEBJ 5, A448
- Wick SM (1990)** Localization of calcium-binding proteins in dividing plant cells. En: Calcium in Plant Growth and Development. R.T, Leonard and P.K. Hepler Eds. The American Society of Plant Physiologists Symposium Series Vol. 4; 1-8.