



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

***ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE LAS CALMODULINAS
DE PLANTAS EN ARABIDOPSIS THALIANA***

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO

PRESENTA

ALVIN LÓPEZ RETANA



MÉXICO, D.F.

2010



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: PROFESOR: ROGELIO RODRÍGUEZ SOTRES

VOCAL: PROFESORA: REBECCA ELIZABETH FRANCO Y BOURLAND

SECRETARIO: PROFESOR: EDUARDO BONILLA ESPINOSA

1ER. SUPLENTE: PROFESORA: GLORIA GUTIÉRREZ VENEGAS

2° SUPLENTE: PROFESOR: BEATRIZ RUIZ VILLAFAN

**EL TRABAJO AQUÍ PRESENTADO FUE REALIZADO EN EL LABORATORIO 115 DEL CONJUNTO “ E “ ,
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA, FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM**

ASESOR DEL TEMA

DR. ROGELIO RODRÍGUEZ SOTRES

SUSTENTANTE

ALVIN LÓPEZ RETANA

Para Marianita y papá, que tanta falta me hacen

Antecedentes	7	
I. Introducción : Las plantas, su desarrollo y su entorno	7	
<i>Arabidopsis thaliana</i>		11
II. Mecanismos de señalización celular	13	
Mensajeros secundarios y el papel central del calcio		13
III. El calcio y la calmodulina.		17
Estructura, unión del calcio y moléculas blanco		17
Mecanismos de unión CaM – blanco		24
IV. Respuestas mediadas por Ca – CaM en células y organismos vegetales	26	
Estrés en las plantas		26
Respuesta a estrés abiótico		27
Presión osmótica		27
Respuesta a la temperatura		29
Respuesta a la oxidación		31
Tolerancia a compuestos xenobióticos		32
CaM en respuesta a estrés biótico		33
CaM y desarrollo en plantas		35
V. Características de las calmodulinas de <u>Arabidopsis</u>	37	
VI. Relaciones filogenéticas entre las calmodulinas	43	
VII. Relaciones filogenéticas entre las calmodulinas de diversos grupos filéticos		49
VIII. Expresión de las isoformas de calmodulina en relación con el tejido, la edad y algunas condiciones de crecimiento en <u>Arabidopsis</u>	54	
IX. Conclusiones y perspectivas	59	
X. Apéndice		60
Análisis filogenético		61

Alineamiento de secuencias

63

XI. Referencias

65

Agradecimientos

A todos los que han representado una guía para mí a lo largo de estos años : mi abuela Lilia, cuyo incondicional cariño ha sido la fortaleza más grande en mi camino; mi invencible madre y mi bondadoso y valiente padre que sigue conmigo aunque ya no esté aquí. A mis hermanos Alfonso , Moisés y Jair; de los que he aprendido mucho y me han otorgado el privilegio de llamarles amigos. A Adrián, que se preocupó porque este proyecto estuviera completo inclusive más que yo mismo. Al doctor Rogelio, cuya infinita comprensión jamás podré terminar de agradecer. A todos aquellos que de alguna forma pequeña o grande me tendieron la mano : Gracias!!!

Antecedentes

I. Introducción. Las plantas, su desarrollo y su entorno

Una de las propiedades fundamentales de los seres vivos es la capacidad de crecer. El crecimiento es un proceso que implica la producción controlada de moléculas muy diversas que se disponen con una organización específica, cuyo arreglo responde a los planos contenidos y almacenados en el ser vivo mismo. En dicho crecimiento, la pauta no está determinada únicamente por la estructura de las moléculas; sino que además involucra complejas interacciones entre ellas, que se establecen dinámicamente y cambian en respuesta a las presiones del medio circundante y a directrices internas del ser vivo (1).

La plantas, por ser cérciles son organismos que parecieran estáticos, sin embargo, se trata de organismos en continuo cambio. Una planta no sólo difiere de una estación a otra, sino que atraviesa por diferentes etapas de desarrollo marcadas por cambios morfológicos y por diferentes estados metabólicos marcados por su capacidad para mantenerse funcional ante los cambios de temperatura, humedad iluminación, etc.

La existencia de directrices propias del organismo se manifiesta cuando encontramos que en un lote de semillas puestas a germinar en forma simultánea, bajo condiciones controladas, la germinación de los individuos no es simultánea, sino que algunos germinan en poco menos de un día y otros pueden tomar varios días adicionales. Así mismo, la aparición de sincronización de las yemas de crecimiento de los árboles sugiere la existencia de dos tipos de mecanismos de control del brotado. Seguramente, el organismo es capaz de percibir y responder a una o más influencias externas. Un grosellero suele brotar alrededor de un mes antes que la haya, aún si ambos crecen al lado del otro.

Así, cada especie difiere, en el tiempo, el patrón y la forma de desarrollarse y responder al ambiente, lo que significa la existencia de un patrón interno de respuesta que es específico de la especie, que seguramente involucra una o más señales internas que habrán de integrarse con los estímulos externos y que además está matizado por diferencias entre los individuos de una misma especie.

En muchos casos, se ha demostrado que la respuesta requiere de estímulos reiterados, cuya influencia es acumulada por el vegetal; o de fenómenos periódicos cuyo ritmo debe ajustarse a intervalos bastante definidos. Debido a que las capacidades de percepción de los vegetales no residen en órganos tan conspicuos y bien diferenciados como los ojos o los oídos de los animales, y dado que no poseen un sistema nervioso para integrar la información, los mecanismos de percepción y la integración de las respuestas resultan todavía más fascinantes.

Para entender mejor estos mecanismos de sincronización, debemos empezar por preguntarnos cómo crece una planta. El crecimiento de una planta se inicia con divisiones sucesivas de un óvulo fecundado que producen una burbuja de células diferenciadas. Después, estas se diferencian en un embrión (Fig. 1) con un primordio de tallo, llamado plúmula, que se conecta a la radícula mediante la porción llamada hipocotilo (2). Además, se presentan una o dos hojas embrionarias, llamadas cotiledones (equivalente al escutelo en la Fig. 1), así como el primordio de la raíz, llamado radícula. En las angiospermas, la mayor parte de muchas semillas está ocupada por las hojas embrionarias o cotiledones, que constituyen grandes órganos de reserva de alimento, útil para sustentar el desarrollo durante la germinación y el crecimiento inicial de la planta. En algunas otras, el embrión puede estar rodeado de tejidos accesorios, tales como el endospermo, que suele almacenar también una cantidad significativa de reservas (Fig. 1, referencia 3).

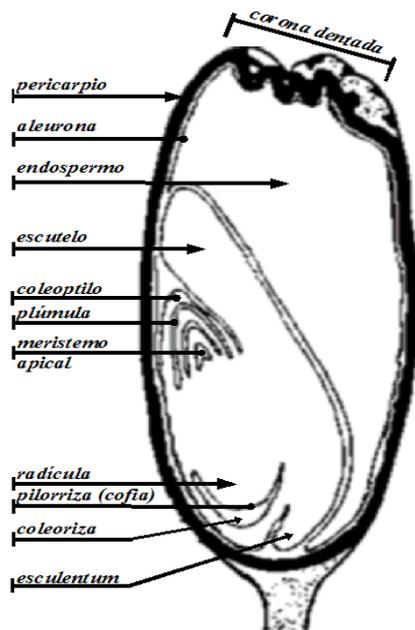


Figura 1. Anatomía de una semilla de maíz. En el esquema se muestran las partes del embrión, incluyendo al cotiledón único de esta monocotiledonea, denominado escutelo, así como a los tejidos que rodean a la semilla que derivan de un linaje celular distinto al embrión: endospermo, aleurona y pericarpio. (Tomada de la referencia 3).

La mayoría de las semillas de interés agrícola son del llamado tipo ortodoxo, lo que significa que sufren desecación al final de su desarrollo y permanecen secas en estado latente, en tanto no se inicie la germinación. En estas semillas, la germinación comienza por una fase de hinchamiento general que consiste en la absorción de agua, para que los componentes celulares puedan ponerse en marcha. De manera confluyente, se inician los procesos de reparación y restablecimiento de la maquinaria celular, que dan lugar a la protrusión de la radícula (2). Así, el embrión inicia su verdadero crecimiento en el que continúa la captación de agua, pero que se acompaña del rápido alargamiento del talluelo (hipocotilo) y de la raíz, abriéndose camino hacia el aire y ahondando en el suelo, respectivamente. Durante esta fase, las células del embrión, que al formarse eran muy pequeñas, se alargan de 10 a 20 veces. Esto resulta posible gracias al aporte de azúcar y nutrientes procedente de las reservas almacenadas, ya sea en los cotiledones, o en el endospermo (3). Así, enriquecidas, las células captan grandes cantidades de agua, que aumentan su turgencia y que literalmente las estiran hasta rebasar el punto en que pudieran volver a contraerse, de modo que su

crecimiento es definitivo. La estructura de la pared celular debe relajarse y el control de este proceso permite que la elongación sea sólo longitudinal, lo que explica el sentido del estiramiento de la raíz y el hipocotilo.

Por otro lado, las paredes celulares de las hojas embrionarias son mucho más gruesas y poseen limitada capacidad para relajarse, por ello, ya no crecen más, a pesar de la su elevada presión de turgencia, generada por las azúcares y otros solutos, lo cuales se van acumulando al degradarse las reservas acumuladas en los cotiledones y/o el endospermo (2). Como ya se comentó, la función de estos últimos tejidos es suministrar alimento al embrión y sus distinta capacidad de estiramiento es relevante para dicha función (1)

El alargamiento permite la emergencia de la plántula, pero el crecimiento posterior requiere nuevas células, de modo que a la vez que las células preexistentes se estiran, se induce la división celular en las regiones apicales de la raíz y el tallo. Dichas regiones contienen células especializadas capaces de proliferar y luego diferenciarse. Estas regiones se conocen como meristemas. En momentos definidos, las células meristemáticas, pueden dividirse en la dirección longitudinal y crecer, ó se dividen lateralmente y se diferencian para dar lugar a los primordios de hojas y flores en el meristemo del tallo, o a raíces secundarias en el meristemo radicular. La regularidad de aparición de estos primordios es notable y determina en gran medida la morfología característica de cada especie vegetal (1).

En adición, la organización del tejido meristemático es también característica de cada especie y determina aspectos tan relevantes como la velocidad de crecimiento del tallo y la raíz, la cantidad de brotes laterales y sus respectivas velocidades de crecimiento, etc. Aunque se ha logrado un gran avance en el entendimiento del control del crecimiento y la diferenciación celular en plantas, los mecanismos subyacentes se conocen parcialmente o son desconocidos (4).

Una vez que la planta ha iniciado realmente el crecimiento y el tallo ha brotado del suelo, la luz constituye un factor importante en el desarrollo ulterior (5). Además, el crecimiento de diversas partes de las plantas, en particular de las raíces, está influido por la presencia de agua y de productos alimenticios. Las raíces tienden a dirigirse y concentrarse hacia las capas del suelo particularmente ricas en agua, en minerales o ambos.

La renovación celular es una diferencia básica entre plantas y la mayoría de los animales. Cuando un animal alcanza la madurez, su crecimiento se detiene. Los huesos y las células nerviosas cesan de crecer y sus células casi no se dividen. En otros tejidos, unas células reemplazan a otras sin que aumente el tamaño del individuo. Una vez que un animal alcanza su tamaño adulto conveniente, se conserva en él toda la

vida, prácticamente sin crecimiento ulterior. La razón de ello es que, aunque algunas de sus células no sean insustituibles, poseen una vida larga y algunas células pueden persistir casi inalteradas durante años. Sin embargo, llegarán a desgastarse y el animal morirá. En cambio, las células vegetales tienen vida más corta y deben sustituirse constantemente, al mismo tiempo, son células que tienen un control menos estricto sobre la diferenciación celular. En las células animales, el potencial para que una célula hepática pueda desdiferenciarse se pierde casi por completo. En las células vegetales, la plasticidad es mayor y a menudo, aunque no en todos los casos, una célula parcialmente diferenciada puede desdiferenciarse, proliferar y dar lugar a células que a su vez pueden regenerar un organismo completo (6).

Una vez analizado el complejo mecanismo que implica el desarrollo de un organismo vegetal, se puede iniciar un estudio aun más complejo; aquel que involucra las respuestas al medio que permiten a la planta sobrevivir y más aun, adaptarse a los diferentes estímulos con los que tiene que enfrentarse día tras día, es decir , su señalización celular.

Arabidopsis thaliana

La mayor parte de la información conocida sobre genómica de organismos vegetales, tiene como base de estudio a una planta de la familia Brassilaceae llamada *Arabidopsis thaliana*. Esta planta está relacionada con plantas comestibles como el brócoli, la col y la coliflor; se le puede encontrar de forma natural en algunas regiones de Asia, Europa y el norte de África; y ha sido introducida en América y Australia. Su tamaño es pequeño, aproximadamente 30 cm; su ciclo de vida oscila entre las seis y ocho semanas; es capaz de producir hasta diez mil semillas; puede auto fertilizarse y tiene distintas variedades que pueden encontrarse en diferentes ecosistemas. (54)

Las razones por las cuales se ha elegido a este organismo como patrón para estudios de biología molecular son diversas: su genoma es uno de los más pequeños entre las plantas; contiene únicamente cinco cromosomas que incluyen aproximadamente 115,409,949 pares de bases; puede ser utilizada para elaborar transgénicos empleando *Agrobacterium tumefaciens* como vector. Debido a su pequeño tamaño, puede ser fácilmente criada en laboratorios; además de que su elevada producción de semillas facilita los estudios genéticos, y es muy susceptible a mutaciones. Sin embargo, todos estos factores podrían parecer superfluos comparados con el hecho de que sus genes son comunes para cerca de 250 00 especies más complejas; lo que facilita enormemente el entendimiento y desciframiento de otras secuencias genéticas. (54)

De los cinco cromosomas, el número 1 es el más largo, dividido en dos bloques de aproximadamente 14.2 y 14.6 megabases respectivamente. Estos bloques se extienden desde los telómeros hasta los bordes centroméricos, que son regiones ricas en secuencias repetitivas. Este cromosoma representa el 25% del genoma total, y contiene 236 tRNAs y 12 RNAs nucleares. Los genes de tRNA están divididos en dos cúmulos ubicados en regiones diferentes del cromosoma, que almacenan 300 familias de genes duplicados. (54)

En comparación con el genoma humano, el de *Arabidopsis* tiene más zonas sin emplear, y representa una cuarta parte del total de genes humanos. De cualquier forma, de poco serviría la comparación de genomas, si no se diera el caso de que hay funciones que tanto animales como vegetales comparten; o inclusive afecciones o degeneraciones, como es el caso de la enfermedad de Wilson; que consiste en la imposibilidad de un organismo para eliminar el exceso de cobre. Así mismo, se sabe que la mitad de los genes de *Arabidopsis* son compartidos por bacterias y hongos, hecho que realza la importancia del estudio genómico de esta sencilla, pero importante planta. (54)



Figura 2. *Arabidopsis thaliana*. ©William S. Justice. Courtesy of Smithsonian Institution, Dept. of Systematic Biology, Botany.

II. Mecanismos de señalización celular

Mensajeros secundarios y el papel central del calcio

A lo largo de su ciclo de vida, las plantas, así como todos los organismos en general, supervisan constantemente las variaciones que ocurren en su entorno; variaciones que en un momento dado pudieran convertirse en amenazas reales para su desarrollo, aunque ocasionalmente pueden constituir una oportunidad para crecer de manera extraordinaria. Entre estas alteraciones encontramos al clima como un importante exponente, ya que un cambio en la temperatura o en la fuerza con la que sopla el viento, por ejemplo, resulta en un daño irreparable para la planta si ésta no produce una respuesta defensiva ante tales estímulos. Pero el clima no es la única amenaza a la que tiene que hacerle frente; existen también factores orgánicos tales como insectos, o patógenos intracelulares que invaden a la planta y que es necesario eliminar o, al menos controlar, para continuar con el desarrollo normal (7).

Los mecanismos de percepción y respuesta ante los diversos estímulos son regulados por la planta por medio de señales que son transportadas intra e intercelularmente a través de una serie de redes que proporcionan la información necesaria para contender adecuadamente con estos factores. Las señales transportadas varían en cuanto a calidad y cantidad, de manera que puedan ser interpretadas para generar una respuesta específica. Además la respuesta debe estar coordinada con el estado general de la planta, por lo que dicha respuesta estará modulada por la madurez y experiencia previa del organismo, a través de mecanismos internos (8).

Las moléculas utilizadas para transportar y codificar la información acerca del estímulo se denominan mensajeros secundarios, los cuales son capaces de difundirse en la célula y enlazarse a proteínas específicas para iniciar las respuestas celulares adecuadas, que incluyen cambios en la actividad enzimática, expresión de genes y rearreglo del citoesqueleto (7). La información suministrada por la señal y que debe ser interpretada incluye la propagación espacial y temporal de la misma, además de la amplitud, la cual es proporcional al estímulo; así como la frecuencia de oscilaciones. En gran medida en las células vegetales, dicha distribución espacial es controlada por la célula mediante una compleja red de canales iónicos que operan en la membrana (8).

El primer paso en la transducción de la señal, es la percepción mediada por una proteína receptora que puede hallarse en la membrana o en el citosol. La proteína receptora interpreta la señal, después genera o modifica un mensajero secundario que a su vez, activa enzimas específicas para iniciar la cadena de eventos que dan

respuesta al estímulo dado. Algunas proteínas receptoras pueden estar acopladas a canales iónicos que permiten la entrada o salida de iones (9). Además, algunos canales secundarios que son activados por diferencia de potencial, pueden permitir cambios importantes en el contenido de iones entre el medio externo, el citosol y/o diversos compartimentos intracelulares. En muchos de estos casos, los iones se convierten en el mensajero que transduce la señal (7).

En células animales, se conoce una variedad de mecanismos de señalización celular, mientras que en los vegetales; entre las moléculas señalizadoras de mayor importancia se encuentran el calcio como principal exponente, y en un segundo término, el ácido fosfatídico (PA). La formación de PA en plantas es una consecuencia de un estímulo biótico o abiótico, en donde el clima ocupa un lugar preponderante como generador de dichos estímulos (10).

Cuando se percibe un estímulo cuya señal es transducida a través del PA, es cuestión de unos minutos para que el nivel de éste se modifique y desencadene otras señales que conducen a una respuesta celular. La señal inicial es transitoria y, por supuesto, está en función de la intensidad y duración del estímulo (10).

Como bien sabemos, la mayoría de los lípidos membranales cumplen funciones más bien estructurales y de regulación de la permeabilidad celular; pero los lípidos asociados a sistemas de señalización, tales como el PA, son más heterogéneos y se encuentran presentes en cantidades muy bajas y aunque sus niveles pueden llegar a elevarse significativamente, esto ocurre sólo por un breve lapso, y generalmente, se restringe a una región discreta de la membrana celular. Así, los mecanismos de síntesis y degradación de los lípidos involucrados en la señalización son rápidos y se encuentran sujetos a controles estrictos (10).

La formación de PA puede darse a través de dos vías bien conocidas : i) A partir de la fosfolipasa D (PLD), que hidroliza a los fosfolípidos estructurales para generar PA y un grupo cabeza libre. ii) Mediante la acción en secuencia de la fosfolipasa C (PLC) y la diacilglicerol cinasa (DGK).

El segundo caso es la acción de la PLC sobre el fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP_2) a inositol-1,4,5-trifosfato (IP_3) y DAG. Este mecanismo está muy bien caracterizado en células animales (10) y hay buena evidencia experimental de su operación en plantas. El IP_3 difunde en el citosol, en donde promueve la liberación de calcio desde los almacenes intracelulares, mientras que el diacilglicerol (DAG) permanece en la membrana en donde también puede actuar como un segundo mensajero, pero que es rápidamente fosforilado a PA por DGK (13). A su vez, el PA ejerce su efecto como mensajero secundario, pero luego es eliminado de la membrana por la fosfatidato fosfatasa (PApasa), o bien, fosforilado a diacilglicerol pirofosfato (DAGPPi) por acción

de la fosfatidato cinasa. Este último mecanismo fue de hecho descubierto inicialmente en plantas luego de que se descubrió la existencia del diacilglicerol pirofosfato en los seres vivos (12,13). Aparentemente, la formación de PA por uno u otro mecanismo está determinada por el tipo de estímulo percibido (10).

El modo de acción de PA involucra el reclutamiento de proteínas membranales en las que el lípido funciona como ligando activador, para que una vez activada la proteína, pueda iniciar el efecto de respuesta. (Los blancos de PA incluyen una variedad de cinasas, fosfatasas, fosfatidilinositol cinasas y muchas otras como proteínas G, esterasas, oxidasas y oxidasas del tipo llamado mTOR, todas involucradas en distintos mecanismos de respuesta (10).

A su vez el DAGPPI ha sido identificado como un mensajero secundario por si mismo, mediador de la señal de fitorregulador ácido abscísico (ABA) y cuyos efectos requieren a su vez de cambios en los niveles de Ca^{2+} intracelular (13).

Además de las señales anteriores y como se puede intuir de todos estos datos, en las plantas el calcio es el mensajero secundario más importante en la transducción de señales. Este mensajero secundario actúa a través de una gran cantidad de proteínas asociadas a la percepción de estímulos del desarrollo y la diferenciación, del control del ciclo celular, de la reproducción, y del estrés biótico y abiótico. El calcio es almacenado intracelularmente en diversos organelos como la vacuola, la mitocondria y el retículo endoplásmico rugoso, de los que puede ser liberado cuando sea requerido. Además de estos almacenes, existen otras fuentes de calcio extracelular que de la misma manera son manipulados por la célula para transducir las señales (7).

Las señales que son mediadas por calcio producen elevaciones transitorias de la concentración intracelular de calcio. De hecho, las concentraciones citoplasmáticas de calcio suelen moverse en rangos del orden μ molar, en contraste con las concentraciones extracelulares o en los depósitos intracelulares de calcio, en donde puede alcanzar niveles milimolares. El flujo de calcio desde los depósitos extracelulares hacia el citoplasma dependen de la apertura y cierre de canales de calcio, en tanto que, una vez transducida la señal, el estímulo se amortigua gracias a la acción de las ATPasas de Ca^{2+} , que bombea nuevamente el calcio a sus depósitos originales (14). La liberación de calcio se traduce en la unión de este catión divalente a diversas proteínas, algunas de las cuales ejercen acciones posteriores directamente, tales como fosforilar a otras proteínas (11). Otras más, después de unirse al calcio, se unen a otras proteínas con actividad catalítica o de transporte, modificando su actividad. Esto último es lo que finalmente da lugar a la respuesta. (7, 11)

Los mecanismos de homeostasis del Ca^{2+} intracelular son complejos, porque involucran además señales que permiten el influjo extracelular de calcio hacia los depósitos

intracelulares, ello con el objeto de mantener los niveles de calcio de dichos depósitos en niveles adecuados para la célula (11, 14).

Uno de los aspectos más interesantes de la señalización mediada por calcio es el hecho de que las concentraciones de Ca^{2+} libre intracelular no se modifican de manera simple. Las respuestas de apertura y cierre de canales, así como la actividad de las bombas que lo remueven están a su vez reguladas directa o indirectamente por el catión, con diferentes periodos de respuesta en cada caso. Como resultado, el Ca^{2+} se eleva y baja repetidamente generando oscilaciones en su concentración local, que se propagan de manera definida hacia otras regiones del citoplasma como ondas con frecuencias bien definidas. Entonces, las enzimas blanco resultan sensibles no sólo a la elevación del calcio, sino que además la frecuencia de las oscilaciones permite un acoplamiento entre los mecanismos que inician la respuesta y aquellos que la apagan, generando así una señal oscilatoria cuya intensidad, periodo y duración progresan con una reproducibilidad sorprendente. Dichas variaciones permiten que diferentes mecanismos de respuesta mediados por calcio puedan dispararse o no en función de la amplitud y frecuencia de la señal generada (8).

III. El calcio y la calmodulina

Estructura, unión del calcio y moléculas blanco

Muchas proteínas que transducen señales de calcio poseen un dominio estructural en común: el dominio de la mano EF (Fig 2), el cual consta de dos hélices alfa (designadas como E y F) enlazadas entre sí por una cadena corta de aminoácidos que conforman un asa, la cual, a su vez, presenta en su secuencia, aminoácidos que participan en la unión a un ión de calcio (15, 16). Tanto en la calmodulina (CaM; Fig. 3), como en otras proteínas que unen calcio, este arreglo se halla unido a otra estructura semejante por medio de una lámina β (16), aunque existen algunos casos en los que no es así (17). En la CaM, estos dominios están enlazados por una asa más larga a otro dominio similar, de modo que se tienen dos dominios globulares y cuatro sitios de unión a calcio (15). Las proteínas de unión a calcio forman una familia, y los miembros se distinguen unos de otros por el número de pares de manos, afinidad con calcio, mecanismos de acción, proteínas blanco y, desde luego, por sus genes diferenciados (8).

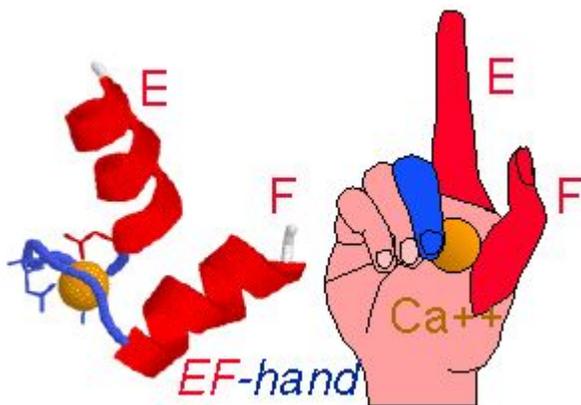


Figura 3. Dominio de la mano EF. Imagen tomada de la presentación *Predicción de estructura de proteínas*, por Aurelio A. Moya García.

En las plantas, al igual que en muchos otros eucariontes, uno de los receptores primarios de la señal de calcio es la CaM. En las células humanas la CaM es una única

proteína, cuya secuencia está codificada por 3 isogenes cuya expresión es regulada de diferente manera. En las plantas, sin embargo, la CaM es una proteína con diferentes isoformas, algunas de las cuales varían significativamente en su secuencia de aminoácidos y poseen afinidad diferencial por el tipo de proteínas blanco a las que regulan, aun no se sabe con certeza el por qué de la existencia de la gran variedad de dichas isoformas, aunque probablemente se deba a que algunas plantas responden a estímulos sumamente específicos, por ejemplo, el ataque de algún insecto perteneciente a una familia o género en particular, que no se presentaría en otras plantas de diferentes ecosistemas. (8, 18, 19).

Como ya se ha mencionado, la molécula de CaM posee cuatro sitios de unión a Ca^{2+} , en lo que se considera que existen 12 aminoácidos que participan directamente en el sitio de unión a Ca^{2+} , muchos de los cuales son residuos glutamato o aspartato; sin embargo, dichos sitios no son idénticos entre sí, por lo que su afinidad por Ca^{2+} también es distinta.

La CaM no tiene actividad catalítica por sí sola, pero una vez que se enlaza a Ca^{2+} puede modular la actividad de numerosas proteínas blanco que están involucradas en una gran cantidad de procesos celulares. La asociación a la gran diversidad de moléculas está relacionada directamente con las estructura primaria, que responde específicamente a la presencia de dichas moléculas. (8, 9, 11, 17, 19, 20).

El modelo clásico de la estructura tridimensional de la CaM se determinó a partir de la proteína de los mamíferos y posee 148 aminoácidos arreglados en dos dominios globulares conectados entre sí por una larga hélice flexible. Los blancos moleculares son proteínas que poseen regiones usualmente compuestas de 12 a 30 aminoácidos. Dichos blancos presentan secuencias primarias muy diversas, pero adoptan estructuras de hélice α de baja polaridad (8, 15, 16).

Al enlazarse el calcio a la CaM, la estructura terciaria de la molécula se modifica exponiendo una parte hidrofóbica rica en metionina, leucina y fenilalanina, lo que proporciona flexibilidad al complejo (21, 24). Las proteínas blanco reconocen estas zonas y se enlazan, por interacciones hidrofóbicas, algunos puentes salinos y/o algunos puentes de hidrógeno (24). El modo de unión de las proteínas a la CaM es variable y las proteínas blanco pueden, a su vez, establecer interacciones adicionales con la CaM, a través de su región amino, su región carboxilo, o ambas (25).

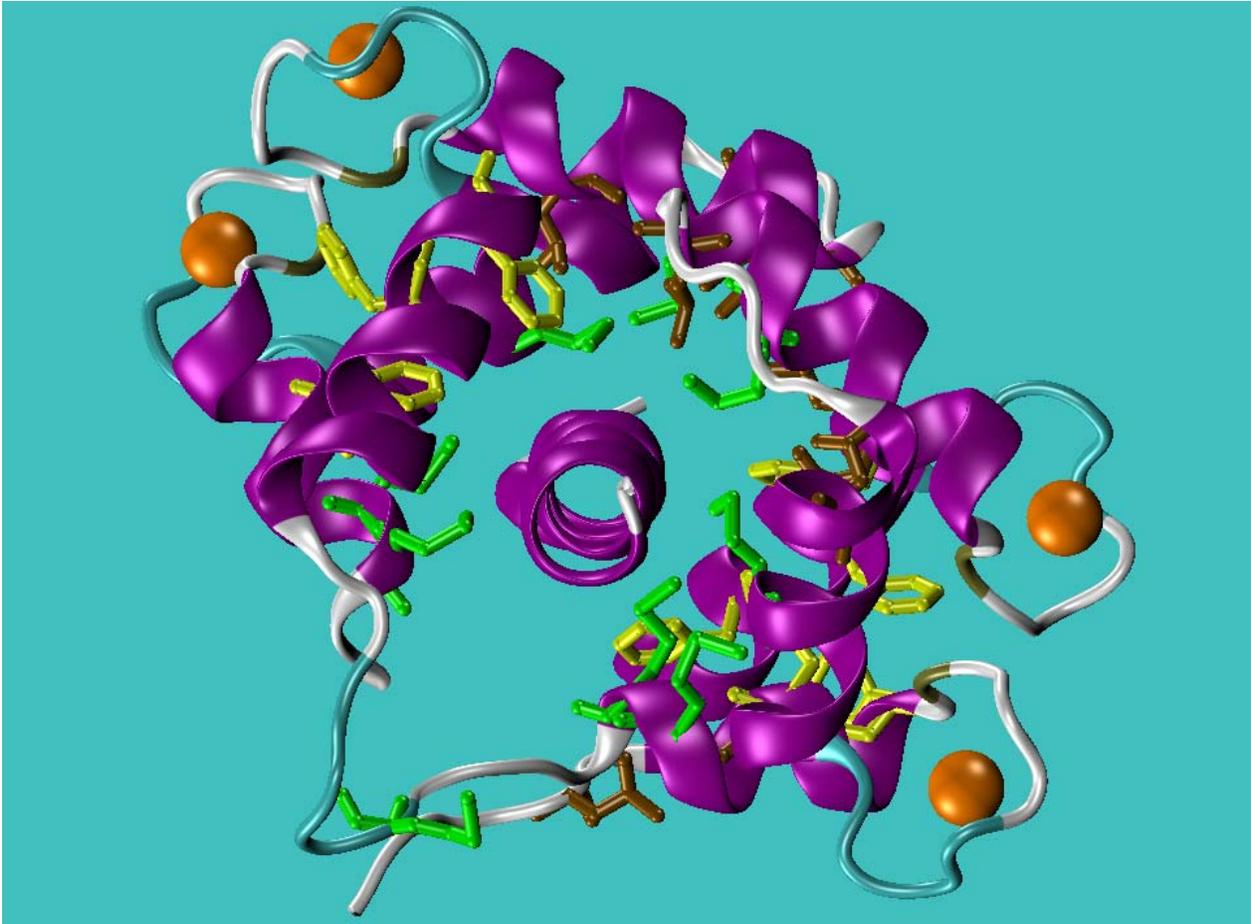


Figura 4. Calmodulina exponiendo los residuos de metionina (verde), leucina (marrón) y fenilalanina (amarillo). La hélice al centro es un fragmento del extremo amino del receptor a NMDA que es regulada por CaM. La imagen fue preparada con VMD (ref) empleando las coordenadas del archivo 2HQW del PDB (ref), para fines de esta imagen los aminoácidos que no fueron resueltos por cristalografía fueron reconstruidos mediante modelado molecular.

Es de suma importancia recalcar que la unión a proteínas blanco es modulada directamente por el calcio. Así, la CaM transduce las oscilaciones en la concentración del catión, las que, a su vez, son función del estímulo. Como se ha mencionado, hay evidencia que indica que el sistema de la CaM es capaz de responder no sólo a la intensidad, sino también a la frecuencia de las oscilaciones generadas por un estímulo específico, aspecto que sin estar completamente resuelto, no deja de ser sorprendente (11).

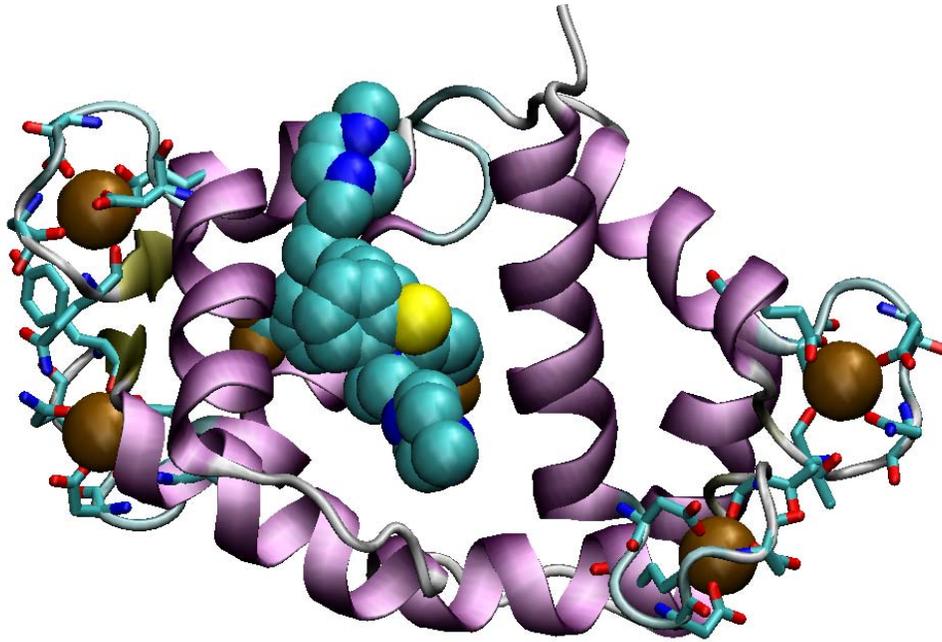


Figura 5 . Modelo esquemático de la calmodulina mostrando la estructura secundaria de la cadena polipeptídica en la que destacan la hélices α (espirales magenta), los átomos de Ca^{2+} (esferas ocre) y el ligando sintético trifluoroperazina (TFP), que es un potente inhibidor. La imagen proviene del archivo 1CTR (21) depositado en el banco de datos cristalográficos de proteínas (PDB; 22) y fue preparada empleando el programa VMD (23).

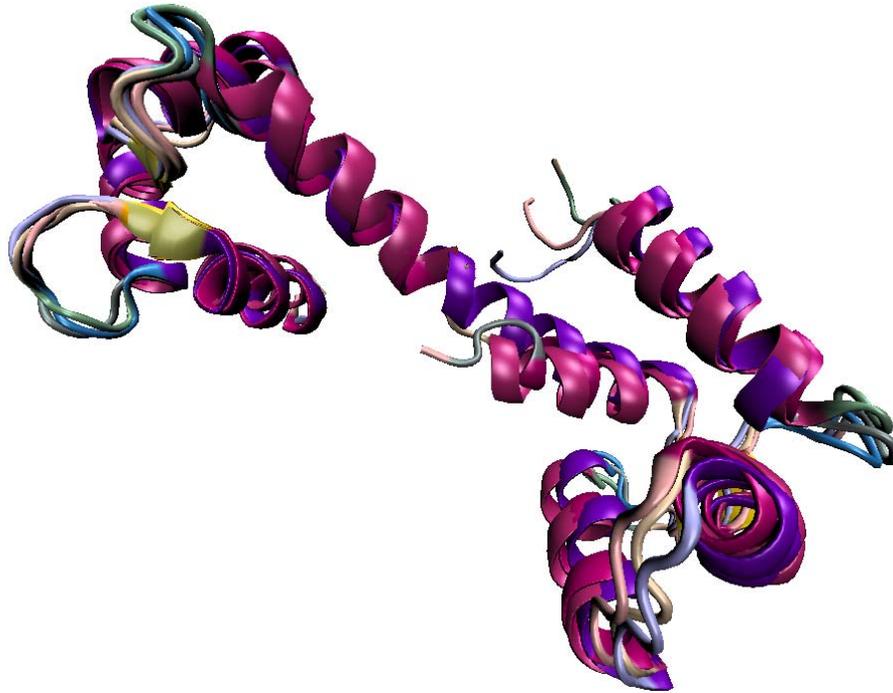


Figura 6. Modelo esquemático de la isoforma 6 de la calmodulina de la papa (pdb 1RFJ; 22) superpuesta a las estructuras de dominios amino y carboxilo de las calmodulinas 1 (pdb 2RO8 y 2RO9; 22) y 4 (pdb 2ROB y 2ROA; 22) de la soya. La imagen fue preparada empleando el programa VMD (23).

La CaM puede ubicarse en el citoplasma o en el núcleo y puede estar además enlazada a la membrana. Su concentración celular varía en las plantas dependiendo de la etapa de desarrollo por la que esté atravesando la planta, además de que, como se ha mencionado, están presentes varias isoformas.

Las secuencias de aminoácidos de las calmodulinas vegetales presentan importantes variaciones entre sí, sin embargo, existen estructuras resueltas hasta la fecha, correspondientes a la CaM 1 y 4 de la soya y la CaM 6 de la papa, que presentan entre sí plegamientos muy semejantes. (Fig. 5).



Figura 7. Modelo esquemático de la apocalmodulina de *Xenopus laevis* (pdb 1CFD; 22) superpuesta a las estructuras de dominios amino y carboxilo de las calmodulinas 1 (pdb 2RO8 y 2RO9; 22) y 4 (pdb 2ROB y 2ROA; 22) de la soya. La imagen fue preparada empleando el programa VMD (23).

Las calmodulinas vegetales muestran además una importante divergencia respecto de las calmodulinas animales a nivel de estructura primaria. Sin embargo, el plegamiento tridimensional del esqueleto de la proteína difiere apenas en la posición de algunas asas (Fig 6).

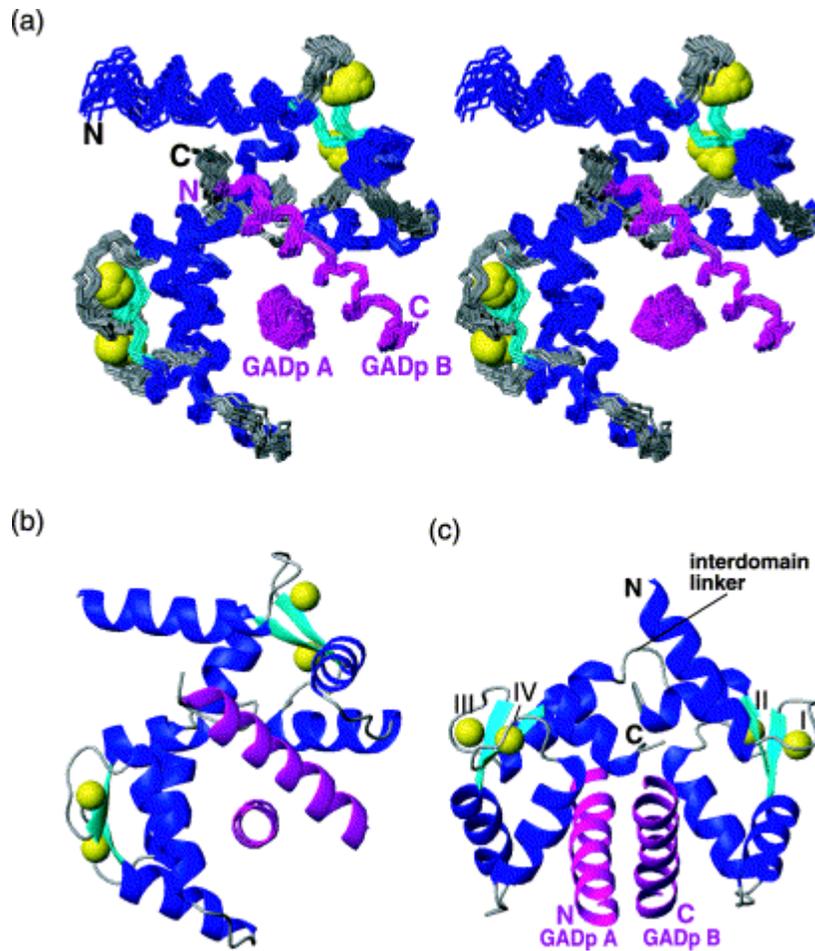


Figura 8. CaM enlazada a la membrana celular a través de sus blancos. Estructura tridimensional del complejo Ca^{2+} - CaM unido a un dímero del péptido regulador de la GAD de petunia. La estructura fue resuelta por medio de NMR. a) Superposición de 20 conformeros ,las hélices de CaM están en azul, los iones de calcio en amarillo y las hebras en púrpura. b) Estructura promedio obtenida del conjunto de las 20 estructuras en a). c) la misma estructura en b) rotada para permitir observar la simetría de la interacción. Los números romanos indican la posición de los átomos de Ca^{2+} . (Tomada de Yap et al 2003).

Mecanismos de unión CaM-blanco

Existen tres mecanismos comunes en los que la CaM puede unirse a una proteína blanco y activarla para iniciar la respuesta correspondiente. El primero de ellos consiste en eliminar la auto inhibición de la proteína blanco. La proteína blanco posee un dominio capaz de inhibir su actividad, la unión de la calmodulina ocurre a través de este dominio y, una vez que el complejo $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ se enlaza, el dominio auto inhibitorio es desplazado del sitio activo, volviendo activa a la enzima (8, 11, 26).

El segundo mecanismo de activación provoca un cambio en la conformación de la proteína blanco inactiva, estabilizando así el sitio activo y permitiendo que se pueda utilizar a esa enzima para el proceso requerido (8, 11, 25, 27, 28, 31).

El último de los mecanismos es una dimerización del blanco, que ocurre en el caso especial de transporte iónico. En este proceso, intervienen dos moléculas de CaM, que actúan sobre dos dominios de canales iónicos. Dicho dominios quedan expuestos y median la dimerización del complejo, el que a su vez permite la formación del canal por el que puede pasar el ion metálico (8, 24, 31)

Como cabe esperar en todo proceso de respuesta a un estímulo, el complejo $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ libera a la proteína blanco al reducirse la concentración de Ca^{2+} libre, debido principalmente a la acción de las bombas primarias de Ca^{2+} que restablecen el balance iónico a su condición de reposo (28, 31).



Figura 9. Modelo esquemático de la CaM unida a la proteína cinasa asociada a apoptosis (DAPK) mostrando los aminoácidos de la CaM que hacen contacto con la cinasa (bolas y alambres) y los de la cinasa que hacen contacto con la CaM (varillas). La imagen fue preparada con VMD (53) empleando las coordenadas del archivo 2X0G del PDB .

IV. Respuestas mediadas por Ca-CaM en células y organismos vegetales

Estrés en las plantas

Como se ha mencionado, las plantas son sometidas a condiciones de estrés que pueden afectarlas adversamente. Estas condiciones pueden ser sequías, inundaciones, cambios drásticos en la temperatura, alta salinidad o inclusive ataques de insectos y demasiada o poca luz. Dependiendo del origen del estrés, se pueden clasificar en bióticos cuando la amenaza proviene de otro organismo (30), y abióticos cuando se trata de un estímulo inorgánico o propio del medio ambiente (29).

Cuando la planta detecta una amenaza, se disparan una serie de procesos que tienen como finalidad la supervivencia, estos procesos incluyen cambios en el metabolismo, expresión génica y otras situaciones necesarias para continuar con el desarrollo (7). La resistencia a cada uno de estos factores adversos depende de la especie, del genotipo y de la etapa de desarrollo en la que se encuentre la planta (29, 30).

La respuesta depende de la duración, número de exposiciones y severidad del estímulo, además de las características del tejido u órgano que esté bajo ataque y, por supuesto, del tipo de estrés al que se enfrente la planta. En ocasiones, sucede que se presenta una combinación de condiciones estresantes que afectan al mismo tiempo a la planta, por lo que será necesaria una respuesta distinta a la que se presentaría ante un estrés simple (7).

Un mecanismo ordinario de señalización celular inicia con la percepción de un estímulo ambiental, seguida de la generación de moléculas mensajeras que viajan hasta células blanco específicas. Estas moléculas mensajeras provocan el incremento transitorio de Ca^{2+} intracelular, que a su vez inicia una cascada de fosforilaciones que como parte final se unen a proteínas involucradas directamente en la protección de la célula, o en la modulación de genes que codifican moléculas reguladoras de estrés como ácido salicílico o etileno. A su vez, estas moléculas reguladoras inician una segunda ronda de señales que siguen el mecanismo ordinario pero con otro tipo de moléculas involucradas (42).

El estrés por sí mismo puede generar una respuesta, pero también puede generarla indirectamente al producir una lesión, lo que casi siempre afecta la integridad de la membrana celular (31, 33). El genotipo determina si la respuesta permite a la planta aclimatarse al estrés, o sólo evitan la exposición o resistir transitoriamente hasta que el estímulo termine.

La CaM es una de estas proteínas reguladoras que son capaces de coordinar procesos defensivos y que gracias a su gran especificidad, puede activar diversas proteínas blanco apropiadas para cada tipo de estrés (11, 25, 31). Se encuentra preferentemente en el citosol, aunque debido al gran número de proteínas blanco que puede activar, también puede hallarse en algunos organelos y compartimentos intracelulares cercanos a estos blancos. Muchos de los genes de CaM en plantas codifican para la misma isoforma, pero la expresión de cada uno es regulada de diferentes modos, lo que habla de la especificidad con que esta proteína trabaja (43).

La transducción de las señales requiere de la absoluta coordinación espacial y temporal de todas los componentes involucrados en el proceso, de tal forma que existen moléculas que se encargan de ensamblar o modificar a dichos componentes para continuar con el mecanismo. Entre las modificaciones a los componentes están la lipidación y metilación de las enzimas seleccionadas (42).

Respuesta de CaM a estrés abiótico

Presión osmótica

Cuando la planta se encuentra en un medio en el que la cantidad o la calidad de agua asequible es insuficiente para cubrir las necesidades vitales, o por el contrario, cuando se tiene un exceso de la misma; se presenta un tipo de estrés que afecta severamente a las células.

Existen varios factores que pueden llevar a la planta a esta situación, por ejemplo periodos largos de sequía o un medio en donde el suelo tenga una alta concentración de sales; que provoca que las raíces sean incapaces de acarrear el agua del subsuelo que necesitan. Además, las bajas temperaturas pueden provocar una descompensación de agua en la célula, pues al formar cristales de hielo en los espacios intracelulares se favorece una deshidratación celular (7)

En la situación inversa, cuando hay un exceso de agua, el potencial de la misma podría provocar que la célula alcanzara una presión de turgencia tan alta que finalmente reventaría; por lo que es fundamental que los niveles intracelulares sean reagulados y monitoreados constantemente.

La presión hiperosmótica es una descompensación de agua en la célula, mientras que la presión hipoosmótica es un incremento del potencial del agua. Ambas situaciones son ejemplos de estímulos abióticos que activan al calcio citosólico y provocan el aumento rápido de su concentración. Una señal de calcio inducida por este tipo de presión es detectada por proteínas dependientes de calcio unidas a la membrana, así como por proteínas sensibles a sal que a su vez indican a otras proteínas que deben activarse en respuesta al ataque (8).

La CaM es una de esas proteínas que perciben la señal estimulada por presión osmótica y que además coordina a las enzimas adecuadas para generar una respuesta que proteja a la célula. Las enzimas blanco enlazadas a CaM durante presión osmótica son muy específicas para ese fin, pues se sabe que esas mismas enzimas no se activan ante otro tipo de estímulo como calor o frío. Sin embargo, esto no es exclusivo para todas las enzimas blanco, pues existen proteínas que son utilizadas por la CaM para combatir además del estrés osmótico otro tipo de agentes dañinos como luz UV o etileno. Esto podría explicarse en términos de la estructura de la proteína blanco. Las diferencias entre una y otra proteína de enlace radican en la secuencia y cantidad de aminoácidos que poseen, por lo que pudiese existir una proteína blanco que posea tal secuencia de aminoácidos que la hiciera útil para más de un estímulo, mientras que la estructura primaria de otra sólo la hiciera viable para una única respuesta (8).

Un mecanismo de respuesta ante este tipo de estrés consiste en un ajuste osmótico. Para que la planta pueda extraer agua del suelo debe cumplirse la condición de que el potencial del agua en la raíz sea menor al potencial del agua en el suelo, de manera que la raíz debe establecer un gradiente de potencial de agua tal que el agua fluya hacia la raíz desde el suelo. Entonces, cuando hay presión hiperosmótica, el ajuste osmótico produce un incremento en el número de partículas de soluto en la célula, elevando la presión de turgencia y favoreciendo que el potencial del agua en la célula sea menor que el potencial del suelo y poder así cubrir la condición necesaria para el proceso, aún en el caso de contar con una cantidad mínima de agua en el suelo (7)

Un ejemplo de cómo actúa la CaM y sus proteínas de enlace ante estrés osmótico se da con una proteína activada por CaM llamada ACA4, que al activarse inicia el relleno de los almacenes de calcio intracelular como un mecanismo de defensa,

regulando la tolerancia de la célula ante altos niveles de sal. La ACA4 es una ATPasa autoinhibida que cuando se enlaza a CaM elimina la autoinhibición y puede restaurar el crecimiento que se vio truncado por el estrés osmótico (8).

Respuesta a la temperatura

El calcio está también involucrado en la respuesta al frío y al viento, aunque las señales son espacialmente distintas. La CaM recibe y traduce esas señales para lograr la aclimatación mediante la activación de enzimas que inician procesos que tienen como fin el endurecimiento de la pared celular y así resistir estas condiciones ambientales. Una vez que la CaM ha regulado el proceso de aclimatación, la planta presenta una mayor tolerancia al frío (8 , 42).

Las bajas temperaturas afectan en demasía a las plantas causando un déficit de agua al formar cristales de hielo en el espacio entre la membrana y la pared celular, o en condiciones extremas, el congelamiento del citoplasma, que lleva a la muerte celular. Para controlar este estímulo, las plantas promueven el desplazamiento del agua intracelular hacia el exterior, para de esta manera evitar que el agua se congele mientras está en el citoplasma. (7).

Para minimizar el efecto que provoca la deshidratación causada por el congelamiento, la célula es capaz de inducir y acumular proteínas que funcionan como anticongelantes en el espacio entre la membrana y la pared, y así poder retrasar el proceso de congelación y por lo tanto retardar la deshidratación (7, 42)

Un factor importante en la respuesta a este estímulo es la severidad con la que la planta es expuesta al frío, ya que si las condiciones son muy extremas, el agua que se encuentra en el citoplasma no alcanzaría a ser desplazada hacia el exterior lo suficientemente rápido para evitar que los cristales se formen dentro.

La tolerancia a las bajas temperaturas es una cualidad que se desarrolla en un proceso de aclimatación que es una respuesta a temperaturas bajas pero no congelantes, es decir, como si la planta determinara, por así decirlo, el grado del estímulo al que se enfrenta para después poder combatirlo adecuadamente. Una vez que se ha efectuado este proceso, la planta es capaz de tolerar temperaturas mucho más bajas, por ejemplo, la *Arabidopsis* es expuesta a temperaturas de entre 1 y 5 °C durante cinco días; y después de este lapso se vuelve tolerante a temperaturas de hasta – 12 °C (7).

Además de la acumulación de proteínas anticongelantes, la respuesta incluye acumulación de azúcares y estabilización de la membrana, que resulta dañada tras la formación de los cristales.

En *Arabidopsis*, la CaM actúa como traductor de las señales de calcio estimuladas por el frío y como activador de un transportador de $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ llamado CAX1 que controla la expresión de genes inducidos por frío. Estos genes codifican para una familia de activadores que median la aclimatación. Además, la CaM funciona como un regulador negativo de la expresión de genes inducidos por frío, como se observó en *Arabidopsis* tratada en bajas temperaturas, disminuyendo los niveles de transcriptos regulados por frío (8). Es así como se demuestra que las proteínas de enlace a CaM participan en la respuesta ante estímulos generados por bajas temperaturas.

Por otro lado, la CaM también es capaz de dirigir el mecanismo de respuesta ante temperaturas elevadas movilizandoproteínas específicas ante el choque térmico. Varias proteínas de enlace a CaM funcionan durante esta respuesta, formando complejos con las proteínas de choque térmico logrando la aclimatación a la nueva temperatura (8).

La respuesta característica ante el choque térmico es la disminución de la síntesis de proteínas normales, y la rápida producción de un nuevo conjunto de proteínas conocidas como proteínas de choque térmico (HSPs por sus siglas en inglés). La síntesis de estas proteínas se da cuando la planta es expuesta a temperaturas 5 °C más arriba de las condiciones óptimas de desarrollo (41).

El calor daña a los organelos y al citoesqueleto, además de desestabilizar a la membrana. Las condiciones bajo las cuales este tipo de estrés afecta a la planta son diversas, por ejemplo cuando el suelo es sobrecalentado por el sol o cuando la transpiración es insuficiente debido a bajos niveles de agua y altas temperaturas. (41).

Para poder tolerar estos estímulos, es necesario que la planta sea expuesta previamente a temperaturas altas pero no letales durante algunas horas antes del choque térmico. Una vez aclimatada, la planta puede sobrevivir a temperaturas que de otra manera resultarían mortales. Esta tolerancia térmica está dada por las nuevas proteínas sintetizadas que le confieren a la planta esta propiedad, aunque por supuesto

existe un límite dentro del cual la aclimatación funciona, y rebasarlo significa la muerte. La función de las HSPs es la de reemplazar a las proteínas que fueron desnaturalizadas por las altas temperaturas y así poder continuar con el desarrollo normal (41).

La CaM interactúa con las HSPs para montar un proceso de defensa que involucra la expresión de genes que a la postre resultarán en la síntesis de las proteínas de respuesta al choque de calor.

Respuesta a la oxidación

La CaM también interviene en el proceso de defensa contra estrés oxidativo. El estrés oxidativo se presenta cuando la planta es sometida a presiones en su medio que generan intermediarios de oxígeno reactivos (ROI) cuyos niveles deben ser regulados en la célula para no ocasionarle daño (8). Los factores ambientales que causan el estrés oxidativo incluyen la polución del aire, que es un aumento en la cantidad de ozono o dióxido de azufre en el aire, además de las sequías, metales pesados, luz UV y la exposición a luz muy intensa. En la célula, los ROI se forman durante procesos que involucran reacciones redox y durante la oxidación de agua por medio de la transferencia electrónica en la mitocondria y los cloroplastos. La formación de oxígeno también estimula la producción de peróxido de hidrógeno y otros radicales que resultan dañinos para la célula (7).

Los ROI son moléculas que destruyen lípidos, ácidos nucleicos y proteínas, por lo que es de gran importancia controlar sus niveles. Sin embargo, estas especies son usadas por la célula como señales en el mecanismo de respuesta a patógenos y como defensa antioxidante en sistemas presentes en compartimentos subcelulares. Cuando estas defensas fallan en detener la propagación de la oxidación en reacciones que involucran ROI, la célula muere . Los daños que puede causar una sobreexposición de ozono en la planta involucran una disminución de la fotosíntesis, además de lesiones en las hojas y la interrupción del crecimiento de las raíces, que trae como consecuencia una disminución en la producción de cosechas (7).

El ozono y otros ROI, además de los radicales formados en el proceso que no son descompuestos en la célula, reaccionan con los lípidos de la membrana para formar lípidos peroxidados que promueven la formación de más ROI. Gradualmente, los ROI no eliminados entrarán al citoplasma después de dañar a la membrana y formarán radicales dentro de la célula, ocasionando la inhibición de procesos importantes como el transporte iónico o el incremento de la permeabilidad de la membrana (7).

La manera en que los niveles de ozono y otros oxidantes son controlados por la planta consiste en evitar que el ozono entre a la planta. Esto se logra cerrando la compuerta estomacal, que es el principal sitio de acceso para el ozono. Esta respuesta es influenciada por la edad de la planta y por el tipo de factor que estimule el estrés, además del grado de exposición al mismo (7). La exposición a ozono estimula la actividad de enzimas antioxidantes que responden al estrés y minimizan el daño, la CaM está involucrada en la activación de estas enzimas, que además desintoxican al sistema.

Igual que en la respuesta a los cambios en la temperatura, el calcio recibe la señal del estímulo y se enlaza a CaM para activar a las proteínas de enlace correspondientes y generar la respuesta. Esta respuesta consta de la activación de proteínas que regulen los niveles de ROIs. Existen catalasas protectoras que degradan H_2O_2 a oxígeno y agua evitando de esta manera que la oxidación dañe a la célula (8)

Sin embargo, H_2O_2 funciona también como un mensajero secundario además de ser un agente oxidante dañino. Por lo tanto, sus niveles deben ser estrechamente controlados, para que una disminución no resulte contraproducente, pero tampoco lo sea un exceso.

La CaM puede intervenir indirectamente en la regulación de los niveles de ROIs manipulando un señalador metabólico llamado GABA (γ -ácido aminobutírico). La degradación de este señalador limita la acumulación de ROIs en la célula que pueden inhibir enzimas de muchos procesos celulares (8).

La producción de GABA se efectúa a partir de glutamato, catalizada por una enzima llamada GAD. La actividad de esta enzima está regulada por CaM, por lo que se demuestra cómo es que CaM está indirectamente relacionada con el control de los niveles de ROIs. Se sabe también que CaM interviene en la producción de GABA bajo estrés calorífico (8).

Tolerancia a compuestos xenobióticos

A pesar de que el transporte membranal de metales es de gran importancia para el funcionamiento de la célula, la mayoría de ellos resultan altamente tóxicos inclusive en concentraciones muy pequeñas. Es por esto que los niveles de los metales más pesados deben ser controlados o eliminados de la célula. En estos procesos también

está involucrada la CaM. Las proteínas de enlace a CaM encargadas de responder a estímulos de este tipo son capaces de abrir canales en la superficie de la membrana para que los metales que fueron detectados como tóxicos no lleguen al citoplasma y se evite el daño. Una vez que la CaM ha iniciado el proceso de respuesta, la célula se vuelve más tolerante al metal, pero no puede eliminarlo, de manera que lo almacena en sitios que no afecten en demasía el funcionamiento (8).

Otro ejemplo de proteínas de enlace a CaM que ayudan a eliminar el riesgo por compuestos xenobióticos son las apirinas. Estas enzimas se encuentran en la membrana y trabajan como un guardia que impide el paso hacia el interior de la célula por medio de la hidrólisis de muchos nucleósidos di y trifosfatados, esta hidrólisis está dirigida hacia la matriz extracelular. Cuando estas enzimas son codificadas por CaM, la célula presenta una mayor resistencia a concentraciones tóxicas de herbicidas de distintas clases. Es como si las apirinas fueran un antídoto para una droga que fluye por la planta (8).

CaM en respuesta a estrés biótico

Durante la respuesta a estímulos de origen biótico, como bacterias o insectos; el calcio y la CaM están de nueva cuenta involucrados. Cuando un invasor patógeno es detectado por la célula, rápidamente comienza una serie de procesos que tienen como finalidad el mitigar los efectos de ese invasor. Entre esos procesos está el fortalecimiento de la pared celular, producción de ROIs, síntesis de compuestos de defensa y flujo de iones (8).

La planta cuenta con barreras físicas y químicas que son la primer línea de defensa y que son capaces de reducir el acceso a atacantes. Sin embargo, si estas barreras son vencidas, se inducen mecanismos que incluyen la síntesis de proteínas y otras moléculas reguladas espacial y temporalmente. El atacante puede dañar de dos formas : masticando las hojas, o depositando huevos de los que emergerá una larva cuya fuente de alimentación será la misma planta. De tal modo, la planta actúa ante estas dos situaciones de maneras distintas, en el primer caso, liberará sustancias que de manera indirecta disminuirán la atracción del insecto por la planta, o en el segundo caso; liberará sustancias que inhibirán el crecimiento de la larva (47).

La clave para estos mecanismos de defensa está en la especificidad del ataque, pues algunas plantas son capaces de soportar ataques de insectos polívoros, pero no de especialistas y viceversa. Por ejemplo, algunas plantas perciben los componentes químicos de la saliva de los agresores y disparan una vía distinta cuando se trata de un daño físico en los tejidos. En *Arabidopsis thaliana* se conocen más de 150 genes relacionados con la respuesta a ataques bióticos, que difieren de los genes regulados ante otro tipo de stress. Estos genes son administrados por vías como la del jasmonato, que es un lípido encargado de controlar y manejar varias moléculas defensivas capaces de enfrentar el desafío directamente, o de interactuar con otras vías defensivas de señalización (47).

Entre los mecanismos defensivos más conocidos están : el metabolismo del indol glucosinolato, el metabolismo fenólico, la desintoxicación, y la producción de lipoxigenasas entre otros, que con sus respectivas vías confieren a la planta las barreras necesarias para resistir el ataque. Muchas de estas vías son reguladas por mensajeros secundarios como el calcio y sus influjos citosólicos.

El flujo de Ca^{2+} hacia el citosol se ve incrementado cuando se detecta un patógeno, este flujo proviene tanto de almacenes extracelulares como de almacenes internos. La señal enviada por estos flujos es considerablemente distinta a los patrones de oscilación generados durante la respuesta a factores abióticos, lo que habla de una especificidad y de una gran importancia para responder a estos ataques, pues se sabe también que los influjos hacia el citosol durante esta respuesta son más prolongados. Sin embargo, cuando se trata de un patógeno compatible con la célula, es decir, que no es dañino, la señal enviada por el Ca^{2+} no es tan prolongada; lo que de manera muy especial es entendido, por así decirlo, como que el patógeno no debe ser atacado por los mecanismos de defensa. Esto último es de gran importancia, pues la información que proporciona la señal es fundamental para reconocer a un patógeno huésped de uno invasor (8).

Las proteínas de enlace a CaM envueltas en esta respuesta son tan específicas que son capaces de diferenciar entre varios tipos de patógenos, primero expresando el contexto patogénico de la infección y después generando la respuesta correcta.

Algunos autores sugieren que el proceso de respuesta de una planta ante un estímulo dado es comparable con el proceso de aprendizaje de los animales, pues se ha comprobado que conforme la planta alcanza una mayor madurez, los sensores de calcio encargados de percibir estímulos presentan cambios significativos con respecto a las primeras etapas de desarrollo, mejorando los mecanismos de respuesta (8). Por ejemplo, se ha comprobado que durante un ataque, las hojas que no están siendo atacadas empiezan a liberar y sintetizar proteínas defensivas, que llegado el caso actúan como un detrimento para el agresor en futuros ataques (47).

Una de las primeras enzimas que responden a estímulos de origen biótico es la NAD cinasa (NADK), que es dependiente de CaM. El producto de esta enzima, el NADP contribuye con el banco de NADPH utilizado por la NADPH oxidasa para generar la respuesta al estímulo (8).

Durante un ataque patógeno, la CaM regula enzimas para producir ROI que tienen la función de combatir al organismo incompatible y otros estímulos externos como animales u otras plantas.

Inclusive, las plantas son capaces de detectar ataques de insectos, los cuales estimulan la síntesis de GABA y otros compuestos que funcionan como neurotransmisores inhibitorios y que por lo tanto repelen el ataque y funcionan como insecticidas (8).

CaM y desarrollo en plantas

La CaM desempeña un papel importante en el desarrollo de las plantas. Interactúa con distintas proteínas involucradas en la respuesta a cambios hormonales y desarrollo celular. Para tener una elongación correcta de los tallos de algunas plantas es necesario que exista un flujo de calcio que acarree la información necesaria para este crecimiento, flujo que es modulado por CaM (8).

En las células que distribuyen el polen, existe un flujo de CaM que a su paso por el interior celular regula procesos de crecimiento, lo que recalca la importancia de la enzima no sólo en mecanismos de defensa, sino también de desarrollo. Muchas proteínas de enlace han sido identificadas actuando en estos mecanismos, lo que habla del gran alcance que presenta la proteína para organizar a las enzimas necesarias (8).

Existen enzimas que son útiles para la fertilización de la planta cuya activación es iniciada por estímulos percibidos por el calcio, además se conocen otras proteínas de enlace que regulan los procesos de germinación y que también son dependientes de calcio.

La producción de GABA está nuevamente emparentada con el control de procesos regulados por CaM. En esta ocasión participa en las vías que indican a los genes de crecimiento de los tubos de polen cómo deben actuar. Esto se corrobora cuando la enzima presenta mutaciones que se ven reflejadas en la inhibición del crecimiento.

Conforme el tubo es elongado, la producción de GABA se incrementa , siendo ordenada por CaM (8).

Así, existen muchas enzimas que son dependientes de la CaM para ejercer sus efectos a lo largo del desarrollo de la planta, elevando su importancia en los procesos celulares.

V. Características de las calmodulinas de *Arabidopsis Thaliana*

Arabidopsis es el organismo mejor estudiado y comprendido en cuanto a estudios genéticos en plantas se refiere, por lo que se tomó como modelo para el estudio de la CaM y sus isoformas en respuesta a estímulos y en relación con condiciones y etapas de crecimiento.

El genoma de *Arabidopsis Thaliana* contiene nueve genes identificados de CaM (tabla 1) y 50 o más CMLs (*Calmodulin Like Proteins*) que codifican para sensores de potencial de calcio (no se muestran). Los genes de CaM codifican sólo para ocho isoformas de proteínas distintas (tabla 2), lo que clasifica a dos de ellos como isogenes (CaM 2 y CaM 3).

Las diferencias de secuencia entre las CMLs pueden reflejar, por un lado, la subespecialización de las funciones de la CaM, ya que establece la posibilidad de que aparezcan a lo largo de la evolución interactores específicos para cada isoforma. Al respecto, se sabe que el dominio de la mano es el sitio de mayor relevancia en el contacto con los distintos interactores de la CaM (11). Por otra parte, la aparición de isogenes en los organismos es casi siempre resultado de la necesidad de los mismos de regular la expresión de la proteína de manera antagónica en tejidos o situaciones diferentes. En particular, la CaM parece requerir este tipo de control, ya que la aparición de isogenes ocurre también en organismos animales, en los que está claramente demostrado que existe una compleja regulación de la expresión génica de esta proteína (44,45).

Tabla 1. Genes correspondientes a las CaM de *Arabidopsis Thaliana*. Los genes aquí mostrados fueron seleccionados en base a las anotaciones respectivas en la base de datos TAIR. Sin embargo, otras clasificaciones han incluido a otras dos CMLs dentro de las CaM de esta planta (43).

ID	Gene ^A	Grupo ^B	Longitud (pb) ^C	Longitud (aa) ^D	μ arr ^E	Cromosoma
CAM1	37780 (1)	I	1679	149 (16.9, 3.89)	Si	5
CAM2	41090 (2)	II	1132	149 (16.8, 3.87)	Si	2
CAM3	56800 (2)	II	1541	149 (16.8, 3.87)	Si	3
CAM4	66410 (3)	I	1684	149 (16.9, 3.89)	Si	1
CAM5	27030 (4)	II	2330	181 (20.6, 4.44)	Si	2
CAM6	21274 (5)	II	1520	149 (16.8, 3.88)	No	5
CAM7	43810 (6)	II	2090	149 (16.8, 3.88)	Si	3
CAM8	22930 (7)	III	2365	151 (17.2, 3.76)	Si	3
CAM9	51920 (8)	IV	1437	151 (17.0, 3.96)	Si	3

NOTAS: A) Números iguales entre paréntesis indican secuencias idénticas (ver tabla 2). B) el grupo aquí indicado es el asignado según su posible función (11). C) Longitud de la secuencia de bases del gene completo, incluyendo las regiones intrónicas. D) Longitud de la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada por dicho gene, entre paréntesis la masa en kDa y el pI teóricos. E) Está presente una sonda para este gene en el microarreglo de *arabidopsis* affimetryx-32K.

Las proteínas que son codificadas por los nueve genes en *Arabidopsis* tienen un variación en su nivel de semejanza con la CaM humana desde un 48.5 hasta un 88.1% (Tabla 2), siendo las CaM 9 y 1 las más divergentes entre sí, y las CaM 2, 3, 4, 6 y 7 las más semejantes. Los genes de CaM codifican ocho isoformas distintas, sin embargo, debido a su capacidad para interactuar con los mismos blancos, se puede considerar que existen unos 4 diferentes tipos de CaM vegetales (Tabla 1): El primer tipo es codificado por CaM1 y CaM4, mientras que CaM2, CaM3, CaM5, CaM6 y CaM7 codifican para el segundo tipo. CaM8 y CaM9 presentan una alta divergencia y se consideran en categorías separadas. Las diferencias a nivel de secuencia entre algunas CaMs son realmente escasas, por ejemplo, CaM1 y CaM4 difieren de CaM7 por sólo

cuatro aminoácidos, mientras que CaM2, CaM3, CaM5 y CaM6 difieren de CaM7 por únicamente un aminoácido (Tablas 2 y 3; referencia11).

Tabla 2. Semejanza estructural entre cada uno de los genes de CaM en *Arabidopsis thaliana*. Cada cifra representa el grado de semejanza entre uno y otro gen, 1 indica que las secuencias son idénticas (por ejemplo CaM-2 y CaM-3) y 0 si no existe ninguna coincidencia (lo cual no se presenta en este caso). La primera columna presenta la comparación con la CaM humana. Se definió como CaM aquella proteína de la planta con una semejanza superior al 45% respecto a la CaM humana.

Secuencia	CaMhs	CAM2	CAM3	CAM4	CAM5	CAM6	CAM7	CAM8	CAM9
CAM1	0.613	.641	.641	.635	.549	.630	.635	.728	.396
CAM2	0.875	--	1.00	.966	.819	.986	.993	.730	.490
CAM3	0.875		--	.966	.819	.986	.993	.730	.490
CAM4	0.875			--	.792	.966	.973	.730	.490
CAM5	0.722				--	.808	.814	.606	.509
CAM6	0.875					--	.993	.717	.490
CAM7	0.881						--	.723	.496
CAM8	0.668							--	.470
CAM9	0.487								--

En cuanto a las estructuras primarias se refiere, las secuencias de las asas de enlace a calcio varían muy poco en verdad. El calcio en estas asas se enlaza con una geometría de bipirámide pentagonal con siete sitios de coordinación. Los aminoácidos encargados de quelar al calcio son, numerando con respecto al dominio mínimo de mano EF, el 1,3,5, 7, 9 y 12 (también llamados X, Y, Z, #, -X y -Z respectivamente). Estos aminoácidos están muy conservados en dichas asas y su concenso XYZ#-X-Z Asp-Asn/Asp-Asp/Asn/Ser-AApolar-Ser/Asp/Asn/Arg-Glu La posición número seis es por lo

regular glicina, que permite un giro agudo dentro de asa. La posición ocho presenta en la mayoría de las veces para isoleucina (11).

Tabla 3. Composición de aminoácidos de las proteínas codificadas por cada uno de los 9 genes para calmodulinas identificados en el genoma de *Arabidopsis Thaliana*. La cifra en paréntesis representa la fracción molar (%) con relación al número total de aminoácidos. En la columna 1 se muestra la composición de la CaM humana para fines de comparación.

AA	Humano	CAM1	CAM2	CAM3	CAM4	CAM5	CAM6	CAM7	CAM8	CAM9
Ala	11 (7.2)	8 (4.6)	10 (6.7)	10 (6.7)	10 (6.7)	13 (7.2)	10 (6.7)	10 (6.7)	9 (6)	11 (7.3)
Cys	0 (0)	2 (1.2)	1 (0.7)	1 (0.7)	1 (0.7)	2 (1.1)	1 (0.7)	1 (0.7)	2 (1.3)	1 (0.7)
Asp	18 (11.8)	18 (10.4)	19 (12.8)	19 (12.8)	17 (11.4)	19 (10.5)	19 (12.8)	19 (12.8)	17 (11.3)	17 (11.3)
Glu	21 (13.8)	22 (12.7)	19 (12.8)	19 (12.8)	21 (14.1)	21 (11.6)	19 (12.8)	19 (12.8)	23 (15.2)	15 (9.9)
Phe	8 (5.3)	8 (4.6)	9 (6)	9 (6)	9 (6)	9 (5)	9 (6)	9 (6)	8 (5.3)	12 (8)
Gly	11 (7.2)	9 (5.2)	10 (6.7)	10 (6.7)	10 (6.7)	12 (6.6)	10 (6.7)	10 (6.7)	7 (4.6)	12 (8)
His	1 (0.7)	1 (0.6)	1 (0.7)	1 (0.7)	1 (0.7)	2 (1.1)	1 (0.7)	1 (0.7)	2 (1.3)	2 (1.3)
Ile	8 (5.3)	11 (6.4)	7 (4.7)	7 (4.7)	8 (5.4)	8 (4.4)	7 (4.7)	7 (4.7)	12 (8)	10 (6.6)
Lys	8 (5.3)	7 (4.1)	11 (7.4)	11 (7.4)	11 (7.4)	16 (8.8)	10 (6.7)	10 (6.7)	11 (7.3)	10 (6.6)
Leu	10 (6.6)	13 (7.5)	11 (7.4)	11 (7.4)	11 (7.4)	12 (6.6)	11 (7.4)	11 (7.4)	13 (8.6)	10 (6.6)
Met	10 (6.6)	9 (5.2)	9 (6)	9 (6)	9 (6)	10 (5.5)	9 (6)	9 (6)	6 (4)	12 (8)
Asn	6 (4)	8 (4.6)	7 (4.7)	7 (4.7)	7 (4.7)	9 (5)	7 (4.7)	7 (4.7)	7 (4.6)	3 (2)
Pro	3 (2)	1 (0.6)	2 (1.3)	2 (1.3)	2 (1.3)	2 (1.1)	2 (1.3)	2 (1.3)	1 (0.7)	1 (0.7)
Gln	6 (4)	32 (18.5)	6 (4)	6 (4)	6 (4)	6 (3.3)	6 (4)	6 (4)	7 (4.6)	8 (5.3)
Arg	6 (4)	3 (1.7)	4 (2.7)	4 (2.7)	4 (2.7)	11 (6.1)	5 (3.4)	5 (3.4)	1 (0.7)	3 (2)
Ser	4 (2.6)	5 (2.9)	5 (3.4)	5 (3.4)	5 (3.4)	9 (5)	6 (4)	5 (3.4)	7 (4.6)	10 (6.6)
Thr	12 (7.9)	8 (4.6)	9 (6)	9 (6)	9 (6)	9 (5)	8 (5.4)	9 (6)	9 (6)	6 (4)
Val	7 (4.6)	6 (3.5)	8 (5.4)	8 (5.4)	7 (4.7)	9 (5)	8 (5.4)	8 (5.4)	7 (4.6)	5 (3.3)
Tyr	2 (1.3)	2 (1.2)	1 (0.7)	1 (0.7)	1 (0.7)	2 (1.1)	1 (0.7)	1 (0.7)	2 (1.3)	3 (2)

El Trp está ausente en todas las calmodulinas, aún en las más divergentes. Cuando una CaM acusa un contenido de un aminoácido deferente a las demás, la celda se marcó en color azul (contenido

superior) o rojo (contenido inferior). A diferencia de la CaM humana, las CaM de *Arabidopsis* poseen uno a dos cisteínas.

El resto de la secuencia de las calmodulinas también presenta pocos cambios entre sí, lo que se refleja en una composición de aminoácidos relativamente constante (Tabla 3). A partir de la tabla de composición de aminoácidos (3) se puede apreciar que las CaM son en general proteínas ácidas, por la abundancia de residuos de Glu y Asp y un menor contenido de Lys y Arg, en este aspecto se distinguen las CaM 5, que posee un contenido superior de Lys y Arg, y la CaM 9 que posee un contenido inferior de Glu. Adicionalmente, a diferencia de las CaM animales, las CaM vegetales presentan cisteína en su secuencia de aminoácidos, pero ninguna de las CaM presenta Trp en su secuencia. El contenido de Tyrosina es también bajo (menor a 2%), lo que explica que de señales espectroscópicas débiles, por lo que, para poder determinar la interacción de la CaM con diferentes ligandos se ha recurrido a diferentes estrategias, algunas recientes, incluyen el uso de ingeniería genética y modificación química para introducir grupos fluorofóricos que permitan la cuantificación de la transición entre las formas abierta y cerrada de la CaM (48,49).

A pesar de que los cuatro tipos de CaM codificadas son relativamente similares, pequeños cambios en la secuencia de aminoácidos resultan en la activación de diferentes proteínas blanco, situación que realza el valor de la especificidad sobre estas proteínas y las enzimas que activan; teniendo cada una de ellas afinidades distintas para diferentes enzimas. (43).

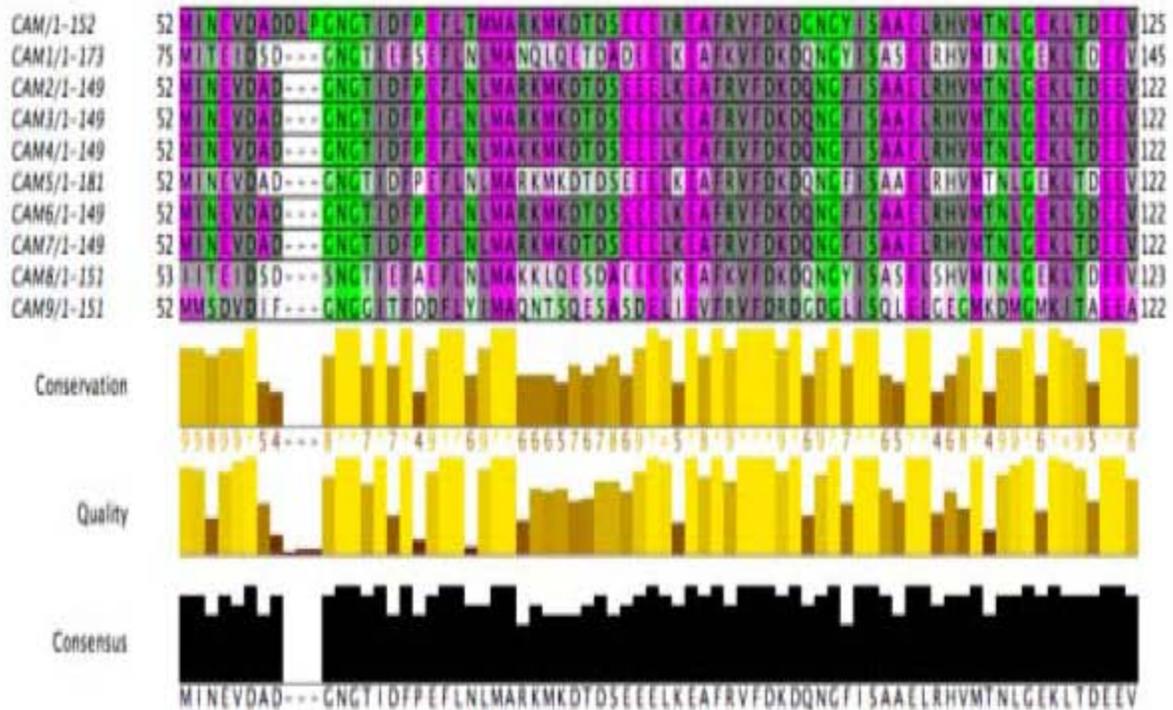
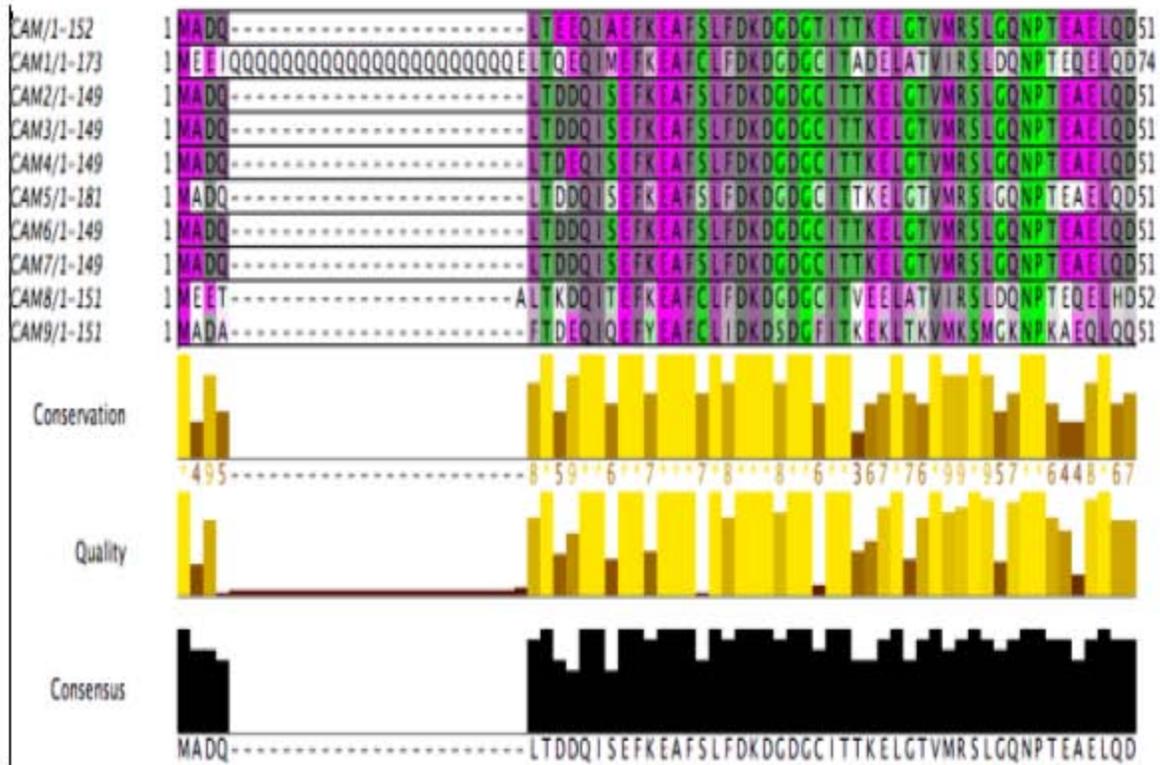
Podría esperarse que la constante duplicación de genes conllevaría gradualmente a mutaciones y a variaciones importantes en la secuencia de aminoácidos, sin embargo, en el genoma de *Arabidopsis* se presenta muy pocas veces esta situación; lo que hace pensar que existe una fuerte presión de selección que mantiene la secuencia relativamente invariante (11). De hecho, en los animales, la conservación es casi perfecta desde los peces hasta el humano (45).

Puesto en otros términos, dada la enorme cantidad de interactores de la CaM, pequeñas variaciones en la secuencia de aminoácidos podrían afectar el plegamiento, el camino de plegamiento, la unión a calcio, la afinidad relativa entre sitios, o el contacto con alguno de sus varios blancos. De esta manera, la mayoría de los posibles cambios de aminoácido resultantes de una mutación, resultarían en la pérdida o modificación de alguna función y, con gran frecuencia, serán nocivos para el organismo mutante, por lo que la tendencia sería eliminarlos de la población.

Por otro lado, la mayor diversidad se observa en las plantas, en donde la conservación puede llegar a niveles inferiores al 50% entre algunas isoformas. Esto puede fácilmente conciliarse, porque al ocurrir la duplicación génica y adquirir cada uno de estos genes una subfuncionalización, el número de blancos de cada proteína individual se reduce y se presentarán mayor número de posiciones con presión de selección reducida. Adicionalmente, algunas mutaciones podrían no ser fatales, ya que alguna de las isoformas podrían complementar, al menos parcialmente, la función, lo que haría viable la diversificación de los genes a lo largo del proceso evolutivo de las plantas.

VI. Relaciones filogenéticas entre las calmodulinas

En la figura 10, se muestra un alineamiento de las CaM de *Arabidopsis* comparadas con la CaM humana. En dicho alineamiento se puede observar que la CaM 1 posee una extensión inusual hacia el extremo amino caracterizada por una secuencia de poliglutamina. Se ha especulado que la poliglutamina resulta del deslizamiento del aparato de duplicación del DNA durante la fase S del ciclo celular, en sitios que contiene regiones codificantes con la secuencia CGA·CTG (50, 51). Dicho deslizamiento introduce codones adicionales para glutamina que, a lo largo de la evolución produce que dichas secuencias de poliglutamina se extiendan (51,52). Es de hacer notar, que una extensión semejante se ha encontrado en un marsupial (*Monodelphis domestica*, Genebank accession XP_001369763.1) y una pequeña región de poliglutamina se ha encontrado en el extremo amino de las isoformas de CaM presentes en el caballo (*Equus caballus*; GeneBank accession XP_001500896.2), en un primate (*Macacca mulata*, genebank accession XP_001113485.1), en el erizo de mar (*Strongylocentrotus purpuratus*; genebank accession XP_780925.2), en un protozooario parasítico (*Trypanosoma cruzi*; genebank accession XP_808089.1) y en algunos otros organismos.



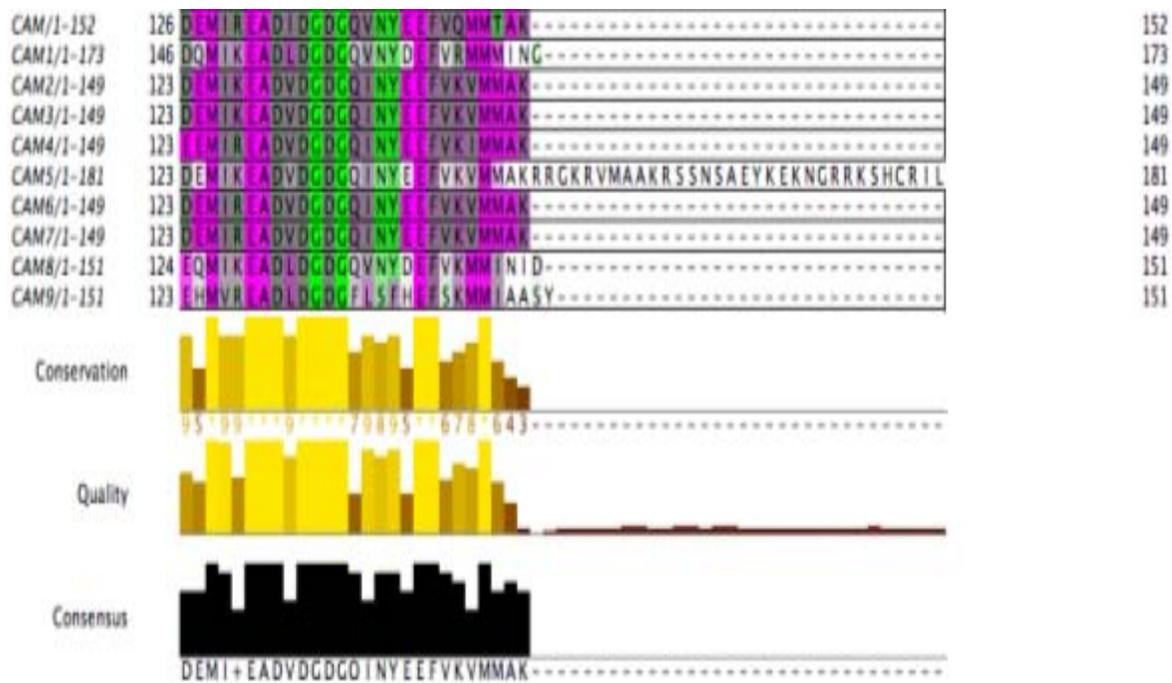


Figura 10. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las CaM humanas. El alineamiento fue realizado con ClustalW(43) utilizando la tabla de sustitución BLOSUM62. La figura se obtuvo a partir de JalView (39). El color de los aminoácidos es de acuerdo al nivel de conservación de la posición y corresponde a verde oscuro y claro para sitios muy conservados, rojo y rosa para sitios de conservación intermedia, gris oscuro y gris claro para sitios ligeramente conservados y blanco para aminoácidos que difieren del patrón de conservación.

La figura 10 también indica la presencia de una extensión en el extremo carboxilo de la CaM 5, dicha extensión es rica en aminoácidos básicos lo que explica la abundancia inusual de estos aminoácidos en dicha isoforma de la CaM de aradipsis (Tabla 3).

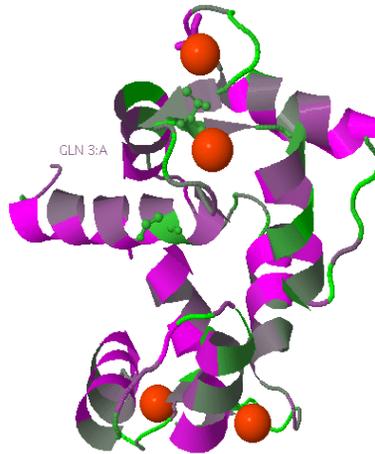


Figura 11. Estructura tridimensional de la CaM animal (PDB 1LIN) con un código de colores según el nivel de conservación con respecto al alineamiento de la figura 6. Las esferas naranja indican la posición de los átomos de calcio, mientras que los residuos mostrados en modelo de bolas y palos son la Ser17 y la Thr26 que corresponden a los sitios en los que las CaM de arabidopsis presentan substituciones por Cys. Nótese que ambos pertenecen al primer dominio de mano EF y que la Thr26 forma parte del sitio 1 de unión a calcio. La figura fue generada mediante JalView (39).

Adicionalmente, la figura 10 muestra la presencia de Cys en la región amino (posición 27 respecto de la CaM humana), que está conservada en todas, excepto en la CaM 9. Dicha isoforma, presenta en cambio otra Cys, (posición16 respecto a la CaM humana), que sólo está presente en ésta y en las isoformas CaM 1 y CaM8. La posición putativa de dichas cisteínas puede apreciarse en la figura 7, la cual muestra la estructura tridimensional de la CaM animal (código PDB 1LIN) en su forma cerrada, coloreada según el nivel de conservación, empleando el mismo código de colores que en el alineamiento de la figura 6. Dicha figura ilustra que la mayor conservación se da en los dominios globulares y con especial énfasis en los sitios de unión a calcio (véase figura 2). Los dos sitios en los que aparecen substituciones por Cys en las CaM de plantas corresponden a regiones muy conservadas de la primera mano EF.

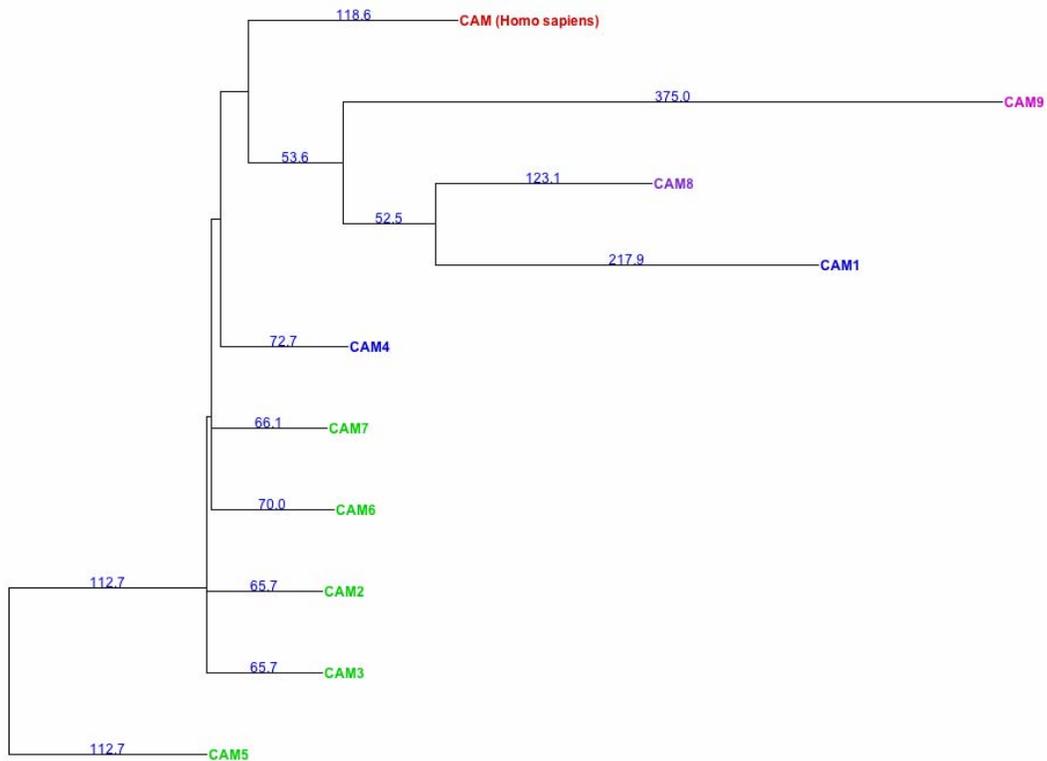


Figura 12. Relaciones filogenéticas entre las isoformas de CaM de *Arabidopsis thaliana*, comparadas con la CaM humana (Rojo). Los números indican las distancias relativas. Los colores de las etiquetas corresponden a los grupos funcionales enuncados en la tabla 1: grupo I, azul; grupo II, verde; grupo III, morado y grupo IV, púrpura.

La figura 12 muestra un árbol filogenético de las secuencias de aminoácidos de las CaM de *Arabidopsis*, comparadas con la CaM humana, como referencia. El esquema de colores coincide con los grupos funcionales que se han identificado por medio de su interacción con diversos blancos (tabla 1). Puede observarse que la distancia en el árbol no correlaciona con los grupos, ya que, por ejemplo, la CaM5 pertenece al grupo II, pero su secuencia diverge significativamente de las demás CaM del mismo grupo, en cambio, las CaM 1, pertenece al mismo grupo que la CaM4, pero se encuentra un poco más cercana a la CaM 8 que a la CaM4. Es probable, sin embargo, que la clasificación actual se modifique conforme se estudien más detalladamente los interactores de cada CaM y su subfuncionalización, ya que los datos actuales distan mucho de ser completos.

El árbol de la figura 12 confirma también que la CaM9 es la más divergente de las CaM de arabidopsis. Desde el punto de vista filogenético podría decirse que las CaM2 y 3, 4, 6 y 7 forman un grupo semejante a la CaM animal, en tanto que las restantes CaM de arabidopsis parecen representar cada una un grupo separado. Al final, tanto funcionalmente (11) como por relaciones filogenéticas se pueden clasificar en 4 grupos, aunque dichas clasificaciones no son coincidentes.

VII. Relaciones filogenéticas entre las calmodulinas de diversos grupos filéticos

Con el fin de identificar si las CaM de plantas poseían secuencias que permitieran distinguirlas de otras CaM se eligieron CaM de diversos grupos filéticos incluyendo animales vertebrados superiores, vertebrados inferiores, animales invertebrados, protozoarios, hongos y diversas plantas. Dichas secuencias se agruparon y se alinearon como antes empleando ClustalW (43), con lo que se construyó un árbol filogenético.

El alineamiento resultante se presenta en la figura 12. En dicha figura, se puede observar que las CaM presentan un elevado grado de conservación a lo largo de toda la escala filogenética. Como se ha comentado antes, esta conservación se puede explicar, ya que la gran diversidad de vías de comunicación intra y extracelular en las que la CaM es intermediario establecen una importante fuerza de selección para evitar cambios en la mayoría de la proteína. A pesar de ello, algunas CaM han divergido de manera importante, por ejemplo la CaM del pez *Tetraodon nigroviridis* (una clase de pez globo) presenta numerosos cambios en la secuencia y una inserción de 18 aminoácidos alrededor de la posición equivalente a la 60 (tomando a la CaM humana como referencia). Por otro lado, la CaM del primate *Macaca mulata* presenta una extensión de 15 aminoácidos hacia el amino terminal.

En la figura 12 es también posible apreciar algunas diferencias entre las CaM de diversas plantas incluyendo cebada (*Hordeum vulgare*), maíz (*Zea mays*), frijól mungo (*Vigna radiata*), trigo (*Triticum aestivum*), uva (*Vitis vinifera*), espinaca (*Spinacea oleraceae*), arroz (*Oryza sativa*), manzana (*Malus domestica*), papa (*Solanum tuberosum*), el berro de oreja de ratón (*Arabidopsis thaliana*) y chile (*Capsicum annuum*). Todas estas secuencias muestran el cambio de Trh por Cys en las posición equivalente a la posición 26 de la CaM humana, de manera que esta parece ser una característica de grupo, que posiblemente sea relevante para la función de esta proteína en plantas, ya que está conservada en todas estas especies, que incluyen tanto mono como dicotiledóneas y se ha mantenido tanto en plantas cultivadas (casi todas las anteriores) como en plantas silvestres (arabidopsis). De hecho, ya se mencionó que dicha característica está presente en todas las isoformas de CaM de arabidopsis.

Debido a que la posición 26 de la CaM humana se encuentra en el sitio 1 de unión a calcio, es posible especular que este cambio produce una modificación en la afinidad de estas proteínas por el metal, lo que podría resultar en un diferente umbral de sensibilidad a Ca^{2+} . Es posible que tal diferencia, de presentarse, se relacione con diferencias sutiles pero detectables en los niveles intracelulares de calcio entre células animales y

vegetales. Otras diferencias menos notables son el cambio de Met70 por Ile y Met148 por Val, ambos cambios están presentes en todas las CaM de plantas y el primero es compartido con las CaM de protozoarios (Fig. 12, Pfiesteria, Paramecium, Tetrahymena, Toxoplasma y Plasmodium), en tanto el segundo parece ser también característico de plantas.

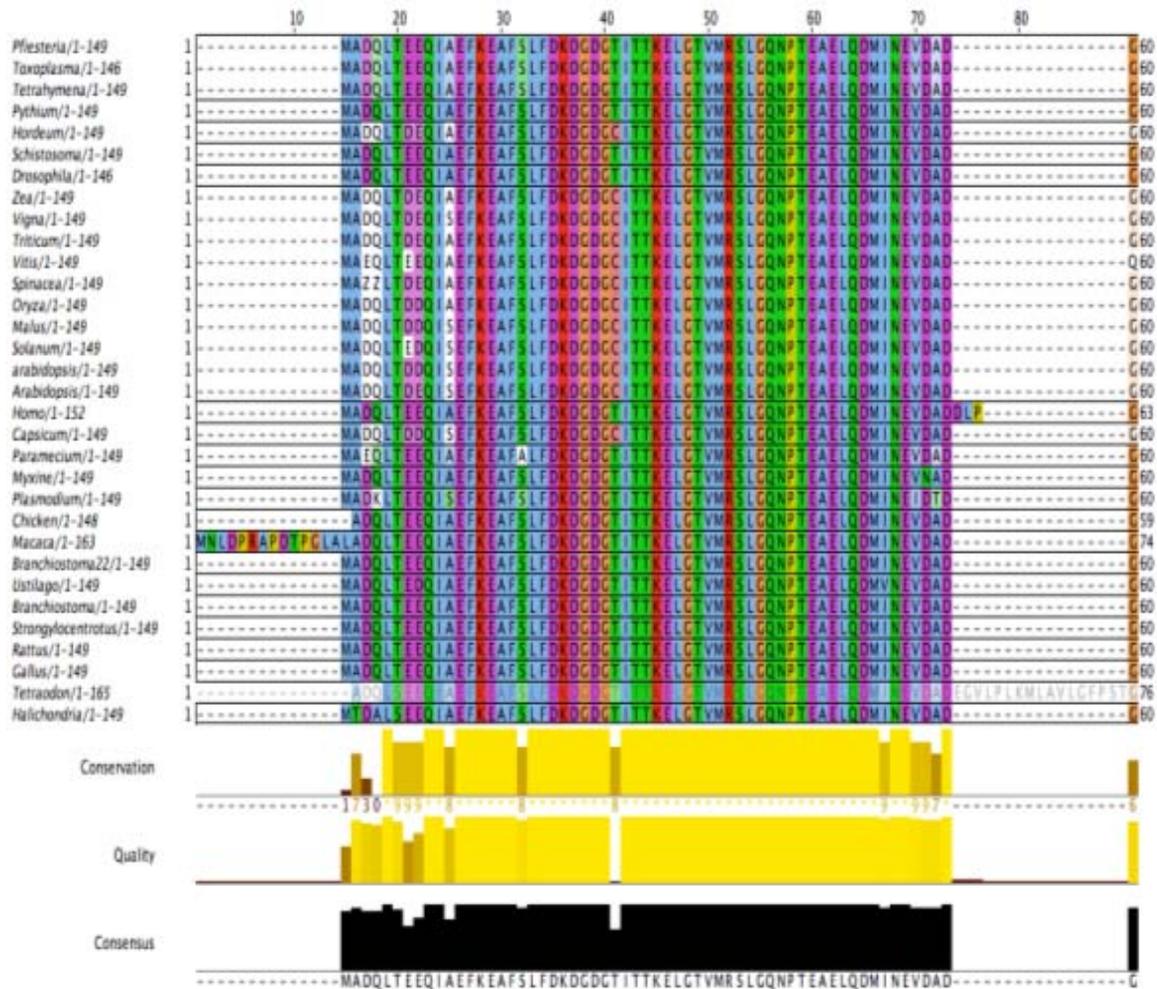


Figura 12 A. Comparación de las secuencias de calmodulina de diversos organismos. Para la realización de este análisis, se seleccionaron secuencias de calmodulinas pertenecientes a organismos relativamente alejados en la escala filogenética. El alineamiento fue realizado con ClustalW (43), utilizando la tabla de sustitución BLOSUM62 y la imagen se preparó con JalView (39). La coloración se eligió para resaltar la conservación de las secuencias a lo largo de toda la escala filogenética.

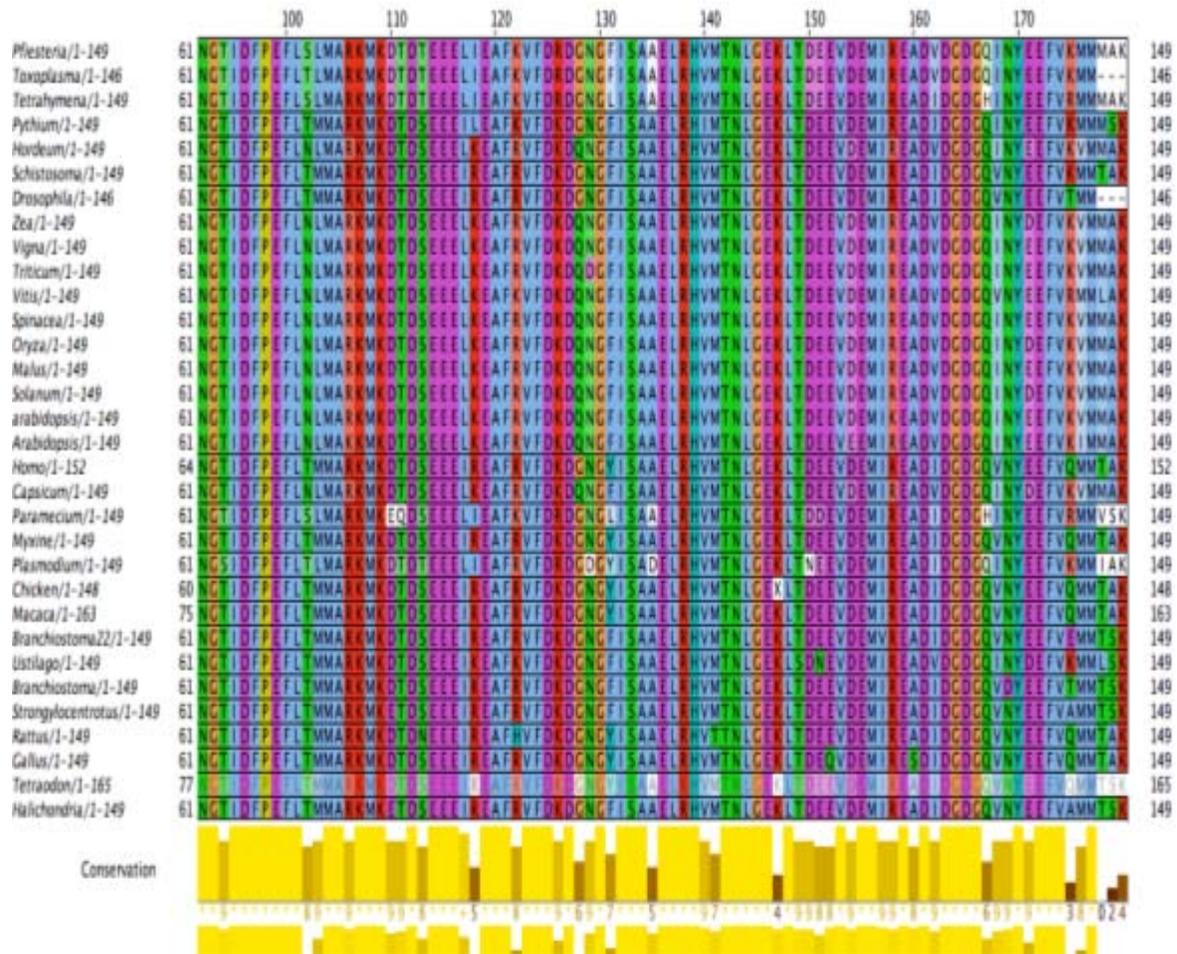


Figura 12 B. Comparación de las secuencias de calmodulina de diversos organismos. Para la realización de este análisis, se seleccionaron secuencias de calmodulinas pertenecientes a organismos relativamente alejados en la escala filogenética. El alineamiento fue realizado con ClustalW (43), utilizando la tabla de sustitución BLOSUM62 y la imagen se preparó con JalView (39). La coloración se eligió para resaltar la conservación de las secuencias a lo largo de toda la escala filogenética.

Con los datos de la figura 12, se preparó el árbol filogenético de la figura 11, que muestra las distancias relativas entre las distintas secuencias. Como puede observarse, las distancia filogenéticas entre las CaM coinciden en forma razonable como los grupos filéticos, con excepción de la CaM de peces (*Tetraodon*) y la del macaco (*Macaca*).

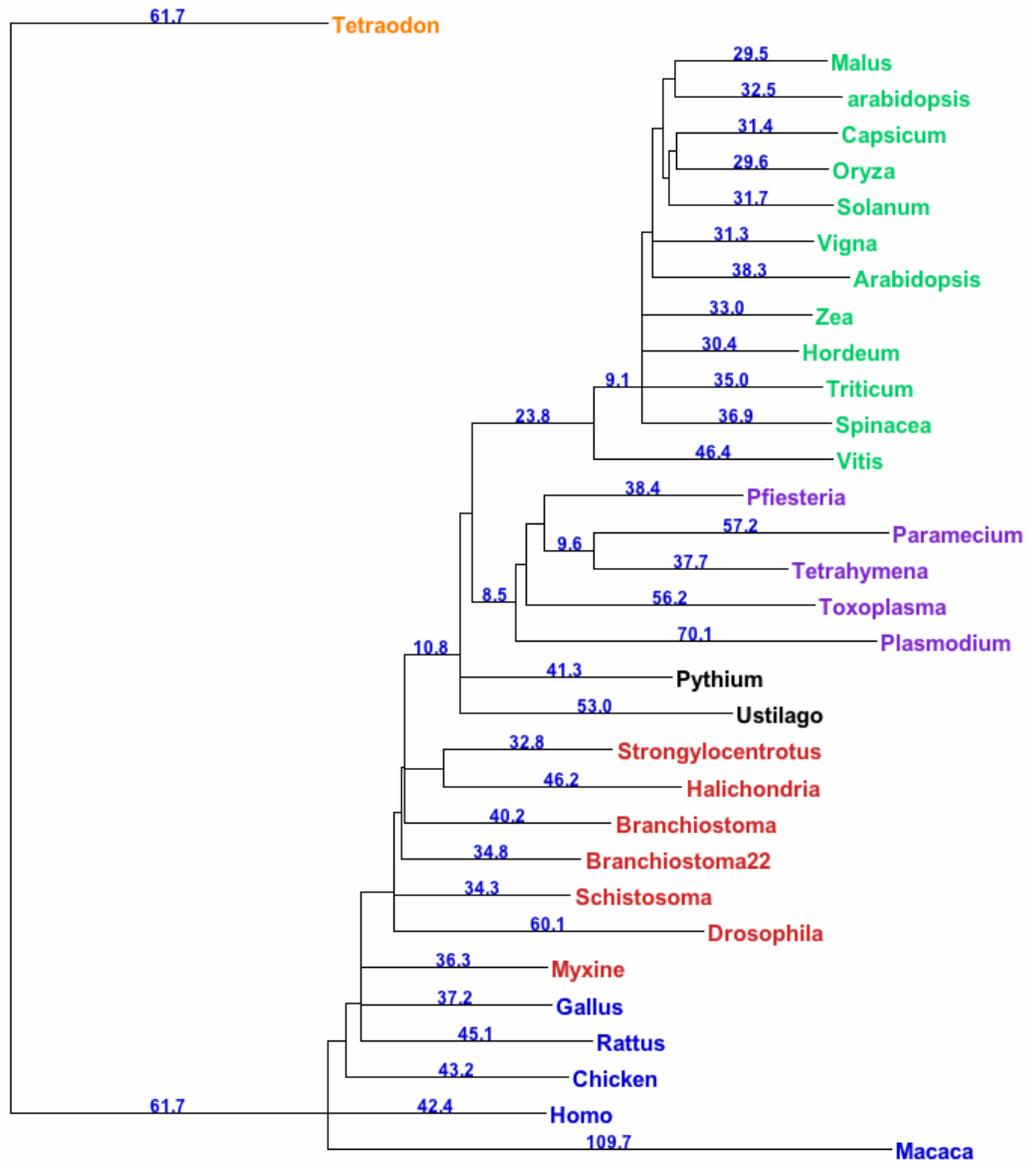


Figura 13. Árbol filogenético de los genes incluidos en la figura 7. El árbol se obtuvo mediante el programa clustalW (43), utilizando la tabla de sustitución BLOSUM62 y la imagen se preparó con TreeDyn (40). Los número sobre las ramas son las distancias filogenéticas relativas. En verde se muestran las secuencias correspondientes a las plantas y en azul las de animales superiores. Otros colores corresponden a protozoarios (morado), hongos (negro), peces (naranja) y animales invertebrados (rojo).

VIII. Expresión de las isoformas de calmodulina en relación con el tejido, la edad y algunas condiciones de crecimiento en *Arabidopsis*

De los 9 genes que se eligieron como pertenecientes al grupo de las calmodulinas verdaderas, sólo ocho se encuentran en los microarreglos de *Arabidopsis thaliana* más extensos (32K). Por lo que, estos se eligieron para analizar su expresión. Los datos obtenidos de los microarreglos de *Arabidopsis* a través de Genevestigator muestra que la expresión de seis de las ocho CaMs de *Arabidopsis* analizadas es casi constitutiva (CaM2, CaM3, CaM4, CaM5, CaM7, CaM9), ya que se expresan a niveles semejantes en distintas edades (Fig. 11) y tejidos (Fig. 12). Este hecho puede interpretarse como una redundancia de los genes, sin embargo, como se ha mencionado, cada isoforma de la CaM posee un subconjunto específico de interactores y podrían localizarse en regiones subcelulares distintas, por lo que tal redundancia es poco probable. En las CML se observa una expresión diferencial a lo largo de las etapas de desarrollo (no se muestra aquí), en varios órganos y en respuesta a diversos estímulos; lo que puede estar relacionado con su gran diversidad y subfuncionalización. Además, de estos genes de CaM y CML, en el genoma de *Arabidopsis* existen al menos 232 proteínas que contienen el dominio de la mano EF (11).

Resulta particularmente interesante que las CaM2 y 3, a pesar de ser idénticas en su secuencia de aminoácidos, presentan expresión significativa en todos los tejidos, lo que sugiere que son redundantes. Sin embargo, hay que recordar que la presencia de los mensajeros no garantiza que la proteína sea sintetizada y la existencia de diversos mecanismos de control traduccional ha sido extensamente documentada en plantas. Por otro lado, aunque las CaM no parecen contar por un péptido señal, se sabe que en las plantas existen mecanismos de tránsito de proteínas que no ocurren por las vías clásicas, o que dependen de la asociación de la proteína en cuestión con otra proteína que sí posee una señal. De modo, que también es posible que alguna de estas dos isoformas pudiera ser transportada al núcleo, o al interior del cloroplasto.

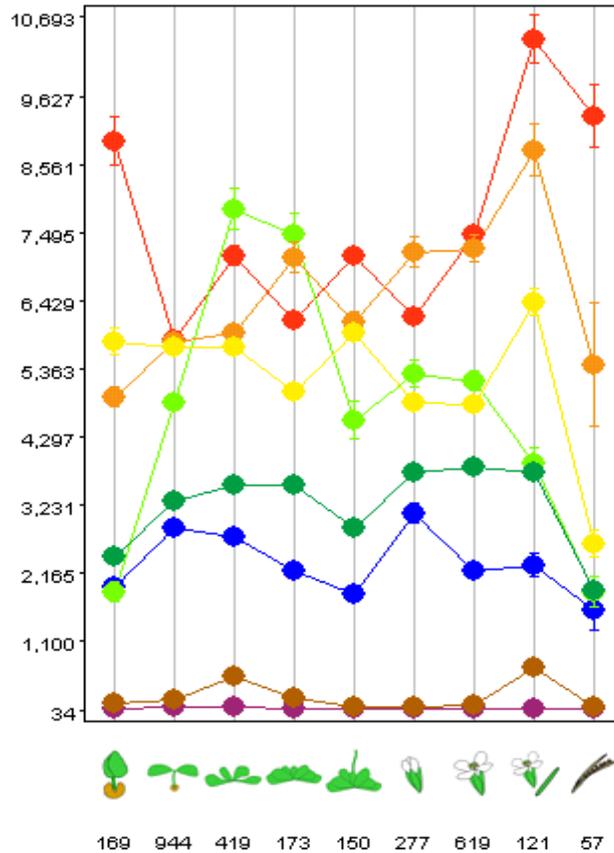


Figura 14. Expresión de ocho de los genes de calmodulina en relación al desarrollo de la planta. CaM1 CaM2 CaM3 CaM4 CaM5 CaM7 CaM8 CaM9

Los datos obtenidos con ayuda del Genevestigator acerca del desarrollo, anatomía y respuesta a estímulos en *Arabidopsis thaliana* presentados en las figuras posteriores (12,13 y 14), muestran que hay diferencias en el nivel de expresión de cada uno de estos genes en comparación unos con otros. Sin embargo, la expresión a lo largo del desarrollo para cada uno de ellos cambia poco (Figura 14), lo mismo que entre los diferentes tejidos (Figura 15). Salvo en casos muy puntuales, como por ejemplo las calmodulinas CaM3, CaM4 y CaM7 que elevan su expresión en los órganos florales (Figura 12), a bien, las CaM4 y CaM7 que tiene una expresión elevada en los atricoblastos y la epidermis, o en la corteza y la endodermis (Figura 13) y la CaM9 que se expresa de manera más notable en las partes aéreas de la planta adulta (Fig. 12). Adicionalmente, el gen CaM8 se expresa muy poco en todos los tejidos (Fig 12) y edades de la planta (Figura 15).

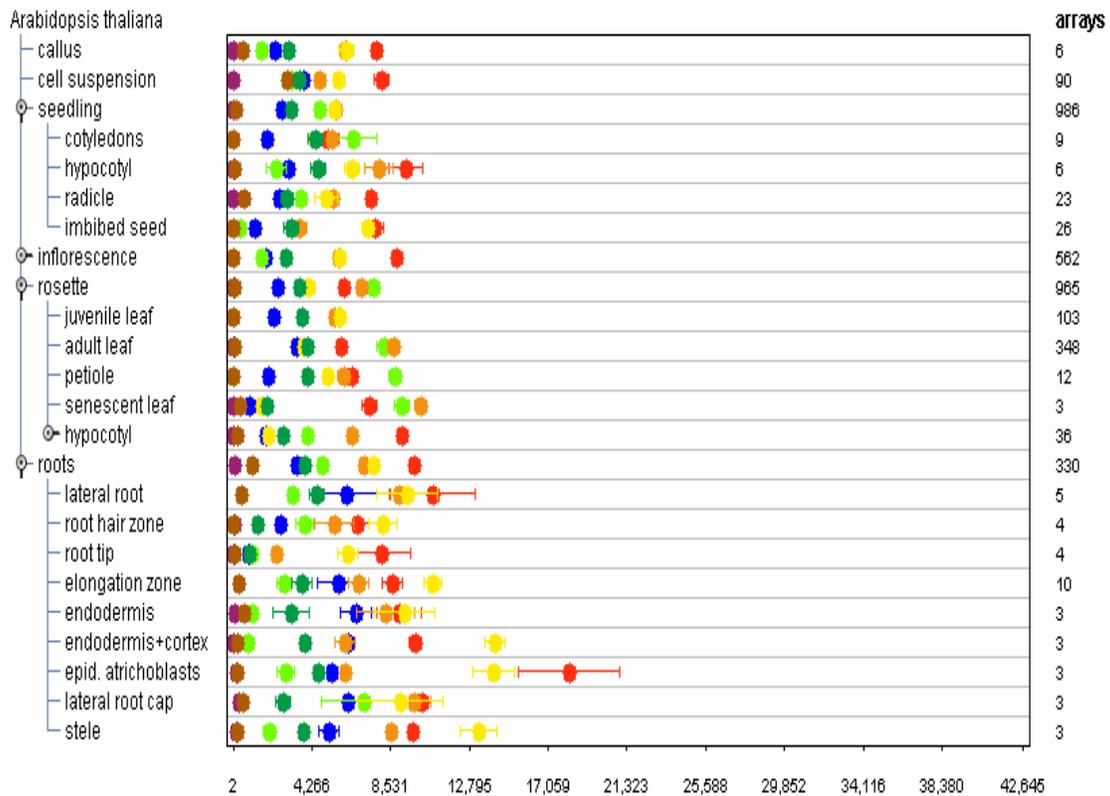


Figura 15. Expresión de los genes en función de la anatomía de la planta. CaM1 CaM2 CaM3 CaM4 CaM5 CaM7 CaM8 CaM9

Es de resaltar el caso del gen CaM3, cuya actividad permanece prácticamente inmutable en cada una de las distintas edades (Fig 13) y tejidos (Fig 12). Lo que indica que este gene es constitutivo y que posiblemente, tiene funciones centrales en las células vegetales, es decir, su actividad es requerida constantemente aunque probablemente sea una señal de funciones puramente estructurales.

Lo anterior, refleja la expresión de los genes en condiciones óptimas de crecimiento, a lo largo de las diferentes etapas de la planta y en función de los tejidos. Sin embargo, la expresión puede modificarse muy severamente en respuesta a estímulos que establezcan condiciones de estrés para la planta. Tales datos se muestran en la figura 16.

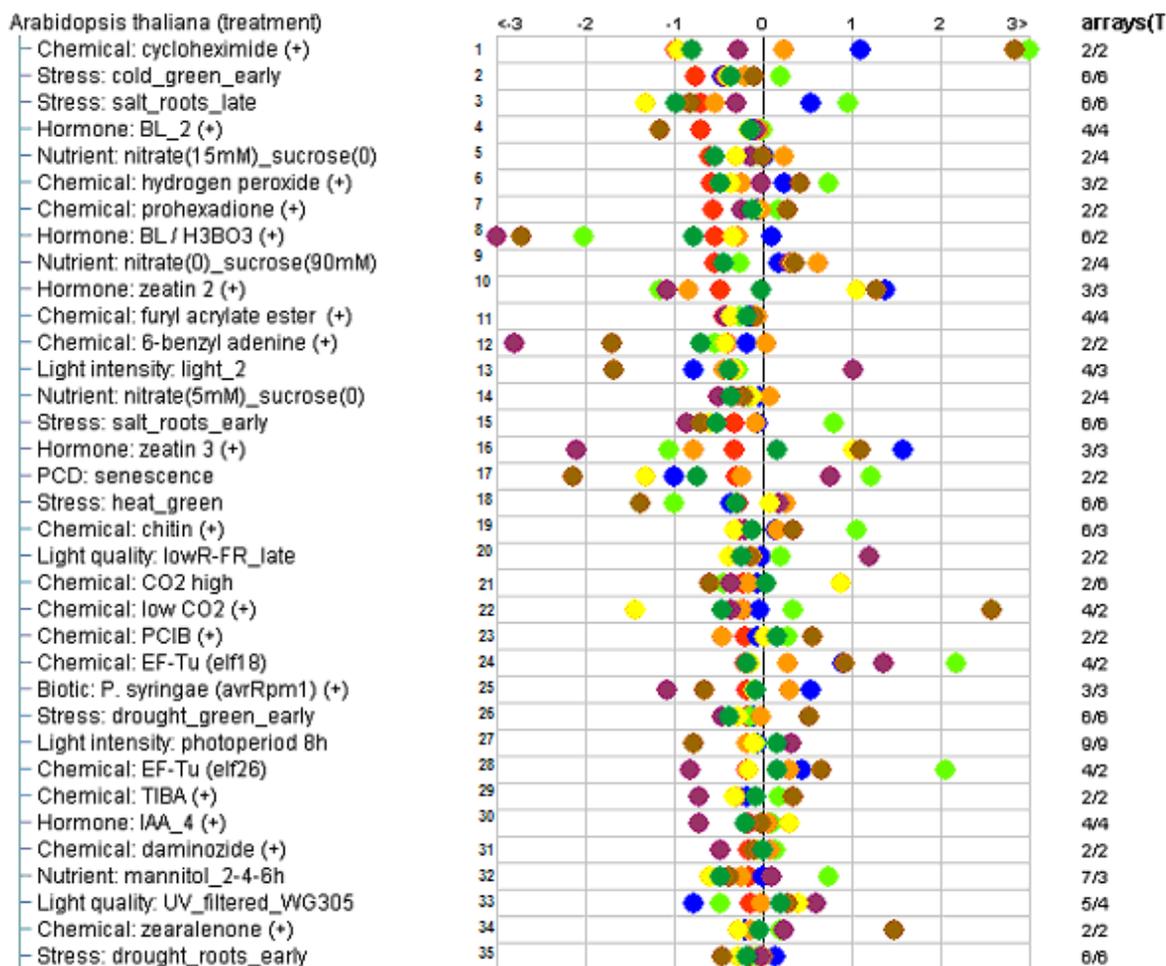


Figura 16. Expresión de los genes en función de algunos estímulos. CaM1 CaM2 CaM3 CaM4 CaM5 CaM7 CaM8 CaM9

Puede observarse, que en la mayoría de las condiciones la expresión de las calmodulinas en general cambia poco (Fig. 16), con excepción de genes específicos que responden a condiciones muy particulares. Por ejemplo, la aplicación del antibiótico cicloheximida, que actúa a nivel de la traducción en los eucariotes, resulta en una expresión muy elevada de las CaM1 y CaM9, mientras que la aplicación de la hormona brasinólida, reduce significativamente su expresión, incluyendo la de la CaM8. De hecho, las CaM1 CaM9 y CaM8 muestran cambios importantes en sus niveles, en varias de las condiciones que han sido investigadas. A pesar de ello, hay condiciones en las que su expresión no es afectada y, en cambio, sí la de otros genes, como es el caso de la CaM2 que muestra respuesta importantes al variar la calidad de la luz y con la aplicación de la zeatina, que es una hormona perteneciente al grupo de las citocininas.

En concordancia con lo observado para la expresión tejido y edad específica, la CaM3 se expresa de manera constitutiva y no cambia su expresión en respuesta a diversos estímulos. Lo que confirma su relevancia para las funciones basales de las células vegetales. En este punto hay que recordar que CaM2 y CaM3 tienen una secuencia idéntica, Por lo que llama la atención que CaM2 responda a condiciones como luz y citocininas, dado que CaM3 estaría presente para realizar las funciones que le correspondan. Aquí caben dos hipótesis : que estas proteínas se localizan en sitios diferentes dentro de la célula, o bien, los cambios en los niveles de CaM2 permiten variaciones en la cantidad de esta proteína sin bajar de una cota inferior, que sería la cantidad basal necesaria para el mantenimiento.

De manera general, el comportamiento de estos genes en las distintas situaciones, puede definirse como constante, exceptuando las condiciones específicas que provocan que la actividad de algunos de ellos se dispare, aunque pareciera tratarse de condiciones límite debido al bajo número de casos en los que estos fenómenos se presentan.

IX. Conclusiones y perspectivas

La diversidad de isoformas de Calmodulina presente en las plantas sugieren que la regulación de las señales mediadas por calcio es mucho más compleja en plantas que en animales.

Por otro lado, las CaM de plantas presentan cambios en sus secuencias de aminoácidos que se conservan entre los vegetales. Uno de los cambios más notable está a nivel del sitio 1 de unión a Ca^{2+} , lo que sugiere que la afinidad de estas proteínas por el metal podría presentar diferencias importantes respecto a las proteínas de animales.

Tanto las diferencias en la secuencias de aminoácidos de las 9 isoformas de CaM en arabidopsis, como los diferentes niveles de expresión de los mensajes para 8 de las 9 isoformas de CaM los datos de microarreglos indican que dichas formas no son redundantes y que poseen una delicada subespecialización, posiblemente, a nivel de distintos interactores, así como, quizá, a nivel de su ubicación intracelular.

Todo lo anterior plantea numerosas interrogantes y pocas respuestas, por lo que, si queremos comprender mejor el papel del calcio como segundo mensajero en las plantas, deberán emprenderse numerosos estudios para determinar la estructura y las características moleculares de las CaM vegetales, así como sus interactores propios y sus funciones particulares.

X. Apéndice

Análisis de los datos de expresión genética

Para el análisis de la expresión de los genes de la calmodulina en función de factores como el tejido, la edad y el desarrollo se utilizó la base de datos de microarreglos de *Arabidopsis thaliana* disponible en genevestigator.

El genevestigator presenta un software que puede realizar cuatro tipos distintos de análisis: meta-profile, que permite ubicar en qué tejidos, etapa de desarrollo o estímulo se expresa un determinado gen; la búsqueda de biomarcadores, que permite identificar a los genes que son expresados en condiciones específicas, por ejemplo estímulos, anatomía o en mutantes. El tercer tipo de análisis ofrece la posibilidad de analizar a todo un grupo de genes similares ante una misma condición; y por último, el proyector de vías permite la visualización de las vías metabólicas en las cuales está involucrado el gen de interés.

Para una manipulación más sencilla, el genevestigator cuenta con una serie de herramientas acomodadas por ventanas que facilitan el análisis. Para el estudio de los genes de calmodulina se decidió utilizar el tipo de análisis meta-profile, ya que los datos que proporciona son suficientes para el fin de esta investigación.

Para poder iniciar un análisis, el primer paso es seleccionar el tipo de análisis que se desea hacer, como ya se mencionó antes, será el meta-profile. El segundo paso es seleccionar un organismo, para los fines de este proyecto, se eligió la *Arabidopsis thaliana* pues es el organismo vegetal mejor estudiado .

El siguiente paso es introducir una lista de genes del organismo en cuestión que se desean analizar, en este caso los de la calmodulina. Por último, los resultados del análisis son desplegados en la pantalla; de donde se pueden elegir diversas condiciones, como anatomía, estímulos, desarrollo y mutaciones.

Es de esta manera como el genevestigator permitió realizar un análisis de la expresión genética de la calmodulina en *Arabidopsis thaliana*. Es importante mencionar que para poder usar esta base de datos es necesario estar registrado ante la organización, de modo contrario no podrá tenerse acceso a la información. (35). El registro es gratuito para usuarios académicos y permite el acceso al programa mediante las funciones

básicas. Las funciones avanzadas del programa se pueden contratar anualmente y si el usuario no es académico el acceso debe ser contratado para cualquier tipo de servicios.

La búsqueda de los genes correspondientes a las calmodulinas de plantas se realizó empleando previamente la base de datos de TAIR (<http://www.arabidopsis.org>). En esta base es posible ubicar genes tomando en cuenta las anotaciones de los mismos. Una búsqueda con la palabra clave "Calmodulin" recuperó un gran número de genes, muchos de ellos correspondientes a proteínas reguladas por calmodulina, o bien algunos que poseen en su estructura manos EF de unión a calcio tipo calmodulina. De entre ellos, fue posible seleccionar 9 genes correspondientes a distintas isoformas de la calmodulina. Cabe señalar, que las plantas poseen un número importante de proteínas semejantes a la Calmodulina (CaMLs) por lo que, dependiendo del nivel de conservación de secuencia que se elija respecto a la CaM de animales, el número de genes de CaM puede ser de 9 o de 11 en *Arabidopsis thaliana*. En este trabajo se limitó el análisis a los 9 genes más cercanos a las CaM animales.

Análisis filogenético

Las secuencias de los distintos organismos que se utilizaron para el árbol filogenético se obtuvieron de la base de datos informática genbank, que es una colección de todas las secuencias de ADN que han sido depositadas públicamente. Existen más de 50 millones de secuencias de diferentes organismos hasta el día de hoy, lo cual constituyó una herramienta sumamente útil para los propósitos de este análisis bioinformático.

Una imagen con información del crecimiento de la base de datos de Genbank se muestra en la figura 16.

Growth of GenBank (1982 - 2005)

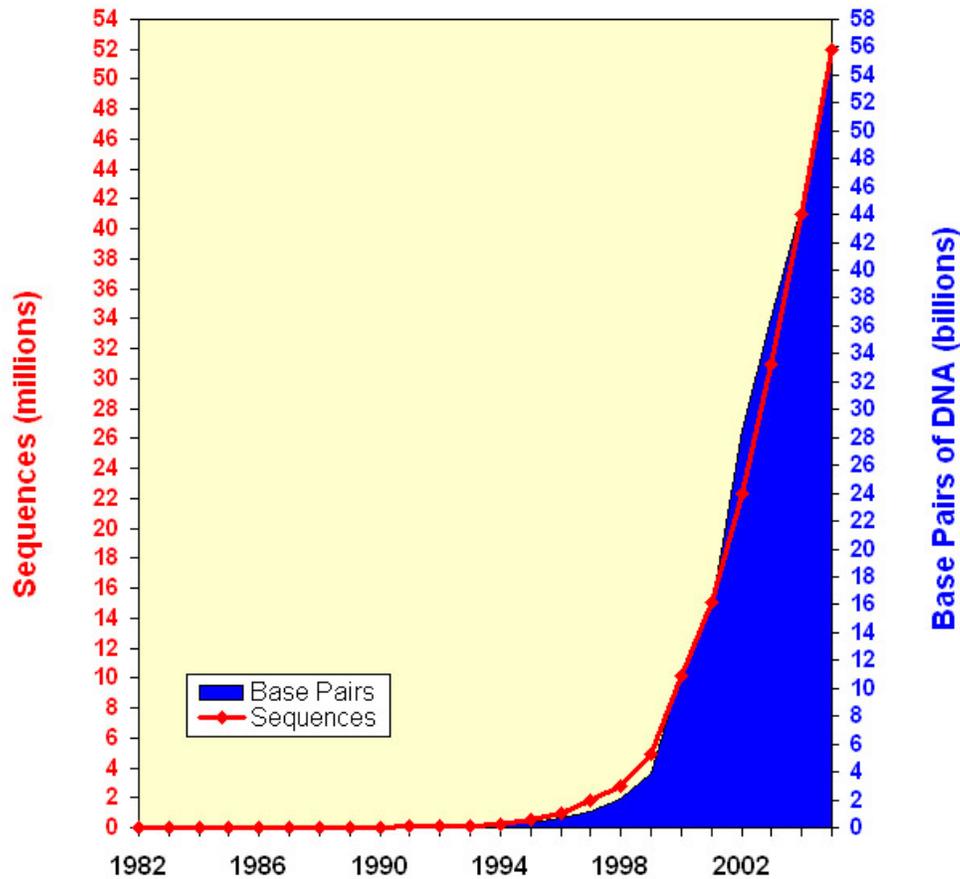


Figura 17. Datos del crecimiento de la base de datos de gnebank desde 1982 a la fecha. La imagen fue dirctamente tomada de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/genbankstats.html>.

El genebank es una división del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI), al cual se puede acceder a través de su dirección electrónica <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank>. Genebank ofrece la posibilidad de encontrar secuencias de nucleótidos, proteínas, dominios, locus, perfiles, cromosomas, estructuras, genomas, taxonomía, genes homólogos, clusters y varias piezas de información más. Estadísticas adicionales sobre la información en esta base pueden encontrarse en las bases mismas. Por ejemplo una estadística de los genes separados por taxa se encuentra en http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/Gene/gentrez_stats.cgi.

Para este análisis se eligió la secuencia de genes de la calmodulina, pues el interés de este análisis es la comparación de los genes que codifican para esta proteína en los

diversos seres vivos. Se encontró una numerosa lista de secuencias de organismos, que fueron analizadas y agrupadas filogenéticamente, particularmente las correspondientes a las plantas, para de esta manera tener un grupo comparativo más específico y más cercano a los fines del proyecto. (36)

Alineamiento de secuencias

Una parte importante del análisis consistió en el alineamiento de las secuencias de varios organismos con el propósito de encontrar semejanzas de secuencia entre los genes de uno y otro organismo. El alineamiento se refiere al acomodo horizontal de las secuencias de modo tal que puedan compararse las secuencias de aminoácidos de las proteínas correspondientes. Para ese fin se empleó el programa ClustalW (46) , que es un programa de alineamiento de secuencia de ADN o de proteínas. ClustalW calcula el mejor acomodo de las secuencias para lograr el máximo número de coincidencias posibles. Así, pueden observarse las diferencias y similitudes entre las secuencias y pueden establecerse hipótesis acerca de las mutaciones que han ocurrido para permitir la diversidad genética observada (46). Aunque existen otros algoritmos para alinear secuencias de aminoácidos, clustalW es uno de los más frecuentemente empleados. Para este trabajo se utilizó la tabla de sustitución llamada BLOSUM62.

Los alineamientos múltiples de proteínas son una valiosa herramienta en el estudio de secuencias, puesto que permiten identificar fragmentos en donde la secuencia se encuentra total o parcialmente conservada, lo cual resulta de gran ayuda para el estudio de la estructura y función de proteínas. El postulado básico es que las variaciones en las secuencias son resultados de las mutaciones en las secuencias de bases de los genes que codifican para la proteína. Tales cambios, de ser muy deletereos para el organismo, resultan en su muerte y eliminación de la población, por lo que se pierden. Por el contrario, los cambios que afecten la función, pero sin llevar a la muerte del organismo pueden persistir y dar lugar a secuencias divergentes. Una mayor divergencia entre dos secuencias debe entonces resultar de un mayor número de mutaciones acumuladas a lo largo de muchas generaciones. Por lo tanto la tasa de mutaciones, siempre que se realicen los ajustes apropiados y con la referencia adecuada, permite establecer relaciones filogenéticas entre los organismos que portan dichos genes.

En este estudio, se alinearon todas las secuencias seleccionadas de genebank para compararlas y agruparlas en un árbol filogenético generado por el mismo ClustalW. El árbol contiene diversos organismos agrupados en conjuntos emparentados filogenéticamente, por ejemplo el grupo de los eucariontes superiores o el de los microorganismos. De esas secuencias se apartaron en un grupo especial las pertenecientes a vegetales, con la finalidad de clasificar y analizar de manera más específica este grupo de secuencias en relación con la CAM, y entender su expresión genética (37).

Además del ClustalW, se utilizó otro programa para editar las secuencias, este es el Bioedit (Hall, T. Ibis Biosciences Carlsbad, CA. 92008. USA; <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>). Este software cuenta con herramientas que permiten realizar análisis de las secuencias que desean alinearse, por ejemplo, el porcentaje de aminoácidos por secuencia; expresando estos resultados en gráficas que permiten visualizar fácilmente las proporciones de cada uno de los aminoácidos en la proteína. También cuenta con la opción de alinear nucleótidos llamando a clustalW y agrupar secuencias para englobarlas en conjuntos con características similares, así como la propiedad de manipular a las secuencias para conocer los efectos de un cambio en la secuencia. Además es posible exportar las secuencias alineadas para poder trabajar con ellas en otros formatos, lo que resulta de gran utilidad para el análisis posterior (38).

La elaboración de los alineamientos y los árboles filogenéticos en forma gráfica fue realizada con BioEdit, JalView (39) y TreeDyn (40). JalView también permite la preparación de imágenes tridimensionales de proteínas en las que se puede apreciar la conservación del alineamiento sobre la estructura tridimensional de uno de los miembros de dicho alineamiento, en este caso, el cristal de la Calmodulina humana (código del pdb 1CTR).

XI. Referencias

1. Went, Frits W (1990) LAS PLANTAS. Segunda edición. Time Life Books Inc.
pag 97-106
2. Bewley D Black M (1994) SEEDS. Physiology of development and germination. 2nd edn. Plenum Press, New York, London, 445pp.
3. Lara-Nuñez A Chávez-Montes R Domínguez-Hernández E Rodríguez-Sotres R (2001) Partición del carbono en las semillas de cereales durante la fase de llenado. EN: Avances en Bioquímica y Biología Molecular de Plantas. I Bernal-Lugo, H Loza-Tavera, comp. Facultad de Química UNAM, pp. 147-164
4. Savaldi-Goldstein S, Peto C, Chory J (2007) The epidermis both drives and restricts plant shoot growth. *Nature* 446(7132):199-202
5. Briggs W R Olney M A (2001) Photoreceptors in Plant Photomorphogenesis to Date. Five Phytochromes, Two Cryptochromes, One Phototropin, and One Superchrome *Plant Physiol* 125:85-88.
- 6 Dörnenburg, H. y Knorr, D.1996. Generation of colors and flavors in plant cell and tissue cultures. *CR Plant Sci.* 15:141-168
7. Buchanan, Bob B. Wilhelm Grivsem y Russel L. Jones. (2000) *Biochemistry and Molecular Biology of plants*. First Edition. American Society of Plant Physiologists, 1336 pp. Pag 930-976
8. Bouché , Nicolas, Ayelet Yellin, Wayne A. Snedden and Hillel Fromm (2005) Plant – Specific Calmodulin – Binding Proteins. *Annual Review. Plant Biology.* 456 pp
9. Neuhaus HE, Wagner R (2000) Solute pores, ion channels, and metabolite transporters in the outer and inner envelope membranes of higher plant plastids.. *Biochim. Biophys. Acta* 1465():307-323
10. Testerink, Christa and Teun Minnik (2005) Phosphatidic acid : a multifunctional estrés signaling lipid in plants. *Trends in Plant Science.*
11. McCormack , Elizabeth. Yu-Chang Tsai and Janet Braam (2005) Handling calcium signaling : *Arabidopsis* CaMs y CMLs. *Trends in Plant Science.*
12. Wissing, J. B., and Behrbohm, H. (1993) Phosphatidate Kinase, a Novel Enzyme in Phospholipid Metabolism (Purification, Subcellular Localization, and Occurrence in the Plant Kingdom) *Plant Physiol.* 102 (4): 1243–1249

13. Munnik T, de Vrije T, Irvine R F, Musgrave A. 1996. Identification of Diacylglycerol Pyrophosphate as a Novel Metabolic Product of Phosphatidic Acid during G-protein Activation in Plants. *J. Biol. Chem* 271 (26):15708-15715
14. Li X, Chanroj S, Wu Z, Romanowsky SM, Harper JF, Sze H. (2008) A distinct endosomal Ca²⁺/Mn²⁺ pump affects root growth through the secretory process. *Plant Physiol.* 147:1675-1689
15. Wilson, M.A., Brunger, A.T. 2000 The 1.0 Å crystal structure of Ca(2+)-bound calmodulin: an analysis of disorder and implications for functionally relevant plasticity *J.Mol.Biol.* 301: 1237-1256
16. Walsh M P, Vogel H J (2007) Structures and metal-ion-binding properties of the Ca²⁺-binding helix-loop-helix EF-hand motifs. *The Biochemical journal* 405 (2): 199-221
17. Kato K, Suzuki H, Terasawa Y, Mizuno T, Yasuda J, Shibata H, Maki M (2005) The penta-EF-hand protein ALG-2 interacts directly with the ESCRT-I component TSG101, and Ca²⁺-dependently co-localizes to aberrant endosomes with dominant-negative AAA ATPase SKD1/Vps4B *Biochem J.* 391(3): 677-685.
18. Echevarria, C, Vidal, J LeMarechal, P, Brulfert, J, Ranjeva, R & Gadal (1988) The phosphorylation of sorghum leaf phosphoenolpyruvate carboxylase is a Ca⁺⁺ calmodulin dependent process.. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 155:835-840
19. Christian S. Hardtke, Eavan Dorcey, Karen S. Osmont, Richard Sibout R (2007) Phytohormone collaboration: zooming in on auxin–brassinosteroid interactions. *Trends in Cell Biology* 17:485-492
20. D. B. Halling, P. Aracena-Parks, S. L. Hamilton, (2005) Regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels by calmodulin. *Sci. STKE* 2005, re15
21. Cook, W.J., Walter, L.J., Walter, M.R. (1994) Drug binding by calmodulin: crystal structure of a calmodulin-trifluoperazine complex. *Biochemistry* 33: 15259-15265
22. H.M. Berman, J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T.N. Bhat, H. Weissig, I.N. Shindyalov, P.E. Bourne (2000) The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research*, 28: 235-242
23. Humphrey, W., Dalke, A. and Schulten, K., (1996) VMD - Visual Molecular Dynamics. *J. Molec. Graphics* 14: 33-38.
24. Elshorst, B., Hennig, M., Forsterling, H., Diener, A., Maurer, M., Schulte, P., Schwalbe, H., Griesinger, C., Krebs, J., Schmid, H., Vorherr, T., Carafoli, E. (1999)

NMR solution structure of a complex of calmodulin with a binding peptide of the Ca²⁺ pump. *Biochemistry* 38: 12320-12332

25. Raymond E. Zielinski (1998) Calmodulin and calmodulin-binding proteins in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 49:697-725.

26. Goraya T A, Cooper D M (2005) Ca²⁺-calmodulin-dependent phosphodiesterase (PDE1): current perspectives. *Cell Signal* 17:789-797.

27. Pandey GK, Cheong YH, Kim BG, et al. (2007) CIPK9: a calcium sensor-interacting protein kinase required for low-potassium tolerance in *Arabidopsis*. *CELL RESEARCH* 17:411-421

28. Park HC, Kim ML, Lee SM, et al. (2007) Pathogen-induced binding of the soybean zinc finger homeodomain proteins GmZF-HD1 and GmZF-HD2 to two repeats of ATTA homeodomain binding site in the calmodulin isoform 4 (GmCaM4) promoter *NUCLEIC ACIDS RESEARCH* 35: 3612-3623

29. Swindell W R (2006) The association among gene expression responses to nine abiotic stress treatments in *Arabidopsis thaliana*. *GENETICS* 174: 1811-1824.

30. Dombrowski J E, Bergey D R (2007) Calcium ions enhance systemin activity and play an integral role in the wound response. *PLANT Sci.* 172: 335-344

31. Sanders D, Brownlee C, Harper JF (1999) Communicating with calcium. *Plant Cell* 11: 691–706.

32. Sakai-Wada A, Yagi S (1993) Ultrastructural studies on the Ca²⁺ localization in the dividing cells of the maize root tip. *Cell Struct Funct* 18: 389–397

33. Martinez-Ballesta MDC, Silva C, Lopez-Berenguer C, et al. (2006) Plant aquaporins: New perspectives on water and nutrient uptake in saline environment. *PLANT BIOLOGY* 8: 535-546

34. Cabanero FJ, Martinez-Ballesta MC, Teruel JA, et al. (2006) New evidence about the relationship between water channel activity and calcium in salinity-stressed pepper plants. *PLANT AND CELL PHYSIOLOGY* 47: 224-233

35. Genevestigator user manual

36. Genbank. National Center of Biotechnologic Investigation.

37. EBI Data bases. EMBL-EBI

38. Tom Hall Ibis Biosciences. Bioedit web site. RnaseP Database

39. Clmap M Cuff J Searle S M Barton G J (2004) The JalView java alignment editor. *Bioinformatics* 20:426-427.
40. Chevenet F, Brun C, Banuls A L, Jacq B, Christen R. (2006) TreeDyn: towards dynamic graphics and annotations for analyses of trees. *BMC Bioinformatics* 7:439
41. Schirmer, E. C. , Lindquist, S., Vierling, E. (1994) An *Arabidopsis* heat shock protein complements a thermotolerance defect in yeast. *PLANT CELL* 6 : 1899 – 1909
- 42 Liming Xiong , Karen S. Schumaker , and Jian – Kang Zhu (2002) Cell signaling during cold, drought and salt stress. *The plant cell* , S165 – S183
- 43 Tianbao Yang and B. W. Poovaiah (2003) Calcium / calmodulin – mediated signal network in plants. *Trends in plant science*. Vol 8 No. 10 505 – 512
- 44 Chin David and Anthony R. Means. (2000) Calmodulin : a prototypical calcium sensor. *Trends Cell. Biol.* 10 322 328
- 45 Palfi A, Kortvely E, Fekete E, Kovacs B, Varszegi S, Gulya, K.(2002) Differential calmodulin gene expression in the rodent brain. *Life Sciences* 70 24 2829 2855
- 46Thompson, J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22:4673-4680; <http://bips.u-strasbg.fr/fr/Documentation/ClustalX/>
- 47 Reymond, Philippe, Natacha Bodenhausen et al. A conserved transcript pattern in response to a specialist and a generalist herbivore. *The plant cell*, Vol 16, 3132 – 3147, November 2004.
48. González-Andrade, M., Figueroa, M., Rodríguez-Sotres, R., Mata, R., Sosa-Peinado, A. (2009) An alternative assay to discover potential calmodulin inhibitors using a human fluorophore-labeled CaM protein. *Analytical Biochemistry* 387(1):64-70.
49. Figueroa, M., González, M.d.C., Rodríguez-Sotres, R., Sosa-Peinado, A., González-Andrade, M., Cerda-García-Rojas, C.M., Mata, R. (2009) Calmodulin inhibitors from the fungus *Emericella* sp. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. 17(6):2167-2174.
50. Daee DL, Mertz T, Lahue RS. (2007) Post-replication repair inhibits CAG*CTG repeat expansions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*. 27:102-110 .
51. Parniewski P, Staczek P (2002) Molecular mechanisms of TRS instability. *Adv Exp Med Biol*.516:1-25.

52. Lindqvist C, Laakkonen L, Albert VA. (2007) Polyglutamine variation in a flowering time protein correlates with island age in a Hawaiian plant radiation. BMC Evol Biol. 2(7):105.
53. A. V. Belenista, M. S. Wainwrightd, M. Zasadzkia, S. Mirzoevac, A. M. Schumachera, J. Haieche, P. J. Fociab, M. Eglif, D. M. Watterson. (2003). An aminopyridazine – based inhibitor of a pro – apoptotic protein kinase attenuates hypoxia – ischemia induced acute brain injury. Bioinorganic & Medicinal Chemistry Letters 13(20):3465-3470; doi:10.1016/S0960-894X(03)00733-9)
54. Marsch, Nayelli y Stefan de Folter (2010). *Arabidopsis thaliana* , un “pequeño” gran genoma. Genómicas. Num 7- Ene – Abr 2010