

03088 /

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

**DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA MOLECULAR
DE PLANTAS**

**Expresión de Calmodulina durante la simbiosis
*Phaseolus vulgaris-Rhizobium***

*Cambios en la expresión del gen de calmodulina relacionados a
la inhibición del transporte polar de auxinas son regulados
por el factor Nod.*

*Tesis que para obtener el grado de Doctor
en Biotecnología presenta el M. en C.
JOSE ALBERTO CAMAS REYES*

2002

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Sept./2002



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

***Expresión de calmodulina durante la simbiosis
Phaseolus vulgaris-Rhizobium etli***

***Cambios en la expresión del gen de calmodulina relacionados a la inhibición del
Transporte polar de Auxinas son regulador por el Factor Nod***

CONTENIDO

RESUMEN.	i
ABSTRACT.	ii
INTRODUCCIÓN.	
CAPÍTULO 1.- FIJACIÓN Y ASIMILACIÓN BIOLÓGICA DEL NITRÓGENO EN LEGUMINOSAS.	1
1.1 Fijación biológica de nitrógeno.	
1.2 El nódulo y sus funciones primarias.	
1.3 El factor de nodulación y la formación del nódulo.	
1.4 Formación del nódulo de <i>Phaseolus vulgaris</i> cv Negro Jamapa inducido por <i>Rhizobium etli</i> .	
1.5 Expresión de nodulinas durante la formación y el metabolismo del nódulo.	
1.6 Estructura del factor Nod y su especificidad por el hospedero.	
CAPITULO 2.- FUNCIONES DE CALCIO Y CALCIO-CALMODULINA EN PLANTAS	20
2.1 Proteínas vegetales dependientes de calcio (Ca ²⁺).	
2.2 Propiedades bioquímicas de calmodulina (Ca ²⁺).	
2.3 Características estructurales de calmodulina y del complejo Ca ²⁺ -CaM	
2.4 Mecanismo por el cual CaM se une a sus proteínas blanco.	
2.5 Mecanismo a través del cual CaM modula la función de sus proteínas blanco.	
2.6 Modificaciones postraduccionales de CaM.	
2.7 Calmodulina vegetal.	
2.8 Proteínas de plantas moduladas por Ca ²⁺ -calmodulina.	
2.9 Regulación de la expresión de los genes de CaM.	
2.10 Expresión de calmodulina en plantas transgénicas.	
CAPITULO 3. AUXINAS.	37
3.1 Propiedades de las auxinas.	
3.2 Transporte activo y transporte pasivo de auxinas.	
3.3 Transporte polar de auxinas.	
3.4 Acarreador de auxinas, mecanismo de inhibición del transporte polar de auxinas y tráfico de vesículas.	
3.5 Las auxinas y la formación de raíces laterales.	
3.6 Mecanismo de acción de las auxinas.	
3.7 Regulación de la expresión de genes por las auxinas.	

ANTECEDENTES.

CAPITULO 4.- TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES EN LA INTERACCIÓN LEGUMINOSA- <i>Rhizobium</i>	46
4.1 Cambios en los niveles y en la distribución iónica en los pelos radiculares y la despolarización de la membrana plasmática.	
4.2 Cambios morfológicos en el pelo radicular.	
4.3 Percepción del factor Nod en la raíz de las leguminosas	
CAPITULO 5.- FUNCIÓN DE LAS AUXINAS Y DE CALMODULINA EN LA DIFERENCIACIÓN VASCULAR.	51
5.1 Auxinas y la diferenciación vascular.	
5.2 Diferenciación de haces vasculares.	
5.3 Auxinas y el transporte de auxinas en la diferenciación de haces vasculares	
5.4 Auxinas y calmodulina	
5.5 Auxinas, calmodulina e inhibidores de CaM en la diferenciación de haces vasculares de la raíz.	
CAPITULO 6. FACTOR NOD, BALANCE AUXINAS/CITOCININAS, INHIBICIÓN DEL TRANSPORTE POLAR DE AUXINAS Y FORMACIÓN DEL PRIMORDIO NODULAR.	56
6.1 Acción de auxinas, citocininas y ENOD40 en la formación del primordio nodular.	
6.2 Factor Nod, inhibición del transporte polar de auxinas e inicio del primordio nodular.	
CAPITULO 7.- OBJETIVOS	59
7.1 Objetivo General.	
7.2 Objetivos Particulares.	
METODOS, RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
CAPITULO 8.- UNA NUEVA FAMILIA DEL GEN DE CALMODULINA EN <i>Phaseolus vulgaris</i> . cDNAs de CaM seleccionados a partir de un banco de expresión de nódulos de frijol.	61
8.1 Amplificación por PCR de una secuencia de la región de codificación de un cDNA de CaM.	
8.2 Caracterización de las clonas de cDNA de CaM (mapas de restricción y secuencias).	
CAPITULO 9.- EXPRESSION OF DIFFERENT CALMODULIN GENES IN BEAN (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.): ROLE OF Nod FACTOR ON CALMODULIN GENE REGULATION. Publicación en Molecular Plant-Microbe Interactions.	71
CAPITULO 10.- ANÁLISIS DE LOS INTRONES DE LOS GENES DE CALMODULINA.	72
10.1 PCR de secuencias genómicas de frijol con oligonucleótidos que amplifican la región de codificación de los genes de CaM.	
10.2 PCR de secuencias genómicas frijol utilizando los oligonucleótidos específicos obtenidos de la región 3'- no traducida de los cDNAs de CaM.	

CAPITULO 11 - PROTEÍNAS DE FRIJOL QUE UNEN CALMODULINA. Análisis comparativo de proteínas de frijol con afinidad por calmodulina : sistema biotina/avidina y cromatografía de afinidad.	76
11.1 Detección de proteínas de frijol con afinidad a calmodulina en membranas de nitrocelulosa utilizando biotina/estreptavidina.	
11.2 Detección de proteínas de frijol con afinidad a calmodulina por cromatografía de afinidad en columna.	
CAPITULO 12.- FOSFORILACIÓN in vitro DE CALMODULINA DE <i>Phaseolus vulgaris</i>.	86
12.1 Extracción de proteínas.	
12.2 Ensayo de fosforilación in vitro.	
CAPITULO 13.- DISCUSIÓN.	90
CONCLUSIONES.	
PERSPECTIVAS	
ABREVIATURAS UTILIZADAS	97

AGRADECIMIENTOS.

Agradezco profundamente al DR. MIGUEL LARA FLORES por la asesoría de ésta tesis doctoral, por su apoyo, y por la oportunidad que me dió de disfrutar todos los días del aprendizaje y del quehacer científico en su laboratorio, lo cual ha contribuído fuertemente a mi formación profesional.

A la Dra. Georgina Hernández, al Dr. Miguel Lara, la Dra. Carmen Quinto, la Dra. Gloria Soberón, al Dr. Marco Villanueva, al Dr. Baltazar Becerril, y a la Dra. Judith Márquez, por haber aceptado integrar el jurado, por la revisión del manuscrito y por verter sus comentarios, puntos de vista y sugerencias, que enriquecieron la discusión de los resultados y la presentación de ésta tesis.

Al Dr. Miguel Lara, al Dr. Federico Sánchez, la Dra. Gladys Cassab, y al Dr. Arturo Liévano, que integraron mi comité tutorial durante el doctorado, en donde sus críticas y puntos de vista siempre fueron guía para conducir el trabajo experimental.

Especialmente al Dr. Federico Sánchez, la Dra. Carmen Quinto, al Dr. Marco Villanueva, la Dra. Gloria Soberón y al Dr. Luis Cárdenas, por su amistad, y por haber contribuído enormemente a la realización experimental de éste trabajo, y en mi formación académica durante el posgrado.

A Araceli Sánchez, José Luis Citlalpopoca, Emilia Alemán y al Dr. Ignacio Islas por su apoyo, indispensable en la realización del trabajo experimental.

A todos los amigos que contribuyeron de una u otra manera a enriquecer la elaboración de ésta tesis con sus comentarios y discusiones académicas, por su ayuda en la práctica experimental, así como por hacer más feliz la estancia en los laboratorios debido a su incondicional amistad y solidaridad, de todo tipo y en todo momento.

Al CONACyT y al “Programa de Apoyo a las Divisiones de Estudios de Posgrado (PADEP)”, UACPyP-CCH, U.N.A.M. por su apoyo económico durante la realización del Doctorado.

También por su apoyo a la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA), U.N.A.M., grant No.IN216696 y Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), grant 3372-N9309.

RESÚMEN.

La fijación biológica de nitrógeno en las leguminosas es establecida mediante una asociación simbiótica entre la planta y bacterias del suelo de la familia Rhizobiaceae. Como producto de esta asociación se forman nódulos en las raíces, los cuales son órganos altamente especializados en la fijación biológica y en la asimilación del nitrógeno. Al inicio de la simbiosis, las bacterias sintetizan señales conocidas como factores de nodulación (FNod), los cuales son percibidos por un receptor con actividad de tirosina cinasa presente en los pelos radiculares. Los FNods producen un aumento de Ca^{2+} intracelular en los pelos radiculares que conducen a la deformación del pelo, y posteriormente, a la formación de un meristemo o primordio nodular en la corteza de la raíz.

Los cambios en los niveles de Ca^{2+} citosólico, en general, se asocian a todas las zonas meristemáticas y puntas de crecimiento en donde se realizan procesos relacionados con la diferenciación y el crecimiento celular vegetal. Calmodulina (CaM), es una de las principales proteínas sensoras de la concentración de Ca^{2+} citosólico, y en conjunto Ca^{2+} y CaM forman parte de vías de señalización que regulan numerosos procesos celulares. Nuestro objetivo fue contribuir al conocimiento de la función de calmodulina en la transducción de las señales que participan en la formación del nódulo durante la simbiosis *Phaseolus vulgaris-Rhizobium etli*.

En los puntos siguientes se resumen los resultados de ésta investigación:

- 1) Se aislaron 5 clonas de una librería de cDNAs construida en λ Zap y derivada de nódulos de la raíz de frijol. PvCaM-1, PvCaM-2 y PvCaM-3, contienen la secuencia completa del mensajero de calmodulina y codifican para distintas isoformas de la proteína. PvCaM-4 y PvCaM-5 son cDNAs con secuencia parcial. Cabe resaltar que en la secuencia de aminoácidos de CaM-2 encontramos una sustitución Tyr/Asp en la posición del residuo 118, sin antecedentes en los reportes de calmodulina, y representa un posible sitio de fosforilación. El análisis de DNA genómico correspondiente a los cDNAs de PvCaM-1 a PvCaM-3, indicó que son codificados por genes diferentes.
- 2) Los genes *cam-1* a *cam-3* se expresan principalmente en los meristemos y en los tejidos jóvenes de la planta. Aunque se expresan diferencialmente, el patrón de expresión de *cam-2* y *cam-3* es prácticamente idéntico. El gen *cam-1* se expresa preferencialmente en la raíz; sin embargo, en tallos y en hojas su expresión es muy baja; los genes *cam-2* y *cam-3* se expresan en todos los tejidos, excepto en tallos maduros. En los nódulos maduros la expresión de *cam-1* aumentó gradualmente a partir del día 11, y su máxima expresión se encontró entre los 15 y 18 días. Por el contrario, el nivel de expresión de *cam-2* y *cam-3* tiene su máximo en el día 13 y posteriormente declina.
- 3) En las raíces, desde los dos días de desarrollo hasta la etapa de primordio nodular, el FNod de *R. etli*, suprime la expresión de *cam-1*. El inhibidor del transporte polar de auxinas (TIBA) también disminuye su expresión, la cual es recuperada con la adición de ácido indolacético (AIA). Como el factor Nod también reduce el transporte polar de auxinas antes de que se forme el primordio, sugerimos que los cambios en la expresión del gen *cam-1* son regulados por la reducción del transporte polar de auxinas inducido por el factor Nod. Debido a ello, hacemos una revisión sobre la función de las auxinas, del transporte polar y la inhibición del transporte polar de auxinas, en relación a calmodulina y al factor Nod previo al inicio de las divisiones celulares que originan el nódulo.
- 4) Finalmente, encontramos que existe un patrón diferencial de proteínas con afinidad por Ca^{2+} -calmodulina en extractos de hoja, de raíz y de nódulos de frijol.

Parte de estos resultados han sido expuestos en la publicación que se incluye en el capítulo 9.

ABSTRACT.

Three different complete calmodulin (CaM) cDNAs (PvCaM-1, PvCaM-2, and PvCaM-3) were isolated from a *Phaseolus vulgaris* nodule library. All clones contain the complete coding region, are 62-74% homologous within this region, sharing 69-77% nucleotide identity in the 3'-untranslated region. When compared within a plant CaM consensus sequence, PvCaM-2 clone had a substitution of a tyrosine for an aspartic acid at position 118 that lies between the third and fourth Ca²⁺-binding domains. This substitution has not been observed in any plant CaM sequences already reported and represents a putative tyrosine-kinase phosphorylation site. PvCaM-3 had a conservative substitution of an alanine for a serine at position 10, already found in other plant CaM polypeptides. PvCaM-1 amino acid sequence, is 100% homologous to the alfalfa CaM gene previously described. A Southern blot genomic analysis suggested that all cDNAs are encoded by different genes. Northern blot analysis revealed different patterns of expression corresponding to the three cDNAs. CaM genes are expressed mainly in young plant tissues and meristems. *cam-1* gene is preferentially expressed in cotyledons and roots, and the expression patterns of *cam-2* and *cam-3* genes are different from that of *cam-1*. All clones are expressed in nodule primordia and nodule-like structures induced by the Nod factor. Also are expressed in mature nodules (from 11 to 21 days post inoculation), where the expression of *cam-1* increased gradually and its maximal expression was observed at days 15 and 18 after inoculation. However, in roots Nod factor lowers mRNA levels of all three genes, but specially of *cam-1*. *cam-2* and *cam-3* exhibited an earliest expression during development of mature nodules than PvCaM-1. Its expression increased gradually until day 13 post inoculation. The expression of *cam-3* was not detected in mature stems and was very low in leaves and roots. Inhibition of *cam-1* expression is also caused when IIBA is added and is recovered when roots are treated with indole acetic acid (AIA), suggesting that the gene regulation corresponding to pvCaM-1 cDNA is related to the Nod factor inhibition of polar auxin transport. These results suggest that *cam* genes could play an important role in the early events of nodule formation.

Expresión de Calmodulina durante la Simbiosis *Phaseolus vulgaris* - *Rhizobium*.

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 Fijación biológica de Nitrógeno.

El nitrógeno (N) es uno de los nutrientes esenciales para el crecimiento vegetal, especialmente para la agricultura. En la biósfera lo encontramos combinado con otros elementos químicos para formar diversos tipos moleculares como amonio, nitritos, nitratos y urea. También es un componente básico de la estructura química de los aminoácidos, los ácidos nucleicos, y otros compuestos celulares como las vitaminas. En la forma molecular N_2 llega a constituir el 80 % del volumen atmosférico; sin embargo, en esta forma molecular es prácticamente inerte porque los enlaces químicos que unen sus átomos son excepcionalmente fuertes y estables. Se necesita gran cantidad de energía para romper su triple enlace covalente (Taiz and Zeiger, 1991). Las plantas no lo asimilan en esta forma química, sino que lo adquieren del suelo como nitratos o amonio (NH_4^+). Ciertas especies vegetales pueden utilizar el N_2 atmosférico estableciendo asociaciones simbióticas fijadoras de nitrógeno con especies de bacterias, cianobacterias, o de actinomicetos (Gualtieri and Bisseling, 2000; Hirsch et al., 2001). Estos microorganismos contienen una enzima llamada nitrogenasa que les permite catalizar la reducción de N_2 a NH_3 , por lo que este proceso se conoce como fijación biológica del nitrógeno. El 90 % de la fijación natural de nitrógeno se realiza biológicamente por la acción de organismos de vida libre como *Azotobacter*, *Clostridium* y *Klebsiella*; por fijadores simbióticos como las bacterias de la familia rhizobiaceae (*Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, y *Azorhizobium*) colectivamente conocidas como rizobios; por cianobacterias (*Anabaena* y *Nostoc*) y por actinomicetos Gram⁺ del género *Frankia* que nodulan casi 200 especies de angiospermas (Doyle, 1998; Taiz and Zeiger, 1991). El otro 10 % resulta de la electrólisis de agua en la atmósfera causada por las descargas eléctricas; durante este proceso se forman óxidos de nitrógeno, que se incorporan al suelo por la acción de la lluvia (Brock y Madigan, 1990). Alrededor de un 90 % de especies de leguminosas forman asociaciones simbióticas con rizobios del suelo (Martínez et al., 1990), y a través de esta asociación la planta obtiene el nitrógeno requerido para su crecimiento y le proporciona a la bacteria compuestos carbonados. Esta simbiosis conlleva adaptaciones en ambos organismos que requieren elaborados mecanismos de control genético y bioquímico. Entre otros, la interacción simbiótica de *Rhizobium* y las leguminosas induce la formación de nódulos que son órganos fijadores de nitrógeno en la raíz de la planta. Por la importancia de las plantas que asimilan nitrógeno fijado biológicamente, se realizan muchos estudios enfocados a conocer estas interrelaciones metabólicas y regulatorias (Schubert, 1986).

1.2 El nódulo y sus funciones primarias.

El nitrógeno como nutriente vegetal.

El nitrógeno es el nutriente más importante para el crecimiento de una planta, ya que sin suficiente nitrógeno, su desarrollo y su productividad se ven limitados aunque en el medio exista abundancia de agua y de CO₂. Las plantas superiores adquieren el nitrógeno disponible en el suelo principalmente en forma de NH₄⁺ y NO₃⁻ dependiendo del habitat y de la especie. A pesar de la aplicación de fertilizantes a base de urea y de amonio, en los suelos agrícolas el NO₃⁻ es la fuente nitrogenada principalmente absorbida por las plantas, pues es la forma de nitrógeno más abundante en el suelo (Schubert, 1986; Crawford y Glass, 1998; Blevins, 1989).

Debido a lo anterior, la productividad de las plantas generalmente es determinada por la disponibilidad del nitrógeno inorgánico y por lo mismo, se tiene que estar reponiendo mediante la adición de fertilizantes al suelo. Sin embargo, las condiciones limitantes de nitrógeno favorecen que las leguminosas tiendan a asociarse simbióticamente con bacterias Gram-negativas del suelo, principalmente del género *Rhizobium* (Elkan, 1984). Esta interacción induce la formación de estructuras vegetales especializadas en la fijación biológica de nitrógeno que se diferencian a partir de los tejidos de la raíz, y que son conocidas como nódulos (Mylona et al., 1995).

Estructura general de los nódulos de las leguminosas.

Por su anatomía, los nódulos constituyen un órgano nuevo en la planta y se desarrollan a partir de células distintas de las que originan a los primordios de raíces laterales. Los nódulos se originan a partir de divisiones celulares en la corteza de la raíz, mientras que las raíces laterales surgen del periciclo. Por su tipo de crecimiento los nódulos de las leguminosas se dividen en determinados e indeterminados. Los determinados tienen forma esférica y no conservan actividad meristemática durante su desarrollo (*Phaseolus*, *Lotus*, *Vigna*, *Glycine*) y los indeterminados tienden a ser cilíndricos y presentan un meristemo persistente durante su crecimiento (*Medicago*, *Pisum*, *Vicia*) (Hirsch y LaRue, 1997) (Fig 1.1)

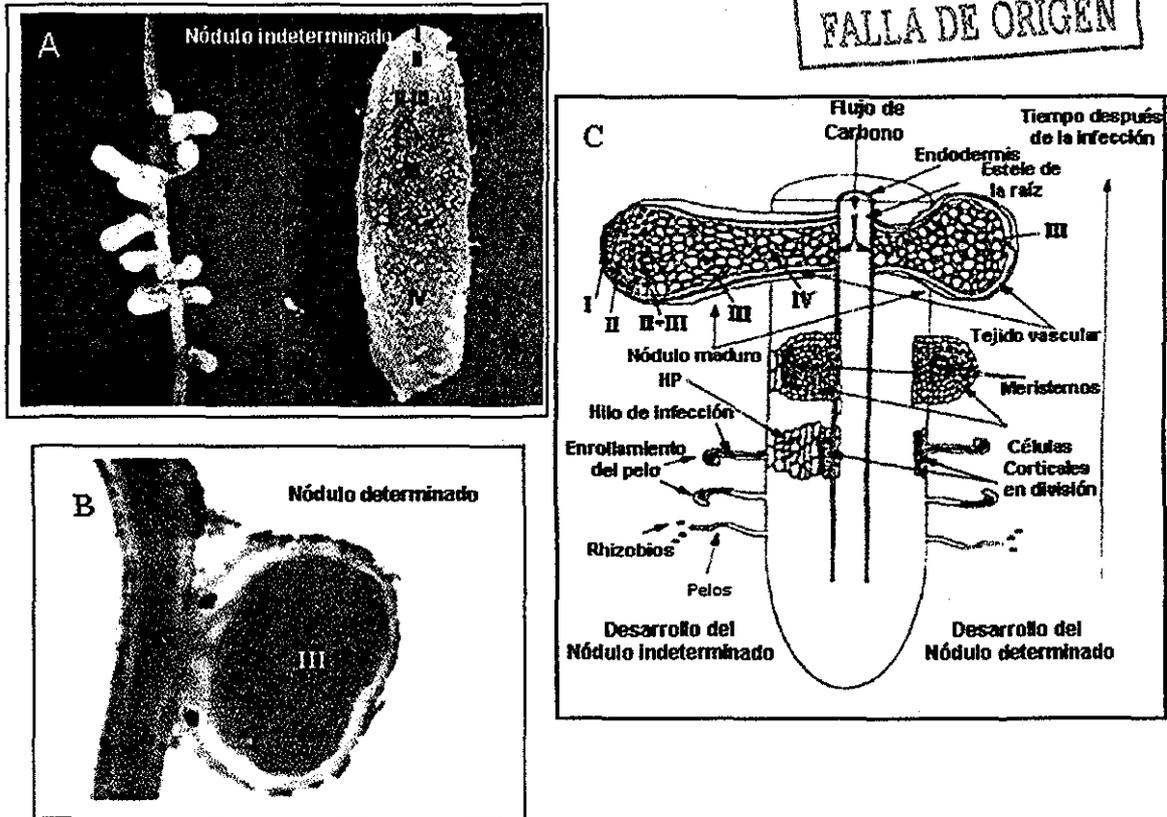
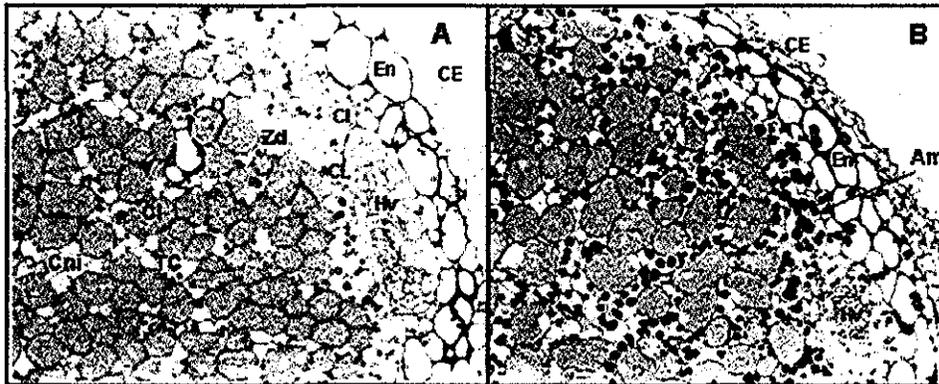


Fig. 1.1. Comparación del desarrollo de un nódulo indeterminado de alfalfa contra uno determinado de frijol. Los rizobios interactúan induciendo la deformación y el enrollamiento de los pelos radiculares. Los hilos de infección permiten la penetración de la bacteria hacia la corteza de la raíz. Simultáneamente el periciclo y las células corticales internas o externas se activan y se dividen para formar el primordio de nódulo que contiene grandes cantidades de amiloplastos. Se requiere del flujo de esqueletos carbonados a través del floema para dar inicio al desarrollo del nódulo. Posteriormente, un grupo de células del primordio forman un meristemo, que permanece durante todo el crecimiento de los nódulos indeterminados de alfalfa. Por el contrario, en los nódulos de frijol la que determina el crecimiento es una región meristemática transitoria. En el nódulo de alfalfa podemos apreciar un gradiente de zonas funcionalmente diferentes (I-IV): I (meristemo); II (invasión o liberación de la bacteria al citosol de las células del nódulo); II-III (interzona, contiene amiloplastos y las bacterias se transforman en bacteroides); III (fijación de nitrógeno) y IV (senescencia). HP, hilos de preinfección. (*J. Plant Growth Regul.* 2000, 19:155-166).

Los aspectos morfológicos y fisiológicos que son particulares a la formación de nódulos determinados como el de frijol e indeterminados como los de la alfalfa han sido exhaustivamente estudiados (Long 1989; Taté 1994).

La morfología del nódulo es de vital importancia para proporcionar un ambiente favorable a la fijación de nitrógeno. Los nódulos de tipo determinado tienen una corteza formada por células parenquimatosas que rodean una región central con gran cantidad de células infectadas con bacterias; entre ellas, y en menor número se encuentran células no infectadas. Rodeando ambos tipos celulares se encuentran los haces vasculares que son originados a partir del periciclo de la raíz y a través de los cuales el nódulo importa sacarosa y exporta productos nitrogenados al resto de la planta. La corteza tiene una endodermis con paredes celulares muy gruesas, y desde ella hacia el centro del nódulo podemos distinguir varias capas celulares: la corteza media o interna (parénquima), la capa

límite, y la zona de distribución en donde las células comienzan a infectarse. El parénquima contribuye a regular la concentración de oxígeno libre en el nódulo estableciendo una barrera a su difusión ya que sus espacios intercelulares pequeños y poco numerosos (Gordon, 199), Fig 1.2.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Fig.1.2. Corte histológico transversal de un nódulo maduro de *P. vulgaris* cv. Negro Jamapa. A, El tejido de los nódulos determinados está organizado en un tejido central (Tc) y en varios tejidos periféricos. Los tejidos periféricos incluyen la corteza externa del nódulo (CE), la endodermis (En) y la corteza interna (Ci). La corteza interna contiene los haces vasculares (Hv) que conectan el nódulo con el cilindro vascular. El tejido central consiste de dos tipos celulares, células infectadas (Ci) y células no infectadas (Cni). Las células infectadas están totalmente empaquetadas de bacterias, mientras que las no infectadas no contienen rizobios. Las células no infectadas participan en la asimilación del N_2 fijado en ureidos. En B, un acercamiento permite apreciar claramente que los amiloplastos (Am) son abundantes en las células no infectadas y en la corteza interna como lo indica la flecha. CL, capa limitrofe y Zd, zona de distribución. (Fotografías facilitadas por Lorena López S. Unidad de Microscopía Electrónica, IBT. UNAM)

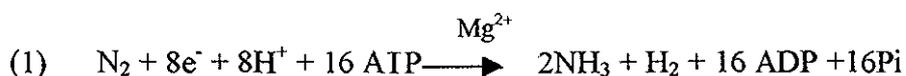
Conforme las bacterias invaden las células de la parte central del nódulo, son rodeadas por una membrana derivada de la membrana plasmática de la célula infectada en un proceso de tipo endocítico; después de su división, las bacterias se diferencian bioquímica y morfológicamente en bacteroides. Este proceso de internalización y propagación de la bacteria en el nódulo requiere de la síntesis masiva de membrana en las células infectadas, que puede ser hasta de 30 veces la cantidad de membrana plasmática producida. La membrana que rodea los bacteroides se conoce como membrana peribacteroidal (PMB) y junto con ellos constituye un espacio llamado simbiosoma. Por la diferencia en la composición de lípidos y proteínas con el resto de las membranas celulares, se le atribuyen funciones especiales en el intercambio de metabolitos entre los bacteroides y las células del nódulo (Mylona et al., 1995).

Funcionamiento del nódulo.

Fijación de nitrógeno

Dentro de los nódulos, las bacterias fijan el nitrógeno atmosférico a cambio de nutrientes carbonados que la planta le proporciona, y ésta a su vez, obtiene el nitrógeno fijado por la bacteria en forma de amonio. Aunque la mayoría de las plantas superiores absorben muy poco amonio del suelo, ellas están equipadas con un sistema de enzimas capaces de asimilarlo, pues finalmente todas las formas de nitrógeno usadas por la planta son reducidas a amonio. En este sentido, la función primaria del nódulo es la reducción de N_2 a NH_4^+ , una forma reducida que es rápidamente asimilada por la planta en aminoácidos, amidas y ureidos. El N_2 es inicialmente asimilado como glutamina (Gln), la cual es posteriormente metabolizada para la producción de biomasa vegetal.

La reacción de la reducción del nitrógeno es catalizada por la enzima nitrogenasa (EC 1 18 6 1) que se encuentra en los rizobios. Estructuralmente es un complejo enzimático compuesto por dos tipos de metaloproteínas, la nitrogenasa y la nitrogenasa reductasa, que contienen hierro y azufre. Ninguna tiene actividad catalítica por separado. La nitrogenasa es un tetrámero que contiene Hierro (Fe) y Molibdeno (Mo), por lo que se conoce como proteína-MoFe; está conformada por dos tipos de subunidades ($\alpha_2\beta_2$) y en promedio tiene un peso molecular de aproximadamente 220 000 Da, el cual difiere según la especie. La otra proteína contiene Fe y dos sitios de unión al complejo MgATP; funciona como un dímero (α_2) conocido como proteína-Fe y posee un peso de 64 000. La nitrogenasa es inactivada por el O_2 , ya que el cofactor MoFe es desnaturalizado rápida e irreversiblemente por esta molécula. Sin embargo, en condiciones normales la nitrogenasa cataliza la fijación de un mol de N_2 en amonio (1), el cual es excretado del bacteroide hacia el citosol de las células del nódulo (Haaker and Veeger, 1984).



Por la acumulación de sacarosa y almidón, el nódulo es un almacén de carbono, a la vez que funciona como una fuente de nitrógeno. De hecho, se ha sugerido que los nódulos de las leguminosas evolucionaron como órganos de almacén de carbono (Caetano-Anolles et al., 1993). El carbono se transporta hacia el nódulo fundamentalmente en forma de sacarosa, viajando por el floema desde las hojas hasta los nódulos en donde también puede almacenarse como almidón. Si bien el movimiento de la sacarosa hacia el bacteroide es restringido por la membrana peribacteroidal, ésta es altamente permeable a algunos ácidos orgánicos dicarboxílicos, y tiene alta afinidad por el malato. La sacarosa es metabolizada particularmente en malato, así como en fumarato y succinato. El continuo aporte de esqueletos carbonados, principalmente de los sustratos del ciclo de Krebs, es requerido para mantener activa la respiración del bacteroide y por ende también de la fijación de nitrógeno. La oxidación de estos fotosintados durante la respiración del bacteroide proporciona ATP y poder reductor para la actividad nitrogenasa.

Asimilación de amonio.

El amonio producido por las bacterias se difunde a través del bacteroide y de la membrana peribacteroidal hacia el citosol de la célula infectada, en donde es combinado con compuestos carbonados derivados de la fotosíntesis vegetal para producir los aminoácidos glutamato y glutamina, los cuales después de seguir diferentes procesos metabólicos son incorporados en las proteínas para el crecimiento y desarrollo vegetal. La mayoría de las leguminosas tropicales (como frijol y soya) tienden a transportar el nitrógeno en forma de ureidos (alantoína y ácido alantoico), y las de clima templado (como alfalfa) exportan las amidas, glutamina o asparagina, a través del xilema. En las leguminosas tropicales los ureidos son formados por la vía de síntesis *de novo* de purinas, seguida de la degradación y oxidación del anillo de purina. La elaboración de estos compuestos correlaciona con el aumento en la actividad de enzimas que participan en la asimilación del amonio como la fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPc), glutamino sintetasa (GS), glutamato sintasa (GOGAT), asparagino sintetasa (AS), aspartato aminotransferasa (AAT) y uricasa (Sánchez et al. 1991; Schubert, 1986). La distribución de estas enzimas en los nódulos es compleja, localizándose en el citosol o en diferentes organelos y está relacionada con el tipo de compuestos nitrogenados que son transportados a partir de los nódulos

En las plantas superiores, el amonio es asimilado por la acción combinada de dos enzimas, la glutamino sintetasa (GS) y la glutamato sintasa (NADH-GOGAT). Ambas presentan isoformas que son específicas del nódulo y su actividad aumenta junto con la actividad de la nitrogenasa. Las actividades de las dos enzimas son interdependientes y constituyen lo que se conoce como la vía GS/GOGAT (Lara et al., 1984; Tingey et al., 1987; Trepp et al., 1999). Estas enzimas mantienen el flujo de N a partir de la conversión de NH_4^+ a glutamato y glutamina. A la vez, estos aminoácidos son sustratos de varias transaminasas que funcionan en la síntesis de purinas, pirimidinas, ureidos y otros aminoácidos (Fig. 1.3)

1.3 El factor de nodulación y la formación del nódulo.

En la mayoría de las leguminosas, los nódulos se inician en las células de la corteza próximas al ápice de la raíz, en la zona en donde comienzan a emerger los pelos radiculares. En esta zona, las leguminosas exudan flavonoides, los cuales estimulan la expresión de genes bacterianos que participan en la síntesis y secreción de factores de nodulación (factores Nod) también conocidos como oligosacáridos de lipoquitina (LCOs) por su semejanza estructural con fragmentos del oligosacárido quitina (Fig. 1.4) El efecto del factor Nod implica la dediferenciación y la activación de la división celular de algunas células del parénquima de la corteza para formar el nódulo (Mylona et al , 1995; Gualtieri and Bisseling, 2000)

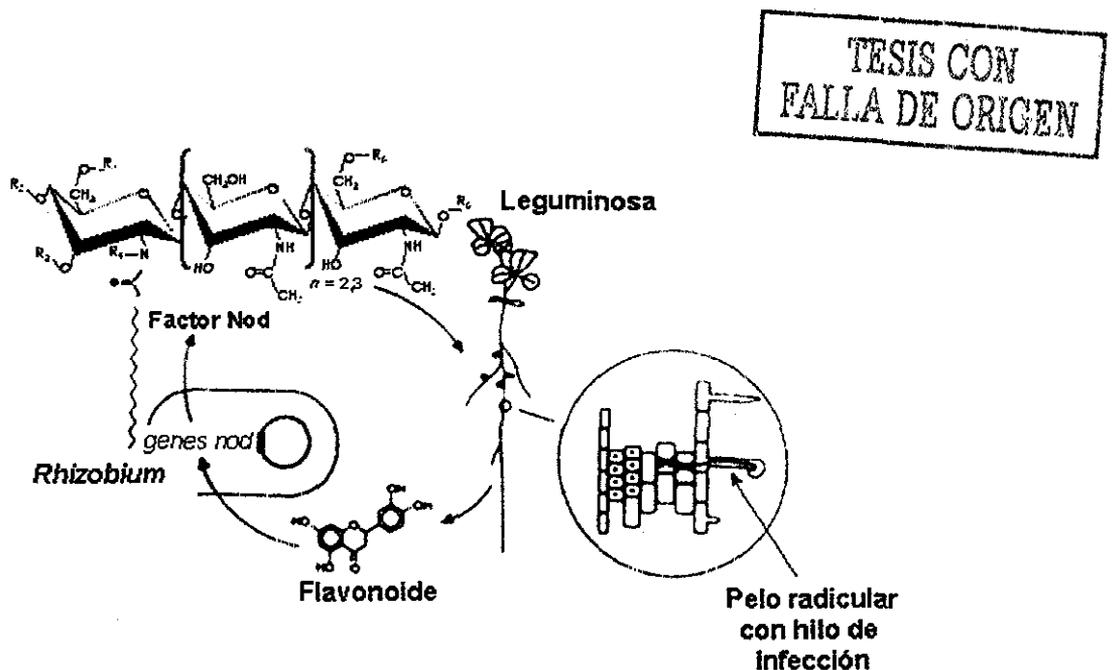


Fig. 1.4. Intercambio de señales en la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa. Los flavonoides producidos por la raíz de la planta inducen la expresión de genes *nod*, cuyos productos sintetizan los factores de nodulación, los cuales difieren en su estructura química dependiendo de la especie de *Rhizobium*. La inserción muestra un hilo de infección originado en el pelo y que atraviesa la corteza de la raíz hacia un grupo de células en división para formar el primordio del nódulo.

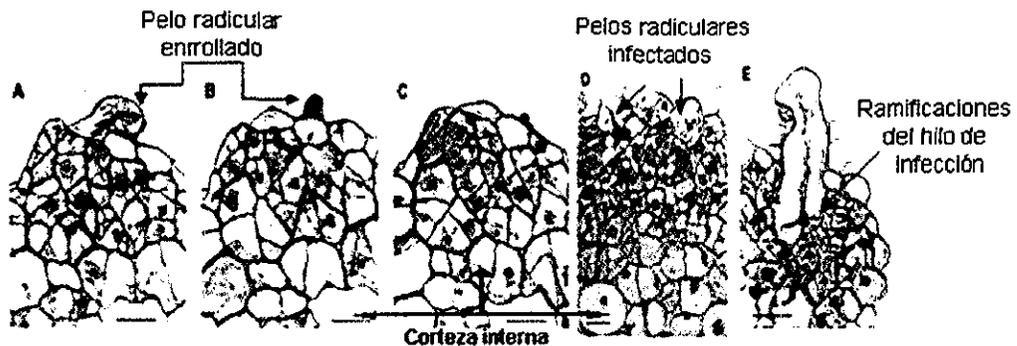
El primer evento morfológico notable de la interacción entre la bacteria y la raíz de la planta es el cambio en la forma de los pelos radiculares, que al percibir al factor Nod se deforman, se bifurcan o se enrollan. Enseguida, dependiendo de la especie vegetal se puede observar una serie de eventos en las raíces como la formación de hilos de preinfección en los pelos radiculares, la producción y secreción de flavonoides, la expresión de genes de nodulinas y la inducción de divisiones celulares que van a formar el primordio nodular en la corteza de la raíz (Fisher and Long, 1992; Bisseling et al., 1995; Mylona et al., 1995; Spaink, 1995).

Los factores Nod puros inducen la división de las células corticales de la raíz, pero no inducen la formación de los hilos de infección; para que éstos se formen es necesaria la interacción entre el pelo radical y la bacteria. Los hilos de infección son tubos de pared celular ricos en secreciones, que las bacterias usan para viajar por su interior desde los pelos hasta las células de la corteza radicular.

1.4 Formación del nódulo en *Phaseolus vulgaris* cv Negro Jamapa inducido por *Rhizobium etli*.

De 5 a 7 días después de la inoculación con una cepa silvestre de *Rhizobium etli*, las raíces laterales de frijol cv. Negro Jamapa presentan primordios nodulares en todas las etapas de desarrollo. Los nódulos pueden formar agrupaciones o racimos que provienen de pelos radiculares vecinos que han sido infectados.

Las primeras divisiones celulares que forman el primordio nodular se originan en la corteza externa de la raíz, exactamente en la primera capa celular debajo de la epidermis; esto es, debajo del pelo radicular que ha sido infectado por la bacteria (Fig 1.5).

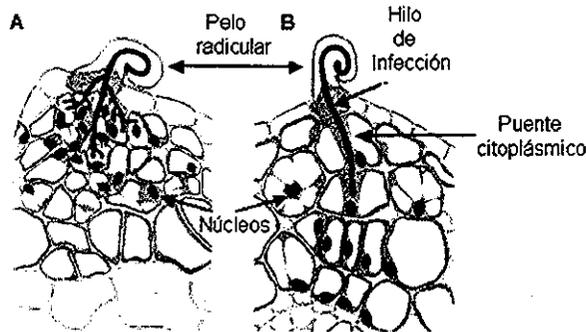


TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Fig.1.5. Secciones transversales de la corteza de raíz de *P. vulgaris*. cv Negro Jamapa inoculada con *Rhizobium etli*. A-C serie de cortes de la corteza de raíz con pelos radiculares infectados. Estos contienen hilos de infección, y debajo de ellos se pueden apreciar las primeras células corticales en división que dan lugar a un primordio nodular en una etapa muy temprana. D, Primordio nodular joven que muestra la abundancia de divisiones celulares en la corteza externa debajo de dos pelos radiculares (flechas). En la corteza más interna solamente se producen divisiones radiales. E, Una etapa más avanzada del desarrollo del nódulo; se muestra un pelo radicular con un hilo de infección que se ramifica (flecha) y penetra a las células subyacentes. (Mol. Plant-Microbe Interac 2000, 14(7):839-847).

Al inicio de la interacción, los pelos infectados se enrollan, aumentan en grosor y presentan paredes celulares gruesas. Presentan hilos de infección amplios que pueden ramificarse hacia la base del pelo, penetrando la pared celular en diferentes puntos y con diferentes direcciones hacia las células vecinas de la primera capa de la corteza. Estas células se pueden distinguir porque sus núcleos aumentan de tamaño y migran hacia el centro de la célula antes de que comience la división celular. Las células que se dividen forman una fila con sus núcleos situados en el centro y alineados por delgadas cadenas citoplásmicas. Posteriormente en la corteza interna, el hilo de infección produce ramificaciones muy finas que penetran en diferentes direcciones y extienden el área de células en división, que al unirse dan origen a un primordio nodular (van Spronsen et al., 2001), Fig. 1.6.

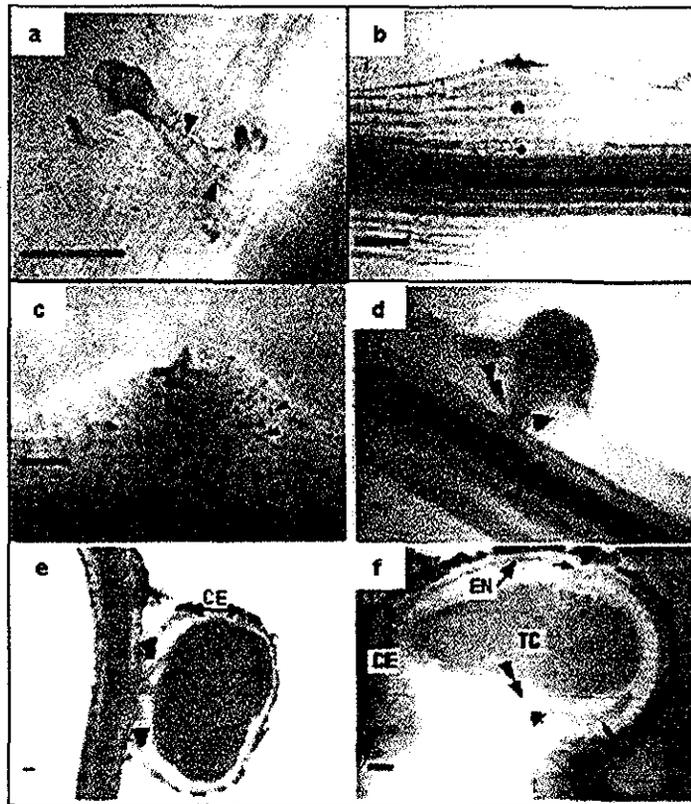
Esquema del inicio del Primordio Nodular



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Fig. 1.6. Esquema comparativo de las etapas muy tempranas de nodulación en la corteza externa de las células de la raíz de dos nódulos de tipo determinado. A, Desarrollo de un primordio en la capa celular de la corteza externa en la nodulación de frijol B, Desarrollo de los puentes citoplásmicos en un primordio en desarrollo en la tercera capa cortical en la nodulación de *Lotus japonicus* (Mol. Plant-Microbe Interac 2001, 14(7):839-847).

Una vez iniciado el primordio, las divisiones celulares en la corteza continúan dando lugar a una masa esférica. Eventualmente, las células centrales detienen su división y conforme son invadidas o no por la bacteria se diferencian en células infectadas y no infectadas. Durante esta etapa las bacterias se transforman en bacteroides y en esta forma expresan los genes responsables de la fijación de nitrógeno atmosférico. Histológicamente, el nódulo maduro se caracteriza por tener una parénquima central compuesto de células infectadas y células no infectadas. Esta región central está rodeada por una corteza de células parenquimatosas que se encuentra entre la epidermis y la región central (Taté et al., 1994), Fig 1.7.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Fig. 1.7 Etapas de desarrollo de *Phaseolus vulgaris* inducidos por *Rhizobium etli*. a) Hilos de infección en un pelo radicular; actividad mitótica en las células de la corteza de la raíz en la vecindad de los hilos de infección y en el cilindro vascular central (asteriscos en b); núcleos condensados del meristemo del nódulo (flechas en c); haces vasculares del nódulo (cabezas de flecha en f-h) y endodermis vascular (dobles flechas en f y h) En g y h se señala la corteza externa CE, la endodermis del nódulo, EN y el tejido central, TC (Mol Plant-Microbe Interac. 1994, 7(5):582-589).

1.5 Expresión de nodulinas durante la formación y el metabolismo del nódulo.

El programa de desarrollo que conduce a la formación de los nódulos en la raíz es tan complejo como el programa de desarrollo para la formación de otros órganos en la planta. Estos programas involucran la participación de muchos genes y la diferencia entre ellos se debe a la expresión diferencial de los mismos en distintos órganos, de tal manera que solamente ciertos genes se expresan específicamente en las células de un órgano particular y en el tiempo preciso para su desarrollo y su funcionamiento. Como ya mencionamos, el nódulo es considerado como un órgano nuevo de la planta y por lo mismo deberíamos esperar que expresara genes únicos asociados a su formación y funcionamiento. Con esta idea, se han estado identificando los genes que se expresan en el nódulo para poder distinguirlo de los otros órganos de la planta y para entender la naturaleza de su desarrollo. Por lo tanto, mucho se ha investigado sobre la expresión de ciertos genes relacionados con las distintas etapas de desarrollo del nódulo (Gresshoff, 1990).

En este contexto, surgió el concepto de la existencia de proteínas vegetales, llamadas nodulinas, que eran específicamente expresadas en el nódulo y en ninguna otra parte de la planta. Por consecuencia, las nodulinas solamente serían expresadas durante la simbiosis. Sin embargo, conforme los genes de las nodulinas se han clonado y conforme han avanzado los métodos para detectar sus transcritos, se ha encontrado que muchos de ellos también son expresados en otros tejidos de la planta e incluso en especies que no son leguminosas como el caso del gen *enod40* o el gen de la proteína leghemoglobina que tienen homólogos no simbióticos (Gualtieri and Bisseling, 2000).

Debido a que los genes de nodulinas son expresados diferencialmente durante la simbiosis, y a que la transcripción de varios de ellos puede identificarse en etapas más o menos definidas durante la formación y la función primaria del nódulo, se clasificaron como genes de nodulinas tempranas o de nodulinas tardías (Verma et al., 1992). Siendo las nodulinas tempranas (ENOD) aquellas incluidas en el proceso de infección y de organogénesis, y las tardías las involucradas principalmente en el funcionamiento del nódulo (NOD) (Gresshoff, 1990).

Algunos genes de nodulinas tempranas se expresan en otras partes de la planta y además de ser inducidos por el factor Nod también pueden inducirse por hormonas como citocininas o auxinas (Fang and Hirsch, 1998). Los genes de nodulinas tempranas pueden usarse como marcadores moleculares de las diferentes etapas de la infección, formación y desarrollo del nódulo.

Genes de nodulinas tempranas.

La formación del hilo de infección y la división celular que conducen al desarrollo del nódulo implica cambios drásticos en la composición bioquímica de la pared celular. Estos eventos están correlacionados con la expresión de genes de nodulinas tempranas que codifican para proteínas que funcionan en la pared celular. Algunos ejemplos son los genes que codifican para proteínas ricas en prolina (ENOD2, ENOD5, ENOD10, ENOD11, ENOD12, PRP4) para extensinas y para proteínas ricas en glicina (GRPs) (Crespi y Gálvez, 2000).

La nodulina temprana ENOD40 se expresa en nódulos inducidos con *Rhizobium* o con el factor Nod purificado. La secuencia del mensajero producido por *enod40* codifica para un péptido de 10 a 13 aminoácidos. Se considera como un regulador endógeno del crecimiento vegetal ya que actúa alterando la respuesta celular a las mismas concentraciones de las hormonas (van de Sande et al., 1996).

Dentro de las primeras 24 h después de la inoculación, *enod40* se expresa en el periciclo de la raíz y en el primordio nodular. Induce divisiones celulares en la corteza de la raíz al modificar los niveles endógenos hormonales de auxinas y citocininas, que a su vez parecen estar implicadas en la desdiferenciación de las células corticales que van a dar origen al primordio del nódulo (Charon et al., 1999; Minami, 1996). En los nódulos maduros ENOD40 se localiza en el periciclo del parénquima vascular y en las células no infectadas (Papadopoulou et al., 1996). Sin embargo, no es un péptido específico del proceso de nodulación ya que también se expresa en las células que originan los primordios de raíces laterales (Papadopoulou et al., 1996), en los márgenes del primordio foliar y en los tallos; incluso podemos encontrar síntesis de péptidos similares en la planta de arroz (Kouchi et al., 1999).

Otros genes inducidos por el factor Nod muestran inducción específica en los pelos radiculares o en las células epidérmicas. Algunos más se expresan tanto en los pelos radiculares como en los nódulos en desarrollo. Por ejemplo, los que codifican para lectinas, anhidrasa carbónica, quitinasas, enzimas del metabolismo fenilpropanoide o proteínas relacionadas a patogénesis. Pero pocos son los genes que se han aislado con una posible función en la transducción de las señales que dan inicio a la formación del nódulo. Entre estos existen genes con secuencias homólogas a los genes de proteínas que unen GTP, un gen MAD-Box y un gen de anexina. También se han involucrados genes que codifican cinasas de proteínas y genes que funcionan en el control del ciclo celular como *cyc2* y *cdc2* (Crespi y Gálvez, 2000).

Genes de nodulinas tardías.

Las nodulinas tardías generalmente suelen expresarse únicamente en los nódulos y las señales para la activación de sus genes son diferentes de las que activan las nodulinas tempranas. La inducción de su expresión comienza poco antes de la fijación del N₂ y está más relacionada con el metabolismo del nódulo para permitir una eficiente asimilación del amonio. Dentro de este grupo de nodulinas consideramos algunas isoformas de la enzima glutamino sintetasa (GS), glutamato sintasa (GOGAT), aspartato aminotransferasa (AAT) que son las responsables de asimilar el amonio que deriva de la reducción del N₂ en el bacteroide. También podemos considerar como nodulinas tardías a las enzimas del metabolismo del carbono como sacarosa sintasa (SS) y fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPc), y a la proteína leghemoglobina (Lb) que interviene en regular la difusión del oxígeno al tejido central del nódulo (Appleby, 1984; Sánchez et al., 1991).

1.6 Estructura del factor Nod y la especificidad por su hospedero.

Los genes de la bacteria que se expresan para dirigir la síntesis del factor de nodulación son conocidos como genes *nod*. Estos se encuentran organizados en varias unidades transcripcionales y se les ha clasificado en cuatro grupos principales: activadores de la transcripción como el gen *nodD*, los genes *nod* comunes ó *nodABC* que son esenciales para la nodulación; los genes de especificidad que determinan el rango de hospedero de la bacteria (*nod FE*, *nod LMN*, *nod PQ*); y los genes implicados en la síntesis y secreción de polisacáridos (Schlaman et al., 1992; Franssen et al., 1992; Spaik, 1995).

La interacción entre las leguminosas y *Rhizobium* es de naturaleza muy específica ya que una o un grupo de especies de leguminosas, se nodulan únicamente por una o algunas especies particulares de *Rhizobium*. Por ejemplo, los genes *nodH* y *nodPQ* de *Rhizobium meliloti* especifican únicamente para la nodulación de alfalfa, y el gen *nodE* de *R. leguminosarum* biovar *viciae* es responsable de determinar que solamente se nodule el chícharo. Actualmente se han clonado la mayoría de los genes que determinan el rango de hospedero de *Rhizobium* (Franssen et al., 1992).

Todos los factores Nod producidos por los Rhizobia consisten de un oligosacárido de N-acetil-D-glucosamina con enlaces β -1,4. Varían en longitud entre 3 y 5 unidades de glucosamina (GlcNac) dependiendo de la especie de *Rhizobium*. La adición de los monómeros del oligosacárido se produce a partir del extremo no reductor. Todos los

factores Nod se encuentran N-acilados en este extremo; sin embargo, las N-sustituciones están relacionadas a la especificidad pues presentan variaciones de acuerdo al hospedero. La posición N se encuentra acilada en la mayoría de las especies con un ácido graso de longitud e insaturación variable. La misma posición también puede presentar una metilación como segundo sustituyente (Cohn et al., 1998; Spaink, 2000).

La síntesis y la modificación de la estructura molecular de la señal Nod es controlada por los productos proteicos de los genes de nodulación *nod*, *nol* y *noe*. Las principales modificaciones pueden ser la presencia de grupos sulfato, metilo, ácido graso y sacáridos modificados (Fig. 1.8) (Schultze and Kondorosi, 1998; Cohn et al., 1998; Spaink, 1995; Spaink, 2000).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

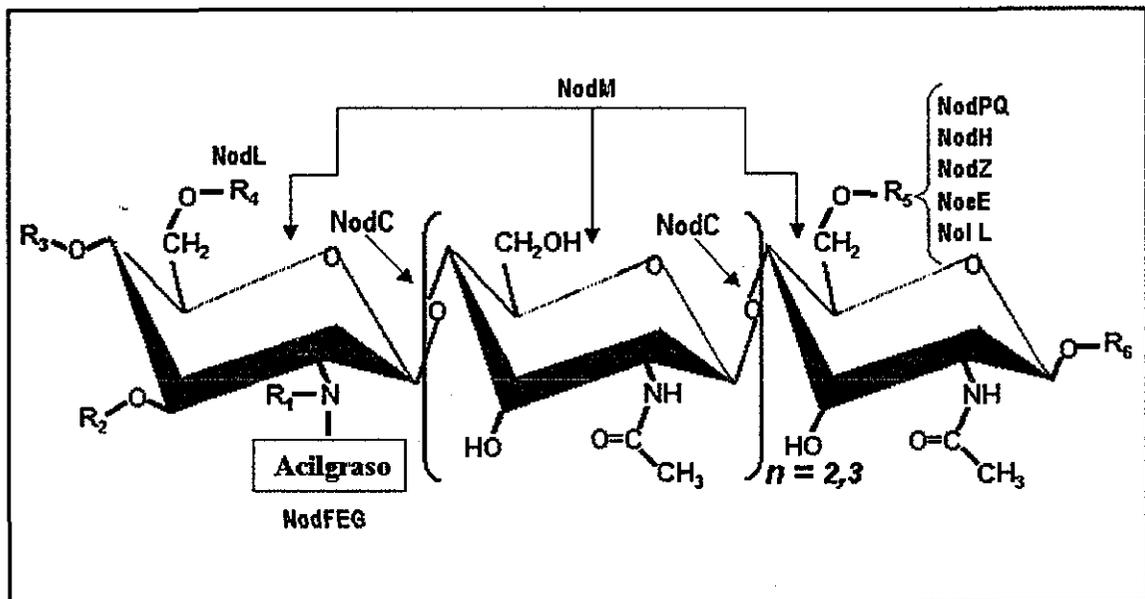


Fig. 1.8. Estructura de los factores Nod. Actualmente se ha obtenido la estructura de mas de 30 aislados de *Rhizobia* de diferentes especies en distintas regiones geográficas. El número total de residuos de N-acetilglucosamina que forman la estructura del factor Nod puede variar entre 3 y 5, dependiendo de la especie y/o biovar de *Rhizobia*. En esta figura se presenta una fórmula generalizada de la estructura del factor Nod, en donde la letra *n* es un factor que representa 2 ó 3 unidades de glucosamina. Según la especie de *Rhizobium*, diferentes grupos químicos pueden modificar la estructura en las posiciones R1 a R6. Los productos de los genes *nod*, participan en la síntesis y en la modificación de la estructura del factor Nod. Los factores Nod producidos por *R. etli* son pentasacáridos; en el extremo no reductor, la unidad de azúcar lleva un ácido graso insaturado C18:1, un grupo metilo y un grupo carbamilo; mientras que en el extremo reductor contiene un grupo acetilglucosamino. Todos los *Rhizobia* producen mezclas complejas de diferentes LCOs. (Annu. Rev. Microbiol. 2000, 54:257-88).

Las enzimas codificadas por los genes de nodulación que son hospedero-específicos modifican la estructura química básica del oligosacárido introduciendo diferentes sustituyentes que son los que determinan la especificidad.

Las proteínas Nod A (aciltransferasa) Nod B (desacetilasa) y NodC (quitina sintasa) sintetizan una molécula de quitina acilada (el esqueleto del oligosacárido más un ácido graso) por lo que los factores Nod se conocen como oligosacáridos de lipoquitina. En el caso de *Rhizobium meliloti*, a esta estructura química básica, las enzimas NodH, NodP y NodQ le introducen un grupo sulfato en el extremo reductor. Esta modificación le permite a *Rhizobium meliloti* nodular únicamente a la alfalfa. Sin embargo, las cepas mutantes que no pueden adicionar el grupo sulfato a la molécula también tienen la capacidad de nodular a *Vicia sativa*. Mientras que las raíces de *V. sativa* nodulan eficientemente con el factor Nod normal, los mismos factores Nod sin el sulfato no inducen la deformación del pelo radicular ni las divisiones celulares de la corteza en las raíces de alfalfa.

A pesar de que los genes *nodC* tradicionalmente se han clasificado dentro de los genes *nod* comunes, también actúan como determinantes de especificidad. Su actividad de quitina sintasa controla la longitud del oligómero de glucosamina según la especie de *Rhizobium*. El factor Nod producido por *R. meliloti* es un oligómero de cuatro unidades de glucosamina, mientras que el de *R. tropici* es de cinco. La introducción de *nodC* de *R. tropici* dentro de *R. meliloti* que tiene el gen *nodC* mutado, hace que *R. meliloti* produzca pentámeros en lugar de tetrámeros. Esta cepa es menos eficiente sobre alfalfa que la cepa silvestre. De tal manera que a través del control de la longitud del oligómero, *nodC* interviene en determinar la especificidad de los Rhizobia (Kamst et al., 1997; Schultze et al., 1992). De esta manera, la longitud del oligómero como la presencia o ausencia de los sustituyentes y/o la diferente combinación de ellos, le confiere a los Rhizobia la capacidad de tener un rango específico de hospedero (Cohn et al., 1998) (Tabla 1).

Tabla 1. Algunas de las modificaciones producidas en los factores de nodulación por diferentes cepas de *Rhizobium*.

<i>Rhizobium</i>	Hospedero	R ₅	Acilgraso	<i>n</i>
<i>Bradirhizobium japonicum</i>	Soya			
USDA 110		2-O-metilfucosa	C18:1/C16:0	3
USDA 135		2-O-metilfucosa	C18:1/C16:0	3
<i>Rhizobium meliloti</i>	Alfalfa	Sulfato	C16:1/C16:2 C16:3/(w-1)OH C18 a C26	2,3
<i>Rhizobium tropici</i>	<i>Phaseolus</i> <i>Leucaena</i> <i>Medicago</i> <i>Macroptilium</i>	Sulfato, hidrógeno		3
<i>Rhizobium fredii</i>	Soya	2-O-metil-fucosa/ fucosa	C18:1	1-3
R. NGR 234	Rango muy Amplio de hospedero	2-O-metil-fucosa/3-S- metilfucosa/3 o 4 acetil-metil-fucosa	C18:1/C18:0	2,3
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>Viciae</i>	Chicharo	Hidrógeno	C18:1/C18:4	2,3
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>Trifolii</i>	Trébol	Acetilo	C18:1/C18:4	2,3
<i>R. etli</i>	<i>Phaseolus</i>	4 -O-acetil- L fucosa	C18:1/C18:4	2,3
<i>A. caulinodans</i>	<i>Sesbania</i>	Arabinosa	C18:1/C18:0	2,3

En la columna correspondiente al hospedero se encuentran las especies en las que son activos diferentes factores de nodulación. R₅ representa la posición de las diferentes modificaciones en el extremo reductor de la molécula (Fig. 1.8). Acilgraso, representa la cadena de ácido graso en el extremo no reductor; ésta cadena puede variar tanto en su grado de insaturación, como en la posición de la insaturación. Igual que en la Figura 1.8, al número representado por *n* hay que sumarle 2 unidades de glucosamina para obtener el total de unidades que componen un factor Nod específico. Las modificaciones del factor Nod presentadas aquí, también podrían encontrarse en otras cepas de *Rhizobium* que no se muestran en la tabla. (Annu. Rev. Microbiol. 2000, 54:257-88).

Referencias.

- Appleby CA. 1984. Leghaemoglobin and *Rhizobium* respiration. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 35: 443-478.
- Blevins DG. 1989. An overview of nitrogen metabolism in higher plants. In *Plant Nitrogen Metabolism*. Chap. 1. JE Poulton, JI Romeo y EE Conn (Eds). Plenum Publishing Co. pp 1-41.
- Brock DT y Madigan TM. 1990. *Microbiología*. Prentice Hall Hispanoamericana, S.A. 715-722.
- Caetano-Anolles G et al. 1993. "Nodule morphogenesis in the absence of *Rhizobium*". In *New Horizons in Nitrogen Fixation*, eds. R. Palacios, J. Mora, and W.E. Newton, pp 297-302. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- Charon C et al. 1999. Alteration of *enod40* expression modifies *Medicago truncatula* root nodule development induced by *Sinorhizobium meliloti*. *Plant Cell*, 11:1953-1966.
- Cohn J et al. 1998. Legume nodule organogenesis. *Trends in Plant Science*, 3(3):105-10.
- Crawford NM y Glas ADM, 1998. Molecular and physiological aspects of nitrate uptake in plants. *Trends in Plant Science*, 3(10):389-395
- Crespi M and Gálvez S. 2000. Molecular mechanisms in root nodule development. *J. Plant Growth Regul.* 19:155-166.
- Doyle JJ. 1998. Phylogenetic perspectives on nodulation: evolving views of plants and symbiotic bacteria. *Trends in Plant Science*, 3(12):473-
- Fang Y and Hirsch AM. 1998. Studying early nodulin gene ENOD40 expression and induction by nodulation factor and cytokinin in transgenic alfalfa. *Plant Physiol.* 116:53-68.
- Fedorova M, et al. 1999. Expression of C-assimilating enzymes in pea (*Pisum sativum* L.) root nodules. *In situ* localization in effective nodules. *Plant Cell and Environment*, 22:1249-1262.
- Fisher RF and Long SR. 1992. *Rhizobium*-plant signal exchange. *Nature*, 357:655-660.
- Franssen HJ et al. 1992. Developmental aspects of the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Plant Molecular Biology*. 19: 89-107.
- Elkan GH. 1984. Taxonomy and metabolism of *Rhizobium* and its genetic relationships. In *Biological Nitrogen Fixation. Ecology, Technology and Physiology*. M Alexander (Ed). Plenum Press, New York Pp 1-38.
- Gordon AJ. Carbon metabolism in the legume nodule. In. Chap. 7. pp 113-147.
- Gresshoff PM. 1990. Nodulins and nodulin gene regulation in root nodule development: overview and discussion. In *The Molecular Biology of Symbiotic Nitrogen Fixation*. Gresshoff PM (Ed). CRC Press; Boca Ratón F. pp 51-103.
- Gualtieri G and Bisseling T. 2000. The evolution of nodulation. *Plant Mol. Biol.* 42:181-194.
- Haaker H. and Veeger C. 1984. Enzymology of nitrogen fixation. *Trends in Biochemistry Sci.*, vol. 9: 188-192.
- Hirsch AM and LaRue TA. 1997. Is the legume nodule a modified root or stem or an organ sui generis? *Crit. Rev. Plant Sci.* 16:361-92.
- Hirsch AM et al. 2001. What makes the rhizobia-legume symbiosis so special? *Plant Physiology*, 127:1484-1492.
- Kamst et al. 1997. *Rhizobium* nodulation protein NodC is an important determinant of chitin oligosaccharide chain length in Nod factor biosynthesis. *J. Bacteriol.* 179:2103-2108.
- Kouchi et al. 1999. Rice ENOD40: Isolation and expression analysis in rice and transgenic soybean root nodules. *Plant J.* 18: 121-129.
- Lara M et al. 1984. Heterogeneity of glutamine synthetase polypeptides in *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Physiology*. 76: 1019-1023.
- Layzell DB. N₂ fixation, NO₃⁻ reduction and NH₄⁺ assimilation. Pp 389-406.
- Long SR. 1989. *Rhizobium*-legume nodulation: life together in the underground. *Cell*, 56:203-214.
- Martínez E et al. 1990. The *Rhizobium* genome. *Critical Review Plant Science*. 9(1):59-53.
- Minami E et al. 1996. Expression of the early nodulin, ENOD40, in soybean roots in response to various lipo-chitin signal molecules. *The Plant Journal* 10(1):23-32.
- Mylona P et al. 1995. Symbiotic Nitrogen Fixation. *Plant Cell*, 7:869-885.
- Papadopoulou K et al. 1996. *Phaseolus* ENOD40 is involved in symbiotic and non-symbiotic organogenetic processes: expression during nodule and lateral root development. *Plant Mol. Biol.*, 30:403-17.
- Sánchez F, et al. 1991. Control of nodulin genes in root-nodule development and metabolism. *Annu. Rev. Plant Phys. Plant Mol. Biol.* 42:507-528.

- Schlaman HRM, et al. 1992. Regulation of nodulation gene expression by NodD in rhizobia. *Journal of Bacteriology*, 174(16):5177-5182.
- Schubert KR 1986 Products of biological nitrogen fixation in higher plants: synthesis, transport, and metabolism. *Annu. Rev. Plant Physiol* 37: 539-74.
- Schultze et al. 1992. *Rhizobium meliloti* produces a-* family of sulphated lipo-oligosaccharides exhibiting different degrees of plant host sepecificity. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 89:192-196
- Schultze M and Kondorosi A. 1998 Regulation of symbiotic root nodule development *Annu. Rev. Genet.* 32:33-57.
- Smill V. 1997. Global population and the nitrogen cycle. *Scientific American* 227:76-81
- Spaink HP. 1995 The molecular basis of infection and nodulation by rhizobia: the ins and outs of symphogenesis. *Ann Rev. Phytopathol.* 33:345-68
- Spaink HP. 2000 Root nodulation and infection factors produced by rhizobial bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 54:257-88.
- Taiz L and Zeiger E. 1991. *Plant Physiology*. Benjamin/Cummings Pub. Co. California U S A
- Taté R et al. 1994. Development of *Phaseolus vulgaris* root nodules *Mol. Plant-Microbe Interac.* 7(5):582-589
- Tingey SV, et al 1987. Glutamine synthetase genes of pea encode distinct polypeptides which are differentially expressed in leaves, roots and nodules. *EMBO J.* 6:1-9.
- Trepp GB et al. 1999. NADH-glutamate synthase in alfalfa root nodules Genetic regulation and cellular expression. *Pant Physiology*, vol. 19:817-828.
- van Spronsen PCv et al 2001 Cell biological changes of outer cortical root cells in early determinate nodulation. *Mol. Plant-Microbe Interac.* 14(7):839-847.
- van de Sande K et al. 1996. Modification of phytohormone response by a peptide encoded by ENOD40 of legumes and a nonlegume *Science*, 273(5273):370-3.
- Verma DPS et al 1992. Root nodule development: origin, function and regulation of nodulin genes. *Physiologia Plantarum* 85:253-265

CAPÍTULO 2

FUNCIONES DE CALCIO-CALMODULINA EN PLANTAS.

2.1 La importancia del Ca^{2+} como segundo mensajero en las plantas.

Los estímulos ambientales y hormonales afectan muchos aspectos de los procesos de crecimiento y de desarrollo en las plantas, por lo que las células vegetales responden en muchos casos de manera específica, adaptando para ello mecanismos de detección y de transducción de estas señales (Bush, 1993; Poovaiah and Reddy, 1993).

Mucha evidencia se ha reunido acerca de la función del calcio como segundo mensajero en las respuestas vegetales a muchos estímulos ambientales de origen abiótico (luz, calor, frío, viento, hipoxia y sequía, estímulos mecánicos, gravedad o salinidad) y de origen biótico, como las hormonas ácido indolacético (AIA), ácido abscísico (ABA) y ácido giberélico (GA), e interacciones patogénicas y simbióticas (Bush, 1993 and Bush, 1995).

Las respuestas específicas a estas señales tan diferentes se logran gracias a ciertas variaciones en la amplitud, la duración, la localización y la frecuencia de las “oscilaciones” en su concentración citosólica. El punto clave en la regulación de la señal de calcio consiste en un fino control entre su influjo al citosol a través de canales y su salida por el bombeo de Ca^{2+} -ATPasas o por medio de antiportadores $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ (Hwang et al., 2000).

En la célula, el calcio regula funciones como el balance iónico, la expresión genética, el metabolismo de carbohidratos, la mitosis, el tráfico de vesículas y la secreción. Para establecer una vía de transducción de señales estimulada por calcio, se requiere información de cómo el estímulo regula los niveles de calcio citosólico y qué proteínas son activadas cuando cambia su concentración. Algunas de ellas son proteína cinasas dependientes de Ca^{2+} o de calmodulina, calmodulina, fosfatasas, fosfolipasas, etc. (Fig. 2.1).

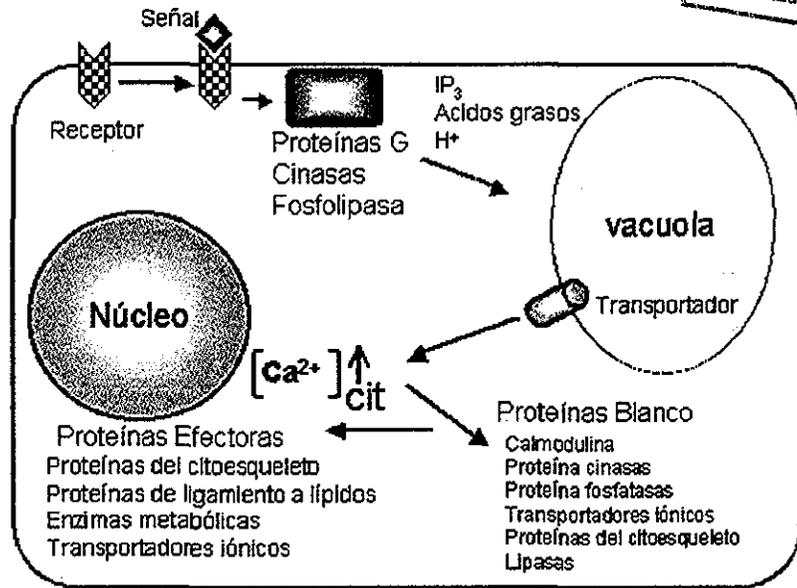


Fig. 2.1. Un esquema de las vías de mensajeros basados en calcio. La interacción entre el receptor y el estímulo conduce a la activación de una enzima asociada (Proteína G, fosfolipasa o cinasas) que produce mensajeros difusibles [Inositol trifosfato (IP_3), ácidos grasos, H^+] que activan un canal de Ca^{2+} en la membrana vacuolar. El nivel de calcio aumenta en el citosol y puede ligarse a proteínas blanco, las cuales posteriormente alteran la actividad de otras proteínas efectoras que son responsables de la respuesta final de la célula (Bush DS. 1993 Plant Physiol. 103:7-13)

Para ubicar los cambios en los niveles de calcio citosólico dentro de una vía de transducción de señales, se requiere identificar las proteínas específicas que son reguladas *in vivo* por calcio.

2.2 Proteínas vegetales dependientes de Ca^{2+} .

El aumento en el nivel de calcio citosólico promueve la formación de complejos de Ca^{2+} con proteínas que determinan la respuesta celular. En las plantas se han identificado muchas proteínas cuya actividad depende del cambio en los niveles de calcio intracelular. Actualmente se conocen diferentes proteínas que son blanco del calcio como calmodulina (CaM), fosfatasa de proteínas, fosfolipasas, cinasas dependientes de Ca^{2+} -CaM (calcio y calmodulina), y cinasas dependientes de Ca^{2+} (CDPK). Sin embargo, la calmodulina y las CDPKs son las proteínas que mejor se han caracterizado en plantas (Fig. 2.2). La calmodulina se encuentra en todas las plantas y en todos los animales y es de mucha importancia en las vías de señalización por Ca^{2+} en estos organismos.

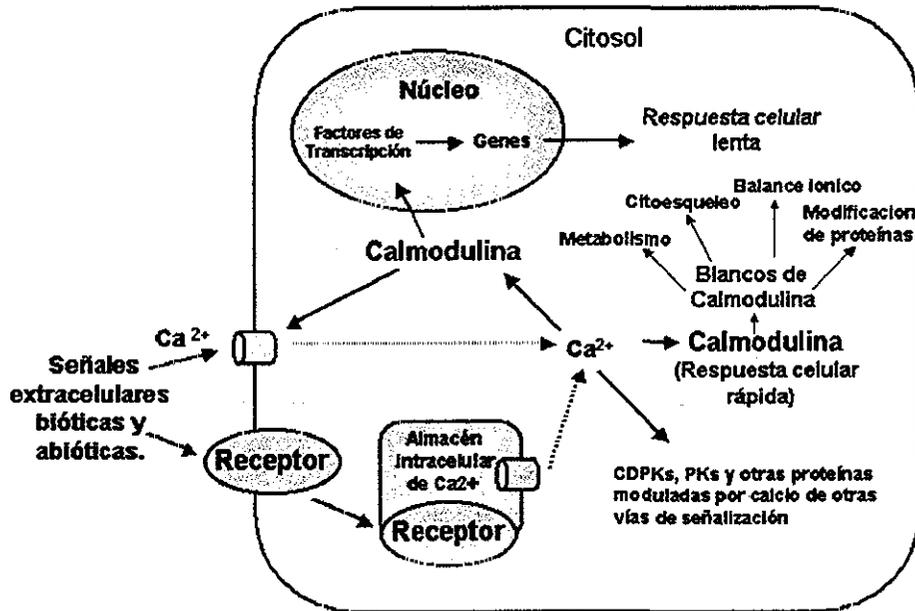


Fig. 2.2. Transducción de señales mediadas por el complejo Ca^{2+} -calmodulina. Señales bióticas y abióticas son percibidas por los receptores provocando cambios transitorios en los niveles de calcio citosólico y de organelos (núcleo). El aumento en las concentraciones de calcio libre que provienen del exterior celular o de los almacenes celulares (vacuola) es sentido por proteínas que unen calcio como calmodulina y proteínas relacionadas. Modulaciones estructurales de estas proteínas les permiten interactuar con numerosos blancos celulares para controlar muchas funciones celulares. Entre ellas, funciones metabólicas, balance de iones, modificaciones a proteínas y al citoesqueleto. Además, el complejo calcio calmodulina podría regular la expresión de genes mediante la unión a factores de transcripción. Los procesos mediados por calmodulina junto con los cambios celulares disparados por otras vías de señalización, constituyen la respuesta de la planta a señales externas. Las flechas con líneas interrumpidas señalan flujos de Ca^{2+} provenientes del exterior celular o de los almacenes internos como la vacuola o el retículo endoplásmico (ER) no señalado (Trends in Plant Science. 1998 3(8):299-303)

Las CDPKs (quinasas dependientes de calcio e independientes de calmodulina) sólo se encuentran en las plantas y han sido bien caracterizadas. Existe un tercer grupo de proteínas con secuencias homólogas a calmodulina que también detectan cambios de calcio en el citosol y por supuesto, participan en la acción del calcio en plantas (Roberts and Harmon, 1992).

2.3 Propiedades bioquímicas de CaM.

La calmodulina es una proteína pequeña, estable al calor y al pH ácido; está constituida por 148 aminoácidos, tiene un tamaño aproximado de 17 KDa y está presente en todos los organismos eucariontes estudiados (Fig. 2.3) (Vanaman, 1980).

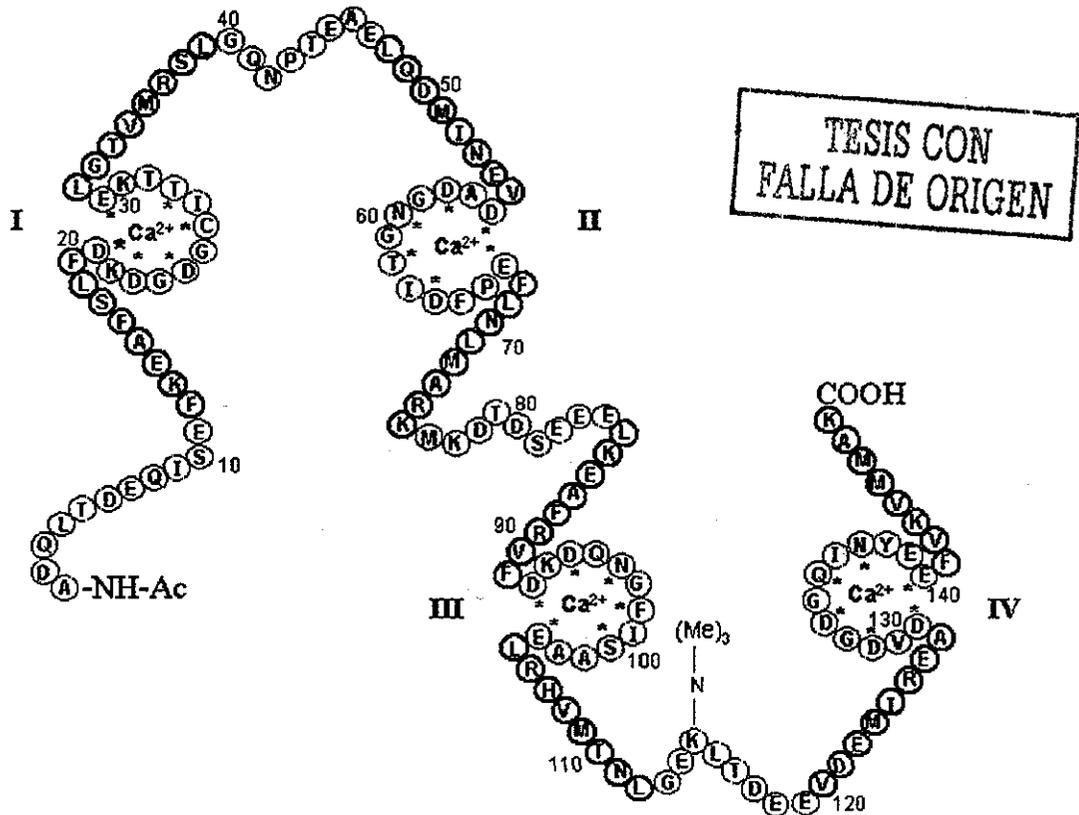


Fig. 2.3. Secuencia de calmodulina de *Phaseolus vulgaris*. Los cuatro dominios de ligamiento a calcio (I a IV) o “manos-EF” están compuestos de dos regiones α -helicoidales separadas por una vuelta o asa de ligamiento a calcio. Los residuos aminoácidos que ligan directamente al calcio están señalados con un asterisco. Los segmentos de α -hélice se muestran con círculos negros. El péptido que conecta los dominios III y IV contiene el residuo de Trimetilisina que es característico de todas las calmodulinas.

La molécula de calmodulina posee cuatro sitios que unen iones de Ca^{2+} con alta afinidad (K_d 10^{-5} a 10^{-6} M); unida al calcio actúa como un regulador multifuncional, ya que transduce la señal de calcio a múltiples procesos celulares en donde participan proteínas diferentes, por lo que se considera como el primer decodificador de Ca^{2+} en las células. La función bioquímica de calmodulina es tan importante en los organismos que su estructura génica y proteica han sido altamente conservadas (Klee, 1980; James et al., 1995).

Cuando los cuatro sitios de calmodulina están unidos al Ca^{2+} , se produce un cambio de conformación en su estructura que aumenta el contenido helicoidal y le da mayor estabilidad. Este cambio, expone regiones hidrofóbicas en su superficie a través de las cuales reconoce a múltiples proteínas con muy alta afinidad (K_d 10^{-7} a 10^{-11} M). La identificación de estas proteínas permite establecer la función de calmodulina en una vía de transducción de señales. En general, su unión a las proteínas es reversible y se vuelven a unir únicamente en presencia de calcio. Cuando el complejo Ca^{2+} -CaM reconoce un segmento peptídico en una proteína, produce que esta también cambie de conformación, y así modula su actividad en un tipo celular particular (Crivici and Ikura, 1995). Este mecanismo, ha llamado mucho la atención porque no existen secuencias consenso en las proteínas que la reconocen, y a pesar de ello, se forman complejos altamente específicos y con gran afinidad.

2.4 Características estructurales de calmodulina y del complejo Ca^{2+} -CaM.

Estructura de Calmodulina.

La estructura del cristal de CaM exhibe dos dominios globulares que poseen sitios de afinidad por calcio (I, II, III y IV), Fig. 2.3, caracterizados como motivos estructurales “mano-EF” (Fig. 2.4a). Los motivos “mano-EF” fueron descubiertos por primera vez por Kretsinger y colaboradores en la proteína llamada parvalbúmina. Estos consisten de dos α -hélices dispuestas perpendicularmente. Entre estas hélices se encuentra una vuelta o asa, y el conjunto forma un solo sitio de ligamiento a Ca^{2+} . Este motivo estructural relativamente simple, se ha identificado también en diferentes proteínas sensoras de Ca^{2+} en la célula (Ikura, 1996). Las proteínas sensoras de Ca^{2+} como Calmodulina y Troponina C, confieren a la célula la capacidad de detectar un influjo de calcio al citosol y de esta forma transducen la señal a varios procesos celulares que requieren frecuentemente de una respuesta rápida.

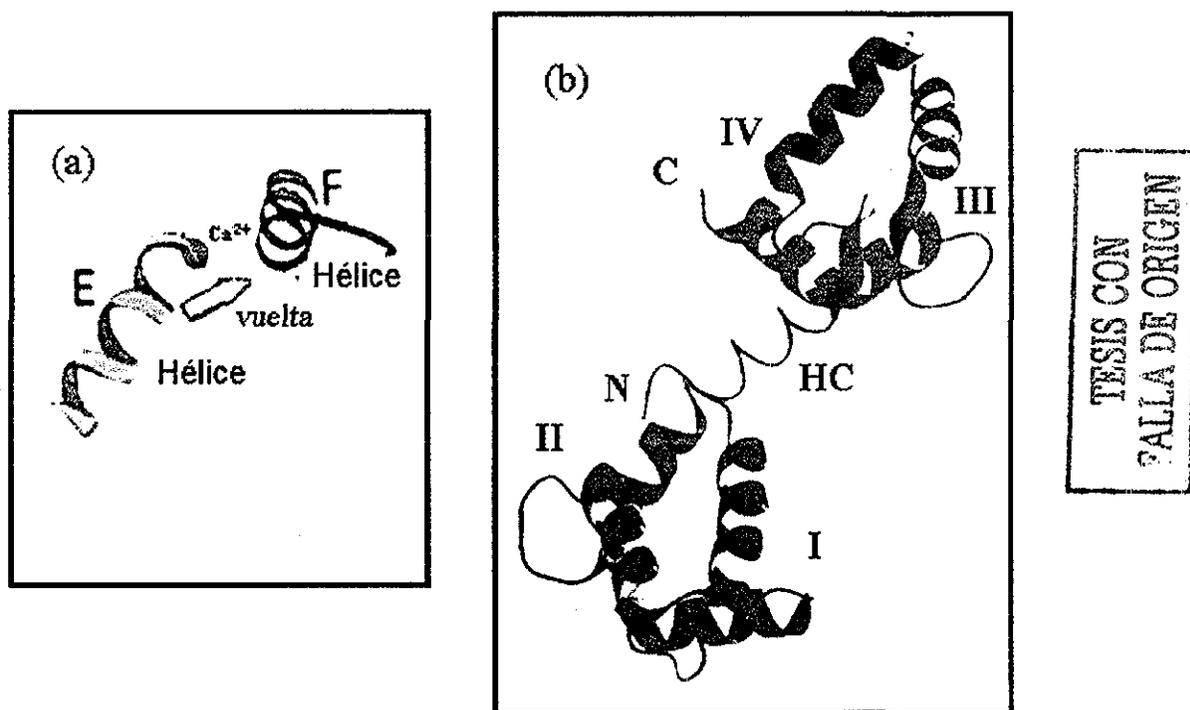


Fig. 2.4. (a) Estructura de un dominio de unión a calcio conocido como “mano EF”. Consiste de dos hélices dispuestas perpendicularmente e interconectadas por un péptido (vuelta) con un sitio de unión a calcio. (b) Estructura cristalina de rayos-X de Ca^{2+} -calmodulina en una resolución de 2.2 Å, mostrada como listón con la mitad carboxilo terminal (arriba), separada del lóbulo aminoterminal por una hélice central (HC) larga que corre diagonalmente de derecha a izquierda. (IIBS, 1996. 21:14-17)

En bajas concentraciones de calcio (10^{-7} a 10^{-6} M) los dominios mano-EF típicamente son inactivos, llegando a activarse cuando las concentraciones de Ca^{2+} aumentan entre 10^{-5} y 10^{-6} M. Sin embargo, las afinidades de unión a Ca^{2+} varían sustancialmente entre las

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

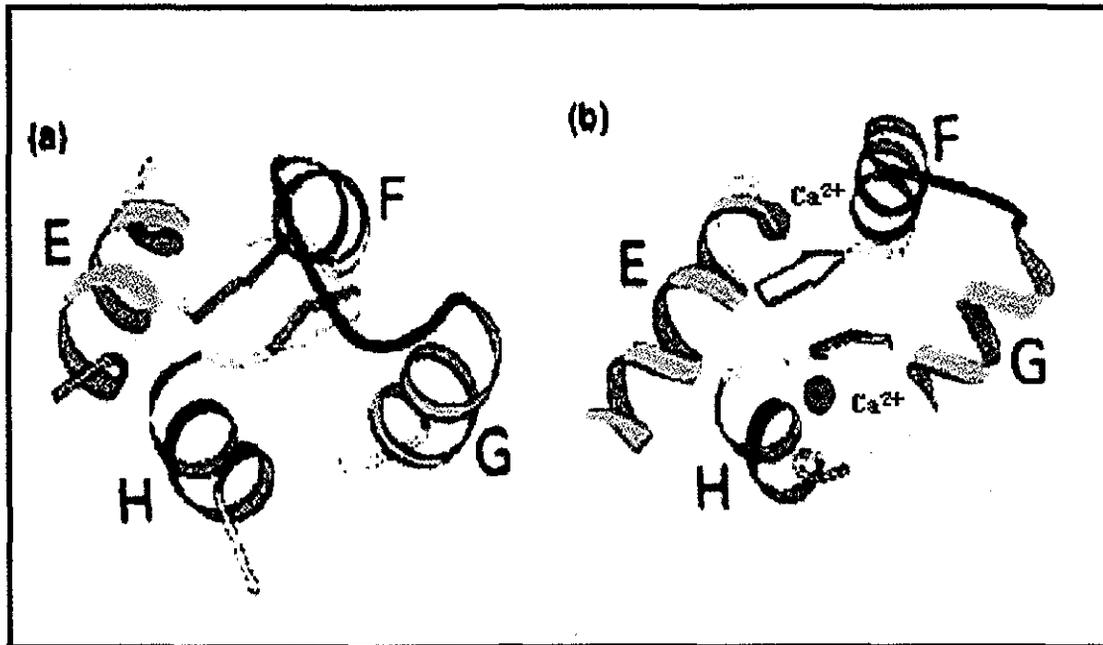
diversas proteínas, residiendo estas diferencias en una secuencia de 12 aminoácidos que forman el asa que liga el ión calcio directamente. En muchas proteínas los motivos mano-EF existen por pares conformando un dominio globular, con secuencias β -plegada antiparalelas entre las dos asas de unión. Los dos sitios de unión a calcio (par de manos-EF) del dominio globular muestran cooperatividad y ello le confiere a calmodulina lograr alta afinidad por calcio. De tal forma que un movimiento concertado de las hélices en estos pares mano-EF es crucial durante el ligamiento al Ca^{2+} . Así, CaM posee cuatro motivos "mano-EF" distribuidos en dos dominios globulares (uno en su lado amino terminal y el otro en el carboxilo terminal) separados por una hélice central (HC) que los hace estructuralmente independientes (Ikura, 1996), Fig. 2.4b.

Estructura del complejo Ca^{2+} -Calmodulina.

La unión de calcio provoca cambios de conformación, tanto en la estructura de los dominios de CaM como entre los motivos mano-EF en un mismo dominio. El cambio estructural implica la exposición de superficies hidrofóbicas en la molécula que son estrictamente necesarias para la función reguladora de calmodulina.

El ligamiento de una proteína blanco a calmodulina permite que los dominios globulares amino- y carboxilo-terminales de CaM se comuniquen entre sí, produciendo por lo tanto una alta cooperatividad desde que se liga el primer ión de Ca^{2+} . El cambio conformacional en la estructura de la proteína, hace que CaM se comporte como un "switch molecular", convirtiéndose de la forma inactiva (libre de Ca^{2+}), Fig. 2.5a, a la forma activa (ligada a Ca^{2+}) capaz de unirse a las proteínas blanco, Fig. 2.5b, (Ikura, 1996).

La estructura cristalina del complejo Ca^{2+} -CaM es una molécula en forma de "paraguas", de aproximadamente 65 Å de largo, con dos dominios globulares (N- y C-terminales) interconectados por una hélice (hélice central) de aproximadamente 8 vueltas (Fig 2.6a). Ambos dominios tienen grandes regiones hidrofóbicas flanqueadas por regiones de potencial electrostático altamente negativo. La hélice central de CaM parece servir como una especie de "varilla" flexible que facilita que los dos dominios se muevan como cuerpos semirígidos, acercándose para formar sitios únicos de ligamiento capaces de acomodar péptidos y enzimas blanco diferentes (Fig.2.6b).



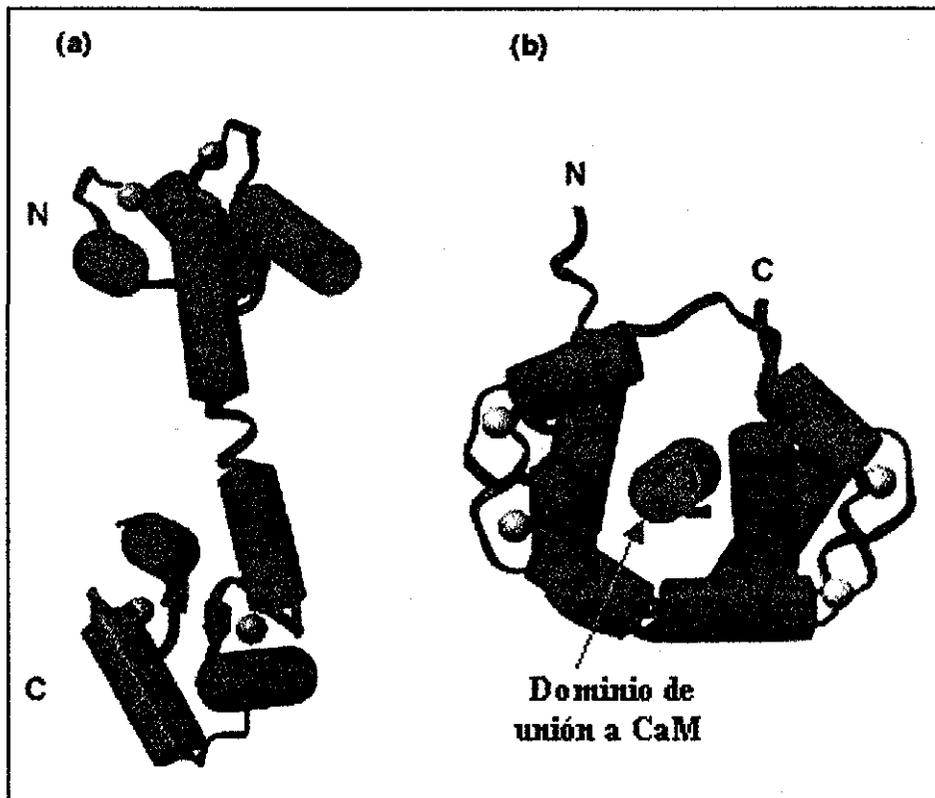
TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

Fig. 2.5. Cambios conformacionales inducidos por la unión de Ca^{2+} a un par de dominios mano-EF Las dos hélices de cada uno de estos dominios se muestran en diferente color. El dominio carboxilo terminal de calmodulina en (a) se encuentra "cerrado" en el estado libre de Ca^{2+} y (b) "abierto" en el estado ligado al Ca^{2+} (TIBS, 1996. 21:14-17)

2.5 Mecanismo por el cual CaM se une a sus proteínas blanco.

Los dominios globulares de CaM forman un canal hidrofóbico que envuelve a un dominio de su proteína blanco.

La superficie de calmodulina que corresponde al estado libre de calcio es hidrofílica, con muchos aminoácidos ácidos y pocos aminoácidos básicos. Cuando se forma el complejo Ca^{2+} -CaM, calmodulina expone extensas regiones hidrofóbicas en la superficie de la molécula que interactúan directamente con el dominio que liga calmodulina (Fig 2.6b). Estas superficies de residuos hidrofóbicos se localizan en las asas que ligan calcio y en la segunda hélice del motivo mano-EF, ya que la primera hélice contribuye a la superficie con residuos ácidos como glutámico (Glu) y aspártico (Asp).

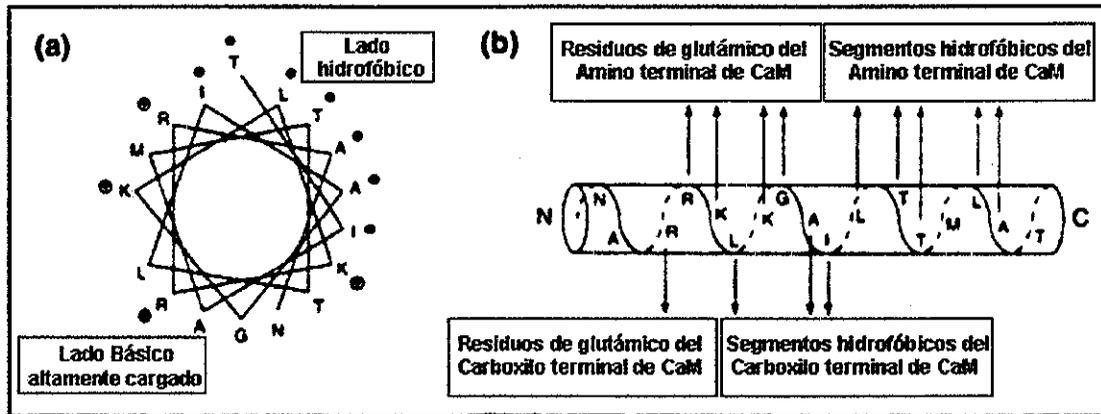


TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Fig. 2.6. Estructura tridimensional de calmodulina. (a) Estructura cristalina de calmodulina unida a calcio (b) Solución de la estructura del complejo Ca^{2+} -calmodulina-péptido. Las α -hélices son mostradas como cilindros (el péptido de la proteína blanco se muestra en azul). Las cadenas β -plegadas están indicadas en azul púrpura. Los iones de calcio se indican como esferas. (Trends in Plant Science 1998 3(8):299-303)

Los dominios de las proteínas blanco que ligan calmodulina forman α -hélices anfifílicas con aminoácidos básicos.

Se han realizado alineamientos de las secuencias de aminoácidos de un gran número de proteínas que ligan CaM y en algunos casos se han podido establecer de manera precisa los aminoácidos de los dominios de ligamiento. La mayoría de los dominios blanco de CaM son segmentos peptídicos cortos de entre 16 a 35 aminoácidos dispuestos en una estructura α -helicoidal anfifílica básica. Los aminoácidos de ésta α -hélice forman dos regiones distintas: una mitad básica en el extremo amino terminal y una mitad hidrofóbica en el extremo carboxilo terminal. La mayoría de los aminoácidos en la región básica están cargados positivamente (Arg, Lys, His) y rara vez encontramos aminoácidos con carga negativa (Glu y Asp), Fig 2.7a. Los residuos hidrofóbicos de la región carboxilo terminal están separados por cada 2 o tres vueltas de la hélice y actúan como puntos de anclaje para los aminoácidos hidrofóbicos de calmodulina, Fig 2.7b, (O'neil and DeGrado, 1995; Crivici and Ikura, 1995).



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Fig. 2.7. Proyección helicoidal del dominio de unión a CaM. a) Esta proyección helicoidal representa la secuencia de aminoácidos de un péptido que une calmodulina. El modelo muestra que los residuos básicos (+) e hidrofóbicos (•) del péptido se agrupan a los lados de la hélice. b) Las flechas señalan los puntos de interacción entre CaM y el péptido de unión a CaM. La interacción entre los residuos básicos del péptido y los residuos de glutámico de CaM se da a través de puentes salinos. La interacción hidrofóbica con la hendidura hidrofóbica del dominio carboxilo terminal de CaM. La mitad carboxilo terminal del dominio de unión a CaM carece de residuos básicos e interactúa principalmente por interacción hidrofóbica con el dominio amino terminal de CaM. Los dominios hidrofóbicos en cada mitad de los dominios de unión a CaM, que están separados por cada 2 ó 3 vueltas de la hélice, actúan como puntos de anclaje para calmodulina. La hélice central es crítica en permitir que CaM se adapte a su proteína blanco desenrollándose para ajustarse al diferente espacio (TIBS 1995, 20:38-42).

De esta forma la interacción entre CaM y sus dominios blanco es predominantemente hidrofóbica. Este mecanismo electrostático confiere a la estructura primaria de CaM una gran flexibilidad para interactuar con regiones hidrofóbicas de diversas proteínas, sin importar su secuencia de aminoácidos (Tabla 2), lo cual explica por qué calmodulina puede participar en diferentes vías de señalización en respuesta a un mismo estímulo (Rhoads and Friedberg, 1997).

Tabla 2. Proteínas vegetales reguladas por calmodulina y la estructura de sus dominios de ligamiento a calmodulina.

Proteína	Secuencia del dominio de ligamiento a CaM
Glutamato Descarboxilasa (Petunia) (Arabidopsis)	HKKTDSE VQLEMITAWKKF VEEKKK VKKSDID KQDIITGWKKF VADRKKT
Proteína tipo cadena pesada de kinesina	ISSKEMVRLKKL VAYWKEQAGKK
Homólogo de la Miosina V (MYA1)	IQRQFRTCMAR
Miosina (Arabidopsis)	ARV IQRQFRTCMARKNY RSI
Factor de Transcripción (TGA3)	LKMLVDSCLNHYANL FRMK

Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 1998. 49:697-725.

2.6 Modificaciones postraduccionales de CaM.

Metilación en la lisina de la posición 115.

Se ha puesto poca atención a las modificaciones postraduccionales de CaM y a las implicaciones que estos cambios tienen sobre el reconocimiento de proteínas que son blanco de CaM. En mamíferos se ha demostrado que las modificaciones postraduccionales de CaM tienen efectos fisiológicos muy específicos en la activación de proteínas blanco.

Prácticamente todas las calmodulinas de organismos superiores contienen un grupo metilo en el residuo ξ -lisina de la posición 115 (Fig. 2.3). La calmodulina sin este grupo metilo puede activar a la mayoría de las proteínas blanco, excepto la enzima cinasa del dinucleótido de nicotinamida (NAD cinasa), la cual es más sensible a la regulación por calmodulinas metiladas (Roberts and Harmon, 1992).

Modificación covalente por grupos fosfato en Ser, Thr y Tyr.

En células animales CaM es fosforilada por la caseína cinasa II (CaMKII) en residuos de serina (Ser81) y treonina (Thr79) de su región central, y estas fosforilaciones disminuyen la activación de la cinasa de la miosina del músculo esquelético (smMLCK), pero no la afinidad de las dos proteínas. Por el contrario, fosforilaciones similares reducen la afinidad entre CaM y fosfodiesterasas (PDE) pero las activa de la misma manera que la CaM sin fosforilar. Aparentemente estas fosforilaciones vuelven más rígida la α -hélice central de CaM que le impiden ajustarse normalmente a las proteínas blanco. La fosforilación de CaM

en el residuo tirosina 99 (Tyr99) genera una forma de CaM que la hace más afin y activa en mayor grado a la PDE de nucleótidos cíclicos.

Algunas formas de CaM fosforilada (Fosfo-CaM) se han aislado de diferentes tejidos animales; son un sustrato del receptor con actividad cinasa de tirosina y de varias cinasas de serina/treonina en células cultivadas *in vivo* e *in vitro*. Debido a que los efectos de la fosforilación parecen promover que CaM interactúe con proteínas blanco específicas, este tipo de modificación representa una forma de regulación capaz de modular la capacidad de CaM para reconocer y activar proteínas blanco dentro de una célula. Los efectos de estas modificaciones estructurales de CaM pueden constituir una vía reguladora en respuesta a señales de Ca^{2+} (James et al., 1995; Crivici and Ikura, 1996).

2.7 Calmodulina vegetal.

La calmodulina ha sido estudiada en chícharo, en maíz, en zanahoria, en cacahuete, en cebada, en calabaza, en espinaca, soya, alfalfa, arabidopsis, papa, haba y arroz. Las propiedades descritas de la calmodulina de vegetales son muy similares a las reportadas de los animales. La secuencia de nucleótidos y de aminoácidos de la calmodulina de ambos tipos de organismos son altamente idénticas. De hecho la calmodulina de ambas fuentes puede activar indistintamente proteínas vegetales o animales (Roberts y Harmon, 1992; Liu et al., 1993; Zielinski, 1998).

Localización.

A pesar de que la calmodulina se encuentra en todos los tejidos vegetales, el calcio y la calmodulina están presentes preferentemente en las zonas meristemáticas y en las puntas de crecimiento vegetal en donde se realizan los procesos fisiológicos asociados con la diferenciación y el crecimiento celular. Las concentraciones de esta proteína varían en los diferentes tejidos y fluctúan dependiendo del estado fisiológico de la célula (Ling V y Assmann S, 1992). También se ha observado que los niveles de expresión de CaM cambian durante la proliferación celular en las zonas meristemáticas (Allan and Trewavas, 1985), lo que sugiere que la expresión de CaM es regulada durante el ciclo celular. De hecho, los niveles de CaM son más altos en los meristemas de las plantas, en los tubos de polen y en la punta de los estolones o de las raíces (Dauwalder et al., 1986). En general, los mensajeros de calmodulina se acumulan en los tejidos más jóvenes de las plantas.

Subcelularmente, la calmodulina se localiza en el citoplasma de todos los tipos celulares (Dauwalder et al., 1986), pero también se ha localizado asociada a la membranas plasmática (Collinge and Trewavas, 1989), al cloroplasto (Jarret et al., 1982) y al núcleo de las células (Schuurink et al., 1996; van der Luit et al., 1999).

Participación de calmodulina en el ciclo celular.

Algunos estudios muestran que los niveles de CaM aumentan al doble durante la transición de la fase G_1 a la fase S del ciclo celular de células animales y que además también interviene en la fase de mitosis del ciclo pues durante la anafase en animales y en plantas se ha localizado en los microtúbulos del aparato mitótico (Chafouleas et al., 1984).

El control del ensamble y desensamble de los microtúbulos es importante para la formación del aparato mitótico y para el movimiento de los cromosomas durante la anafase. Algunos estudios *in vitro* en células animales han mostrado que CaM se liga a proteínas asociadas a microtúbulos (MAPS) para inducir la despolimerización de los mismos. Esta interacción es inhibida por trifluoperazina, un inhibidor de la actividad de calmodulina (Roberts and Harmon, 1992).

Investigaciones realizadas en la mitosis de los pelos del estambre de *Tradescantia* han demostrado que las concentraciones de calcio aumentan de manera gradual y transitoria durante la anafase; y la velocidad con que se mueven los cromosomas hacia los polos de la célula se puede aumentar inyectando iones de calcio. Resultados similares se han obtenido con las células del endospermo de semillas de *Haemanthus*; cuando están en interfase la calmodulina se localiza en el citosol, sin embargo, durante la anafase se detecta en microtúbulos polares y del cinetocoro. Asimismo, cuando comienza a formarse el fragmoplasto (estructura constituida por microtúbulos) entre la anafase y la telofase de la mitosis, la actina-F y la calmodulina tienen la misma localización (Vantard et al., 1985).

En general varios estudios sugieren que la calmodulina interviene en regular el movimiento de los microtúbulos durante la anafase de la mitosis a través las proteínas asociadas a microtúbulos (Dinsmore and Sloboda, 1988; Durso and Cyr, 1994; Reddy et al., 1996; Narasimhulu and Reddy, 1998; Vos et al., 2000).

2.8 Proteínas de plantas moduladas por Ca²⁺-calmodulina.

Además de su participación en la diferenciación y crecimiento vegetal, la calmodulina está implicada en procesos fisiológicos que dan respuesta a estímulos ambientales como los inducidos por la acción de la luz a través de los fitocromos, por el gravitropismo, por estímulos táctiles (Braam y Davis, 1990; Braam, 1992) y por las hormonas vegetales (Snedden y Fromm, 1998).

Conforme se han ido conociendo las proteínas de plantas dependientes de CaM, se ha contado con más información acerca de los eventos celulares que CaM podría regular (Tabla 3). Entre las que han sido caracterizadas se encuentran la NAD-cinasa, las cinasas de proteínas (PK), Ca²⁺-ATPasas, y la descarboxilasa del ácido glutámico (GAD). También se han reportado cinasas de proteínas nucleares, cinasas de la glucano sintasa, cinato: oxidoreductasa del NAD, y factores de transcripción como proteínas dependientes de calmodulina (Snedden and Fromm, 1998). Dentro de éstas, hay algunas proteínas que se encuentran únicamente en las plantas; y aunque en animales existen proteínas parecidas, en éstos no son reguladas por calmodulina. La diversidad de proteínas blanco de calmodulina en las células vegetales, implica que podría participar en la regulación de procesos celulares en distintos tipos de células y además, en diferentes condiciones fisiológicas.

2.9 Regulación de la expresión de los genes de CaM.

Al igual que en los demás eucariontes la forma principal de regulación de la expresión de CaM ocurre a nivel transcripcional. Muchas especies de plantas poseen familias multigénicas de calmodulina compuestas de genes que codifican una proteína idéntica y genes que codifican para distintas formas de la proteína. Por ejemplo, en la planta del trigo

(*Triticum aestivum*) siete genes codifican una secuencia idéntica de calmodulina TaCaM-I, y dos genes más codifican para una forma distinta TaCaM-II. Esta difiere de TaCaM-I en dos sustituciones de aminoácidos que son de tipo conservativo. Lo mismo sucede en células animales como las de la anguila, en donde tres mensajeros que varían en tamaño y en secuencia codifican una misma forma de calmodulina. En *Arabidopsis*, al menos tres genes (*CaM-2*, *CaM-3* y *CaM-5*) codifican la misma forma de calmodulina, mientras que otros genes (*CaM-1*, *CaM-4* y *CaM-6*) codifican isoformas de la proteína. La expresión de los genes que codifican estas isoformas es diferencial, pues de los cuatro solo *CaM-1* se expresa en las raíces. Además, diferentes isoformas de calmodulina podrían reconocer y modular de manera distinta a la misma proteína (Lee et al., 1997).

Por la existencia de familias multigénicas para calmodulina podría pensarse en la redundancia de la función de alguno o varios de sus genes, sin embargo, su forma de regulación y las proteínas blanco también podrían ser diferentes. Además, sin importar que algunos genes codifiquen una misma isoforma, su expresión puede ser regulada específicamente en diferentes tejidos, órganos, etapas de desarrollo, o en células específicas (Yang et al., 1998).

La presencia de intrones en los genes de CaM puede ser otro factor de regulación de la expresión de calmodulina. Un ejemplo de esta posibilidad proviene de los datos obtenidos en células de pollo; el nivel de expresión de dos mensajeros de calmodulina, uno de 1600 y otro de 1900 nucleótidos, varía en diferentes tejidos. Ambos RNAm's se producen por procesamiento diferencial de un mismo gen que contiene tres intrones.

En las plantas, todos los genes de calmodulina descritos poseen un intrón. Este interrumpe la secuencia del gen en la misma posición; sin embargo, puede variar en tamaño y en secuencia como en los genes *cam-1* y *cam-2* de la planta de arroz. El intrón de *cam-1* es de 1400 pb y el intrón de *cam-2* mide 770 pb (Poovahiah and Reddy, 1993).

En trabajos acerca de la regulación de la expresión de CaM en cultivos de protoplastos de zanahoria, se encontró que el nivel de los mensajeros de calmodulina aumenta al inicio de la fase exponencial, cuando la mayoría de la población celular se divide activamente. A pesar de que la síntesis neta de la proteína también aumenta, su nivel permanece constante por el resto del período de división celular, y aumenta hacia la fase estacionaria, en donde ya no hay división. Estos datos sugieren que durante la mitosis, el nivel de calmodulina puede mantenerse constante debido a un mecanismo de regulación postraducciona (Perera y Zielinski, 1992).

Uno de los puntos que regulan la función de calmodulina está relacionado a la metilación de su residuo Lys¹¹⁵ (lisina). Esta modificación es un mecanismo de regulación postraducciona muy interesante. En experimentos *in vitro* se ha demostrado que este residuo es un sitio específico de unión a ubiquitina, y facilita la degradación de la proteína por proteasas. Cuando este residuo está metilado no se forman los conjugados de ubiquitina y por lo tanto la proteína queda protegida de la degradación.

En las raíces de chícharo, el nivel de metilación de la Lys¹¹⁵ varía con el estado de desarrollo del tejido. Los niveles de CaM en estado metilado son mayores en la zona del tejido maduro. La región más joven cerca del ápice de la raíz, posee mayor cantidad de división celular, mayor cantidad de calmodulina no metilada, y por lo tanto, debe haber mayor recambio de la proteína. De este modo, se supone que la proteína que no está

modificada con el grupo metilo se degrada y se recambia rápidamente; pero en el estado metilado, el nivel de calmodulina es más alto en los tejidos maduros que no presentan actividad de división celular. A partir de de éstos datos, la producción de mensajeros de CaM debe estar elevada en las regiones de alta división celular y reducida en las regiones de tejido maduro. Esto se ha comprobado en cebada y en *Arabidopsis*, en donde los más altos niveles de RNAm de CaM se encuentran en los meristemos de la planta (Zielinski, 1998).

2.10 Expresión de la calmodulina en plantas transgénicas.

Los estudios de microinyección o de análisis de plantas transgénicas con calmodulina o proteínas blanco de calmodulina, han mostrado que se alteran los perfiles de desarrollo de los organelos, de las células y de los tejidos, implicando que numerosos procesos vegetales son modulados a través de estas proteínas. Por ejemplo, las plantas transgénicas de papa que sobreexpresan una isoforma específica de calmodulina tienen mayor dominancia apical, tubérculos mas largos y producen tubérculos aéreos. Sin embargo, la sobreexpresión de una isoforma de calmodulina o de su proteína blanco no siempre conduce a cambios fenotípicos, tal vez debido a que las otras isoformas, el nivel de concentración umbral de la proteína u otros mecanismos, intervienen de manera importante en afectar los procesos de desarrollo de la planta. Por ejemplo, algunas plantas transgénicas de tabaco y de cebada que sobreexpresan o disminuyen los niveles de CaM, no tienen ningún cambio fenotípico aparente. El nivel de calmodulina fue el mismo que en las plantas control, indicando que un mecanismo de regulación mantiene un nivel basal de ésta proteína en las células vegetales. Por ello, resulta interesante el hecho de que, aunque se reduzcan los niveles de RNAm de CaM en plantas transgénicas, a veces no se observan diferencias de fenotipo; lo cual puede deberse a que los niveles de la proteína se mantienen constantes a través de un mecanismo de regulación postraducciona como el de la trimetilación en el residuo de Lys¹¹⁵ (Poovahiah and Reddy, 1993; Zielinski, 1998).

Las plantas transgénicas también han permitido conocer la función de las modificaciones postraduccionales de calmodulina, o de las proteínas que unen calmodulina, en los procesos de desarrollo. La descarboxilasa del ácido glutámico (GAD), es una enzima que convierte el ácido glutámico en ácido γ -aminobutírico (GABA); calmodulina modula la función de esta proteína, regulando negativamente la producción de GABA. Se han elaborado plantas de petunia con un transgene de GAD que produce una enzima sin el dominio de unión a calmodulina. Estas plantas exhiben cambios dramáticos en el fenotipo, de tal manera que las células de la corteza del tallo no crecen y por lo tanto las plantas se quedan enanas. Sus niveles de ácido γ -aminobutírico aumentan y los de glutamato se reducen (Baum et al., 1996). Asimismo, las plantas transgénicas de tabaco que expresan una calmodulina cuyo residuo de Lys¹¹⁵ se ha sustituido por otro aminoácido, resultan enanas, producen semillas que pierden su viabilidad rápidamente, y presentan niveles de NADP y de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) por arriba de lo normal (Harding et al. 1997; Zielinski, 1998).

TABLA 3. PROTEÍNAS VEGETALES QUE UNEN CALMODULINA

Grupo Funcional	Proteína	Propiedades	Referencias
Metabolismo	Glutamato Descarboxilasa (GAD)	Cataliza la conversión de L-glutamato en ácido γ -aminobutírico (GABA); es activada por calcio/calmodulina y por varios tipos de estrés. Forma un complejo de varias subunidades que se asocia con calmodulina.	Baum et al., 1996. Snedden et al., 1996.
	Cinasa del NAD	Cataliza la conversión de NAD a NADP; activada por Calcio/calmodulina; funciona en la vía peroxidativa.	Harding et al., 1997.
	Apirasa (nucleósido trifosfatasa)	Es regulada por luz y parece estar en algún organelo. Su expresión es ectópica, afecta el metabolismo y el crecimiento en <i>Arabidopsis</i> .	Hsieh et al., 1996.
Fosforilación	Cinasa dependiente de calcio/calmodulina (CCaMK)	Posee dos dominios, un dominio de tipo visinina que le permite unir calmodulina y un dominio que impide su unión a calcio/calmodulina.	Ramachandran et al., 1997.
	Homóloga de Cinasas (MCK1)	Aislada de las raíces de maíz. Es regulada por calcio/calmodulina de otros eucariotes. Puede participar en el gravitropismo.	Lu et al., 1996.
Transporte iónico	Ca ²⁺ -ATPasa (BCAI y ACA2)	Bombas de calcio endomembrana; con un dominio autoinhibitorio que forma un complejo con calcio/calmodulina en el extremo N-terminal; su localización en endomembranas es particular de las plantas.	Malmstrom et al., 1997 Harper et al., 1998.
	Tipo Transportador (HvCBT1)	Probable transportador iónico con un dominio putativo de unión a nucleótidos cíclicos.	Schuurink et al., 1998.
Citoesqueleto	Relacionada a Kinesina (KCBP)	Proteína con un dominio motor; calmodulina actúa modulando su asociación con la tubulina; tiene alta expresión durante la mitosis; podría estar incluida en el huso acentriolar y en la formación del fragmoplasto. También podría participar en el desarrollo de tricomas.	Vos et al., 2000.
	Factor de Elongación-1 α (EF-1 α)	Se asocia con microtúbulos <i>in vitro</i> y calmodulina modula esta interacción.	Durso and Cyr, 1994.
	Miosina (MYA1)	Es similar a la clase V de las miosinas; contiene segmentos IQ repetidos con características putativas de unión a calmodulina.	Kinkema and Schiefelbein 1994.
Unión a DNA	Proteína básica con Zipper de Leucina (TGA3)	Factor de transcripción; <i>in vitro</i> interactúa con un elemento del promotor del gen de calmodulina <i>Cam-3</i> de <i>Arabidopsis</i> .	Gawienowski et al., 1996.

Trends in Plant Science, 1998, 3(8):299-304.

Referencias.

- Allan E and Trewavas A. 1985. Quantitative changes in calmodulin and NAD kinase during early cell development in the root apex of *Pisum sativum* L. *Planta*, 165:493-501.
- Baum G et al. 1996. Calmodulin binding to glutamate decarboxylase is required for regulation of glutamate and GABA metabolism and normal development in plants. *EMBO J.* 15:2988-2996.
- Bush DS. 1993. Regulation of cytosolic calcium in plants. *Plant physiol.* 103:7-13.
- Bush DS. 1995. Calcium regulation in plant cells and its role in signaling. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 46:95-122.
- Braam J and Davis RW. 1990. Rain-, wind-, and touch-induced expression of calmodulin and calmodulin-related genes in *Arabidopsis*. *Cell*, 60:357-364
- Braam J. 1992. Regulation of expression of calmodulin and calmodulin-related genes by environmental stimuli in plants. *Cell Calcium*, 13:457-463.
- Chafouleas JG. et al. 1984. Changes in calmodulin and its mRNA accompany reentry of quiescent (G0) cells into the cell cycle. *Cell*, 36: 73-81.
- Collinge M and Trewavas A. 1989. The location of calmodulin in the pea plasma membrane. *The Journal of Biological Chemistry*, 264(15):8865-8872.
- Crivici A and Ikura M. 1995. Molecular and structural basis of target recognition by calmodulin. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 24:85-116.
- Dauwalder M et al. 1986. Distribution of calmodulin pea seedlings: immunocytochemical localization in plumules and root apices. *Planta*, 168:461-470.
- Dinsmore JH and Sloboda RD. 1988. Calcium and calmodulin-dependent phosphorylation of 62 Kd protein induces microtubule depolymerization in sea urchin mitotic apparatuses. *Cell*, 53:769-780.
- Durso NA and Cyr RJ. 1994. A calmodulin-sensitive interaction between microtubules and a higher plant homolog of Elongation Factor-1 α . *Plant Cell*, 6:893-905.
- Gawienowski MC et al. 1996. Calmodulin isoforms differentially enhance the binding of cauliflower nuclear proteins and recombinant TGA3 to a region derived from the *Arabidopsis* CaM-3 promoter. *Plant Cell* 8:1067-1077.
- Harding SA et al. 1997. Transgenic tobacco expressing a foreign calmodulin gene shows an enhanced production of active oxygen species. *The EMBO Journal*, 16(6):1137-1144.
- Harper JF et al. (1998). A novel calmodulin-regulated Ca²⁺-ATPase (ACA2) from *Arabidopsis* with an N-terminal autoinhibitory domain. *J. Biol. Chem.* 273:1099-1106.
- Hsieh HL. et al. 2000. Regulation of a recombinant pea nuclear apyrase by calmodulin and casein kinase II. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1494:248-255.
- Hwang, I et al. 2000. A calcium-dependent protein kinase can inhibit a calmodulin-stimulated Ca²⁺ pump (ACA2) located in the endoplasmic reticulum of *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad. Sci. USA*, 97:6224-6229.
- Ikura M. 1996. Calcium binding and conformational response in EF-hand proteins. *Trends in Biochem. Science*, 21:14-17.
- James P et al. 1995. Calmodulin-binding domains: just two faced or multi-faceted? *Trends in Biochem. Sci.* 20:38-42.
- Jarret HW et al. 1982. Evidence that calmodulin is in the chloroplast of peas and serves a regulatory role in photosynthesis. *The Journal of Biological Chemistry*, 257(22):13795-13804.
- Kinkema M and Schiefelbein J. 1994. A myosin from a higher plant has structural similarities to class V myosins. *J. Molecular Biology*, 239:591-597.
- Klee CB. 1980. Calmodulin: structure-function relationships. In Chap. 4, pp 59-77. *In Calcium and Cell Function (Molecular Biology Series) vol. I Calmodulin.* Cheung WY (ed), Academic Press, USA.
- Lee SH et al, 1997. Differential activation of NAD kinase by plant calmodulin isoforms. The critical role of domain I. *Journal of Biological Chemistry*, 272: 9252-9259.
- Ling V and Assmann S. 1992. Cellular distribution of calmodulin and calmodulin-binding proteins in *Vicia faba* L. *Plant Physiol.* 100:970-978.
- Malmstrom S, et al. (1997). A calmodulin-stimulated Ca²⁺-ATPase from plant vacuolar membranes with a putative regulatory domain at its N-terminus. *FEBS Lett.* 400:324-328.
- Narasimhulu SB, Y Reddy ASN. 1998. Characterization of microtubule binding domains in the *Arabidopsis* kinesin-like calmodulin binding protein. *Plant Cell*, 10: 957-965.
- O'neil KT and DeGrado WF. 1995. How calmodulin binds its target: sequence-independent recognition of amphiphilic α -helices. *Trends Biochem. Sci.* 15:59-64.

- Perera IY y Zielinski RE. 1992. Synthesis and accumulation of calmodulin in suspension cultures of carrot (*Daucus carota* L.). *Plant Physiol.* 100:812-819.
- Poovahiah, BW and Reddy ASN. 1993. Calcium and signal transduction in plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* 12:185-211.
- Ramachandiran S et al. 1997. Functional domains of plant chimeric calcium/calmodulin-dependent protein kinase: regulation by autoinhibitory and visinin-like domains. *J Biochem.* 121:984-990.
- Reddy ASN et al. 1996. A plant kinesin heavy chain-like protein is a calmodulin-binding protein. *The Plant Journal*, 10(1):9-21.
- Rhoads AR and Friedberg F. 1997. Sequence motifs for calmodulin recognition. *The FASEB Journal*, 11:331-340.
- Roberts DM and Harmon AC. 1992. Calcium-modulated proteins: targets of intracellular calcium signals in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 43:375-414.
- Schuurink RC et al. 1996. Modulation of calmodulin mRNA and protein levels in barley aleurone. *Plant Physiol.* 111:371-380.
- Schuurink RC et al. 1998. Characterization of a calmodulin-binding transporter from the plasma membrane of barley aleurone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95:1944-1949.
- Snedden WA et al. 1996. Activation of a recombinant petunia glutamate decarboxylase by calcium/calmodulin or by a monoclonal antibody which recognizes the calmodulin binding domain. *Journal of Biological Chemistry*, 271:4148-4153.
- Snedden WA y Fromm H. 1998. Calmodulin, calmodulin-related proteins and plant responses to the environment. *Trends in Plant Science.* 3(8):299-303.
- Vanaman TC. 1980. Structure, function, and evolution of calmodulin. *In* Chap. 3, pp 41-58. *In* Calcium and Cell Function (Molecular Biology Series) vol. I Calmodulin. Cheung WY (ed), Academic Press, USA.
- Vantard M et al. 1985. Characterization and immunocytochemical distribution of calmodulin in higher plant endosperm cells: localization in the mitotic apparatus. *The Journal of Cell Biology*, 101:488-499.
- van der Luit AH et al. 1999. Distinct calcium signaling pathways regulate calmodulin gene expression in tobacco. *Plant Physiol.* 121:705-714.
- Vos JW et al. 2000. The kinesin-like calmodulin binding protein is differentially involved in cell division. *The Plant Cell*, 12:979-990.
- Yang T et al. 1998. Developmentally regulated organ-, tissue-, and cell-specific expression of calmodulin genes in common wheat. *Plant Mol. Biol.* 37:109-120.
- Zielinski RE. 1998. Calmodulin and calmodulin-binding proteins in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49:697-725.

CAPÍTULO 3

Auxinas

Las hormonas vegetales o fitoreguladores son sustancias orgánicas que actúan como mensajeros químicos producidos en pequeñas cantidades en una o más regiones de la planta y son transportados a otras partes de la misma en donde ejercen su acción. Regulan o modifican las respuestas biológicas asociadas con el crecimiento, la diferenciación y el desarrollo. Los grupos básicos de hormonas naturales producidas por los vegetales comprenden las auxinas, citocininas, giberelinas, ácido abscísico y etileno (Salisbury and Ross, 1985). Existen diversas auxinas que ocurren naturalmente en las plantas superiores, pero el ácido indolacético (AIA) es la auxina más importante. También se considera una molécula de tipo hormonal al factor de nodulación ya que posee propiedades morfogenéticas en las plantas aunque no sea producido por ellas (De Jong et al., 1993; Röehrig et al., 1995; Dyachok et al., 2000).

El término auxina se usa generalmente para describir sustancias químicas naturales o sintéticas que estimulan el crecimiento de coleoptilos y tallos causando un alargamiento de sus células. Aunque existen diversos tipos moleculares de auxina producidos por las plantas superiores, el ácido indolacético (AIA) es la auxina más importante (Fig 3.1). Las auxinas actúan como una señal para que se inicie la división y la diferenciación celulares durante el ciclo de vida de una planta. A nivel de la planta poseen una función muy importante en diversos aspectos del crecimiento y desarrollo vegetal, que incluyen la dominancia apical, el fototropismo, el gravitropismo, la formación del patrón vascular y, la producción de raíces y de ramas laterales.

Aunque podemos encontrar a las auxinas distribuidas por toda la planta, en general la biosíntesis de AIA se asocia con los sitios de rápida división celular. Las concentraciones más altas de auxina libre en la planta se encuentran en los meristemos apicales de los tallos, en puntas y márgenes de hojas jóvenes y en frutos en desarrollo. Aunque en más baja cantidad, el AIA también podría producirse en hojas maduras y en las puntas de las raíces. Sin embargo, la mayor cantidad de auxina en las raíces proviene de la que es sintetizada en el brote apical del tallo y se transporta hacia la punta de la raíz (acropétalmente) viajando por el cilindro vascular.

Los compuestos que poseen actividad auxínica tienden a tener una carga negativa muy fuerte a pH neutro, separada por una distancia de 5.5 Å de una carga positiva más débil en la estructura del anillo. Esta separación de cargas parece ser un requerimiento estructural esencial para su actividad como auxina. La carga negativa surge de la disociación de el protón del grupo carboxilo en pH neutro (Salisbury and Ross, 1985).

3.1 Transporte activo y transporte pasivo de auxinas.

El transporte de las auxinas es muy importante para la regulación del crecimiento y la diferenciación celulares y por lo tanto es necesario entender cómo se mueven la planta. Su transporte puede depender de la etapa de desarrollo así como del tipo de tejido o de órgano.

Parecen existir dos mecanismos básicos para su transporte en plantas superiores: 1) uno activo, que requiere de energía y que está constituido por un sistema de transporte polar unidireccional y el otro pasivo, constituido por un sistema de transporte no polar y que ocurre vía floema

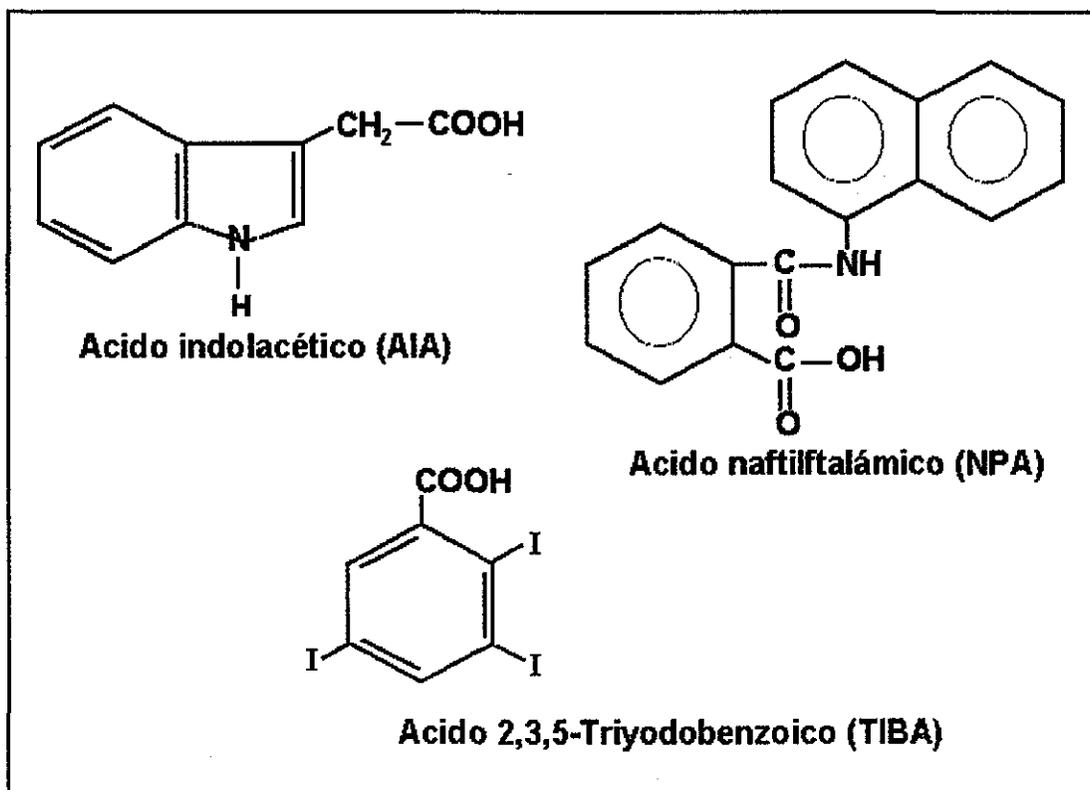


Fig. 3.1. Estructura molecular de la auxina principal, ácido indol-3-acético (AIA). Existe en todas las plantas, aunque hay otras sustancias análogas naturales y sintéticas (2,4-D) que también tienen actividad auxínica. La forma disociada de AIA y 2,4-D poseen la carga negativa del carboxilo y la fracción positiva del anillo separadas por una distancia de 5.5 Å. También se muestran las estructuras del NPA y el TIBA, dos de los más conocidos inhibidores del transporte polar de auxinas en la planta, y que han sido de mucha utilidad en el conocimiento de los procesos celulares en donde actúan las auxinas. (Salisbury and Ross 1985 Plant Physiology)

3.2 Transporte activo y transporte pasivo de auxinas.

El transporte de las auxinas es muy importante para la regulación del crecimiento y la diferenciación celulares y por lo tanto es necesario entender cómo se mueven en la planta. Su transporte puede depender de la etapa de desarrollo así como del tipo de tejido o de órgano. Parecen existir dos mecanismos básicos para su transporte en plantas superiores. 1) uno activo, que requiere de energía y que está constituido por un sistema de transporte polar unidireccional y 2) el otro pasivo, constituido por un sistema de transporte no polar y que ocurre vía floema.

3.3 Transporte polar de auxinas.

Desde hace más de 60 años se sabe que el AIA se mueve polarmente del ápice hacia la base de los coleóptilos y de los tallos (dirección basipétala). En las raíces, el movimiento de AIA se realiza hacia la punta de la raíz (dirección acropétala). Durante el transporte polar las auxinas cruzan la membrana y la pared celular, moviéndose de célula a célula, un proceso que requiere de energía. Este transporte es controlado por proteínas transportadoras específicas que incluyen acarreadores de influjo y acarreadores de eflujo, los cuales bombean la auxina hacia adentro y hacia afuera de las células, respectivamente. Durante su transporte, la auxina se mueve a una velocidad de 1 cm h^{-1} , y es un proceso independiente de la orientación del tejido y de la gravedad.

Teoría Quimiosmótica del transporte de AIA.

De acuerdo a esta teoría, las células invierten energía metabólica para mantener un gradiente de pH (más ácido en el exterior) y un potencial eléctrico a través de la membrana para dirigir el transporte polar de AIA y otros procesos. En que las ATPasas, usan la energía de la hidrólisis del ATP para mantener un gradiente de pH a través de la membrana celular. Este gradiente causa que el espacio extracelular sea ácido (pH 5.0) y que se forme un potencial eléctrico a través de la membrana (positivo en el exterior).

Como el pKa del AIA es 4.75, una cantidad significativa del AIA en un ambiente ácido (pH 5.0) estará en la forma no disociada AIAH, en donde el carboxilo del ácido indolacético está protonado. AIAH es relativamente lipofílico y atraviesa fácilmente las bicapas lipídicas.

Suponiendo que la solución en el apoplasto es ácida, IAAH se difunde del espacio extracelular a través de la membrana hacia el citosol. Como en el citosol el pH es cercano a 7.0 la mayoría del IAAH debería disociarse en auxina aniónica IAA⁻. Este anión se acumula en el interior celular pues la membrana es menos permeable al IAA⁻ que al IAAH. Una evidencia experimental a favor de esta teoría es que las células vegetales captan más AIA exógeno cuando el pH extracelular se disminuye de un valor neutro a un valor ácido.

Existen proteínas que facilitan el transporte pasivo de la auxina (acarreadores de eflujo) a favor de el gradiente de concentración de AIA⁻ a través de la membrana, y debido al potencial de membrana que en el exterior es +. Conforme las moléculas de IAA⁻ se mueven hacia la pared celular ácida, ellas se protonan a AIAH en cuya forma se difunden a la célula vecina, un proceso que se repite a lo largo de una columna de células transportadoras de auxina. El transporte polar de AIA⁻ de una célula a otra es causado por la distribución asimétrica de los acarreadores de eflujo, que se localizan únicamente en el lado basal de las células que transportan el ión (Lomax, et al., 1995; Berleth et al., 2000), Fig. 3.2.

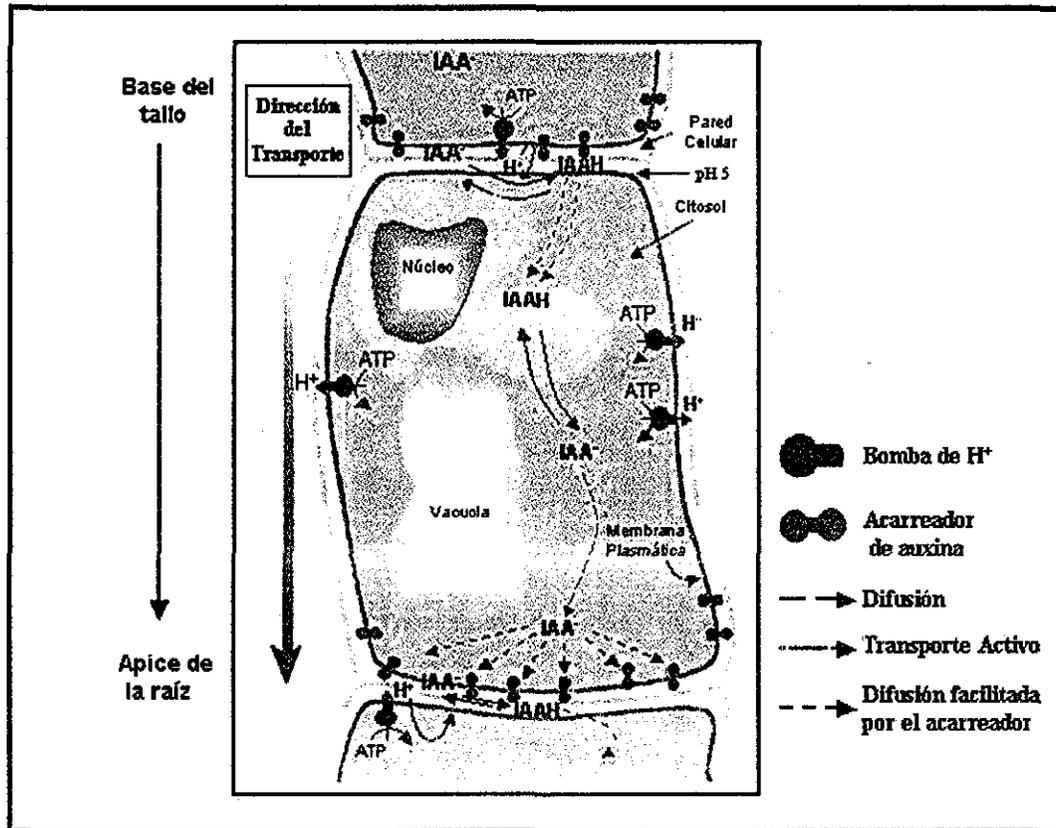


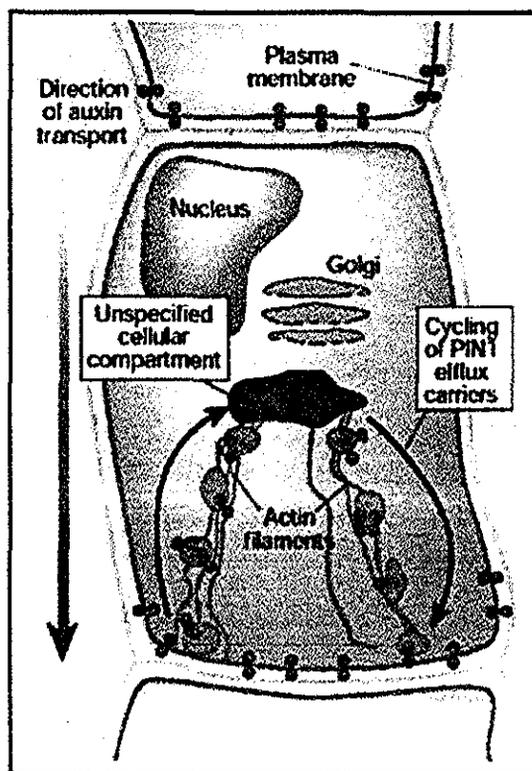
Fig. 3.2. Esquema hipotético del transporte polar de la auxinas. El modelo quimiosmótico del transporte polar de auxinas que se muestra en esta figura nos presenta una célula entre una columna de células transportadoras de auxina en el tallo. La ATPasa en la membrana plasmática usa la energía de la hidrólisis del ATP para mantener un gradiente de pH a través de la membrana. Esto causa que el espacio extracelular sea ácido (pH 5) y conduce a un potencial eléctrico (positivo en el exterior) a través de la membrana. Ambos factores intervienen en el modelo quimiosmótico del transporte de auxinas. La polaridad del flujo neto de la auxina se atribuye a la localización polar (basal) de acarreadores de eflujo de auxina en la membrana plasmática (en rojo). El influjo de auxina a la célula puede ocurrir directamente a través de la membrana plasmática (como AIAH) o facilitado por simportadores de protones (como AIA mas H⁺); AIAH se disocia bajo el pH intracelular y el eflujo de IAA⁻ dependerá estrictamente de los acarreadores de eflujo localizados basalmente. (Salisbury and Ross Plant Physiology. 1985; Curr Opin Plant Biol. 2000, 3:406-411).

El transporte polar es un mecanismo especializado para movilizar específicamente a las auxinas por toda la planta desde el tallo hasta la raíz. Promueve procesos de crecimiento y desarrollo vegetal como la dominancia apical, los tropismos y la formación del patrón de haces vasculares. Este conocimiento está basado en los efectos de los inhibidores de la síntesis de ATP, así como por otro tipo de sustancias que inhiben el transporte polar de las auxinas como el NPA y el TIBA (Fig. 3.1). Muchos compuestos sintéticos bloquean el proceso del transporte polar al inhibir el funcionamiento de los acarreadores de eflujo. Estos inhibidores han sido herramientas muy útiles para evaluar cómo ocurre el transporte polar y cómo este transporte actúa en el desarrollo vegetal (Salisbury and Ross, 1985).

Por otra parte, los flavonoides como quercetina, apigenina y camferol pueden competir específicamente con el NPA por el mismo sitio en las membranas de las células que transportan auxina, sugiriendo que estos compuestos podrían ligarse a la misma proteína. Los flavonoides pueden ser los reguladores endógenos del transporte polar de las auxinas debido a que cumplen con ciertas características que los hacen buenos candidatos para tal fin. Son moléculas naturales que se encuentran ampliamente distribuidas en todas las especies de plantas. Poseen una estructura básica que puede modificarse con una gran diversidad de grupos químicos, los cuales les confieren la capacidad de realizar distintas funciones. Su síntesis es altamente regulada por factores ambientales y por el desarrollo, factores que alteran el transporte polar de auxinas. La luz, el daño mecánico, los patógenos, las bacterias simbióticas y el desarrollo, regulan la expresión de los genes que codifican para las enzimas que controlan la biosíntesis de los flavonoides. Entre ellas la enzima chalcona sintasa (CHS). Finalmente, los flavonoides se distribuyen en los tejidos que transportan auxinas y se han localizado en los sitios de las membranas plasmáticas en donde también se unen los inhibidores del transporte polar de auxinas. (Mathesius et al., 1998b; Brown et al., 2001).

3.4 Acarreador de auxinas, mecanismo de acción de los inhibidores del transporte polar de auxinas y tráfico de vesículas.

Aunque los inhibidores del transporte polar de auxinas han sido muy utilizados para conocer las funciones del transporte polar en el crecimiento y desarrollo vegetal, el sitio exacto en la membrana plasmática o en el interior celular y el mecanismo bajo el cual actúan, se encuentra en estos momentos bajo investigación. Se ha reportado recientemente que estos inhibidores interrumpen el transporte polar interfiriendo la localización de **PIN1**, una proteína acarreadora de auxinas que mantiene una posición basal en la membrana plasmática. Sin embargo este acarreador no está estático en la membrana celular sino que sufre un rápido reciclamiento entre la membrana plasmática y un compartimento endosómico (Fig 3.3).



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Fig. 3.3. Transporte de auxinas y de la proteína PIN1 en una célula vegetal. PIN1 (rojo) actúa como un acarreador de eflujo de auxinas; el punto de vista generalmente aceptado había sido que el acarreador estaba estático en la membrana plasmática. Pero como se muestra en la figura se recicla rápidamente entre la membrana y un compartimento intracelular que aparentemente es distinto del aparato de Golgi. Los filamentos de actina intervienen en este proceso de tráfico vesicular. Los compuestos sintéticos NPA y TIBA, inhiben el tráfico de vesículas y por lo mismo el reciclamiento de PIN1. Sin embargo, aunque hasta ahora se han usado como inhibidores específicos del transporte polar de auxinas, en realidad afectan el transporte de proteínas de membrana de manera más general (Nature. 2001, 413(6854):374-375).

Este reciclamiento es llevado a cabo a través del tráfico de vesículas, un proceso sensible a la citocalasina D (despolimerizador de actina) y por lo mismo, dependiente de actina. En las raíces, los inhibidores del transporte polar como TIBA y NPA interrumpen el eflujo de auxinas de la célula sin interactuar con el acarreador mismo, pero ejercen su acción inhibiendo el reciclamiento de PIN1 así como de otras proteínas entre la membrana plasmática y el compartimento endosómico (Fig. 3.3). De tal manera que cuando interfieren el tráfico de membranas, se interrumpe el mecanismo acarreador de auxinas y por lo tanto se detiene el transporte polar afectándose el crecimiento y el desarrollo vegetal (Geldner et al., 2001)

3.5 Las auxinas y la formación de raíces laterales.

La concentración óptima de auxinas para promover el crecimiento por alargamiento celular es de 10^{-5} a 10^{-6} M, sin embargo, niveles altos de auxinas pueden inhibir el crecimiento al estimular la producción de etileno. El crecimiento de la raíz puede inhibirse por cantidades de AIA mayores a 10^{-8} M.

Niveles altos de auxinas promueven la producción de raíces laterales y de raíces adventicias. Las raíces laterales se encuentran comúnmente arriba de la zona de alargamiento celular y de la zona de pelos radiculares y se originan a partir de pequeños grupos de células que se encuentran en el periciclo. Las auxinas inducen la división de estas células que gradualmente llegan a formar un ápice de raíz y el crecimiento de esta nueva raíz lateral se da atravesando la corteza y la epidermis.

Cuando existe una herida en los tallos o en las raíces, el transporte polar de la auxina se interrumpe y el AIA⁻ tiende a acumularse inmediatamente arriba del sitio de la herida; allí promueve la formación de raíces y con ello aumenta la sobrevivencia de las partes aéreas o de las raíces de la planta ante el daño causado. Este efecto de las auxinas en la formación de las raíces ha sido muy útil en horticultura para la propagación de plantas por esquejes.

3.6 Mecanismo de acción de auxinas.

La aplicación exógena de auxinas, después de un período de 15 min, causa un incremento en la velocidad de crecimiento de las células. La pared celular de coleóptilos aislados tratados con auxinas comienza a crecer después de un intervalo de 15 a 20 min. La extrusión de protones por las ATPasas se induce en el mismo tiempo después del tratamiento de los tejidos con auxina o bien con fusicoccina, una sustancia que induce la extrusión de protones e induce crecimiento de paredes celulares.

Generalmente, se asume que al igual que las hormonas animales, las auxinas pueden inducir el crecimiento de las células actuando a través de un receptor específico. Estos receptores podrían localizarse en las membranas celulares (plasmática o del sistema de endomembranas) o podrían ser solubles.

Cualquiera que sea el receptor o los receptores de auxinas y las vías que sigan para la transducción de su señal, las auxinas pueden alterar la expresión de ciertos genes en tejidos y órganos de manera rápida y muy específica.

3.7 Regulación de la expresión de genes por auxinas.

Para entender cómo las auxinas pueden regular eventos tan distintos y tan complejos a diferentes niveles (celular, de tejidos, de órganos y de planta), debemos entender cómo se perciben sus moléculas, cómo se transduce su señal y cómo regulan la expresión de los genes. Aunque actualmente se conocen varias proteínas celulares que son receptores de auxinas, aún no se conoce la vía de transducción de señales entre el receptor y la regulación de la expresión de los genes nucleares.

La expresión de genes regulados por auxinas se puede detectar a los 2 ó 3 min después de que se aplican exógenamente. Los genes que son activados o reprimidos en este breve tiempo se conocen como genes primarios o genes tempranos que responden a auxinas. Muchos de estos genes ya se han identificado y caracterizado (Abel and Theologis, 1996).

Elementos AuxRE's en promotores de genes tempranos.

Las secuencias (G/T)GTCCCAT y TGTCTC son elementos que actúan en *cis* en el promotor de un gen temprano. También son conocidas como **AuxRE's** y pueden ser suficientes para que un gen temprano se exprese (elementos que actúan en *cis*: son secuencias reguladoras en el promotor de un gen que son reconocidas por factores de transcripción). Estos elementos se han caracterizado dentro de las regiones de respuesta a auxinas en el gen PS-IAA4/5 del chícharo y en el gen GH3 de soya, respectivamente. El gen de soya SAUR15A contiene ambos elementos dentro de la misma región. Estos dos tipos de elementos pueden encontrarse en muchos genes que responden a auxinas; sin embargo, el modo en que operan tiene que evaluarse funcionalmente en cada caso. Por ejemplo, se podrían localizar varias copias de TGTCTC en un promotor, pero hay que evaluar si de manera aislada se comportan como un elemento AuxRE's intrínsecamente activo, o si necesitan actuar en conjunto; también si necesitan cierto espaciamiento entre ellos y/o una diferente orientación dentro del promotor. Esto último le puede ofrecer al promotor mayor o menor intensidad de respuesta a las auxinas (Guilfoyle, 1998).

Elementos AuxRE's compuestos en los promotores de genes tempranos.

Los elementos que actúan en *cis* (G/T)GTCCCAT y TGTCTC pueden necesitar de otro elemento de secuencia para poder promover la expresión de un gen temprano. A este elemento diferente se le conoce como constitutivo o de acoplamiento y podría estar adyacente o traslapado con la secuencia del *cis*-acting. Los elementos de acoplamiento son constitutivos y no responden a auxinas. En conjunto, la secuencia *cis*-acting más la secuencia del elemento de acoplamiento forman un **Aux-RE's compuesto**. Los AuxRE's compuestos podrían encontrarse comúnmente en los promotores de genes primarios (Ulmasov et al., 1995).

Cuando los niveles de auxinas son bajos, en un AuxREs compuesto, el elemento TGTCTC actúa reprimiendo la expresión del elemento constitutivo. Cuando los niveles de auxinas son altos, esta represión se libera y el Aux-REs compuesto es activado (Liu et al., 1997).

Proteínas que se unen a los elementos AuxRE's.

Los **ARF's** (auxin response factors) son factores de transcripción que se ligan directamente a elementos TGTCTC. El tamaño de las proteínas ARF se encuentra entre 69 y 129 kD, y varias de ellas pueden constituir una familia dentro de una especie. La secuencia que liga al DNA se encuentra altamente conservada en la región amino terminal, sin embargo, la secuencia de los dominios carboxilo terminales (III y IV) son más variables y tienen similitud con las de los mismos dominios en las proteínas Aux/IAA.

Las proteínas Aux/IAA son codificadas por los genes tempranos.

La familia de genes Aux/IAA representa una clase de genes primarios o tempranos que responden específicamente a las auxinas y se han localizado en muchas especies de plantas. El nivel de los RNAm's producidos por estos genes aumenta después de 5 a 20 minutos de la adición de auxinas. Estos mensajeros especifican las proteínas Aux/IAA que varían entre

20 y 30 kDa, y poseen dos dominios conservados en su región amino terminal. Los dominios III y IV de su región carboxilo terminal son muy similares a los dominios III y IV de las proteínas ARF y pueden interactuar entre ellas a través de estos dominios. Por ello se propone que los factores de transcripción ARF, las proteínas Aux/IAA y los elementos de acoplamiento, interactúan para regular la expresión de los genes que responden a las auxinas (Guilfoyle, 1998).

Referencias.

- Abel S and Theologist A. 1996. Early genes and auxin action. *Plant Physiol.* 111:9-17.
- Berleth T and Mattson J. 2000. Vascular development: tracing signals along veins. *Curr. Opin. Plant Biol.* 3:406-411.
- Brown DE et al. 2001. Flavonoids act as negative regulators of auxin transport *in vivo* in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 16:524-535.
- De Jong AJ et al. 1993. *Rhizobium* lipo-oligosaccharides rescue a carrot somatic embryo variant. *Plant Cell* 5:615-620.
- Dyachok JV et al. 2000. Rhizobial Nod factors stimulate somatic embryo development in *Picea abies*. *Plant Cell Reports*, 19:290-297.
- Geldner N et al., 2001. Auxin transport inhibitors block PIN1 cycling and vesicle trafficking. *Nature*, 413(6854):425-428.
- Guilfoyle T et al. 1998. How does auxin turn on genes? *Plant Physiol.* 118: 341-347.
- Liu Z-B et al. 1997. A G-box binding protein from soybean binds to the E1 auxin response element in the soybean *GH3* promoter and contains a proline-rich repression domain. *Plant Physiol* 115:397-407.
- Lomax TL et al., 1995. Auxin Transport. In *Plant Hormones: Physiology, Biochemistry, and Molecular Biology*. Davis PJ (ed) pp 509-530. Dordrecht: kluwer Academic Publishers.
- Mathesius U et al. 1998b. Auxin transport inhibition precedes nodule formation in white clover roots and is regulated by flavonoids and derivatives of chitin oligosaccharides. *The Plant J.* 14:23-34.
- Röhrig H et al. 1995. Growth of tobacco protoplasts stimulated by synthetic lipo-oligosaccharides. *Science*, 269:841-843.
- Salisbury FB y Ross BW. 1985. Auxins: growth and tropisms. In *Plant Physiology*. Wadsworth Publishing Co.
- Ulmasov I et al. 1995. Composite structure of auxin response elements. *Plant Cell* 7:1611-1623.

ANTECEDENTES

CAPÍTULO 4

TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES EN LA INTERACCIÓN LEGUMINOSA-*Rhizobium*

4.1 Cambios en los niveles de Ca^{2+} y en la distribución iónica en los pelos radiculares, y la despolarización de su membrana plasmática.

Una de las características distintivas de la nodulación en las leguminosas es su respuesta al factor Nod. Entre las primeras respuestas al factor de nodulación se encuentran el flujo de iones a través de la membrana plasmática y una despolarización de la membrana del pelo radicular. Algunos segundos después de la adición del factor Nod (10^{-7} a 10^{-9} M) ocurre un influjo de Ca^{2+} en el citosol del pelo radicular (Cárdenas et al., 1999), seguido momentos después de un eflujo de iones Cl^- . El eflujo de Cl^- causa despolarización de la membrana (Ehrhardt et al., 1992), que es contrabalanceada por un eflujo de iones K^+ (Schultze and Kondorosi, 1998). Minutos después sucede un nuevo ordenamiento de los filamentos de actina (Cárdenas et al., 1998), se registran oscilaciones de calcio alrededor del núcleo (Ehrhardt et al., 1996) y se observa un aumento en el flujo citoplásmico hacia la punta del pelo (Lhuissier et al., 2001).

Después de dos horas de la adición del factor Nod, se reinicia el crecimiento de la punta del pelo radicular, un evento que es acompañado por un aumento de Ca^{2+} intracelular en el sitio de crecimiento. El comportamiento del Ca^{2+} no es uniforme y presenta oscilaciones que varían en tiempo y espacio en el interior del pelo. Estas diferencias en su comportamiento se interpretan como diferentes etapas de transducción de señales inducidas por el Factor Nod que incluyen respuestas primarias y secundarias al calcio. De esta manera, dependiendo de la cinética del flujo de calcio, su amplitud, su duración y su frecuencia, la señal Nod puede ser reconocida e interpretada como un código de información específica para distinguirla de otros estímulos.

El calcio también podría estar asociado al flujo citoplásmico y a la exocitosis que depositan material de pared celular nuevo en la punta del pelo. Los cambios en el Ca^{2+} intracelular, disparan cascadas de transducción de señales que finalizan con la expresión de genes específicos involucrados en el programa que conduce al desarrollo del nódulo. Al respecto, sabemos que la expresión de varios genes de nodulinas es inducida por el factor Nod, sin embargo, la conexión entre las respuestas rápidas y la expresión de estos genes aún no se conoce.

4.2 Cambios morfológicos en el pelo radicular.

Entre 5 y 30 min después de que ocurren los flujos y las oscilaciones iónicas, los pelos radiculares comienzan a deformarse y a enrollarse. La deformación se inicia con la hidratación de la punta del pelo una hora después de la inoculación, y después de 3.0 hr, se

nota un nuevo crecimiento del pelo con la punta deformada. Tiempo después, debajo de los pelos deformados se observan las primeras divisiones celulares en la corteza de la raíz previas a la formación del primordio nodular (Brewin, 1991; Franssen et al., 1992; Spink, 1995; Gehring et al., 1997; Timmers, 2000; Gage and Margolin, 2000; van Spronsen et al., 2001). Para obtener estas respuestas no es necesario que el factor Nod tenga presente el ácido graso y el grupo o-acetilado en el extremo no reductor en el caso de *Vicia sativa*. Sin embargo, la formación del hilo de infección en los pelos es una respuesta muy específica que requiere de la presencia de la bacteria y que el factor de nodulación posea el ácido graso y el grupo acetilo en su extremo no reductor.

4.3 Percepción del factor Nod en la raíz de las leguminosas.

La característica que hace especialmente diferente la nodulación de las leguminosas de la interacción con otros microorganismos, es su respuesta al factor de nodulación. Sin la capacidad de producción natural de los factores Nod las bacterias no inducen la nodulación y, las plantas mutantes afectadas en la percepción del factor o la transducción de su señal, son Nod⁻.

Debido a que los factores Nod actúan en muy bajas concentraciones con alta especificidad, se postula que algunos receptores específicos localizados en la membrana plasmática del pelo radicular son los primeros en percibir la señal. A su vez, estos receptores de alta afinidad deberían abrir canales de Ca²⁺ y permitir los flujos de calcio que se han registrado como la respuesta más temprana de la planta al factor Nod. La decodificación de las diferentes fluctuaciones del calcio deberían activar factores de transcripción de manera diferencial (Miklashevichs et al., 2001), Tabla 4. La purificación y caracterización de las proteínas que ligan directamente al factor de nodulación será esencial para un mejor entendimiento a nivel molecular del intercambio de señales que conduce a la simbiosis entre las leguminosas y las rhizobiaceae.

NFSB1 y NFSB2

Se han identificado dos sitios en alfalfa que son afines a uno de los factores producidos por *R. meliloti* (factor NodRM-IV). De éstos sitios, conocidos como NFSB1 y NFSB2, NFSB2 cumple con ciertos requisitos para ser un receptor específico: saturable, reversible y de alta afinidad por el ligando. NFSB2 se ha localizado en la membranas plasmáticas de *Medicago sativa* y de *Phaseolus vulgaris* (Hirsch et al., 2001; Miklashevichs et al., 2001); sin embargo, este receptor no discrimina entre factores Nod sulfatados y no sulfatados. Esta falta de especificidad por el grupo sulfato lo descarta como el receptor del factor de nodulación, sin embargo, tiene alta afinidad por el factor Nod (4 nM) (Cullimore et al., 2001).

LPN

La proteína llamada lectina nucleótido fosfohidrolasa (LPN), se aisló por primera vez de las raíces de la leguminosa *Dolichus biflorus* y fue reportada inicialmente como una lectina que se unía al factor de nodulación. Actualmente, se sabe que pertenece a una superfamilia de ATPasas con actividad de apirasa (pifosfatasa). Sin embargo, puede aislarse de las raíces de soya con columnas de afinidad para lectinas. Con este

procedimiento también se han aislado proteínas relacionadas a LPN de alfalfa y de chícharo. En *D. biflorus* se localiza en la superficie de las raíces, particularmente en la punta de los pelos radiculares, pero puede localizarse en fracciones de membrana; el factor Nod se une con alta afinidad a esta proteína e induce la actividad apirasa. Los anticuerpos elaborados contra esta proteína inhiben la deformación del pelo radicular y la nodulación. Sin embargo, aún no es claro cómo su actividad ATPasa extracelular participa en la transducción de señales del factor Nod y cómo la LNP podría ubicarse dentro del esquema de percepción del factor Nod (Cullimore et al., 2001).

Por otro lado, el uso de plantas mutantes Nod⁻ ha conducido a identificar proteínas o *locus* importantes que parecen estar incluidos en la percepción o en la transducción de la señal del factor Nod. A partir de una mutante Nod⁻ (MN1008) de *Medicago truncatula* que no presenta oscilaciones de calcio ni deformación del pelo radicular, Kiss et al. (1998), clonaron el gen *NORK* (receptor de nódulo con actividad de cinasa). Este gen codifica para una proteína cinasa rica en leucina (Leu) que podría ser el receptor del factor Nod o podría interactuar con la proteína receptora del factor. Este mismo gen fue mapeado como los loci *sym19* (chícharo) y *Dmi2* (alfalfa) (Schneider et al. 1999) y fue el mismo *locus* alterado en las mutantes Nod⁻ Myc⁻ de diferentes especies bloqueadas en un paso previo a las oscilaciones de calcio en el pelo radicular (*Pssym18*, *Mtdmi1*) (Hirsch et al., 2001).

En un par de artículos publicados recientemente en la revista Nature, se comprobó la identidad del gen *NORK* y del gen *SYMRK* (receptor de simbiosis tipo cinasa), como la secuencia que codifica un componente indispensable de la vía de señalización necesaria para percibir y transducir la señal del factor Nod en *Medicago truncatula* y en *Lotus japonicus*, respectivamente. Este gen se ha detectado en las leguminosas de los géneros *Sesbania*, *Cassia*, *Trifolium*, *Desmodium*, *Vicia*, *Melilotus*, *Vigna*, *Macroptilium*, *Lotus*, *Glycine*, *Pisum*, *Phaseolus* y *Medicago* (Endre et al., 2002; Stracker et al., 2002). El producto de los genes *NORK* y *SYMRK*, pertenece a una familia de receptores presente en animales y en plantas, que contienen un motivo LRR (tres repeticiones ricas en leucina) en un dominio extracelular, a través del cual interactúan con otras proteínas. En animales, conforman un grupo de proteínas conocidas como receptores de tipo Toll que funcionan en el sistema inmune innato. En las plantas, pertenecen a una subfamilia de receptores con dominios serina/treonina cinasa que transducen señales al interior celular. Varios de éstos miembros funcionan como receptores de los productos de los genes de avirulencia producidos por microbios patógenos, o en el desarrollo vegetal. Además, el fenotipo Nod⁻ Myc⁻ de las mutantes sugiere que este receptor también es esencial para el reconocimiento de la asociación simbiótica entre leguminosas y hongos micorrízicos arbusculares; lo cual significa, que los programas genéticos de ambos tipos de simbiosis convergen a través de un componente común, que pudo ser adquirido en la evolución de la simbiosis fijadora de nitrógeno a partir de la simbiosis con micorrizas arbusculares (Stracke et al., 2002).

Podría asumirse que las variaciones en la secuencia del dominio extracelular del receptor en distintas leguminosas, expliquen la especificidad por el reconocimiento de las diferentes estructuras del factor Nod; Sin embargo, debido a que los motivos LRR interactúan con proteínas, podría ser que los factores Nod inicialmente sean reconocidos por una proteína distinta de *NORK* o *SYMRK*. De hecho, otros candidatos a receptor del factor Nod son *DM11*, *SYM1* o *SYM5* y *SYM8* o *SYM10* (Endre et al., 2002) mencionados en la tabla siguiente.

Tabla 4. Algunos Candidatos a Receptores de Factores Nod.

Proteína o gen candidato	especie y expresión	Localización subcelular	Carácterticas de ligamiento del factor Nod		
			Afinidad	Reconocimiento del extremo reductor	Reconocimiento del extremo no reductor
NFBS1	Raíces de <i>Medicago</i> y tomate	Desconocida (fracción de 3000 xg)	86 nM	Muy poca selectividad	Muy poca selectividad
NFSB2	Cultivos cel. <i>Medicago</i> y <i>Phaseolus</i>	Membrana Plasmática	4 nM	Selectividad parcial	Selectividad para ciertas sustituciones
LPN	<i>Dolichos</i> , Soya, <i>Medicago</i> Chícharo	Extracelular Membrana Plasmática	Desconocida	Selectividad parcial por factores Nod	
<i>DM11</i>	<i>M. truncatula</i>	Desconocida	Desconocida	Desconocida	Desconocida
<i>SYM1/SYM5</i>	<i>Lotus japonicus</i>	Desconocida	Desconocida	Desconocida	Desconocida
<i>SYM2</i>	Raíces de Chícharo	Desconocida	Desconocida	Cierta selectividad	Desconocida pero quizá alta selectividad
<i>nn1</i> (NORK)	Raíces de <i>Medicago</i>	Membrana Plasmática	Desconocida	Desconocida	Desconocida
<i>SYM8</i>	<i>P. sativum</i>	Desconocida	Desconocida	Desconocida	Desconocida
<i>SYM10</i> Aislado de Plantas mutantes Nod ⁻ Myc ⁺ no producen oscilaciones de Ca ²⁺	Raíces de Chícharo	Desconocida	Desconocida	Desconocida	Desconocida

TRENDS in Plant Science, 6(1).Enero, 2001.

Tabla 4. NFBS1, sitio 1 de ligamiento al factor Nod; NFSB2, sitio 2 de ligamiento al factor Nod; LNP, Lectina nucleotido fosfohidrolasa; SYM2, simbiosis 2 gen que permite la infección de rizobios cuyo factor Nod posee una estructura específica; SYM10, las mutaciones en este gene producen plantas Nod-Myc⁺ y están bloqueadas en la respuesta temprana al factor Nod; nn1, gen que se caracterizó de una línea mutante Nod-Myc⁻, codifica un receptor-cinasa con repeticiones ricas en leucina.

En base a lo anterior, es posible que los factores Nod posean diferentes proteínas de reconocimiento que puedan estar relacionadas a diferentes funciones como la formación del hilo de infección, la expresión de nodulinas tempranas, el inicio de la división celular, y la formación del primordio.

Referencias.

- Brewin NJ. 1991. Development of the legume root nodule. *Annu. Rev. Cell Biol.* 7:191-226.
- Cárdenas L et al. 1998. Rearrangement of actin microfilaments in plant root hairs responding to *Rhizobium etli* nodulation signals. *Plant Physiol.* 116:871-877.
- Cárdenas L et al. 1999. *Rhizobium* Nod factors induce increases in intracellular free calcium influxes in bean root hairs. *The Plant Journal* 19:347-352.
- Cullimore JV et al. 2001. Perception of lipo-chitooligosaccharidic Nod factors in legumes. *Trends in Plant Science*, 6(1):24-30.
- Ehrhardt DW et al. 1992. Depolarization of alfalfa root hair membrane potential by *Rhizobium meliloti* Nod factors. *Science*, 256:998-1000.
- Ehrhardt DW et al. 1996. Calcium spiking in plant root hairs responding to *Rhizobium* nodulation signals. *Cell* 85: 673-681.
- Endre G et al. 2002. A receptor kinase gene regulating symbiotic nodule development. *Nature*, 417(6892):962-966.
- Franssen HJ et al. 1992. Developmental aspects of the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Plant Molecular Biology*. 19: 89-107.
- Gage DJ y Margolin W. 2000. Hanging by a thread: invasion of legume plants by rhizobia. *Current Opinion in Microbiology*, 3:613-617.
- Gehring CA et al. 1997. Rapid, plateau-like increases in intracellular free calcium are associated with Nod-factor-induced root-hair deformation. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 10(7):791-802
- Hirsch AM et al. 2001. What makes the rhizobia-legume symbiosis so special? *Plant Physiology*, 127:1484-1492.
- Lhuissier FGP et al. 2001. Time course of cell biological events evoked in legume root hairs by *Rhizobium* Nod factors: state of the art. *Annals of Botany*, 87:289-302.
- Miklashevichs E et al. 2001. Perception and signal transduction of rhizobial Nod factors. *Crit. Rev. Plant Sciences*, 20(4):373-394
- Schneider A et al. 1999. Genetic mapping and functional analysis of a nodulation-defective mutant (Sym19) of pea (*Pisum sativum* L.). *Mol. Gen. Genet.* 262:1-11
- Spaink HP. 1995. The molecular basis of infection and nodulation by rhizobia: the ins and outs of symbiogenesis. *Annu. Rev. Phytopathol.* 33:345-68
- Stracke S et al. 2002. A plant receptor-like kinase required for both bacterial and fungal symbiosis. *Nature*, 417(6892):959-962
- Timmers ACJ. 2000. Infection of root hairs by rhizobia: infection thread development with emphasis on the microtubular cytoskeleton. *Chapter 14*, 223-239 pp. *In Root Hairs, Cell and Molecular Biology*. Ridge RW y Emons AMC (eds). Springer Verlag, Tokyo.
- van Spronsen PCV et al. 2001. Cell biological changes of outer cortical root cells in early determinate nodulation. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 14(7):839-847.

CAPITULO 5

FUNCIÓN DE LAS AUXINAS EN LA DIFERENCIACIÓN VASCULAR

5.1 Auxinas y la diferenciación de haces vasculares.

Revisando la asociación de auxinas con los haces vasculares, y analizando su probable función en la diferenciación celular, encontramos en la literatura, que las auxinas promueven la correcta formación del patrón de diferenciación de los tejidos vasculares. Funcionan como una guía organizando filas o líneas celulares en posiciones definidas en la planta para originar los haces vasculares, promueven la continuidad vascular y especifican el patrón de venación de las hojas.

Aunque los mecanismos moleculares que controlan la diferenciación vascular durante el desarrollo de los órganos vegetales no se conocen bien, sí se sabe muy bien que las auxinas participan en este proceso. El nivel de concentración y la distribución de las auxinas durante el desarrollo contribuye a especificar los sitios de diferenciación vascular de los órganos vegetales (Mattson et al., 1999).

La evidencia experimental sugiere que el transporte polar del AIA marca una dirección en las células que responden a auxinas. El transporte de AIA sirve como una señal de orientación que guía la organización del patrón vascular durante el desarrollo de los órganos. El flujo apical-basal de auxinas señala cuáles son las células que deben diferenciarse en haces vasculares y promueve constantemente la diferenciación vascular para que el xilema tenga continuidad entre todos los órganos de la planta (Berleth et al., 2000).

5.2 Diferenciación de haces vasculares.

El xilema presente en los haces vasculares incluye parénquima de xilema, fibras, vasos y elementos traqueales. Los vasos y las traqueidas colectivamente se conocen como elementos traqueales y forman una serie de tubos interconectados para transportar agua y sales minerales. Se pueden distinguir fácilmente en el protoxilema porque sus paredes celulares toman la forma de anillo, de espiral o de retículo. En las plantas se forman a partir de las células del procambium y del cambium vascular. Sin embargo, cuando los tejidos de la planta sufren daño mecánico, cuando forman raíces laterales, o incluso en las interacciones planta-patógeno, las células que ya están diferenciadas se desdiferencian de nuevo para volver a diferenciarse y formar tejido vascular que establezca la conexión con el tejido transportador de agua.

La formación de elementos traqueales se caracteriza por una serie de eventos. Entre ellos, los microtúbulos toman una orientación transversal, marcando la posición futura del engrosamiento de las paredes secundarias por deposición de celulosa, de proteínas estructurales y de xilanos. Los microtúbulos dirigen el tráfico de vesículas provenientes del Aparato de Golgi que transportan las proteínas y los polisacáridos de pared celular hacia los sitios de la membrana plasmática en donde vierten su contenido para formar la placa celular. Los microfilamentos de actina participan dándole orientación a los microtúbulos,

por lo tanto los sitios de deposición de material para la formación de la pared secundaria de los elementos vasculares traqueales dependen del arreglo de estos elementos del citoesqueleto.

5.3 Auxinas e inhibidores del transporte de auxinas en la diferenciación de haces vasculares.

La inhibición artificial del transporte de auxinas ha contribuido a definir la función del flujo de auxinas en la formación del patrón vascular de las plantas. Los inhibidores del transporte polar de auxinas, ácido NPA y TIBA causan alteraciones en la forma de los órganos y en el patrón de vascularización. En *Arabidopsis* la aplicación de estos inhibidores provoca que el patrón normal de venación de la hoja se altere dramáticamente, que las raíces primarias produzcan menos raíces laterales, y que el cilindro vascular llegue a deformarse totalmente.

Cuando el transporte polar se interrumpe, se produce una acumulación local y una difusión lateral de las auxinas en el tejido. Es decir, se pierde la estrecha zona de células que debería diferenciarse, con la consecuente ampliación de la zona vascular. Por lo tanto, en los tallos y en las raíces, la inhibición del transporte de auxinas puede cambiar la morfología del órgano (los haces vasculares en el tallo y el cilindro central en las raíces).

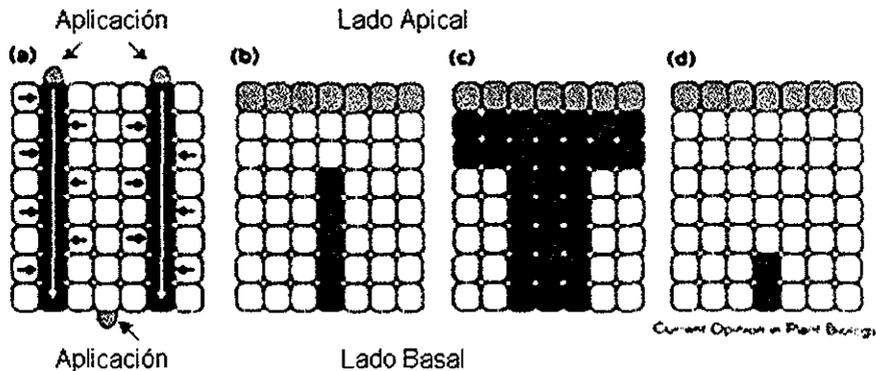
Los estudios sobre cómo responde el sistema vascular cuando se inhibe el transporte de auxinas en *Arabidopsis* (Mattson et al., 1999) han permitido entender la función del flujo de auxinas en la diferenciación vascular.

Se puede explicar este proceso de la siguiente manera: la planta tiene la necesidad de transportar las auxinas para crear la vascularización; sin embargo, este flujo tiene que transcurrir por zonas celulares muy restringidas; esto es, las auxinas deben de estar siendo drenadas eficiente y constantemente hacia una delgada fila celular o "canal" para mantener el resto del tejido en una concentración por debajo del umbral de vascularización (Fig. 5.1).

Cuando se inhibe el transporte de las auxinas a través de estos canales, su flujo se detiene "obligándolas" a acumularse en las células de la vecindad inmediata; "cayendo" ahora sí, éstas células en una concentración de auxinas que induciría su diferenciación vascular; y se sumarían a las células de los canales preestablecidos para formar canales más anchos en otros lugares. De este modo, se formarían hileras celulares más amplias y en mayor número en proceso de diferenciación. Cuando esto ocurre, la morfología normal de los órganos se altera debido a que la planta tiene que seguir la misión de no interrumpir la continuidad de su eje vascular (este cambio se vuelve dramático cuando el flujo se detiene cerca de las fuentes de síntesis de auxinas en la planta).

Lo anterior significa que si la inhibición del transporte de auxinas se prolonga mucho tiempo, el órgano podría retrasar su formación, no completarse, deformarse o dar paso a nuevos patrones de vascularización. Un programa con un control fino de este proceso podría ser el que siga la planta para establecer el patrón de vascularización de un nuevo órgano.

**Rutas de vascularización mantenidas por canales de auxina
y alteraciones debidas a la reducción de su transporte**



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Fig. 5.1 Señalización en la formación de cadenas vasculares. a) Una cadena vascular puede desarrollarse en respuesta a la auxina aplicada localmente (gotas en gris). Dos sitios apicales de aplicación de auxina indican que las células pueden responder equivalentemente a la señal. Las flechas indican que hay un mecanismo celular que restringe la señal en ciertas direcciones. La diferenciación vascular ocurrirá en el lado basal a la aplicación de la auxina y permanecerá restringida a bandas estrechas de células. No se observa respuesta vascular cuando la aplicación se hace por el lado basal (a). El flujo predominante de las auxinas en las plantas es del ápice a la base. La restricción a zonas celulares estrechas podría ser controlada por mecanismos de regulación retroactiva que aumentan la conductividad de la auxina por rutas de transporte “preferidas por la hormona” (hipótesis de los “canales de auxina”) Alteraciones en los patrones de diferenciación vascular, (b-d): condición normal (b), reducción del transporte c), y percepción reducida de la auxina (d). La acumulación de la auxina asociada a una reducción de su transporte polar (c), induce la diferenciación vascular en un lugar más cercano a la fuente de la auxina, mientras que el daño en el mecanismo de percepción de la auxina, restringe la diferenciación vascular a sitios más pequeños y más alejados de la fuente (d). (Current Opinion in Plant Biology. 2000 3:406-411)

5.4 Auxinas y calmodulina.

Existen reportes recientes en la literatura en donde se relaciona directamente la participación de calmodulina en regular la transducción de señales mediadas por auxinas. Hay varias evidencias de que los niveles de mensajeros de calmodulina son afectados por esta hormona (Jena et al., 1989; Botella and Arteca, 1994; Okamoto et al., 1995). También Yang and Poovaiah (2000), encontraron que las auxinas inducen la expresión de una proteína dependiente de calcio/calmodulina (ZmSAUR1) que regula el crecimiento celular en *Zea mays*. Esta proteína es codificada por un gen que contiene elementos de respuesta a auxinas (SAUR's), los cuales también se han encontrado en soya, *Vigna*, *Arabidopsis* y

manzana. La existencia de homólogos a *ZmSAURI* en estas especies significa que calmodulina podría estar involucrada en la modulación de la acción de las auxinas a través de la regulación de estas proteínas. Recordemos de la sección 3.6 que los genes *SAUR* codifican para proteínas AUX/IAA, las cuales conforman una familia de reguladores transcripcionales, y se ha sugerido que las auxinas promueven la degradación diferencial de estos factores de transcripción (a través de la vía ubiquitina-proteasoma) para dar diversidad en la respuesta genética a los estímulos ambientales (Gray et al., 2001).

5.5 Auxinas, CaM e inhibidores de CaM en la diferenciación de haces vasculares de la raíz.

Siguiendo la hipótesis de que las auxinas fluyen dentro de ciertos canales celulares, es probable que el nivel de su concentración en estas células con respecto a las del resto del tejido, se mantiene en cierto balance con relación a las citocininas. Sin embargo, si la concentración de auxinas cambia, se puede invertir esta relación en una u otra dirección del balance, de tal forma que se puede dar lugar a ciertos procesos de diferenciación celular.

Los cultivos celulares de *Zinnia* han sido un modelo en donde se pueden estudiar los procesos de formación de haces vasculares. Con el tratamiento de reguladores vegetales *in vivo*, una gran variedad de tipos celulares puede inducirse a entrar en un programa de eventos que incluyen rearrreglos del citoesqueleto, formación de paredes secundarias, lignificación y muerte celular programada para formar un tubo conductor de agua. Células frescas, recién aisladas del mesófilo de las hojas de la planta *Zinnia elegans* tratadas con auxinas y citocininas, tienen la capacidad de formar traqueidas; también cierto balance de auxinas/citocininas en el medio de cultivo puede inducir la diferenciación de las células del mesófilo en elementos traqueales (Fukuda 1997; McCann MC, 1997).

El Ca^{2+} se ha involucrado en la regulación de la formación de la pared secundaria y su nivel se eleva cerca de las membranas durante la diferenciación celular. Los bloqueadores de canales de calcio así como los antagonistas de la acción de calmodulina inhiben el proceso de diferenciación vascular.

Al estudiar la diferenciación de cultivos celulares de *Zinia elegans*, Roberts and Haigles (1989, 1990) y Kobayashi and Fukuda (1994), encontraron que Ca^{2+} y Calmodulina desempeñan un papel importante durante la diferenciación de los elementos vasculares (vasos y traqueidas). Calmodulina participa en el proceso celular que antecede a la formación de las paredes secundarias; en particular, el engrosamiento de la pared secundaria correlaciona con un aumento en los niveles de CaM y de varias de las proteínas que se asocian a calmodulina. El nivel de concentración de dos de éstas proteínas aumenta notablemente y de manera sincronizada con la diferenciación de los elementos vasculares, un aumento que depende de la presencia de citocininas y de auxinas en el medio.

Estos investigadores también observaron que calmodulina puede interactuar con los elementos del citoesqueleto participando conjuntamente en el proceso de diferenciación de las células en elementos traqueales. Antes de que se formen las paredes secundarias, los microtúbulos cambian su orientación longitudinal a transversal y los filamentos de actina comienzan a agregarse. Aparentemente los filamentos de actina ayudan a reorganizar la

posición de los microtúbulos localizándose entre los haces de microtúbulos que subyacen a las bandas de paredes secundarias de vasos y traqueidas. La distribución celular que toman los filamentos de actina en este momento es muy similar a la distribución de calmodulina y cuando se adicionan inhibidores de la acción de calmodulina también se inhibe la formación de los paquetes de filamentos de actina. Ello sugiere que CaM y las proteínas asociadas a CaM participan en la formación de los agregados de filamentos de actina y por lo tanto, en la formación del patrón de las paredes secundarias (Kobayashi y Fukuda, 1994).

A partir de esta información podemos resaltar que los procesos de diferenciación celular de tipo vascular en las plantas requieren del transporte polar de auxinas, de modificaciones del balance hormonal auxina/citocinina, de rearrreglos en los elementos de citoesqueleto y de la acción de calmodulina.

Referencias.

- Botella JR y Arteca RN. 1994. Differential expression of two calmodulin genes in response to physical and chemical stimuli. *Plant Mol. Biol.* 24:757-766.
- Berleth T y Mattson J. 2000. Vascular development: tracing signals along veins. *Current Opinion in Plant Biology*, 3:406-411.
- Fukuda, H. 1997. Tracheary element differentiation. *Plant Cell*, 9:1147-1156.
- Gray WM et al. 2001. Auxin regulates SCF^{TIR1}-dependent degradation of AUX/IAA proteins. *Nature* 414:271-276.
- Jena PK et al. 1989. Molecular cloning and sequencing of a cDNA for plant calmodulin: signal-induced changes in the expression of calmodulin. *PNAS*, 86: 3644-3648.
- Kobayashi H y Fukuda H 1994. Involvement of calmodulin and calmodulin-binding proteins in the differentiation of tracheary elements in *Zinnia* cells. *Planta*, 194:388-394.
- Mattson J et al. 1999. Response of plant vascular systems to auxin transport inhibition. *Development*, 126:2979-2991.
- McCann MC, 1997. Tracheary element formation: building up to a dead end. *Trends in Plant Science*, 2(9):333-338.
- Roberts AW y Haigler CH. 1990. Tracheary-element differentiation in suspension-cultured cells of *Zinnia* requires uptake of extracellular Ca²⁺. Experiments with calcium-channel blocker and calmodulin inhibitors. *Planta*, 180:502-509.
- Yang T y Poovaiah BW. 2000. Molecular biochemical evidence for the involvement of calcium/calmodulin in auxin action. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(5):3137-3143.

CAPÍTULO 6

FACTOR NOD, BALANCE AUXINAS/CITOCININAS, INHIBICIÓN DEL TRANSPORTE POLAR DE AUXINAS Y FORMACIÓN DEL PRIMORDIO NODULAR

Lo interesante de los hechos mencionados en el capítulo anterior es que también hay evidencias de que cierto balance de auxinas/citocininas es necesario para inducir la formación del primordio nodular en la simbiosis leguminosas-*Rhizobium* (Coenen and Lomax, 1997).

6.1 Acción de auxinas, citocininas y ENOD40 en la formación del primordio nodular.

Ante el resultado de que los inhibidores del transporte polar de auxinas y las citocininas (Hirsch AM, 1989), podían producir estructuras tipo nódulos (pseudonódulos), se tuvo la idea de que los factores Nod usaban mecanismos de transducción de señales hormonales para inducir la formación de los nódulos. Esta idea se reforzó con el resultado de que los factores Nod inducían divisiones celulares en protoplastos de hoja de tabaco sustituyendo la adición de auxina y citocinina al medio (Röehrig, 1995). Los factores Nod agregados a los protoplastos indujeron la expresión del gene *axil* (Cooper and Long, 1994) que normalmente es inducido por auxinas y su función se asocia con el control de la división celular.

De esta manera, se relacionó al factor Nod y a las auxinas y citocininas con el inicio de las divisiones corticales que dan lugar a la formación del primordio del nódulo.

Cambio en el balance auxinas/citocininas.

De acuerdo a los hechos anteriores se propuso que el mecanismo por el cual los factores Nod inducen las divisiones corticales, es el cambio en el balance de la concentración hormonal auxina/citocinina.

Esta hipótesis se basa en una serie de hechos experimentales que demuestran que la inducción del primordio del nódulo es precedida por un cambio en la fisiología de las hormonas: a) los factores Nod modulan el transporte de auxinas y perturban el balance hormonal durante la formación del nódulo, cambiando la distribución de las auxinas en los tejidos de la raíz; b) la manipulación exógena de los niveles de citocininas y de auxinas en ausencia de bacterias conduce a la formación de pseudonódulos; c) los inhibidores del transporte polar de auxinas inducen la formación de estructuras tipo nódulo en donde se expresan los genes ENOD12 y ENOD 40; d) los pseudonódulos inducidos por citocininas y por el factor Nod tienen patrones similares de división celular, de acumulación de amiloplastos y de expresión de genes.

Además de los cambios anteriores, también varían los niveles de expresión de los genes de la enzima chalcona sintasa (CHS) y por ende, la concentración de los flavonoides (inhibidores endógenos del transporte polar de auxinas) que también se acumulan específicamente en las células de la corteza de la raíz (Mathesius et al., 2000).

Actualmente se piensa que el péptido codificado por el gen ENOD40 interviene en cambiar el balance auxina/citocinina en las células de la corteza de la raíz en donde su expresión precede a las primeras divisiones corticales (Minami et al., 1996; Charon et al., 1999)

6.2 Factor Nod, inhibición del transporte polar de auxinas e inicio del primordio nodular.

Recientemente se ha demostrado que una reducción del transporte de auxinas precede a las primeras divisiones corticales que conducen a la formación del primordio del nódulo (Mathesius, 1998b; Boot et al., 1999), y que los flavonoides regulan los efectos de los factores de nodulación sobre el balance hormonal (Mathesius, 1998b).

Experimentos realizados en la planta de trébol mostraron que la inoculación con la bacteria *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* o con factores Nod purificados producidos por este organismo, reducen la expresión de un promotor que responde a auxinas (*GH3*) fusionado al gen reportero *gusA*. La expresión de *GH3::gusA* se inhibe en la zona de los haces vasculares entre el sitio de inoculación y la punta de la raíz, situación que puede prolongarse por mas de 30 h. El mismo efecto fue causado por el inhibidor sintético del transporte polar de auxinas, NPA. Pasado el efecto de la inhibición de la expresión de *GH3::gusA* en los haces vasculares, a las 50 h su expresión se localiza en las células de la corteza en división y a las 70 h cuando el primordio nodular comienza a diferenciarse, *GH3::gusA* se detecta en la base y en la periferia del nódulo (Mathesius et al., 1998b).

También en *Vicia sativa* los factores Nod inhiben el transporte polar de auxinas durante mas de 48 h antes de iniciar la formación del primordio. El transporte de auxinas se inhibe en las células de los haces vasculares y esta reducción es del mismo orden de magnitud que la inhibición causada con NPA. También en raíces de soya tratadas con inhibidores del transporte polar, los transcritos de *GH3* se dejan de detectar cuando normalmente se acumulan alrededor de los polos del xilema.

La conclusión de los datos anteriores es que se requiere inhibir transitoriamente el transporte polar de auxinas en las raíces inoculadas con *Rhizobium* para permitir la formación del primordio. Este efecto es inducido por el factor Nod y es mediado por flavonoides.

Referencias.

- Boot KJM et al. 1999. Lipochitin oligosaccharides from *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* reduce auxin transport capacity in *Vicia sativa* subsp. *nigra* roots. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 12:839-844.
- Charon C et al. 1999. Alteration of *enod40* expression modifies *Medicago truncatula* root nodule development induced by *Sinorhizobium meliloti*. *Plant Cell*, 11:1953-1966.
- Coenen C y and Lomax TL. 1997. Auxin-cytokinin interactions in higher plants: old problems and new tools. *Trends in Plant Science*, 2(9):351-355.
- Cooper JB and Long SR. 1994. Morphogenetic rescue of *Rhizobium meliloti* nodulation mutants by *trans*-zeatin secretion. *Plant Cell*, 6:215-225.
- Hirsch AM et al. 1989. Early nodulin genes are induced in alfalfa root outgrowths elicited by auxin transport inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86:1244-1248.
- Mathesius U et al. 1998b. Auxin transport inhibition precedes nodule formation in white clover roots and is regulated by flavonoids and derivatives of chitin oligosaccharides. *The Plant J.* 14:23-34.
- Mathesius U et al. 2000. Temporal and spatial order of events during the induction of cortical cell divisions in white clover by *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* inoculation or localized cytokinin addition. *Molecular Plant-Microbe Interact.* 13:617-628.
- Minami E et al. 1996. Expression of the early nodulin, ENOD40, in soybean roots in response to various lipo-chitin signal molecules. *The Plant Journal* 10(1):23-32.
- Röehrig H et al. 1995. Growth of tobacco protoplasts stimulated by synthetic lipo-oligosaccharides. *Science*, 269:841-843.

CAPITULO 7

OBJETIVOS

El calcio se asocia en general a todas las zonas meristemáticas y puntas de crecimiento vegetal en donde se realizan procesos fisiológicos asociados con la mitosis, la diferenciación y el crecimiento celular. Entre ellos tenemos la germinación y crecimiento del tubo polínico, la formación de los primordios foliares, el crecimiento de las raíces primarias, el fototropismo de los tallos, la orientación gravitrópica de las raíces, la formación de raíces laterales, y la percepción del factor Nod en los pelos radiculares.

El nódulo de las leguminosas surge a partir de una nueva zona meristemática en la planta y su origen involucra toda una serie de eventos celulares, en donde existen cambios en los niveles de calcio citosólico que son una señal importante en la regulación de su formación y su desarrollo. La formación del nódulo implica la sucesión de diferentes etapas de desarrollo que incluyen, desde la percepción del factor Nod por los pelos radiculares y la inducción de divisiones celulares en la corteza de la raíz, hasta la diferenciación del primordio nodular en distintos tipos celulares que permiten la función de fijación y asimilación de nitrógeno. Por lo mismo, requiere del uso de vías de señalización tanto diferentes como complejas para la activación de todos los procesos celulares.

Para entender el significado del aumento en los niveles de calcio citosólico, se requiere conocer qué proteínas forman una vía de transducción de señales reguladas por calcio (Bush, 1993). Calmodulinas, CDPKs y proteínas relacionadas a CaM están entre las principales sensoras de los niveles de calcio intracelulares. Actualmente, en las plantas se ha descubierto la existencia de diversas familias de genes de calmodulina que son regulados diferencialmente en distintos tejidos. Su expresión se acumula preferentemente en las zonas meristemáticas y participa activamente en procesos de diferenciación y crecimiento vegetal como los llevados a cabo en la formación y desarrollo del nódulo.

El nódulo de las leguminosas deriva de un meristemo con características únicas dentro del reino vegetal, ya que fundamentalmente se va elaborando entre la bacteria simbiote y las células de la raíz, culminando en un tejido vegetal altamente especializado en la función de fijación de nitrógeno atmosférico aprovechado en forma de amonio por la planta.

Durante el establecimiento de la simbiosis fijadora de nitrógeno, las bacterias o los factores Nod purificados, inducen la formación de primordios nodulares o estructuras tipo nódulo (pseudonódulos); sin embargo, la naturaleza de las señales endógenas de la planta inducidas por los factores Nod, sobretodo previas a las primeras divisiones celulares de la corteza de la raíz, aún no se conocen totalmente.

Debido al papel primordial que Ca^{2+} tiene en la transducción de señales en las plantas y a que calmodulina es una de las principales proteínas sensoras de los niveles de calcio intracelulares, decidimos contribuir al conocimiento de la participación de calmodulina en el desarrollo o en el establecimiento de la simbiosis entre *Phaseolus vulgaris* y *Rhizobium*.

OBJETIVO GENERAL

Contribuir al conocimiento de la función de calmodulina en los mecanismos de transducción de señales que participan en la formación de los nódulos durante la simbiosis entre frijol y *Rhizobium*.

OBJETIVOS PARTICULARES.

- a) Aislar y caracterizar los genes de calmodulina en frijol.**
- b) Caracterizar el patrón de expresión de los genes de calmodulina durante el establecimiento y desarrollo del nódulo.**
- c) Determinar la expresión tejido específica de los genes de calmodulina.**
- d) Estudiar la regulación de los genes de calmodulina durante el establecimiento de la simbiosis.**
- e) Identificar las proteínas con afinidad por calmodulina en diferentes etapas de la simbiosis.**

MÉTODOS, RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CAPÍTULO 8

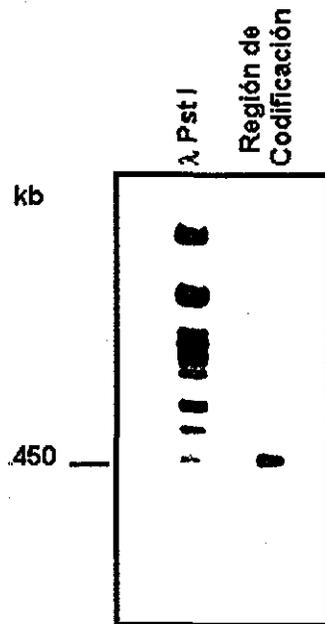
Una nueva familia del gen de calmodulina en *Phaseolus vulgaris*. Análisis de la estructura de cDNAs de CaM seleccionados a partir de un banco de expresión de nódulos de frijol.

Para conocer los genes de calmodulina en frijol y poder realizar estudios de su expresión en los diferentes tejidos, seleccionamos clonas de cDNAs de CaM a partir de una biblioteca de nódulos de frijol. Usamos como sonda un fragmento de la región de codificación de un mensajero de calmodulina que fue amplificado previamente por la técnica de PCR:

8.1 Amplificación por PCR de una secuencia de la región de codificación de un cDNA de CaM.

El protocolo de PCR que se siguió para obtener la sonda fue descrito por Friedman et al. en 1990. Como templado se utilizó una biblioteca de cDNAs de nódulos de *P. vulgaris* contenida en el fago λ gt22a (proporcionada amablemente por el Dr. Carroll Vance, University of Minnesota, St. Paul). La secuencia de los oligonucleótidos iniciadores se diseñó a partir de una secuencia consenso derivada de un alineamiento de cDNAs de CaM de diferentes especies vegetales reportados en el banco mundial de genes.

Las secuencias consenso fueron 5'- dATGGCCGATCAGCTCACCGACGATCAGATC-3' y 3'-dCAAGCAGTTTCAGIACIACCGGTTTCACTC-5', nombrados S1 y S2 respectivamente (Fig. 9.1). La mezcla de reacción de las muestras se incubó a 94 °C durante 4 minutos y luego se sometió a 35 ciclos de la siguiente secuencia: 1 min a 94 °C, 1.5 min a 55 °C y 2 min a 72 °C. Subsecuentemente se incubó 5.0 min a 72 °C y se almacenó a 4 °C hasta que se utilizó. El producto amplificado se separó por electroforesis en un gel de agarosa y fue purificado siguiendo el método de GeneClean II Kit, BIO 101, Inc. (Fig. 8.1).



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Fig. 8.1. Electroforésis de un fragmento de CaM de *P. vulgaris* amplificado por PCR. Las secuencias de la región de codificación de calmodulina se obtuvieron de una librería de cDNA elaborada en λ gt11 con los oligonucleótidos descritos. En el primer carril se muestra el marcador de peso molecular λ -Pst I y en el segundo carril se muestra el producto de amplificación de aproximadamente 450 kb. La banda se aisló del gel, se purificó y se marcó con ^{32}P para usarlo como sonda en diferentes experimentos.

Selección de clones de cDNA de CaM de P. vulgaris.

Con la sonda de CaM de 450 pb marcada radiactivamente con ^{32}P , se aislaron 5 clones de cDNA de CaM a partir de una biblioteca de expresión contenida en el fagémido λ Zap. Esta biblioteca fue originada con los RNAm expresados en nódulos de *P. vulgaris* de 15 días de desarrollo. La hibridación de las placas se realizó a 42 °C. Los filtros se lavaron en 2x SSC, 0.1 % SDS, y en 1x SSC, 0.1 % SDS a 65 °C. Posteriormente se expusieron en película kodak para autoradiografía. Después de revelada, se seleccionaron las placas de fagos que dieron señal de radiación, referidas como placas positivas.

Subclonación y análisis tipo Southern.

Los 5 insertos de cDNA correspondientes a PvCaM-1, -2, -3, 4 y 5 obtenidos con el procedimiento anterior se aislaron después de 3 rondas de purificación de las placas. Las positivas se aislaron como plásmidos recombinantes pbluescript SK⁺ (Stratagene), y cada una fue introducida en bacterias de la cepa "SOLR" (Stratagene) para su multiplicación. El DNA del plásmido aislado por el método de "miniprep" (Sambrook, 1989), se digirió con las enzimas *Pst* I y *Xho* I para liberar los insertos de cDNA contenidos en él. Los insertos se separaron del vector mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1 %, y el DNA separado en el gel se transfirió a una membrana de tipo "Hybond-N⁺ plus" (Amersham).

Esta membrana se analizó mediante hibridación tipo Southern con la misma sonda de 450 pb de CaM marcada con ³²P para corroborar que los insertos de cDNA purificados correspondieran efectivamente a secuencias de calmodulina. Después de la hibridación la membrana se lavó progresivamente con 2x SSC, 0.1 % SDS ; 1x SSC, 0.1 % SDS, 0.1 x SSC, 0.1 % SDS. Todos los lavados del filtro se realizaron a 65 °C y se expuso en una película Kodak para autoradiografía a -70 °C.

8.2 Caracterización de las clonas de cDNA de Calmodulina.

De las 5 clonas aisladas, tres correspondieron al tamaño de los mensajeros de CaM reportados. Como un primer análisis, de las tres clonas completas se obtuvo un patrón de restricción con diferentes enzimas; su secuencia reveló que contenían los marcos de lectura (ORF) completos. Para obtener sondas específicas que nos permitieran monitorear los RNAm's correspondientes a cada clona, por PCR se amplificaron fragmentos de 258, 369 y 205 pb, utilizando un iniciador común (CAL) para elaborar la cadena sentido, y tres iniciadores antisentido específicos X, Y, y Z para PvCaM-1, PvCaM-2 y PvCaM-3, respectivamente (Fig 8.2).

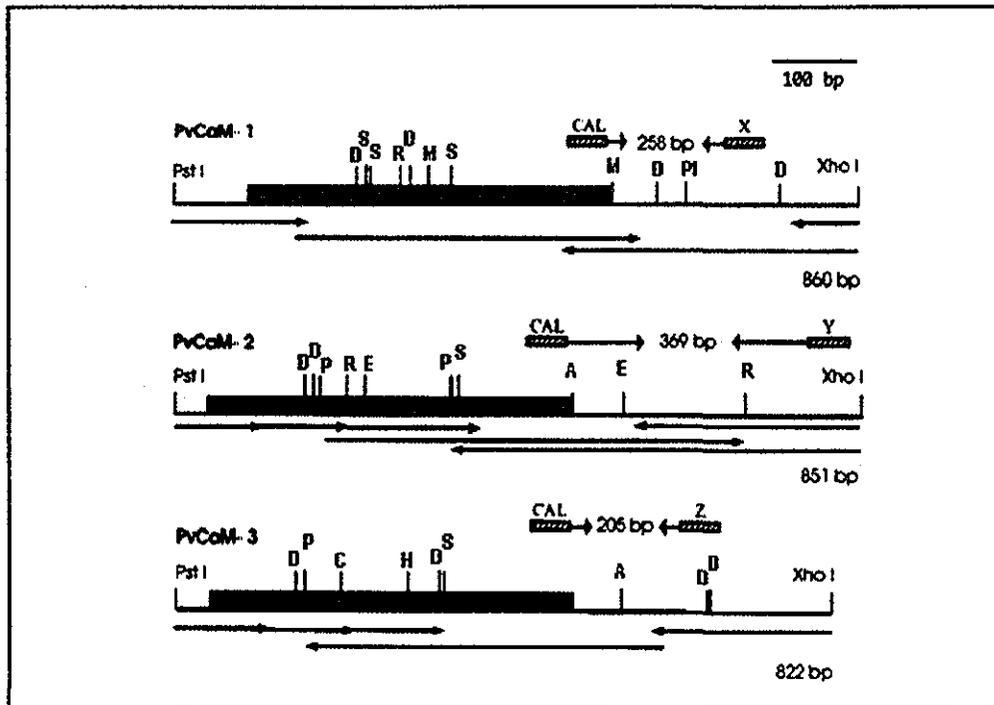


Fig. 8.2. Mapas de restricción y estrategias de secuenciación de las clonas de cDNAs de CaM obtenidas del banco de nódulo de *P. Vulgaris*. Los sitios de las enzimas de restricción son *Ava* II (A), *Cla* I (C), *Dde* I (D), *Eco* RI (E), *Hind* III (H), *Mae* I (M), *Ple* I (PI), *Pst* I (P), *Rsa* I (R) and *Sac* I (Sa). Las barras sólidas representan las regiones de codificación de la proteína. La dirección y las extensiones de los segmentos de secuenciación de DNA, son indicadas con flechas ubicadas debajo de los mapas físicos. Las cajas sombreadas indican la posición y la orientación de los oligonucleótidos CAL- X, -Y, y -Z que se usaron como iniciadores para la amplificación de secuencias específicas en los experimentos de detección de los transcritos del gen de CaM en los diferentes tejidos.

Análisis de la secuencia de los cDNAs

Para secuenciar el DNA de las clonas seleccionadas se siguió el método de terminación de la cadena usando didesoxinucleótidos de la versión de Sequenase (versión 2.0 DNA sequencing kit, United States Biochemical, Amersham) y [³⁵S]-ATP para DNA de plásmido de cadena doble. Ambas cadenas se secuenciaron usando los iniciadores universales T₇ y T₃. La secuencia de los cDNAs se completó sobreponiendo los segmentos señalados con las flechas ubicadas debajo de cada mapa en la figura anterior.

*Caracterización de la secuencia de los cDNAs de CaM de *P. vulgaris**

Las secuencias de nucleótidos de los 5 cDNAs se presentan en las Figs. 8.3A y 8.3B. Las tres clonas con cDNAs completos fueron caracterizadas en la publicación (cap. 9).

Análisis de agrupamiento de las secuencias de los cDNAs de P. vulgaris.

Se localizaron las secuencias de los mensajeros de calmodulina con mayor identidad a las de los cDNAs de frijol mediante análisis tipo BLAST, y después de un alineamiento de dichas secuencias, se realizó un análisis de agrupamiento para darnos una idea del parecido de las secuencias aisladas con las de otras especies. Los resultados de este análisis (Fig. 8.4) revelan que las secuencias de los cDNAs de PvCaM-1, -2 y -3 de frijol se separan en dos grupos con un nivel de similitud distinto, lo cual sugiere que pertenecen a secuencias independientes. También podemos observar que existe mayor similitud entre las secuencias de PvCaM-2 y -3, que entre éstas y PvCaM-1; esto podría significar que ambas secuencias divergieron de una secuencia homóloga distinta a la de PvCaM-1, lo que también explica las diferencias o igualdades en su patrón de expresión (Figs. 4 y 5, cap. 9). Las diferencias entre las clonas se manifiestan a todo lo largo de la secuencia del cDNA, sin embargo, dentro de la región de codificación, nos damos cuenta que usan diferentes codones para los mismos aminoácidos de la proteína (Fig. 9.3A). Por lo tanto, a pesar de las diferencias a nivel de nucleótidos, a nivel de proteína solamente un aminoácido las hace distintas (Fig 1, cap. 9), y éste aminoácido podría otorgarles funciones particulares a cada una. Otra evidencia que se desprende de éste análisis, es que a nivel de nucleótidos, las secuencias de PvCaM-3 y PvCaM-1 tienen mayor identidad con secuencias de *V. radiata*, y la de PvCaM-2 con la de *M. sativa* (alfalfa) y de Soya. Sin embargo, aunque el cDNA de PvCaM-2 tiene mayor semejanza con el de *mscall* de alfalfa y el SCaM-2 de soya, a nivel de aminoácidos PvCaM-1 es idéntica a la proteína codificada por estas especies (Fig. 1, cap. 9).

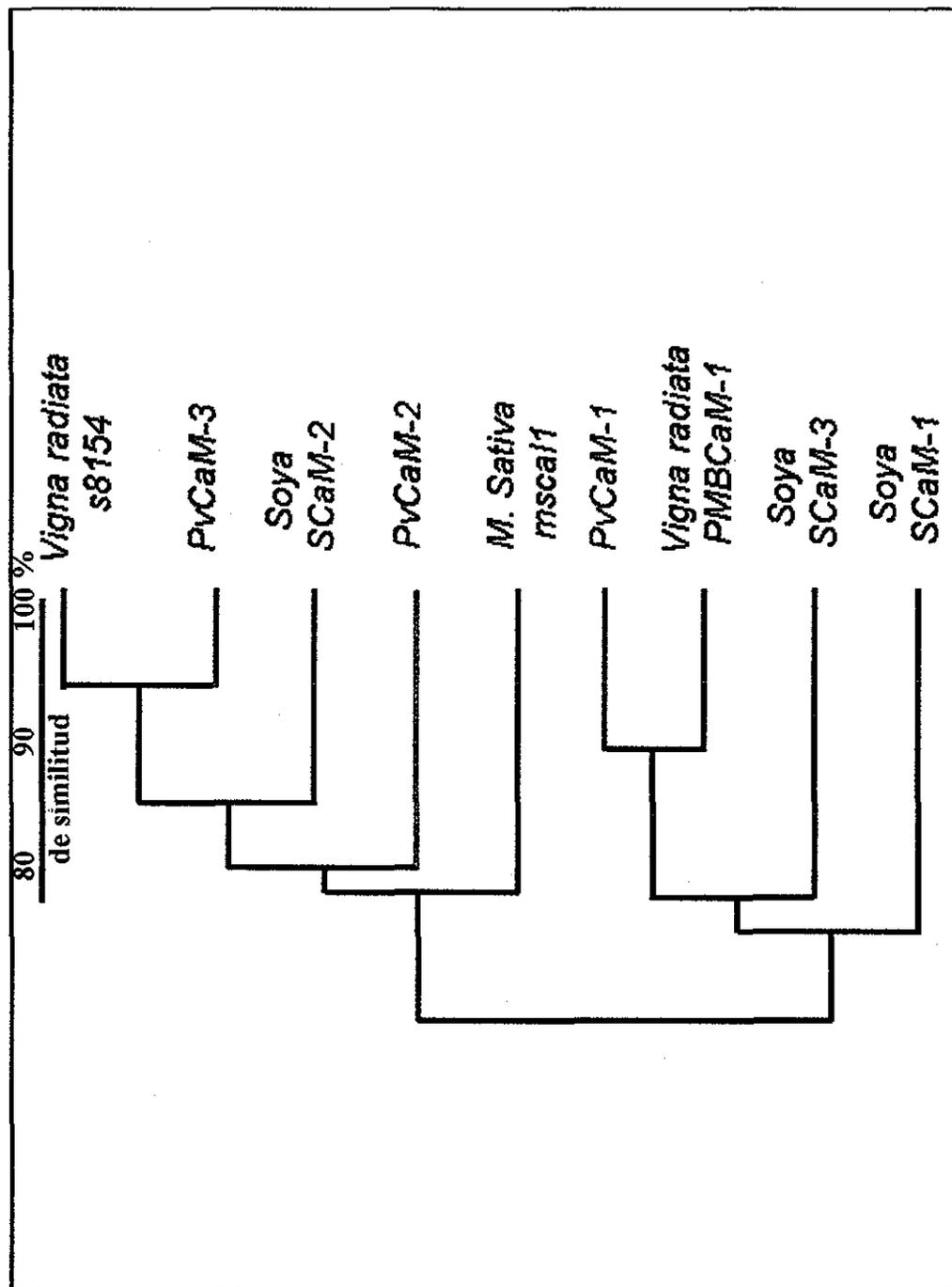


Fig. 8.4. Análisis de agrupamiento de las secuencias de nucleótidos de *PvCaM-1, -2 y -3*. Se comparó la similitud de la secuencia de nucleótidos de los cDNAs de calmodulina de *P. vulgaris* con las secuencias de cDNAs de calmodulinas depositadas en el banco de genes. Este análisis demostró que las secuencias de frijol se agrupan únicamente con las de especies dicotiledóneas (datos no mostrados), y dentro de éstas, comparten mayor similitud con las de leguminosas presentadas en la figura. *PvCaM-2* y *PvCaM-3* se ubican en un grupo distinto al de *PvCaM-1*. *PvCaM-1* es más parecida a las secuencias de *PMBCaM-1* de *Vigna radiata* y a *SCaM-1* y *-3* de Soya; sin embargo, sin importar su agrupamiento a nivel de nucleótidos, la secuencia de aminoácidos de *PvCaM-1* es idéntica a la de alfalfa como se puede observar en la figura 1 de la publicación, en el capítulo 9.

pMBCaM-2 de *V. Radiata*. De tal manera, que cada uno de éstos cDNAs de frijol se parece más a un cDNA de *V. radiata* que entre sí mismos. Lo que resulta bastante interesante de ésta comparación es que PvCaM-1 y pMBCaM-1 son reguladas por la acción de las auxinas (Botella y Arteca, 1994; éste trabajo Fig. 6 cap. 9). La acción del AIA sobre el nivel de expresión de la clona PMBCaM-1 de *V. radiata*, aunada al parecido casi idéntico con la secuencia de pvCaM-1 de frijol, sugiere que muy probablemente comparten las mismas formas de regulación y que poseen elementos que responden a auxinas en la secuencia promotora de sus genes; si no por la unión física de la hormona al DNA, sí a través de la asociación de AIA con factores de transcripción tipo ARF's. Además, *P. vulgaris* y *V. radiata* también poseen en común genes *SAUR1*, que son genes de respuesta temprana a las auxinas. En particular, se ha encontrado que el de frijol (PvSAUR1) codifica para una proteína que es regulada por calmodulina (Reddy et al., 2002), lo mismo que el homólogo de este gen *ZmSAUR1*, reportado recientemente en maíz (Yang et al., 2000). En fin, sería importante completar el estudio de las secuencias genómicas del gen de CaM de frijol.

Referencias.

- Botella JR and Arteca RN. 1994. Differential expression of two calmodulin genes in response to physical and chemical stimuli. *Plant Mol. Biol.* 24:757-766.
- Friedman KD, Rosen NL, Newman PJ, and Montgomery, RR. 1990. Screening of λ gt11 libraries, in: M Innis [Ed.], *PCR Protocols: A guide to Methods and Applications*. Academic Press, San Diego, pp 253-257.
- Reddy AGS et al. 2002. "Identification and expression analyses of bean (*Phaseolus vulgaris*) calmodulin-binding protein genes associated with plant defense responses". ASPB Congress. August 2002. Colorado State. USA.
- Roberts DM and Harmon AC. 1992. Calcium-modulated proteins: targets of intracellular calcium signals in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol Plant Mol. Biol.* 43:375-414.
- Sambrook J, Fritsch EF, and Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning. A laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Whale, E. Kuhn. 1997. The mechanism of 3' cleavage and polyadenylation of 3' eukaryotic pre-mRNA. *Prog. Nucl. Acid Res. Mol. Biol.* 57: 41-71.
- Yang I and Poovaiah BW. 2000. Molecular and Biochemical Evidence for the involvement of calcium/calmodulin in auxin action. *Journal of Biol. Chem.*, 275(5):3137-3143.

CAPÍTULO 9

Publicación en Molecular Plant-Microbe Interactions

Alberto Camas, Luis Cárdenas, Carmen Quinto and Miguel Lara. 2002
Expression of Different Calmodulin Genes in Bean (*Phaseolus vulgaris* L.):
Role of Nod Factor on Calmodulin Gene Regulation.

CAPÍTULO 10.

ANÁLISIS DEL INTRÓN DE LOS GENES DE CALMODULINA

Los genes de calmodulina reportados para plantas contienen un solo intrón, y aunque todos comienzan a partir de la secuencia que determina el aminoácido 25, los intrones varían en tamaño en los genes de diferentes especies, e incluso entre los genes de una misma familia (Poovaiah and Reddy, 1993; Zimmer et al., 1988). El análisis de expresión por Northern blot de los genes de CaM en los diferentes tejidos de frijol (capítulo 9), muestra el mismo patrón general para *cam-2* y *cam-3*, excepto en el nivel de abundancia de los mensajeros. Este hecho podría sugerir que las clonas de cDNA de pvCaM-2 y pvCaM-3 representan alelos del mismo gen. Sin embargo, con la información disponible acerca de la variación del tamaño del intrón de los genes de CaM, realizamos una serie de experimentos para poder identificar cada cDNA con su gen correspondiente:

Amplificación de DNA genómico por PCR.

Se obtuvo DNA genómico (500 ng) de frijol para amplificar las secuencias del intrón de los genes de CaM a través de PCR. El programa de PCR usado para la amplificación fue el siguiente: un paso de desnaturalización a 94 °C for 1 min, un paso de anillamiento a 55 °C for 1.5 min, un paso de extensión de 72 °C por 2.0 min con un paso de extensión final de 5.0 min a 72 °C. La reacción se llevó a cabo durante 35 ciclos. Después de la extracción con cloroformo, los productos de reacción se fraccionaron por electroforesis en un gel de agarosa 1% (w/v). Para comprobar la identidad de las productos, el gel se transfirió a una membrana de nitrocelulosa y se realizó un análisis tipo Southern con la sonda de calmodulina obtenida en la figura 8.1 (datos no mostrados).

Los datos de la Fig. 10.1A representan un experimento control realizado con el DNA del inserto de las clonas. Los carriles 2, 3 y 4 muestran un solo producto de amplificación, que corresponde a la secuencia de codificación (450 pb) contenida en los cDNAs de pvCaM-1, -2 y -3, respectivamente. En los carriles 5, 6 y 7 se muestran las regiones del cDNA amplificadas con los oligonucleótidos específicos X, Y y Z, que hibridan con secuencias diferentes en el extremo 3'. Estos son los mismos oligonucleótidos que se usaron para detectar las secuencias específicas de los mensajeros de *cam-1*, *cam-2* y *cam-3*. El oligonucleótido CAL fue común para los experimentos de la Fig. 10.1 (es diferente al señalado en la Fig. 8.2). Por lo tanto, el par de oligonucleótidos en cada una de estas reacciones debería amplificar la región de codificación (450 pb), mas un fragmento de la región 3' del cDNA como se observa en el gel.

Los productos de PCR mostrados en la Fig. 10.1B se amplificaron a partir de DNA genómico con los pares de oligonucleótidos utilizados en los carriles 5, 6 y 7. En ésta figura, la altura de las bandas obtenidas confirmó la presencia de un intrón en los genes de CaM. Uno de 891 pb en *cam-1*, y otro de aproximadamente 1,300 pb en *cam-2* y en *cam-3*.

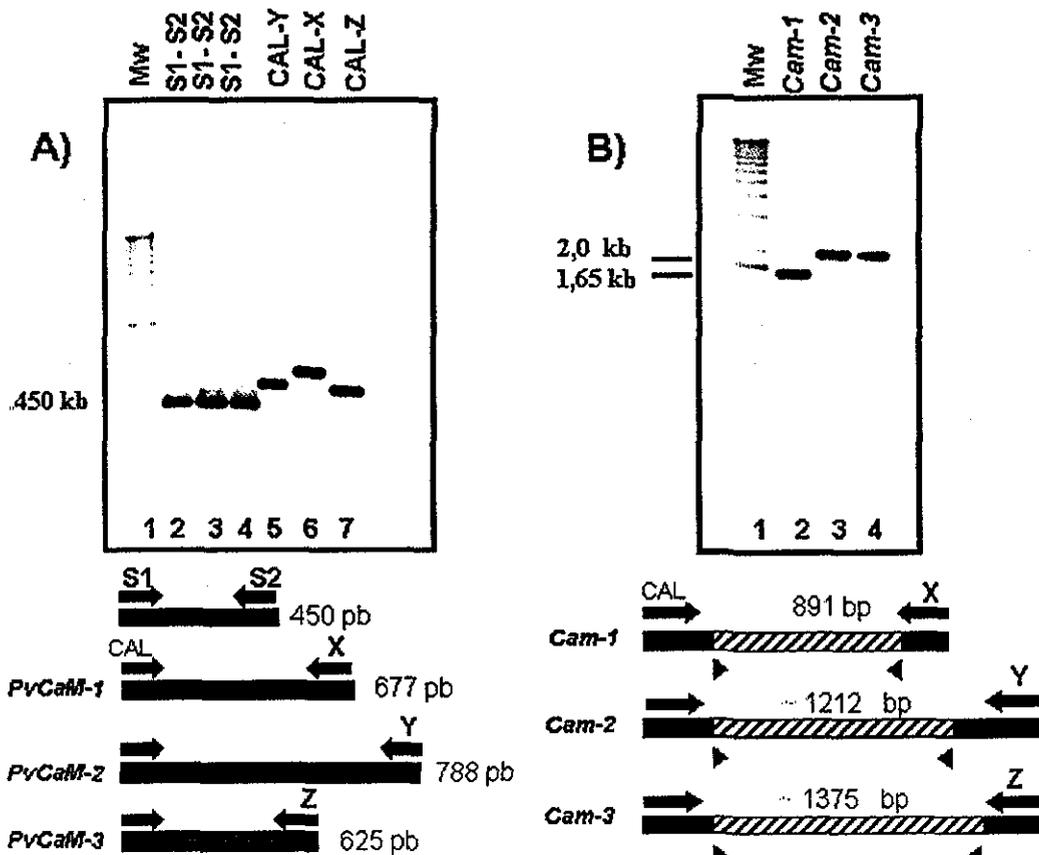


Fig. 10.1. Intrones de los genes *cam-1*, *cam-2* y *cam-3* de calmodulina de *P. vulgaris*. A) En los carriles 2, 3 y 4 se presentan los productos de PCR amplificados con oligonucleótidos comunes ubicados a los extremos de la región de codificación pertenecientes a *PvCaM-1*, -2 y -3, como en la figura anterior. En los carriles 5, 6 y 7 se muestran los productos de PCR obtenidos usando el iniciador común CAL y los oligonucleótidos específicos generados de la región 3' no traducida de cada cDNA (X, Y y Z; Fig. 8.2) El DNA templado usado para las amplificaciones de este panel fue el del cDNA correspondiente, obviamente el intrón no está presente B) Se presentan las mismas amplificaciones que en 5, 6 y 7 del panel A, pero usando como templado DNA genómico.

Discusión.

Mediante la técnica de PCR amplificamos segmentos de DNA genómico que contuvieran la secuencia del intrón de cada gen de CaM. Se obtuvieron tres productos de tamaño diferente, el más pequeño corresponde a *cam-1* y los otros de tamaño semejante, a *cam-2* y *cam-3* (Fig. 10.1B). A simple vista, parecería que *cam-2* y *cam-3* contienen el mismo tamaño de intrón, sin embargo, los oligonucleótidos específicos X, Y y Z que hibridan en el extremo 3' del gen de calmodulina, se localizan a diferente distancia (Fig. 8.2). Por lo tanto, para calcular el tamaño aproximado de los intrones se restó el número de bases de la secuencia entre el codón 26 y el sitio de hibridación de los iniciadores. Haciendo este cálculo, se obtuvo que el tamaño del intrón de los genes *cam-2* y *cam-3* es distinto, una diferencia que no se observa en el gel. Como un dato mas, aislamos y secuenciamos los intrones de los 3 productos de amplificación. Se obtuvo la secuencia completa del intrón de *cam-1* y la secuencia parcial de los intrones de *cam-2* y *cam-3*. El alineamiento de la secuencia de los extremos 3' de los tres intrones de la Fig. 10.2, reveló que contienen

```

+1
Intrón-1 GTGGGTTTTT AAAATTGGG GGGTTAAAT TGGATTGGC CGTTTGTGGT TTAAATAGAT GGGTGGTTAA TTAGGAAAT AAATTACACA
Intrón-3 GTCTTTCTCCT CAGATCCCCTC TCTGTCTTTT TTATATTTC CTGTATTAA CTTTTTCC TCCCAGATC TGGTTCCGC AATTCGTTG

Intrón-1 GATTATATTT TTCCCTTTTA AAAATGGGT TGGTTTAAA TTAAGTCAAT TTAGATTGG ATAATAATAA TTATTAGTTT AAATTTCAAT
Intrón-3 TTAATGGTGC ACGCTTTGTG CTTGTTTGTG TCCAAAGTTT GAAATTTTAG GTAGGT...

Intrón-1 AGGATGTTTA ATATGAATCC CCCAATCAGA AATTGATGTT ATACTTTAAC ATGCTTACGG GTTATTGAT CTCTGATAAG TGCATACGAT

Intrón-1 GCTGTTTATC ATCATATATA TTATATATAT TATTGAGCT TCCCAGTGGG CATGACGTTA ATGTTTTTCC TTATTCTAGT GATTGTTTTT
Intrón-3 .. ATGTGTAAGT TTGTCCTTG

Intrón-1 CATGTTTCTG TTTGGTTGTT GAGGAGAAGA GAGAAAGGA CCGGTGACAC TATTGAAAAT TTGTTTGTGTT CAATTTTTTG TTTTTGATAG
Intrón-3 TAAATACTAA GATTACGGGT GTTTGTTTTT GAAACTGAAC TAACCAATGA TAGTTGATGA TGATGTGCAT ATTTATGTGA TGAACTTGTT

Intrón-1 GTGAATTGCA TGTGCTTAT TTTTTTATAT TTTCAAAGG AAAAATGTTT CTGTTTTTTT ATTTTGTAT TTATGGGGTT CTAGATCATG
Intrón-3 GGATCATTGG TTTAGCTAGA CAGTCTTGT TCCCTAGAT TTGCGTTT GAGTATGAT TTCATTCTGT CTAGATTATT TACCCTTTAT

Intrón-1 GTCATGGCGT GTTGTGTTA TCTGTGATGT TTTGGTGTAT GCAATTTAGG GACAAGAGAG AGAGAAAGGA ACAAAATAGTT ATTCTACAAT
Intrón-3 TTCATTCTGT GGATGTTTCT GCTGTGAGTC TAPCAGCTGA TAPCCAAACC CCTACTACCA TGGATACTCA CAAATATCTCG TCCGAAATGT

Intrón-1 TTTTCTATTT TCTGATCAAT AATCTGCGTT AATCAAGATC GTGACCCATA GGGAGGAAAT CAAATTCATA GATGGACAAC ATTTACTAAT
Intrón-3 TAAATTAAGCG TTAATGTGGA AAATGTTTAC CAAATATATA CCAATGTGTT GTGTTCCTTT GACGCAATGA TACTTTATAA TGTCTTCACT

Intrón-1 CAGGGACAAT ACAGTTGGTG GACCCGGAGA TTGATTGAAT GAGAAAAGTT TATTATACAC ACTATCCTAT GTGGAGTGT TGGTTAATGA
Intrón-3 TCCCGTTGTT GTACCTGCTT CAAAGTTATCT TTTCCCTCTG AAACCTGACT TCCAGTATAA ACTAGATTCC TGTTTTTAAT TCCTTTCAAT
891 pb

Intrón-1 TATTTAAAGTA ACTAATTACG AAACAATGCT ATGAATTAGA AGCCGTTATT AFTTTAATGT ATATGGGGGT GAACTTTCAG GT TGC ..
Intrón-2 TC TGTGTTTGT GTTCAACTTT TTCCCTGTTCA AATGATTCAG GT TGC ..
Intrón-3 TTTCAAACCT TTGACCTGGA TTTCTCTTGT GGGGTTGGAT GATTCATATT TGTGTTTAACT TATTTTGTAA TATGCTGTAG GT TGC ..

```

Fig. 9. Secuencias intrónicas de los genes de calmodulina *cam-1*, *cam-2* y *cam-3*. Las secuencias se obtuvieron amplificando DNA genómico por la técnica de PCR. Los oligonucleótidos que se usaron son los mismos de la Figura 8.2B. Los productos amplificados corresponden al pre-rNAM del núcleo celular. El intrón de *cam-1* que se presenta en color morado se secuenció completamente y tiene una longitud de 891 pb. Solo se presentan las 42 bases del lado 3' del intrón de *cam-2*, y del intrón de *cam-3* (en color cian) se alinean 550 bases del extremo 3' y 147 de la región 5'. La secuencia de los intrones *cam-1* y *cam-3* contiene las bases que cumplen la regla 5'GT-AG3' en ambos extremos, las cuales señalan desde donde debe ser removido el intrón durante la maduración del rNAM. El intrón interrumpe la región de codificación del gen de calmodulina a la altura de la primera base del aminoácido 26 de la proteína (...GGT). En negritas y en forma de triplete se muestran la segunda y la tercera base que complementan el aminoácido 26, y las que siguen corresponden del aminoácido 27 en adelante.

secuencias distintas, confirmando la existencia de una familia de calmodulinas compuesta por tres genes en *P. vulgaris*. La secuencia de nucleótidos, el Southern genómico, el agrupamiento de las clonas, y el tamaño y la secuencia de los intrones, sugieren que a pesar de la alta identidad que en general poseen las secuencias de calmodulina, los cDNAs (PvCaM-1 a PvCaM-3) representan una familia de al menos tres genes de CaM en *P. vulgaris*. Sin embargo, habría que tratar de obtener la ubicación cromosómica de los *loci* correspondientes a cada gen.

Las secuencias de los otros cDNAs (PvCaM-4 y PvCaM-5) podrían ser productos alélicos originados de una regulación de la expresión basada en la poliadenilación diferencial de la secuencia 3' no traducida de un mismo gen (Whale, 1997).

La existencia de secuencias génicas diferentes en frijol, produce diferentes isoformas de calmodulina, las cuales posiblemente se unen a proteínas distintas; a su vez, éstas pueden regular diversos procesos celulares en la planta y en particular en el desarrollo del nódulo. La caracterización de estas proteínas, contribuirá a disectar las funciones específicas de los diferentes miembros de la familia, su distribución celular y su importancia fisiológica. Así, también nos permitirá conocer los mecanismos a través de los cuales calmodulina participa en la regulación del desarrollo del nódulo.

Referencias.

- Poovahiah, BW and Reddy ASN. 1993. Calcium and signal transduction in plants. Crit. Rev. Plant Sci 12:185-211.
- Whale, E. Kuhn. 1997. The mechanism of 3'-cleavage and polyadenylation of 3' eukaryotic pre-mRNA. Prog Nucl. Acid Res. Mol. Biol. 57: 41-71.
- Zimmer WE et al. 1988 Structural organization, DNA sequence, and expression of the calmodulin gene, J. Biol Chem., 263:19730

CAPÍTULO 11

PROTEÍNAS DE FRIJOL QUE UNEN CALMODULINA

Análisis comparativo de proteínas de frijol con afinidad por calmodulina mediante el sistema biotina-avidina (overlay).

Como mencionamos en los capítulos introductorios, para seguir la función de Ca^{2+} -calmodulina en una vía de transducción de señales de calcio, necesitamos detectar e identificar las proteínas que tienen afinidad por calmodulina. Para ello establecimos ensayos preliminares basados en el siguiente sistema:

Detección de proteínas de frijol con afinidad a calmodulina en membranas de nitrocelulosa utilizando el sistema Biotina-Streptavidina.

Sistema biotina-estreptavidina

El uso de calmodulina biotinilada (Bio-CaM), en conjunto con métodos de detección basados en avidina, han proporcionado una herramienta útil para este fin. Este ensayo consiste en la detección de proteínas con afinidad por calcio/calmodulina biotinilada que han sido previamente separadas por electroforesis e inmovilizadas en membranas de nitrocelulosa. En presencia de calcio la CaM-biotinilada funciona como el equivalente de un segundo anticuerpo.

Las proteínas que se encuentran normalmente en los tejidos podrían ligar avidina, calmodulina biotinilada y otros componentes del sistema biotina/avidina. Este ligamiento podría deberse a la biotina endógena o al ligamiento de proteínas que unen biotina, o a lectinas o sustancias de ligamiento no específico presentes en la muestra. Para evitar estos ligamientos que nos podrían dar falsos positivos en nuestro sistema, los experimentos se realizaron con un tratamiento previo de las membranas con avidina/biotina (Fig. 11.1).

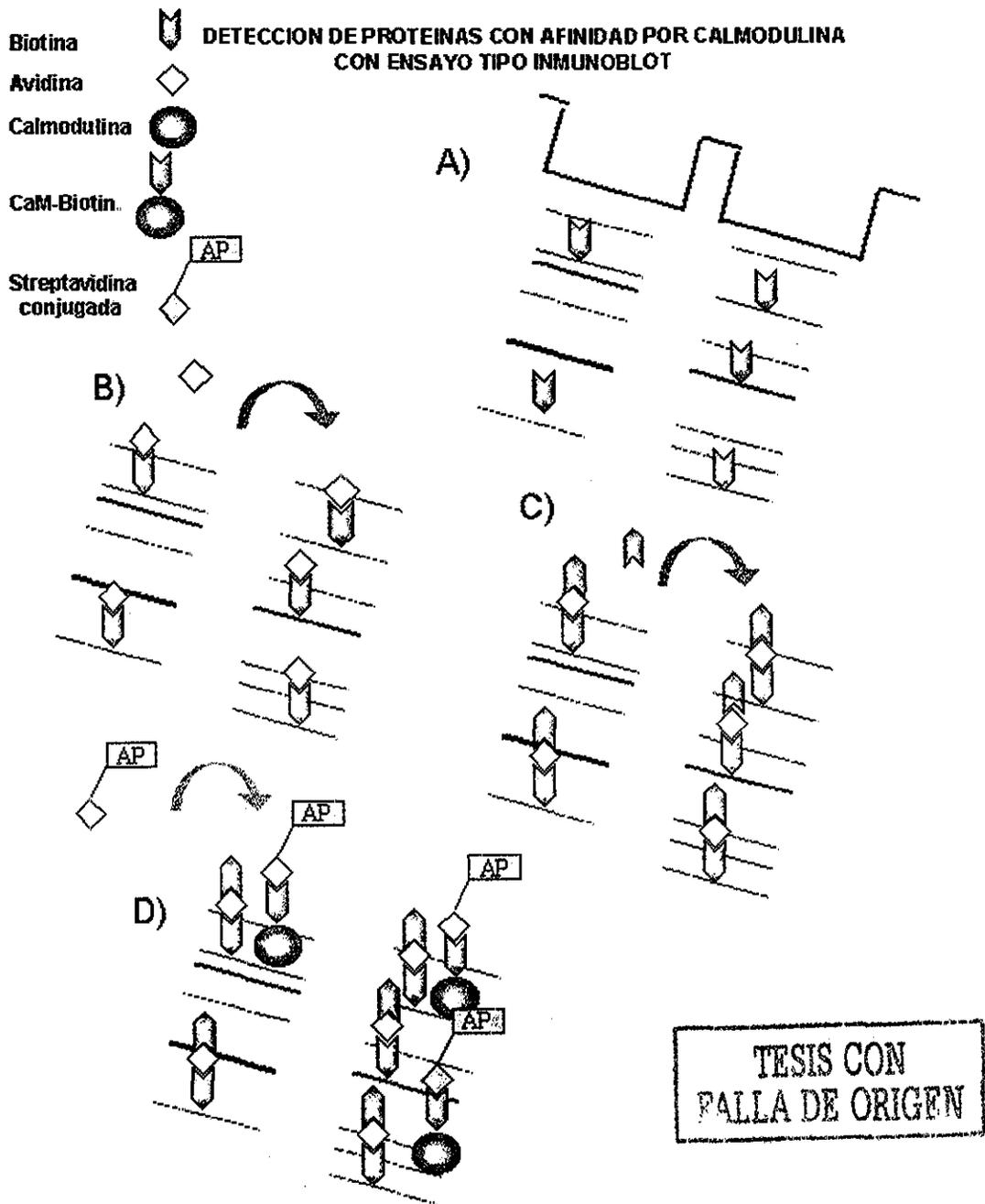


Fig. 11.1 Ensayo tipo inmunoblot (overlay) para detectar proteínas con afinidad por calcio-calmodulina en un sistema biotina-estreptavidina. A) Las proteínas son transferidas a una membrana PVDF después de electroforesis. Estas podrían estar biotiniladas endógenamente y la estreptavidina conjugada con la enzima alcalinofosfatasa (AP) podría dar falsos positivos; B) Los sitios de biotina se ocultan pretratando las membranas durante 10 min con avidina en la solución de ligamiento; C) Sin embargo, esta avidina también hay que bloquearla con biotina para que no pueda ligarse con el grupo de biotina conjugado con calmodulina; D) Ligamiento de calmodulina biotinilada a su proteína blanco y revelado con estreptavidina conjugada con AP que al reaccionar con los sustratos NBT y BCIP nos da una coloración típica de un inmunoblot.

Ensayo overlay con extracto de proteínas de diferentes tejidos de frijol.

Extractos crudos de proteína de diferentes tejidos de frijol se cargaron (40 µg/carril) en geles desnaturalizantes (SDS-PAGE) al 12 %. De hoja se homogenizaron 0.5 g, de raíz 1.0 g, y de nódulo de 21 días 0.5g en buffer Heppes pH 7.4. Después de la electroforesis las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa ("Hybond-C", Amersham) en amortiguador Tris-Glicina Metanol. Las membranas se incubaron por 30 min en solución de ligamiento a calmodulina (50 mM de Tris HCl pH 7.5, 150 mM de NaCl y 1mM de CaCl₂) con leche descremada en polvo al 1 %. La calmodulina de bovino biotinilada (GIBCO BRL) se agregó a una concentración de 0.1 µg/ml y se incubaron con agitación a temperatura ambiente durante toda la noche. Las membranas se lavaron 3 veces en la misma solución. Sobre las membranas se realizó la detección de las proteínas con afinidad a calmodulina en presencia de Ca²⁺ o de 2 mM de EGTA. En seguida se adicionó Streptavidina conjugada con la enzima fosfatasa alcalina a una concentración de 0.1 µg/ml y se incubaron con agitación durante 1 hr a temperatura ambiente. Las membranas se lavaron en solución de ligamiento a calmodulina pero sin leche descremada. La detección de las proteínas con unión a calmodulina se realizó con los sustratos de la fosfatasa alcalina (BCIP y NBT) y el procedimiento usado en la técnica de inmunoblot (Baum et al, 1993), Fig. 11.2.

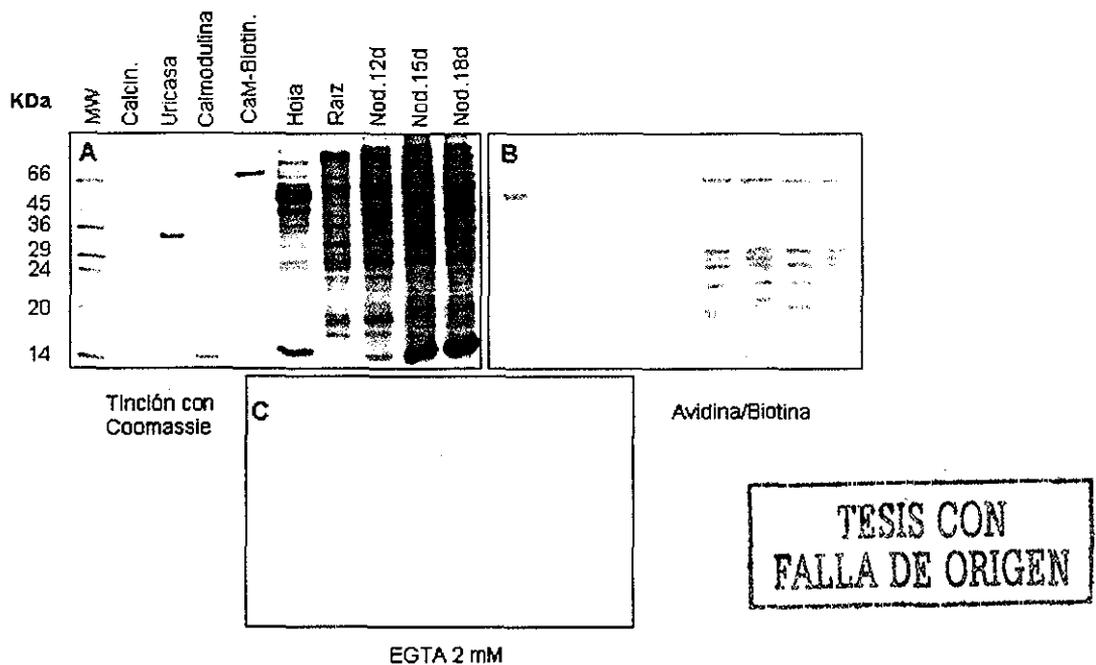


Fig. 11.2 Detección de proteínas afines a calmodulina en presencia de Ca²⁺ y EGTA. **A)** Tinción con azul de Coomassie de la electroforesis de extractos de los diferentes tejidos de frijol. Como control positivo se usó calcineurina (61 kDa), como control negativo se utilizó uricase (35 kDa) una proteína que se expresa en nódulo de frijol, calmodulina, y calmodulina biotinilada (Amersham). **B)** El gel fue transferido a una membrana de nitrocelulosa para su tratamiento con calmodulina biotinilada en presencia de 2 mM de calcio y de **C)** 2 mM de EGTA.

En el panel B, en los carriles correspondientes a los tejidos de frijol se revelaron bandas de proteínas de diferente tamaño, que dieron una señal semejante a la de calcineurina. En la membrana tratada de la misma manera pero en presencia del agente quelante EGTA (2mM), no se detecta ninguna banda

Con el mismo sistema, se diseñaron otros experimentos en donde se variaron diferentes componentes del sistema para despejar la existencia de falsos positivos (Fig. 11.3)

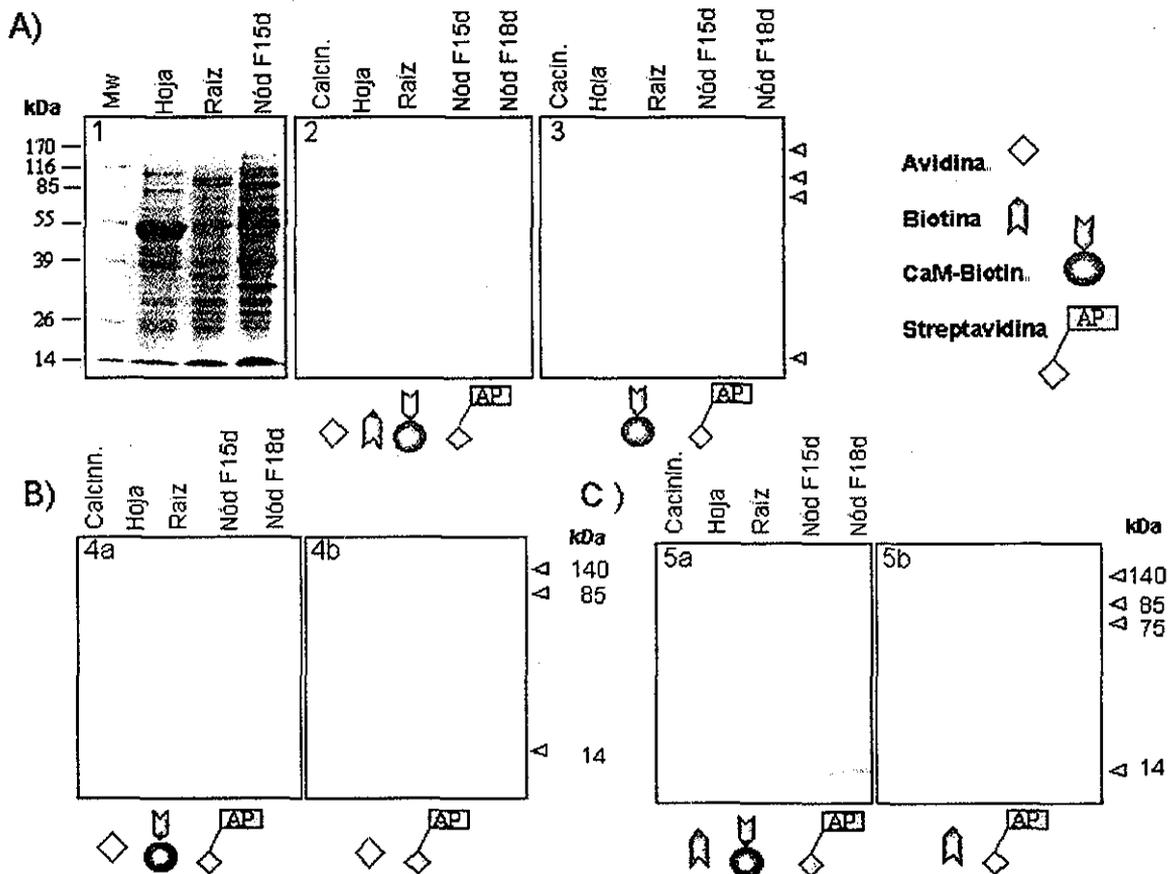


Fig. 11.3 Diferentes protocolos de detección de proteínas afines a calmodulina por el sistema avidina/biotina con calmodulina biotinilada. A) 1 - Electroforesis de las proteínas de hoja, raíz y de nódulo. Las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa y tratadas en presencia o ausencia de los componentes del sistema como se señala debajo de cada figura. B) 4a en presencia o 4b en ausencia de calmodulina biotinilada C) 5a en presencia o 5b en ausencia de calmodulina biotinilada D) comparación del patrón de bandas de proteínas detectadas con calmodulina biotinilada con la fracción eluida de la columna de afinidad de CaM-Sefarosa con 2 mM de EGTA.

En la figura anterior, se detectaron ciertas proteínas que son predominantes (140, 85, 75, y 14 kDa) en los diferentes protocolos; sin embargo, también existen otras proteínas con pesos moleculares intermedios entre este rango, excepto en donde no se adicionó calmodulina biotinilada. Lo cual muestra que las bandas representan proteínas de nódulo que unen calmodulina, igual que el control de calcineurina. Sobretudo, la banda superior

que no aparece en los tejidos de hoja y de raíz. Además, existe un patrón similar al obtenido en la fig. 11.2 como se puede apreciar en los paneles 2 y 4a.

En la figura 11.4 se muestra el resultado de un experimento similar, pero a diferencia del anterior, se adicionó un extracto de nódulos de alfalfa de 3 semanas de desarrollo. En la figura se observa claramente la presencia de las proteínas con peso aproximado de 140 kDa y 85 kDa; Sin embargo, como en los experimentos de la figura anterior, la de 140 kDa parece ser específica en los nódulos de frijol y de alfalfa; también se aprecia una señal fuerte alrededor de los 30 kDa en alfalfa y bandas de tamaño semejante en los tejidos de frijol figura 12.3 (3 y 4a).

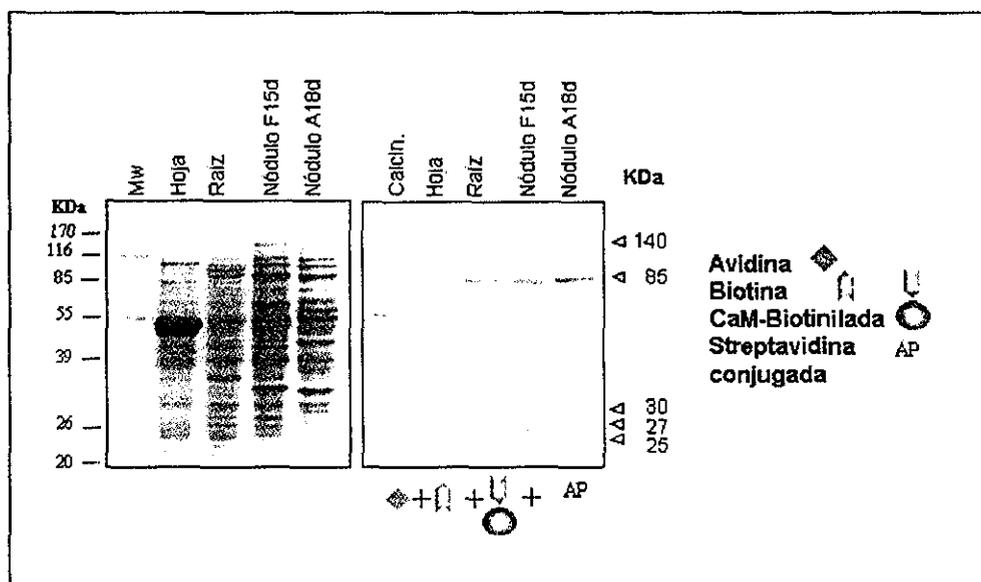


Fig. 11.4 Detección de proteínas afines a calmodulina en hoja, raíz, y nódulos de frijol, así como en nódulo de alfalfa. En el panel de la izquierda de referencia se muestra un gel teñido con Coomassie después de la electroforesis de los diferentes extractos proteicos. En la derecha se muestra el resultado de las proteínas afines a calmodulina detectadas con calmodulina biotinilada en presencia de Ca^{2+} por la técnica de overlay / biotina-avidina. A la derecha de la figura se presentan los pesos aproximados que corresponden a los tamaños de las proteínas detectadas. Los símbolos en colores señalan el protocolo seguido en este experimento de acuerdo a la figura 11.1

2) Comparación de las proteínas de *P. vulgaris* que unen calmodulina por cromatografía de afinidad.

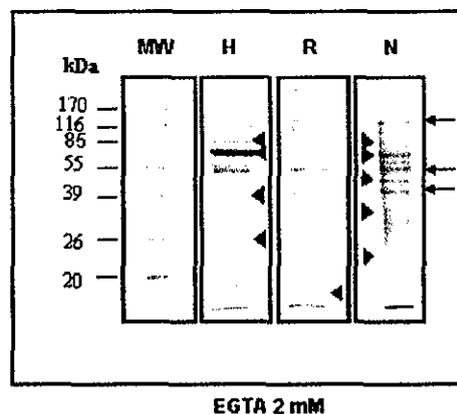
Calmodulina se liga con alta especificidad a sus proteína blanco en la presencia de Ca^{2+} , por lo que este ión es importante para la unión de CaM con las proteínas del extracto de nódulo que pasan por la columna. Para exponer los sitios hidrofóbicos de calmodulina, se necesita de 1 a 2 mM de Ca^{2+} en el buffer de unión.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

La columna de afinidad de CaM-Sefarosa 4B (Pharmacia Biotech) se equilibró con buffer de unión que contiene 50 mM de Tris HCL pH 7.5 y con 2 mM de Ca^{2+} a 4°C. Posteriormente, la columna se cargó con extractos de hoja, raíz y nódulo. Se realizaron varios lavados del extracto en la columna con buffer 50 mM de Tris HCL + 2 mM de Ca^{2+} , hasta que se excluyeron las proteínas sin afinidad por el complejo Ca^{2+} -CaM (Fig. 11.4). Las proteínas retenidas en la columna se eluyeron con buffer 50 mM de Tris HCL + 2 mM de EGTA (4 ml) colectándose fracciones de 0.5 ml c/u. Las fracciones en donde se detectó la proteína eluida se precipitaron con acetona fría y se dejaron precipitando toda la noche a -80 °C. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 15 000 rpm durante 15 min y en seguida la acetona se evaporó durante 3 min a vacío (Savant); las muestras se resuspendieron en buffer de Laemli (Laemmli, 1970), se hirvieron durante 5 min y se cargaron en geles de poliacrilamida al 12 % (Fig. 11.5).

La comparación del patrón de proteínas de hoja, raíz y de nódulo que unen calmodulina, obtenidos de la columna de afinidad se muestra en la Fig. 12.6. En los paneles se presenta la elución de las proteínas con 2 mM de EGTA. Los tejidos tienen un patrón distintivo de estas proteínas; algunas pueden ser comunes, pero en general el patrón fue diferente.

PATRÓN DIFERENCIAL DE PROTEÍNAS DE UNIÓN A CALMODULINA
EN DEDIFERENTES TEJIDOS DE FRIJOL
OBTENIDO POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Fig. 11.5. Electroforesis de proteínas de frijol con unión a calmodulina, obtenidas por cromatografía de afinidad. En el panel de la izquierda se muestran las fracciones salidas de la columna producto del lavado de las proteínas no retenidas por el ligando. La columna se lavó con varios volúmenes de solución de ligamiento hasta que las proteínas no retenidas dejaron de salir. A la derecha se presentan las bandas de proteína con afinidad a CaM eluidas de la columna con 2 mM de EGTA. A-C) Electroforesis de las proteínas de raíz, hoja y nódulo. D) Comparación de las proteínas con afinidad a calmodulina de los diferentes tejidos. Los triángulos señalan las proteínas que no son compartidas por los tejidos y las flechas, proteínas que aparentemente son comunes a los tres.

Discusión

Se montaron diferentes protocolos para detectar proteínas de frijol que unen calmodulina en presencia de calcio. Nuestro objetivo principal pretendía detectar proteínas que preferentemente se expresaran en nódulo sobre otros tejidos de la planta. Para ello comparamos las proteínas de unión a calmodulina provenientes de extractos de hoja, de raíz, y de nódulo de 15 y 18 días. Como control positivo utilizamos calcineurina que es la principal proteína de unión a calcio-calmodulina en cerebro de animales (61 kDa) y uricasa (35 kDa), una proteína de nódulo independiente de calmodulina que participa en la asimilación de nitrógeno. También usamos extractos de nódulos de alfalfa de 3 semanas de edad. Probamos dos sistemas para detectar este tipo de proteínas, uno que consiste en el uso de avidina/biotina y el otro en una columna de afinidad de calmodulina-seferosa A.

La comparación de las proteínas de hoja, raíz y nódulo de 15 días retenidas en la columna de afinidad mostró un patrón diferente en cada tejido. Mientras que algunas bandas son comunes, otras son específicas a cada tejido. También podrían ser la misma proteína pero con un tamaño molecular diferente en hoja, raíz y nódulo. Por ejemplo la enzima GAD de *Vicia faba* es de 62 kDa en raíces, de 60 kDa en el tallo y de 64 kDa en los nódulos (Ling et al., 1994).

El rango de peso molecular de las proteínas detectadas en nódulo coincide en peso con algunas de las proteínas previamente reportadas en plantas como la KCBP (proteína de unión a calmodulina tipo kinesina) que ha sido identificada en *Arabidopsis*, tabaco o papa, que tiene un peso aproximado de 140 kDa y que es única a las plantas. Esta proteína interacciona con los microtúbulos y participa en procesos como el tráfico de vesículas y de organelos, en la fusión nuclear, en la formación del huso mitótico y en el movimiento de los cromosomas durante la división celular (Vos et al., 2000). En *Arabidopsis thaliana* se ha encontrado otra proteína de menor tamaño que interacciona con calmodulina, la CIP de 111 kDa (ATPasa) y que también está incluida en la división celular y en la fusión de vesículas (Buaboocha et al., 2001).

Vidali et al. (1999) y Yokota et al. (2000) reportan una proteína de 135 kDa (P-135-ABP) que es encontrada en los tubos polínicos de *Lilium longiflorum* con dominios de ligamiento a actina F; esta proteína es regulada negativamente por Ca^{2+} -calmodulina y aparentemente interviene en el proceso de empaquetamiento y orientación de filamentos de actina durante el crecimiento del tubo. Su secuencia de aminoácidos es homóloga con la secuencia de proteínas de la familia vilina-gelsolina de células animales.

En la planta de tabaco existe otra proteína que es regulada por calmodulina y que forma parte de un canal en la membrana plasmática de tabaco designada como NtCBP4 de alrededor de 81 kDa con un dominio de unión a nucleótidos cíclicos (Arazi et al., 2000). En mas reportes recientes mencionan a la a NAD-cinasa (nicotinamida adenina dinucleotido cinasa) de *Lycopersicum pimpinellifolium* de aproximadamente 65 kDa, cuya función es fosforilar el NAD^+ para convertirlo en $NADP^+$, el cual es importante en varias vías metabólicas (Delumeau et al., 2000), y otras proteína cinasas como CCaMK y MCKI que son muy semejantes con otras cinasas de células animales (Snedden and From, 1998); también se ha reportado otra proteína de 50 kDa que es homóloga al factor de elongación EF-1 α y que interactúa con microtúbulos *in vitro* (Lu et al., 1995). Hsieh et al. (2000) publican el aislamiento de un cDNA que codifica para una apirasa nuclear (NTPasa) de 47 kDa en las plúmulas de plántulas de chícharos, que puede intervenir en el mecanismo de

regulación de la expresión por la luz, pues no se expresa en hojas y en tallos que han recibido iluminación.

Además de las anteriores, también podemos citar a las proteínas conocidas como Ca^{2+} -ATPasas (BCA1 y ACA2) que intervienen en el mantenimiento de la homeostasis de concentraciones de Ca^{2+} en la célula y que en las plantas también son reguladas por calmodulina (Malmstrom et al., 1997; Harper et al., 1998).

Por último, distintos reportes incluyen una amplia variedad de proteínas de diverso tamaño molecular detectadas por su afinidad a calmodulina en diferentes tejidos vegetales, pero que aún no se han aislado o no se les ha encontrado alguna homología con las ya conocidas. Dentro de esta lista se incluyen proteínas de 115, 78, 70, 56, 52, 48, 44, 43, 28, 27 y 18 kDa.

Durante el transcurso de la escritura de ésta tesis, en el congreso de la American Society of Plant Biologist (ASPB) celebrado en el mes de Agosto del 2002, se presentó el poster "Identification and expression analyses of bean (*Phaseolus vulgaris*) calmodulin-binding protein genes associated with plant defense responses" en el cual se reportan las proteínas de la hoja de *Phaseolus vulgaris* que unen calmodulina. Estas proteínas se obtuvieron a partir de un banco de expresión con mensajeros aislados durante la interacción con una bacteria patógena. Algunas de éstas, probablemente están asociadas a la respuesta de defensa de la planta. En ese trabajo, se menciona que se identificaron un total de 29 proteínas con unión calmodulina. La secuencia de los cDNAs reveló que pertenecen a 11 genes diferentes, y ocho de ellos son homólogos a otras proteínas de unión a calmodulina ya reportadas en otros sistemas. Aunque no refieren exactamente cuales, suponemos que son algunas de las que mencionamos en la presente discusión. Los genes restantes codifican para proteínas no descritas en la literatura. Los cDNAs se expresan diferencialmente en distintos tejidos de la planta, de manera semejante a nuestros resultados. Dentro de las proteínas mencionadas en el poster se encuentran 3 isoformas de canales dependientes de nucleótidos cíclicos (PvCNGC-A, -B y -C), un factor de transcripción tipo "dedos de Zinc" (PvZFL) y una proteína regulada por auxinas (PvSAUR1). El ácido salicílico, el ácido jasmónico, el H_2O_2 y un elicitor (incitador), que son inductores de la respuesta de defensa vegetal, afectaron la expresión de la mayoría de las proteínas de unión a calmodulina de frijol que se expresan o se reprimen en la presencia de un patógeno (Reddy et al., 2002).

A partir de éstos datos podemos apreciar que las proteínas vegetales reguladas por calmodulina divergen en cuanto a tamaño y en cuanto a su presencia o ausencia en ciertos tejidos o células, incluso entre especies diferentes. A través de su aislamiento y purificación, del análisis de sus aminoácidos y de la secuencia de sus genes nos hemos dado cuenta del diferente origen que existe entre ellas y por lo mismo, de las funciones celulares tan distintas en donde participan. Por lo tanto, hemos aprendido que no podemos agruparlas mediante el simple ejercicio de alinear sus secuencias y relacionarlas con una misma ruta de transducción de señales. De tal suerte que calmodulina funciona como una sola llave, que puede abrir múltiples combinaciones de cerraduras que abren paso a la modulación de rutas metabólicas o eventos celulares tan diferentes entre sí. Como ejemplos de ello, tenemos proteínas que funcionan regulando el transporte de iones, interaccionando con distintos elementos del citoesqueleto, regulando la expresión genética como factores de transcripción o a través de cascadas de fosforilación; o como enzimas en eventos

metabólicos propios del desarrollo vegetal. Por ello pueden dar respuesta a toda una serie de estímulos ambientales mediados por Ca^{2+} en segundos o en días. De este modo las proteínas reguladas por calmodulina, intervienen en procesos tan distintos como el desarrollo del cloroplasto, la regulación de genes mediada por la luz; en la acción de las hormonas vegetales o en el proceso de división y diferenciación celular; en vías de secreción, en el tráfico de vesículas, en la síntesis de flavonoides, en la respuesta de defensa a patógenos, en el gravitropismo, la germinación, etc. Muchas de éstas proteínas sólo se encuentran en las plantas, y a pesar de que varias de ellas comparten características estructurales y funcionales con proteínas de células animales, en éstos tipos celulares no parecen ser reguladas por calmodulina. Por lo tanto en las plantas podrían realizar funciones distintas.

En base a lo anterior, proponemos aislar las proteínas con afinidad a CaM que se detectaron en este trabajo, para caracterizarlas y determinar su función en los tejidos de frijol, particularmente del nódulo. Sin olvidar que aun faltaría detectar las proteínas que se encuentran en la fracción de membrana. Con el análisis de ambas fracciones seguramente encontraremos proteínas muy interesantes que intervienen en la simbiosis.

Referencias.

- Arazi I et al. 2000. A high-affinity calmodulin-binding site in a tobacco plasma-membrane channel protein coincides with a characteristic element of cyclic nucleotide-binding domains. *Plant Molecular Biology*. 42:591:601, 2000.
- Baum G, et al. 1993. A plant glutamate decarboxylase containing a calmodulin binding domain. *The Journal of Biological Chemistry*, 268 (15): 19610-19617.
- Buaboocha I et al. 2001. Isolation of cDNA and genomic DNA clones encoding a calmodulin-binding protein related to a family of ATPases involved in cell division and vesicle fusion. *Planta*, 212:774-781.
- Delumeau O. et al. 2000. Characterization and possible redox regulation of the purified calmodulin-dependent NAD-kinase from *Lycopersicon pimpinellifolium*. *Plant Cell and Environment* 23, 1267-1273.
- Harper JF et al. (1998). A novel calmodulin-regulated Ca^{2+} -ATPase (ACA2) from Arabidopsis with an N-terminal autoinhibitory domain. *J. Biol. Chem.* 273:1099-1106
- Hsieh HL et al. 2000. Regulation of a recombinant pea nuclear apyrase by calmodulin and casein kinase II. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1494:248-255.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227:680-685.
- Ling et al., 1994. Analysis of a soluble calmodulin-binding protein from fava bean roots: identification of glutamate decarboxylase as a calmodulin-stimulated enzyme. *Plant Cell*, 108:1197-1202.
- Lu YT et al. 1995. Characterization of a cDNA encoding a novel heat-shock protein that binds to calmodulin. *Plant Physiol.* 108:1197-1202.
- Malmstrom S, et al. (1997). A calmodulin-stimulated Ca^{2+} -ATPase from plant vacuolar membranes with a putative regulatory domain at its N-terminus. *FEBS Lett.* 400:324-328.
- Reddy AGS et al. 2002. "Identification and expression analyses of bean (*Phaseolus vulgaris*) calmodulin-binding protein genes associated with plant defense responses". ASPB Congress. August 2002. Colorado State. USA.

- Snedden WA and Fromm H. 1998. Calmodulin, calmodulin-related proteins and plant responses to the environment. *Trends in Plant Science*, 3(8):299-303.
- Vidali L et al. 1999. The 135-Kilodalton actin-bundling protein from *Lilium longiflorum* pollen is the plant homologue to villin. *Plant Physiology*, 209:283-291.
- Vos JW et al. 2000. The kinesin-like calmodulin binding protein is differentially involved in cell division. *The Plant Cell*, 12:979-990.
- Yokota E et al. 2000. Calcium-calmodulin supresses the filamentous actin-binding activity of a 135-Kilodalton actin-bundling protein isolated from Lily pollen tubes. *Plant Physiology*, 123: 645-654.

CAPÍTULO 12

FOSFORILACIÓN *in vitro* DE CALMODULINA DE *Phaseolus vulgaris*

La secuencia de aminoácidos deducida a partir de la secuencia nucleotídica del cDNA de pvCaM-2 de frijol, nos muestra una sustitución de Asp/Tyr en la posición 118. La presencia de una tirosina en esta posición no había sido descrita previamente para calmodulina en ningún tipo celular. Sí se había reportado para la proteína A-p21, la cual es modulada por calcio y tiene alta identidad con calmodulina, en donde existe una sustitución Asp/Tyr pero en la posición equivalente al aminoácido 80 de la hélice central de CaM.

En las calmodulinas de vertebrados normalmente hay dos Tyr presentes en los dominios de unión a calcio (III y IV), pero en todas las calmodulinas vegetales reportadas únicamente está presente la del dominio IV en la misma posición que en la de vertebrados, algas y protozoarios (Vanaman, 1980; Roberts and Harmon, 1992; Snedden and Fromm, 1998). Así que hemos encontrado una nueva calmodulina vegetal que presenta una tirosina extra, y será interesante saber la importancia funcional que le confiere la segunda Tyr a las calmodulinas vegetales, particularmente a la de frijol, y qué repercusiones estructurales tendría en la posición 118 para todos los organismos.

Por otro lado, en los vertebrados, los residuos Thr79 y Ser81 de la hélice central y uno en el dominio III de ligamiento a Ca^{2+} (Tyr99), pueden ser fosforilados en calmodulina; en la calmodulina de invertebrados no existe la Tyr99. En unos casos el efecto de la fosforilación es disminuir la afinidad de CaM-P (fosfo-CaM) por el sitio de unión de las proteínas blanco. En otros, como en la fosforilación de la Tyr99 se genera una forma de CaM que hace mas activa a la enzima fosfodiesterasa (PDE).

La CaM fosforilada (fosfo-CaM) se ha aislado de varios tejidos vegetales y en ensayos *in vitro* funciona como un sustrato del receptor tipo tirosina cinasa de la insulina y de otras serina/treonina cinasas. Sin embargo, poco se sabe del efecto de la fosforilación sobre la estructura de la proteína, aunque es probable que le induzca un cambio conformacional que aumente su contenido de α -hélice (Crivici and Ikura, 1995).

Para comprobar la existencia de fosforilación en las calmodulinas de frijol, realizamos ensayos de fosforilación *in vitro* de extractos crudos de nódulo y de calmodulina de frijol obtenida a través de expresión *in vitro* de las clonas de cDNA. CaM-1, CaM-2 de frijol, se purificaron y se ensayaron para fosforilación *in vitro* con [^{32}P] γ -ATP.

Extracción de proteínas para el ensayo de fosforilación

Se obtuvieron extractos crudos de proteína de nódulos de 18 días de desarrollo después de la inoculación con *R. etli*; se homogenizaron en buffer 50mM de Tris HCl pH 7.4, 10 mM de pirofosfato de sodio, 50 mM de NaCl, 250 mM de Sacarosa, 10 % de glicerol, 1 mM de EGTA, 0.2 mM de ortovanadato, 1 mM de PMSF, 1 mM de β -mercaptoetanol, 1 μ g/ml de leupeptina y aprotinina. El homogenado se centrifugó a 14 000 x g durante 20 min. El sobrenadante fue congelado a $-80^{\circ}C$.

Ensayo de fosforilación *in vitro*

Se incubaron 20 µg de la fracción soluble a 30 °C con buffer 20 mM de HEPES pH 7, 10 mM de MgCl₂, 0.1 mM de Ortovanadato, 50 µM de ATP mas 2µCi/nmol de [³²P]γ-ATP (Amersham) Después de 15 min, la reacción fue detenida con buffer de Laemmli, (Laemmli, 1970) y se incubó por 5 min a 85 °C. Posteriormente, las muestras fueron cargadas en un gel de electroforesis SDS-PAGE al 15 % (40 mAmp). Después de la separación, los geles fueron secados y expuestos a una película para autoradiografía (Islas-Flores et al., 1998) Fig 12.1

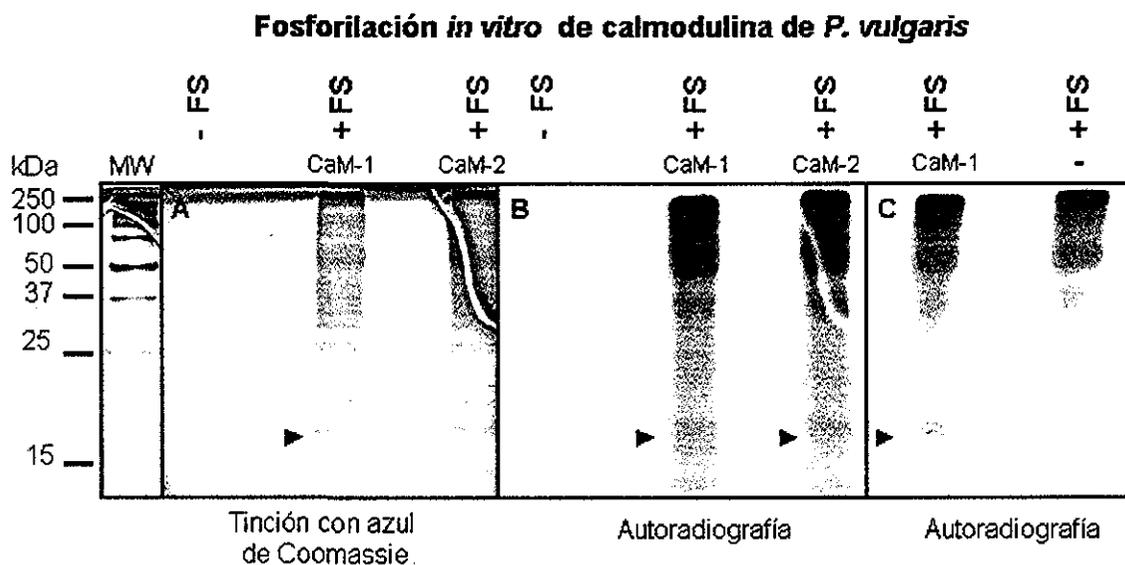


Fig.12.1 Ensayo de fosforilación *in vitro* de CaM-1 y CaM-2 de frijol con (+FS) o sin (-FS) la fracción soluble de extractos crudos de proteína de nódulo. A) Separación de las proteínas por electroforesis teñidas con azul de Coomassie; B) Autoradiografía del gel anterior en donde se aprecia el cambio en la densidad de la impresión causada por la radiactividad del fosfato unido a calmodulina; C) Autoradiografía de un experimento similar al presentado en B, pero a diferencia de éste, en presencia o en ausencia de CaM-1. Las cabezas de flecha indican el peso molecular correspondiente calmodulina.

Discusión.

La sustitución Tyr/Asp en la posición 118 de la secuencia de CaM-2 de frijol, posiblemente representa la creación de un sitio de fosforilación en el aminoácido Tyr, que puede ser parte de una regulación de la estructura de la proteína. Esto nos llevó a realizar

ensayos de fosforilación *in vitro* con las calmodulinas CaM-1 y CaM-2 de frijol que habían sido previamente expresadas en *E. coli* (Fig. 3B, cap. 9).

La modificación de calmodulina por fosforilación ha sido reportada en diferentes tejidos animales y es realizada por la caseína cinasa II (CaMKII). Esta cinasa fosforila calmodulina en los aminoácidos Ser81 y Thr79 de la hélice central de la proteína (Fig. 2.3). Estas fosforilaciones reducen la afinidad entre calmodulina y sus proteínas blanco, y el estado fosforilado posiblemente podría modular la capacidad de CaM para reconocer a unas u otras proteínas de manera específica dentro de una misma célula. También se ha reportado la fosforilación de CaM en el residuo de Tyr99, la cual genera una forma de calmodulina más activa y con mayor afinidad por la fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos (James P et al., 1995; Crivici and Ikura, 1995). En la Fig. 12.1, se muestran datos preliminares que prueban la fosforilación de calmodulina de frijol. En unos ensayos, a la fracción soluble del extracto de nódulo se adicionó CaM-1 y CaM-2 (Fig. 12.1B); como control, en otro experimento similar se adicionó CaM-2 solamente en uno de los ensayos (Fig. 12.1C). En éste último experimento, el ensayo en ausencia de CaM-2 no manifestó la presencia de radiactividad en la autoradiografía. Estos resultados sugieren la presencia de alguna proteína cinasa de CaM en la fracción soluble de extractos proteicos de nódulo. Sin embargo, en los films no se forma una banda de fosforilación definida, lo cual podría tener varias causas que podrían estar relacionadas: a) una ineficiente fosforilación de calmodulina, es decir, que pocas moléculas incorporaron el fosfato, probablemente debido a que la cantidad de ATP frío usada en el ensayo haya sido alta en la reacción; b) a que la CaM incorpore 1 solo fosfato en su molécula y por lo tanto su emisión sea muy baja para revelarse en el film como una banda definida o c) a que las formas de CaM nativas en la fracción soluble poseen un peso molecular más bajo que la CaM recombinante adicionada a en el ensayo; por lo tanto, es posible que la radiactividad producida por calmodulinas de tamaño molecular ligeramente diferente, se vea como una emisión difusa en el film. La CaM recombinante (Fig. 3B, cap. 9) presenta una cola de varias histidinas (His) unidas a su extremo amino terminal, la cual permite su purificación en una columna de afinidad a histidina. De cualquier manera, además de mejorar las condiciones del ensayo, la inmunoprecipitación con anti-CaM y la exposición al film de la proteína inmunoprecipitada, revelaría definitivamente si CaM es fosforilada en los nódulos de *P. vulgaris*.

Debido a que la fracción soluble (FS) de los extractos contienen todas las formas de calmodulina, se adicionó una isoforma diferente en cada extracto para poderlas distinguir. Como ambas formas de calmodulina (CaM-1 y CaM-2) aparentemente se fosforilaron, no podemos discernir a partir de este ensayo qué aminoácidos se están modificando en cada una, y si en CaM-2 efectivamente existe alguna fosforilación en la posición Tyr118. Para saber esto se necesitan aislar los fosfoaminoácidos de cada proteína. Finalmente, también se necesitan estudios para determinar si existen cambios estructurales en calmodulina que puedan ser conferidos por la modificación covalente con el grupo fosfato como ha sido previamente reportado (Quadroni et al., 1998). La importancia de estos estudios radica en que son los primeros indicios en la literatura acerca de la fosforilación de calmodulina vegetal, y por lo tanto sería muy interesante continuar en esta dirección.

Referencias

- Crivici A and Ikura M, 1995. 1995. Molecular and structural basis of target recognition by calmodulin. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 24:85-116.
- Islas-Flores I, et al. 1998. Protein phosphorylation during coconut (*Cocos nucifera* L.) zygotic embryo development. *Plant Physiology*, 118:257-263.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227:680-685.
- Quadroni M et al. 1998. Phosphorylation of calmodulin alters its potency as an activator of target enzymes. *Biochemistry*, 37:6523-6532.
- Roberts DM and Harmon AC. 1992. Calcium-modulated proteins: targets of intracellular calcium signals in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 43:375-414.
- Snedden WA and Fromm H. 1998. Calmodulin, calmodulin-related proteins and plant responses to the environment. *Trends in Plant Science*. 3(8):299-303.
- Vanaman TC. 1980. Structure, function, and evolution of calmodulin. Chap. 3, pp 41-77. *In* Calcium and Cell Function (Molecular Biology Series) vol. I Calmodulin. Cheung WY (ed), Academic Press, USA.

CAPÍTULO 13

DISCUSIÓN GENERAL.

Immunodetección de calmodulina en la raíz y el nódulo de frijol.

Se realizó la inmunodetección de calmodulina en tallos, en raíz y en nódulo de frijol con anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos detectaron la proteína en mayor nivel en los nódulos de 15 a 25 días de desarrollo, siendo menor su abundancia en los nódulos del día 12, en el tallo y en la raíz (Fig. 3A, cap. 9). La concentración de proteína aumentó notablemente a partir del día 12 en los nódulos maduros, una acumulación que podría estar más relacionada al metabolismo de asimilación de nitrógeno que a la organogénesis o al desarrollo del nódulo en las etapas maduras. Además, este aumento en la cantidad de proteína tiene un correspondiente aumento en el nivel de la expresión de los mensajeros, particularmente de *cam-1*.

En la literatura nos encontramos varias menciones acerca de la posible participación de proteínas reguladas por calmodulina en el metabolismo y almacenamiento del nitrógeno en plantas. En particular, de la actividad de la enzima descarboxilasa del ácido glutámico (GAD), que cataliza la reacción de conversión del glutamato para producir GABA (ácido amino butírico) (Chen et al., 1994).

En las células animales, este metabolito funciona como un neurotransmisor inhibitorio que regula la conductancia de canales iónicos, y aunque en las plantas no se conoce muy bien su función, también podría ser un regulador de canales iónicos en células vegetales. Sin embargo, a pesar de que las GAD animales y vegetales son muy idénticas en su secuencia, solamente las GAD de plantas son reguladas por calmodulina.

Se ha sugerido que la reacción de síntesis de GABA en plantas es un mecanismo para estabilizar el pH citosólico durante los tipos de estrés que acidifican el pH del citosol. Las evidencias de que GABA se acumula rápidamente en respuesta a la anaerobiosis, el estímulo mecánico, la oscuridad, el frío, el calor y la falta de agua, apoyan esta hipótesis. Sumados a estas evidencias, se encuentran los reportes de que la actividad de GAD aumenta cuando se disminuye el pH del citosol. Pero la disminución en el pH del citosol no es la única manera en que se estimula la producción de GABA, por lo que se piensa que existen otros mecanismos que regulan la actividad de esta enzima.

Existen evidencias de que los diferentes tipos de estrés que aumentan el calcio citosólico, también aumentan la actividad de GAD y por lo mismo se ha sugerido que participa en regular vías de transducción de señales mediadas por calcio. La GAD se ha reportado en todos los tejidos de la planta en diferentes especies vegetales, así como también en el nódulo de las leguminosas. En éste órgano se ha sugerido que el GABA puede tener alguna relación con la asimilación y el almacenaje del nitrógeno, ya que en varias leguminosas su masa molecular puede representar hasta el 6 % del peso seco de los nódulos (Larher et al., 1983).

Por otra parte, siendo el glutamato el sustrato de la GAD y además el aminoácido en la primera reacción de asimilación del amonio derivado del bacteroide en los nódulos, esta enzima podría tener alguna participación en la regulación de la disponibilidad de glutamato para la asimilación del nitrógeno en las células infectadas del nódulo. En relación a esta función, se ha sugerido que el glutamato podría producirse en la reacción de transaminación

del 2-oxoglutarato por GABA que produce semialdehído succínico y glutamato, bajo ciertas condiciones fisiológicas (Dixon and Fowden, 1961). GABA también podría ser transaminado con piruvato para producir semialdehído succínico y alanina (Streeter and Thompson, 1972b). Esta vía alterna de producir succinato directamente a partir de 2-oxoglutarato, podría contribuir a regular el flujo de carbono en el ciclo de Krebs (Dixon y Fowden, 1961) y en el nódulo, podría aportar succinato para su oxidación en la respiración celular de la mitocondria en células del nódulo y de los bacteroides. Otro dato que relaciona la actividad de GAD con la asimilación del nitrógeno en plantas es que GABA es un intermediario obligado durante el proceso de asimilación del nitrógeno en una línea celular de tabaco alimentada con putrescina como única fuente nitrogenada (Balint et al., 1987).

Una vía diferente en la que proteínas reguladas por calcio-calmodulina podrían relacionarse con la fijación y asimilación del nitrógeno es el mecanismo de transducción de señales que conduce a la fosforilación de la PEP carboxilasa. La fosforilación regula la sensibilidad de esta enzima al malato, ya que logra atenuar la inhibición alostérica que este metabolito tiene sobre la actividad de la enzima. Esta modificación le permite continuar con la fijación de carbono cuando las concentraciones de malato son altas en el citosol de las células del mesófilo en la hoja. Sin embargo, este tipo de regulación también podría estar presente en todos los tejidos vegetales incluyendo a las PEP carboxilasas no fotosintéticas, ya que todas las secuencias de PEP carboxilasas que se han reportado presentan un dominio de fosforilación en su extremo aminoterminal (Vidal and Chollet, 1997).

La modificación de la PEP carboxilasa con el grupo fosfato lo lleva a cabo la enzima PEP carboxilasa cinasa, una proteína cinasa de Ser/Thr, cuya acción por sí misma es independiente de calcio. Pero existen evidencias de que esta enzima es regulada por una cascada de transducción de señales dependiente de calcio que opera en todos los tejidos y células vegetales investigadas a la fecha, y que integran varias señales que conducen incluso a la fosforilación reversible de las PEP carboxilasas no fotosintéticas. Estas evidencias provienen de experimentos en donde se ha involucrado la participación de calcio. El uso de IP_3 (inositol trifosfato), el uso de bloqueadores de canales de calcio en tonoplasto, el aumento en los niveles de calcio citosólico, y aumentos en el pH del citosol, están relacionados con cambios en la actividad de esta enzima y de otras proteínas cinasas dependientes de calcio. Este conocimiento también provino de los resultados obtenidos en cultivos de protoplastos tratados experimentalmente con W-7 (una sustancia inhibidora de la acción de proteínas cinasas dependientes de calcio-calmodulina), con calcimina (ionóforo A23187) y con EGTA, los cuales inhibieron la actividad de la PEP carboxilasa cinasa (Vidal and Chollet, 1997). De acuerdo a la información anterior es posible que alguna o algunas proteínas cinasas dependientes de calmodulina participen en la cascada de fosforilación relacionada con la regulación de la actividad de PEP carboxilasa en el nódulo. En la autoradiografía (capítulo 13) de los experimentos de fosforilación *in vitro* de proteínas de nódulo de frijol, se puede observar que alguna de las proteínas de alto peso molecular que se fosforilan intensamente podría corresponder a PEP carboxilasa (110 kDa), reflejando la existencia de proteína cinasas correspondientes a esta vía de señalización. Experimentos dirigidos a detectar y aislar las proteínas cinasas dependientes de calmodulina podrían establecer la participación de calmodulina en la regulación del metabolismo de carbono en los nódulos.

Expresión de los genes de calmodulina en los diferentes tejidos de frijol y durante el desarrollo del nódulo a los 11 días después de la inoculación con *Rhizobium*.

Se obtuvieron sondas de DNA específicas para seguir el nivel de expresión de cada uno de los genes de calmodulina en diferentes tejidos de frijol y durante un curso temporal del desarrollo del nódulo. Los resultados de este análisis nos revelaron que los genes de calmodulina se expresan diferencialmente dependiendo del tipo y la edad del tejido. *cam-1* se expresó en raíces jóvenes, en el ápice de la raíz y en los cotiledones pero no se detectó en los tallos y en las hojas maduras. El patrón de expresión de *cam-2* y *cam-3* fue el mismo en todos los tejidos, sin embargo la expresión de *cam-2* fue la más abundante. El mayor nivel de expresión de estos genes fue en el ápice de la raíz, excepto en los tallos maduros.

En general la expresión de estos genes fue detectada en los tejidos jóvenes y en los meristemas, lo cual concuerda con el patrón de expresión que ha sido reportado previamente para otros genes de calmodulina (Allan and Trewavas, 1985; Dauwalder et al., 1986; Ling and Assman, 1992; Yang et al., 1998). La expresión en el ápice de la raíz puede ser debida a la importancia de éste como un órgano de percepción que participa activamente en el gravitropismo (Lu and Feldman 1997). Así mismo, en las zonas meristemáticas se ha asociado frecuentemente a la calmodulina con el proceso de división mitótica (Zielinski, 1998).

A partir del día 11 de desarrollo del nódulo, los mensajeros de *cam-2* y *cam-3* son abundantes y disminuyen progresivamente, mientras que los de *cam-1* aumentan hacia los 15 y 18 días después de la inoculación con la bacteria. El aumento en la expresión de *cam-1* por estos días coincide con el tiempo de mayor actividad de la enzima nitrogenasa, del metabolismo del carbono y de la asimilación y transporte del nitrógeno entre el nódulo y la planta. Lo cual sugiere que *cam-1* puede estar involucrado en regular alguna función metabólica durante este período. Esta idea es sustentada por la evidencia de que la actividad de la enzima GAD (descarboxilasa del ácido glutámico) es activada por calmodulina y produce la acumulación de GABA (ácido γ -aminobutírico) en los nódulos, interviniendo en el metabolismo nitrogenado (Ling et al., 1994; Satyanarayan and Nair, 1990). Al respecto sería interesante profundizar en caracterizar esta enzima para establecer cómo podría intervenir en el metabolismo del nódulo.

Expresión de los genes de calmodulina en respuesta al factor Nod.

De manera interesante, los niveles de expresión del gen de calmodulina *cam-1* son reducidos por la presencia del factor de nodulación de *R. etli*. Uno de los efectos tempranos de los LCOs es causar que el balance auxina/citocinina disminuya inhibiendo la capacidad del transporte polar de las auxinas, y por tanto, es posible que la disminución de la expresión de éste gen de calmodulina esté asociada a la reducción del nivel de auxinas en las zonas de la raíz de *P. vulgaris* sensibles al factor de nodulación. Estos resultados nos llevaron a establecer la siguiente hipótesis respecto a su función:

La expresión de los genes de CaM puede ser mantenida por los niveles normales del flujo de auxinas presentes en la raíz, y esta expresión puede suprimirse debido a la inhibición del transporte polar de las auxinas provocada por el factor de nodulación. Al restablecerse el balance auxina/citocinina que permite la división celular durante la formación del primordio nodular, la expresión de CaM aumenta de nuevo para tomar participación activa en la formación y funcionamiento del nódulo.

En esta zona de la raíz, CaM podría estar participando normalmente en los procesos de diferenciación de células para formar los haces vasculares, pero por la presencia de los factores de nodulación, este programa celular cambia de tal manera que es necesaria suprimir su participación para evitar la deposición de pared celular secundaria (Kobayashi and Fukuda 1994), en células que normalmente formarían haces vasculares, y dedicar un nuevo programa para la diferenciación de estas células hacia la formación del primordio nodular (Yang et al., 1994; Foucher and Kondorosi 2000). Al respecto es muy conocida la asociación de CaM con la división celular (Chafouleas 1984; Rasmussen and Means 1989; Durso and Cyr, 1994; Reddy et al., 1996; Vos et al., 2000). Posteriormente, la expresión de este gen vuelve a aumentar en las estructuras tipo nódulo que poseen una alta división meristemática y por tanto deducimos que podría intervenir en la formación de los nuevos haces vasculares del nódulo en desarrollo (Taté et al., 1994; Cárdenas et al., 1995).

Finalmente y como una conclusión general, la información vertida sobre las proteínas que son estimuladas por calmodulina de frijol con los patógenos, y el avance en la identificación de los receptores del factor de nodulación, nos permite dimensionar la importancia que tendría el conocer las proteínas que son reguladas por calmodulina durante el establecimiento de la simbiosis y, durante la formación y funcionamiento del nódulo. La identificación de estas proteínas, la integración de las vías de transducción de señales en donde participan, el conocimiento de sus genes y la regulación de su expresión, son el sustento de una línea de investigación basada en la función de las señales de calcio en numerosos aspectos de la biología vegetal. En nuestro caso, eventualmente permitiría tener un mapa de los puntos potenciales de regulación para suprimir o activar muy específicamente el desarrollo y el funcionamiento del nódulo. El trabajo avanzado apenas sienta las bases para una investigación futura y los resultados más importantes obtenidos hasta ahora se enumeran en las conclusiones.

Referencias.

- Allan E and Trewavas A. 1985. Quantitative changes in calmodulin and NAD kinase during early cell development in the root apex of *Pisum sativum* L. *Planta*, 165:493-501.
- Balint R et al. 1987. *N*-Caffeoyl-4-amino-*n*-butyric acid, a new flower-specific metabolite in cultured tobacco cells and tobacco plants. *J. Biol. Chem.* 262:11026-11031.
- Cárdenas et al. 1995. Isolation, chemical structures and biological activity of the lipo-chitin oligosaccharide nodulation signals from *Rhizobium etli*. *Plant Mol. Biol.* 29:453-464.
- Chafouleas JG. et al. 1984. Changes in calmodulin and its mRNA accompany reentry of quiescent (G0) cells into the cell cycle. *Cell*, 36: 73-81.
- Chen Y et al., 1994. The 58 kDa calmodulin-binding glutamate decarboxylase is a ubiquitous protein in *Petunia* organs and its expression is developmentally regulated. *Plant Physiol.* 106:1381-1387.
- Dauwalder M et al. 1986. Distribution of calmodulin in pea seedlings: immunocytochemical localization in plumules and root apices. *Planta*, 168:461-470.
- Dixon R O D and Fowden L. 1961. γ -Aminobutyric acid metabolism in plants. 2. Metabolism in higher plants. *Ann. Bot.* 25:513-530.
- Durso NA and Cyr RJ. 1994. A calmodulin-sensitive interaction between microtubules and a higher plant homolog of elongation factor 1a. *Plant Cell*, 6:893-905.
- Foucher F and Kondorosi E. 2000. Cell cycle regulation in the course of nodule organogenesis in *Medicago*. *Plant Molecular Biology*, 42:773-786.
- Kobayashi H and Fukuda H. 1994. Involvement of calmodulin and calmodulin-binding proteins in the differentiation of tracheary elements in *Zinnia* cells. *Planta*, 194:388-394.
- Larher F et al. 1983. Bound 4-Aminobutyric acid in root nodules of *Medicago sativa* and other nitrogen fixing plants. *Plant Sci. Lett.* 29:315-326

- Ling et al., 1994. Analysis of a soluble calmodulin-binding protein from fava bean roots: identification of glutamate decarboxylase as a calmodulin-stimulated enzyme. *Plant Cell*, 108:1197-1202.
- Lu YT and Feldman LJ. 1997 Light-regulated root gravitropism: A role for, and characterization of, a calcium/calmodulin-dependent protein kinase homolog. *Planta*, 203:191-197.
- Rasmussen CD and Means AR. 1989 Calmodulin is required for cell-cycle progression during G1 and mitosis. *The EMBO Journal*, 8:73.
- Reddy ASN et al. 1996. A plant kinesin heavy chain-like protein is a calmodulin-binding protein. *The Plant Journal*, 10(1):9-21.
- Satya Narayan, V and Nair PM. 1990 Metabolism, enzymology, and possible roles of 4-aminobutyric acid in root nodules of *Medicago sativa* and other nitrogen-fixing plants. *Plant Sci. Lett.* 29:315-326.
- Streeter JG and Thompson JF. 1972b. *In vivo* and *in vitro* studies on-Aminobutyric acid metabolism with the radish plant (*Raphanus sativus* L.). *Plant Physiology*, 49:579-584.
- Taté R et al. 1994. Development of *Phaseolus vulgaris* root nodules. *Molecular Plant Microbe Interactions*. 7(5):582-589.
- Vidali L et al. 1999. The 135-Kilodalton actin-bundling protein from *Lilium longiflorum* pollen is the plant homologue to villin. *Plant Physiology*, 209:283-291.
- Vidal J and Chollet R. 1997. Regulatory phosphorylation of C4 PEP carboxylase. *Trends in Plant Science*, 2(5):230-237.
- Vos JW et al. 2000. The kinesin-like calmodulin binding protein is differentially involved in cell division. *The Plant Cell*, 12:979-990.
- Yang WC et al. 1994. *Rhizobium* Nod factors reactivate the cell cycle during infection and nodule primordium formation, but the cycle is only completed in primordium formation. *Plant Cell*, 6:1415-1426.
- Yang I et al. 1998. Developmentally regulated organ-, tissue-, and cell-specific expression of calmodulin genes in common wheat. *Plant Mol. Biol.* 37:109-120.

CONCLUSIONES.

- 1.- Existen diferentes secuencias genómicas de calmodulina en *Phaseolus vulgaris* y el análisis de estas secuencias predice la producción de diferentes isoformas de la proteína.
- 2.- La expresión de los genes de CaM es regulada diferencialmente en los diferentes órganos de frijol y particularmente en el nódulo los niveles de expresión de calmodulina cambian durante el desarrollo.
- 3.- La presencia de los intrones en los genes de CaM puede ser un factor de regulación de la acción de calmodulina a nivel de transcripción, lo mismo que los sitios de poliadenilación en su región 3' no traducida.
- 4.- Las auxinas regulan positivamente la expresión del gen *cam-1* en las raíces de *Phaseolus vulgaris*.
- 5.- Extractos crudos de factor Nod de *Rhizobium etli* disminuyen la expresión de *cam-1* en la raíz y este efecto es revertido por la adición de ácido indolacético (AIA).
- 6.- El inhibidor del transporte polar de auxinas, ácido triyodobenzoico (TIBA) también reduce la expresión de *cam-1*. Un efecto revertido por ácido indolacético (AIA).
- 7.-El transporte polar de las auxinas en la raíz es necesario para mantener la expresión normal de este gen.
- 8.- Existen aumentos significativos en el nivel de expresión del mensajero de *cam-1* y la concentración de CaM, que coinciden con en el período de fijación y asimilación del nitrógeno en el nódulo.
- 9.- La acción de CaM-1 y CaM-2 podría ser regulada postraduccionalmente en el nódulo de frijol por modificación covalente con un grupo fosfato.
- 10.- La regulación diferencial de la expresión de los genes de calmodulina, la existencia de isoformas distintas y el diverso origen de las proteínas blanco de calmodulina en diferentes tejidos de frijol significan que calmodulina podría intervenir de manera muy importante en regular distintos procesos celulares y metabólicos en la simbiosis.

PERSPECTIVAS

- 1.- Caracterizar las secuencias genómicas que producen las isoformas de calmodulina y analizar sus regiones promotoras para conocer qué elementos intervienen en la regulación de sus genes, y entender cómo se controla su expresión.
- 2.- Aislamiento e identificación de las proteínas que interactúan específicamente con las diferentes isoformas de CaM de frijol, particularmente durante el establecimiento de la simbiosis, y durante el desarrollo y el funcionamiento del nódulo.
- 3.- Determinar cómo calmodulina regula a sus proteínas blanco y conocer qué función tienen éstas proteínas en la regulación de los procesos celulares.
- 4.- Aislar los genes que codifican para las proteínas de unión a CaM en el proceso simbiótico de nódulos determinados e indeterminados.
- 5.- Comprobar estructuralmente los cambios conformacionales así como funcionales conferidos por la sustitución Tyr/Asp en la posición 118 de la isoforma pvCaM-2.
- 6.- Conocer cómo la modificación postraducciona de calmodulina por fosforilación puede afectar *in vivo* su funcionamiento.
- 7.- Construcción de plantas transgénicas o realizar experimentos de expresión transitoria, principalmente para estudiar los efectos del cambio en la expresión de *cam-1* en los inicios del primordio nodular.
- 8.- Realizar hibridación *in situ* e inmunolocalización para localizar a nivel celular la expresión específica de los genes de calmodulina en raíz y en el desarrollo del nódulo bajo los efectos del factor de nodulación, de los flavonoides y de los inhibidores del transporte polar.

ABREVIATURAS UTILIZADAS

AIA = Acido Indolacético.
ATP = Adenín Trifosfato
BCIP = Bromo cloro indolil fosfato.
CaCl₂ = Cloruro de calcio.
cDNA = DNA complementario.
EGTA = Acido Etilenguanidino tetraacético
EDTA = Acido Etilendiamino tetraacético
LCO = Oligosacárido de lipoquitina.
M = Concentración molar.
mM = Concentración en milimolas.
MW = Marcador de peso molecular.
NaCl₂ = Cloruro de sodio.
NaH₂PO₄ = Fosfato ácido de sodio.
NBT = Nitro azul de tetrazolio.
pb = Pares de bases nucleotídicas.
Kb = Mil pares de bases.
kDa = Mil Daltones.
PAGE = Electroforesis en geles de poliacrilamida.
PCR = Reacción en cadena de la polimerasa.
PMSF = Fenil metil sulfonilfluoruro.
PVDF = Difloruro de Polivinilideno.
SDS = Dodecilsulfato de sodio.
SSC = Citrato de sodio.
TIBA = Acido triyodobenzoico.
Tris = Tris hidroximetil aminometano.