

Tesis Doctoral

# Caracterización funcional de proteínas del tipo acuaporinas en polen maduro de *Arabidopsis thaliana*

Soto, Gabriela Cynthia

2009

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Soto, Gabriela Cynthia. (2009). Caracterización funcional de proteínas del tipo acuaporinas en polen maduro de *Arabidopsis thaliana*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Soto, Gabriela Cynthia. "Caracterización funcional de proteínas del tipo acuaporinas en polen maduro de *Arabidopsis thaliana*". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2009.

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires



**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**  
**Facultad de Ciencias Exactas y Naturales**  
**Departamento de Fisiología, Biología Molecular y Celular**

**Caracterización funcional de proteínas del tipo  
acuaporinas en polen maduro de  
*Arabidopsis thaliana*.**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área Ciencias Biológicas.

Lic. Gabriela Cynthia Soto

Director de Tesis: Dr. Jorge Muschiatti.

Director Asistente: Dra. M. Agustina Mazzella.

Consejero de Estudios: Dr. Alejandro Mentaberry.

Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular

INGEBI-CONICET

Buenos Aires, 2009

## Caracterización funcional de proteínas del tipo acuaporinas en polen maduro de *Arabidopsis thaliana*.

### Resumen

La reproducción sexual en plantas incluye procesos en donde el movimiento de agua y solutos se encuentra finamente regulado, lo cual sugiere la participación de acuaporinas. La existencia de acuaporinas, facilitando estos flujos, provee una base molecular sólida para la regulación del transporte de agua y solutos a través de las membranas y de esta forma establecen conexiones entre dicho transporte, el desarrollo de las plantas y sus respuestas adaptativas a las condiciones a las que se encuentran expuestas tanto a nivel organismo, como tejido e incluso a nivel intracelular.

Este trabajo de tesis se centró principalmente en la identificación y caracterización de las acuaporinas potencialmente involucradas en la reproducción desde los órganos reproductivos masculinos en *Arabidopsis thaliana*.

Primeramente identificamos las tres acuaporinas específicas de granos de polen de *Arabidopsis*, *AtTIP5;1*, *AtTIP1;3* y *AtNIP4;1*. En base a experimentos funcionales, utilizando ovocitos de *Xenopus laevis* como sistema heterólogo, pudimos determinar que *AtTIP5;1*, *AtTIP1;3* y *AtNIP4;1* son transportadores de agua. *AtTIP5;1* y *AtTIP1;3* son también transportadores de urea y solamente *AtTIP5;1* se encuentra regulado por pH externo.

Estudios de localización subcelular evidenciaron que *AtTIP5;1* se expresa en mitocondrias de polen. Por otro lado, *AtTIP1;3* se encuentra en estructuras intracelulares no vacuolares del tipo vesiculares, pero que no participan de mecanismos de endocitosis ni exocitosis.

Finalmente, los experimentos fisiológicos *in vitro* sugirieron un papel de *AtTIP5;1* en germinación del grano de polen actuando como regulador negativo. *AtTIP5;1*, *AtTIP1;3* y *AtNIP4;1* se vincularon de forma directa o indirecta con el proceso de elongación del tubo polínico, destacándose los efectos más drásticos para *AtTIP1;3*. En cuanto a los experimentos fisiológicos *in planta*, encontramos que solamente *AtNIP4;1* tiene afectados los parámetros de fertilidad con una reducción significativa en el número de semillas.

En el marco de esta tesis doctoral hemos realizado una revisión de la información disponible de acuaporinas de plantas, evaluando los perfiles de expresión de las mismas en los diversos tejidos. Hemos discutido la nomenclatura utilizada para clasificar esta familia proteica y analizado la posibilidad de establecer relaciones filogenéticas y funcionales entre los distintos subgrupos: PIPs, TIPs, NIPs y SIPs.

El conjunto de resultados desarrollados en esta tesis, en concordancia con los trabajos publicados en estos últimos años, nos ha permitido aventurar posibles roles en relación con la actividad de transporte de agua y/o solutos de las acuaporinas de polen; que van desde la migración celular hasta el control del daño y prevención de apoptosis. También nos ha permitido generar un modelo sobre el mecanismo de acción de las acuaporinas en el polen relativo a la actividad como transportadores de urea. Este modelo vincula la actividad de *AfTIP5;1* y *AfTIP1;3* con el reciclado del nitrógeno descrito en polen.

Palabras claves: Aquaporinas, polen, elongación del tubo polínico, transporte de agua, transporte de urea, reciclado de nitrógeno, localización mitocondrial.

**Functional characterization of aquaporin-type proteins in  
*Arabidopsis thaliana* mature pollen.**

**Abstract**

Sexual reproduction involves processes where water and solute movement is finely regulated, suggesting the involvement of aquaporins. The existence of aquaporins facilitating these flows, provides a solid molecular basis for the regulation of water and solute transport through membranes and thus make connections between the transport, plant development and adaptive responses to conditions to which the plant is exposed at both the organism such as tissue or even intracellular level. This thesis is focused mainly on the identification and characterization of aquaporin potentially involved in reproduction from the male reproductive organs in *Arabidopsis thaliana*.

We first identified the three *Arabidopsis* pollen grains specific aquaporins, *AtTIP5;1*, *AtTIP1;3* and *AtNIP4;1*. Based on functional experiments using *Xenopus laevis* oocytes as a heterologous system, we could determine that *AtTIP5;1*, *AtTIP1;3* and *AtNIP4;1* are water carriers. *AtTIP5;1* and *AtTIP1;3* are also carriers of urea and only *AtTIP5;1* is regulated by external pH.

Subcellular localization studies showed that *AtTIP5;1* is expressed in pollen's mitochondria. Furthermore, *AtTIP1;3* is located in intracellular structures not vesicular vacuolar-type, but not participating in endocytosis and exocytosis mechanisms.

Finally, *in vitro* physiological experiments suggested a role *AtTIP5;1* in pollen grain germination by acting as negative regulator. *AtTIP5;1*, *AtTIP1;3* and *AtNIP4;1* is linked directly or indirectly with the process of pollen tube elongation, especially the more drastic effects for *AtTIP1;3*. For physiological experiments *in planta*, we found that only *AtNIP4;1* has affected fertility parameters with a significant reduction in the number of seeds.

As part of this thesis, we have conducted a review of available information of plant aquaporins, evaluating the expression profiles of the same in various tissues. We discussed the nomenclature used to classify this protein family and discussed the possibility of phylogenetic and functional relationships between different subgroups: PIPs, TIPs, NIPs and SIPs.

Together, the results obtained in this thesis, along different reports published in recent years has allowed us to venture possible roles in relation to water and urea transport activity of pollen's aquaporins ranging from cell migration, to damage control and prevent apoptosis. It also allowed us to generate a model on the mechanism of action of aquaporins on the activity of urea transporters in pollen. This model links specially *AtTIP5;1* activity, and *AtTIP1;3* with nitrogen recycling in pollen.

Keywords: Aquaporins, pollen, pollen tube elongation, water transport, urea transport, nitrogen recycling, mitochondrial localization.

*al Monkey, a Benjamín, a Papá  
mis tres amores*

Gracias...

A Jorge, por la libertad con la que me permitiste llevar a cabo esta tesis. Por estar siempre dispuesto a escucharme y sostenerme siempre que me hizo falta. Por apoyarme en cada decisión que tomé en estos años. Siento que crecí mucho en el camino, gracias por la guía.

A Gabi Amodeo, por tu invaluable y constante ayuda. Por enseñarme e incitarme a planificar y desarrollar mi carrera.

A Agus, mi maestra de vida. Cómo me va a costar la despedida!! Te quiero mucho y así te voy a extrañar.

Al Monkey, por ayudarme cada vez que te lo pido y cuando no también!!. Por tanto tiempo invertido en que disfrute escribir esta tesis, por la bioinformática, el metabolismo del nitrógeno y la discusión de absolutamente cada uno de mis resultados.

A Romi, por el entusiasmo y ganas que le pones a la ciencia. Por tu constante aporte a mi trabajo y por permitirme participar en el tuyo. Porque es excelente ver lo rápido que va tu mente pero mejor es ser tu compañera. Te quiero mucho Chiru!

A todo el laboratorio de Biomembranas por abrirme las puertas tantos días y hacerme sentir tan cómoda. Especialmente gracias Karin por preocuparte por mí, por ayudarme y por el impulso.

A los miembros del Lab. Muschietti: Tami por tantas risas y tristezas compartidas; Die por estar siempre dispuesto a socorrer, aportar y especialmente por el empujoncito final. A Lori y Mariana por la buena onda.

A los miembros del Lab Erijman. A Leo, por hacerme reír en la mateadas de la mañana; a Eva por lo generosa que sos con absolutamente todo, de lejos me parecías un lindo ejemplo de cerca además de eso me llevo una gran amiga; a la Chiqui por compartir tantas charlas y por compartir la ansiedad final. A Lean y Joaco por la buena onda.

A Nadina y a Marian excelentes compañeras con las que aprendí mucho, me encantaría tenerlas más cerca.

A San y mi pequeña vecina Jani por los momentos compartidos (especialmente los de plaza, uii), Caro y Vero por los mates y charlas.

A los directivos del INGEBI, que me permitieron realizar mi Tesis. Especialmente a Mirtha Flawia que hace del Instituto un lugar de pertenencia.

A todos los miembros del INGEBI. Especialmente Irma, Marta, Gladis, Mari y Pancho de quienes recibí tantas veces tanta ayuda.

A Francisco Guaimas y Eli Jares-Erijman por su ayuda en el trabajo de deconvolución. A Pablo Do Campo por su trabajo en las fotos del confocal y su gran ayuda en mi entendimiento de las imágenes.

A CONICET y ANPCyT por otorgarme las becas que me permitieron realizar esta Tesis y por financiar los proyectos que la contienen.

A mi hermosa familia:

A mis hermanas del alma Pao y Ro, las quiero muchísimo!! Gracias por estar siempre!

A mi abuelchu del corazón, que tanto amor nos da.

A Marce, Val y Nona mis hermanas que tanto me dan y me apoyan. Siempre ahí para compartirlo absolutamente todo. Tan distintas, tan iguales, somos incondicionales eso nos define. Las adoro chicas!! A mis cuñados, siempre que las hagan felices.

A mis tres princesas que me regalan tanto todos los días. Si supieran lo que vale para mí tenerlas cerca y verlas crecer, sabrían que siempre nos van a tener y sabrían que cada día que pasa las amo más.

A quien ante todo elige ser Mamá, es un privilegio tenerte. Gracias por enseñarme con un precioso ejemplo quién quiero ser y con quién quiero estar. Gracias porque desde siempre y con amor me enseñaste que lo único importante es buscar la felicidad y sobre todo saber disfrutarla. Gracias por tu fuerza, gracias por pararte, gracias por ser el junco. No me alcanzan las palabras, te AMO mami. A mis papás por darme el valor de la familia, por las raíces. Por enseñarme a soñar e incentivar a luchar por esos mis sueños.

Gracias a mis tres amores, por hacerme la persona feliz que soy

    Mi Benjamín, mi orgullo más puro. A la dulzura de mirarte en esos ojos llenos de amor que me llenan de emoción. Gracias porque ser tu mamá es el regalo más hermoso que puede existir.

    Mi Monkey te amo todo los días, te elijo todos los días, soy muy feliz caminando la vida con vos. Simplemente, te amo. Gracias por darme tanto. Fundamentalmente gracias por nuestro día a día.

*Con todo el dolor de tanto extrañarte  
Con toda la felicidad de lo que me enseñaste a construir  
Con todo el orgullo de lo que soñamos juntos  
Como siempre todo por y para vos pá.*

## INDICE

RESUMEN .....	2
ABSTRACT .....	4
AGRADECIMIENTOS.....	6
INTRODUCCION.....	11
<b>El polen en la reproducción sexual</b> .....	12
<i>Desarrollo del grano de polen</i> .....	13
<i>Polen y flujo de agua</i> .....	15
<i>Crecimiento del tubo polínico</i> .....	16
<i>El entendimiento del desarrollo del polen con los recursos actuales</i> .....	19
<b>Acuaporinas</b> .....	20
<i>Estructura</i> .....	21
<i>Clasificación</i> .....	24
<i>Selectividad del poro</i> .....	27
<i>Regulación</i> .....	29
<b>Objetivos</b> .....	32
METODOLOGÍA.....	33
<i>Análisis Filogenético</i> .....	34
<i>Elección de Arabidopsis thaliana como sistema de estudio</i> .....	34
<i>Material vegetal</i> .....	34
<i>Recolección de polen de Arabidopsis</i> .....	35
<i>Extracción de ARN</i> .....	35
<i>RT-PCR</i> .....	35
<i>Clonado de las acuaporinas de polen maduro de Arabidopsis</i> .....	36
<i>Subclonado y expresión de las acuaporinas de polen en ovocitos</i> .....	37
<i>Transcripción in vitro</i> .....	37
<i>Mutagénesis dirigida</i> .....	38

<i>Expresión de acuaporinas de polen en ovocitos de Xenopus laevis</i> .....	38
<i>Preparación de Xenopus para la extracción de ovocitos</i> .....	38
<i>Obtención de los ovocitos</i> .....	39
<i>Inyección de ARNc en ovocitos</i> .....	39
<i>Estudios funcionales de permeabilidad al agua de ovocitos inyectados con acuaporinas de polen</i> .....	40
<i>Estudios de cambio de volumen</i> .....	40
<i>Estudios funcionales de permeabilidad a solutos de ovocitos inyectados con acuaporinas de polen</i> .....	41
<i>Estudios de regulación de la permeabilidad al agua de ovocitos que expresan acuaporinas de polen</i> .....	41
<i>Construcciones de vectores binarios</i> .....	42
<i>Bombardeo de polen de tabaco</i> .....	44
<i>Transformación de Arabidopsis mediante Agrobacterium tumefaciens</i> .....	44
<i>Selección de semillas transgénicas</i> .....	45
<i>Germinación de polen de Arabidopsis</i> .....	45
<i>Mediciones de longitud de tubo polínico</i> .....	46
<i>Genotipificación de plantas mutantes de inserción</i> .....	46
<i>RT-PCR en tiempo real</i> .....	47
<i>Tinciones</i> .....	47
<i>Mitotracker</i> .....	47
<i>FM4-64</i> .....	48
<i>DAPI</i> .....	48
<i>Microscopia</i> .....	48
<i>Microscopia Confocal</i> .....	48
<i>Deconvolución de mitocondrias</i> .....	48
<i>Análisis estadístico</i> .....	48
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>50</b>
<i>Análisis filogenético de las acuaporinas de plantas</i> .....	51
<i>Acuaporinas en polen maduro de Arabidopsis</i> .....	52
<i>Análisis transcripcional de las acuaporinas de polen</i> .....	55
<i>Clonado de las acuaporinas de polen</i> .....	59
<i>Evaluación de la actividad de transporte de agua de las acuaporinas de polen</i> .....	60

<i>Evaluación de la actividad de transporte de solutos de las acuaporinas de polen.</i>	<i>61</i>
<i>Estudio de la regulación de las acuaporinas de polen.....</i>	<i>66</i>
<i>Localización subcelular de las acuaporinas de polen.....</i>	<i>69</i>
<i>Predicción bioinformática de la localización subcelular de las acuaporinas de polen.....</i>	<i>70</i>
<i>Localización subcelular in situ de las acuaporinas de polen.....</i>	<i>74</i>
<i>Obtención de plantas homocigotas mutantes simples de acuaporinas de polen.</i>	<i>81</i>
<i>Caracterización funcional in vitro de las acuaporinas de polen.....</i>	<i>84</i>
<i>Caracterización fisiológica de las acuaporinas de polen in planta.....</i>	<i>89</i>
<i>Rol de AtTIP5;1 en el metabolismo del nitrógeno en polen de Arabidopsis.....</i>	<i>90</i>
<b>DISCUSION.....</b>	<b>96</b>
<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>110</b>

# Introducción

---

## Introducción

### El polen en la reproducción sexual

La reproducción sexual es un proceso vital para el éxito de las plantas con flor, ya que no sólo asegura el mantenimiento de las especies, sino que además incrementa la diversidad genética y confiere de esta forma el potencial de adaptarse a diferentes ambientes. En todos los organismos que se reproducen sexualmente, para que la reproducción ocurra, deben encontrarse las gametas masculinas con las femeninas. En el caso de las plantas se distinguen dos fases en este proceso: la polinización y la fecundación. La polinización comprende el paso del polen o gametofito masculino desde el aparato reproductor masculino al aparato femenino de las plantas. Este proceso puede efectuarse de tres maneras distintas: como ocurre en general en plantas con flores vistosas, algunos insectos o aves ofician de agentes polinizadores; también puede ser el viento el encargado de realizar el transporte o de forma autopolinizante, si el polen de los estambres cae sobre los estigmas de la misma planta. La fecundación por su parte se inicia cuando el grano de polen se posa sobre la superficie del estigma y concluye cuando el núcleo de una de las gametas presentes en el polen se fusiona con el de la ovocélula femenina, mientras el núcleo de la otra gameta se fusiona con los dos núcleos de la célula central. Como producto de esta doble fecundación característica de las plantas con flor, se genera el cigoto ( $2n$ ) y el endosperma ( $3n$ ), respectivamente (Figura 1) (Boavida *et al.*, 2005 a y b).

La fecundación en las plantas con flor es un mecanismo que requiere gran coordinación entre los diferentes tejidos involucrados para guiar hacia los óvulos a las células espermáticas; el polen juega un papel vital en la fertilidad de la planta a través de la generación y traslado de las gametas masculinas hasta el saco embrionario. Además de su importancia intrínseca en la reproducción sexual, el linaje celular simple y el desarrollo altamente orquestado del gametofito masculino representa también un microcosmos de desarrollo celular (Borg *et al.*, 2009) (Figura 1).

El modelo de estudio elegido en esta tesis es *Arabidopsis thaliana*, planta pequeña, sin valor agronómico, pero seleccionada como organismo modelo para los estudios de biología molecular, fisiología y genética de plantas debido a importantes ventajas operativas, enumeradas en metodología, que presenta para la investigación básica.

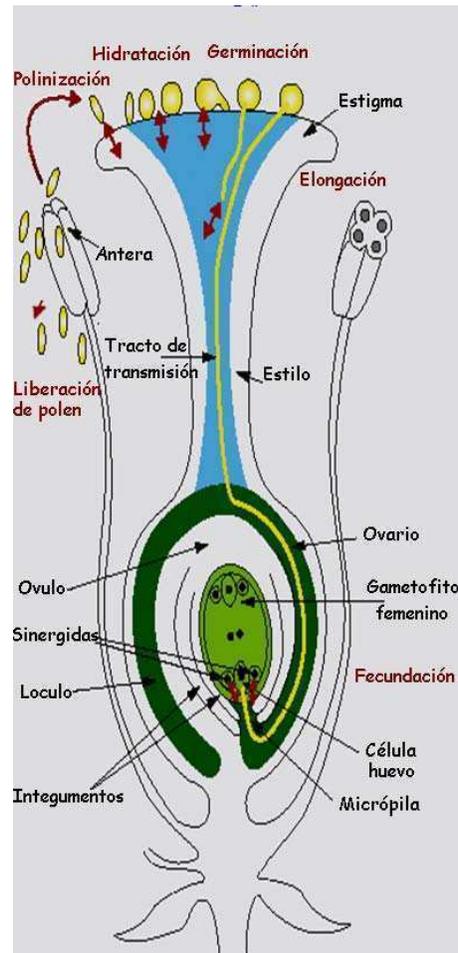


Figura 1: Esquema de la reproducción una planta con flor.

En color borgoña se representan los procesos involucrados en la polinización y fecundación.

En color negro se detallan los tejidos pertenecientes a los órganos sexuales.

### Desarrollo del grano de polen (Microesporogénesis y Microgametogénesis)

En las plantas a diferencia de los animales, el desarrollo de los tejidos reproductivos comienza con una diferenciación eventual del tejido meristemático dando lugar a los órganos reproductivos que contienen células esporogénicas diploides. En la Figura 2 se muestran de modo esquemático los principales eventos que conforman el desarrollo del polen, basado en la ultraestructura de la microesporogénesis de *Arabidopsis thaliana* (ultraestructura de Owen y Makaroff, 1995, esquematizado en McCormick, 2004). En la antera las células madre de la microespora se encapsulan en calosa, aislándose de esta forma de las células esporofíticas. En este momento las células madre entran concertadamente en meiosis para dar lugar a tétradas de microesporas haploides, cada una encapsulada en una pared de calosa. Las microesporas se liberan de la tétrada

por acción de la calasa, una enzima que se produce en el tapete y digiere la calosa envolvente. Las microesporas ya libres se alargan y el citoplasma adopta una distribución polar que desencadena una mitosis asimétrica que da como productos una célula de mayor tamaño (célula vegetativa) y otra más pequeña (célula generativa). Juntas, ambas células, componen el polen bicelular. La célula vegetativa no sufre más divisiones y da lugar al tubo polínico. La célula generativa pequeña, que se encuentra embebida dentro del citoplasma de la mayor, participa del segundo ciclo mitótico, simétrico en este caso, en el que se producen dos células espermáticas idénticas encargadas de la doble fecundación. El momento en el que ocurre la segunda mitosis varía según la planta, en las Crucíferas y los pastos ocurre dentro de las anteras, pero lo más frecuente es que suceda durante la elongación del tubo polínico (McCormick, 2004). Los pasos finales de la maduración del polen coinciden con la antesis y la dehiscencia de las anteras, finalizando con la liberación de los granos de polen deshidratados.

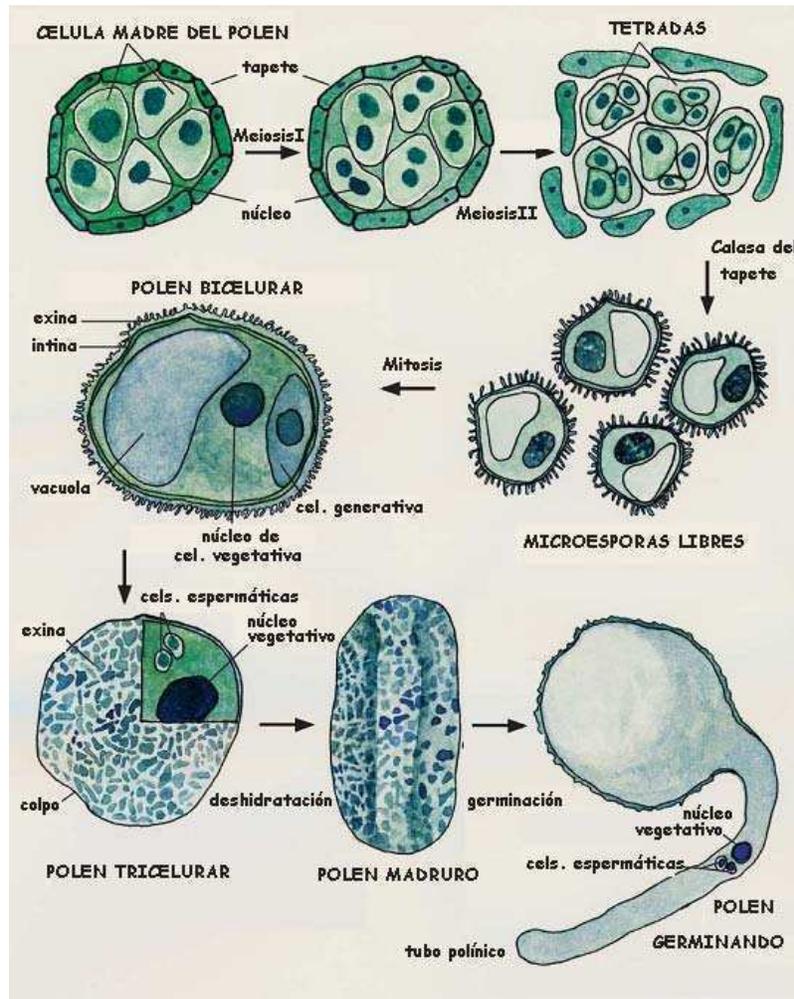


Figura 2: Esquema de microesporogénesis de Arabidopsis, tomado de McCormick, 2004.

### **Polen y flujo de agua**

El grano de polen maduro tiene una pared celular doble con una capa interna pectocelulósica (intina) y una externa (exina) compuesta por un polímero altamente resistente llamado esporopolenina. La estructura esculpida típica de la exina alberga en su interior lípidos y proteínas fundamentales para las interacciones con las células del estigma. La mayoría de los granos de polen maduros son metabólicamente quiescentes y se encuentran deshidratados con un contenido de agua que fluctúa entre un 15 y 30 % (Heslop-Harrison, 1979). En estigmas húmedos como los de la familia de las Solanáceas, el agua fluye espontáneamente hacia el grano de polen que se ha posado sobre su superficie. Este movimiento de agua se debe a la liberación de un exudado por parte de los estigmas húmedos en las épocas reproductivas. En estigmas secos en cambio, como es el caso de *Arabidopsis thaliana*, el proceso de adhesión e hidratación se establece como producto de un diálogo entre el grano de polen y las células glandulares estigmáticas, especializadas en la recepción de los granos de polen. En este caso no se liberan secreciones líquidas o exudados, sino que producen proteínas o ceras. Si el reconocimiento es de aceptación (interacciones compatibles) entonces se produce una interface rica en lípidos entre las dos estructuras celulares que promueve el flujo de agua (Elleman *et. al.*, 1986).

El agua, los nutrientes y las moléculas pequeñas son transportadas rápidamente desde el exudado del estigma (en estigmas húmedos) o desde las glándulas del estigma (en estigmas secos) hacia el polen. El descubrimiento de acuaporinas expresadas en estigmas, impulsó un modelo que involucra a las acuaporinas en el rápido y controlado transporte de agua desde el estigma al polen (Dixit *et. al.*, 2001). Independientemente del mecanismo, aún desconocido, hay que destacar que la hidratación del polen está controlada en forma espacial y temporal. Se han descrito casos en los que la hidratación inadecuada lleva a consecuencias desastrosas como germinación temprana o en tejidos no reproductivos, que por supuesto no alcanzan la fecundación (Lolle *et. al.*, 1998; Johnson y McCormick, 2001). Esto sugiere fuertemente que la entrada de agua al polen es un evento regulado por el grano de polen y no depende solamente de diferencias de osmolaridad.

En las plantas de estigmas secos, la regulación de la hidratación del polen genera una barrera eficiente y temprana para la incompatibilidad ya sea intraespecífica o interespecífica (Sarker *et. al.*, 1988). En interacciones compatibles la secuencia de eventos que suceden comienza con la hidratación que transforma al grano de polen en una célula altamente polarizada. Los cambios ocurren unos minutos después de la hidratación e incluyen: la formación de estructuras filamentosas alrededor del núcleo, la polarización del citoesqueleto de actina (Tiwari y Polito, 1990), la reorientación del núcleo vegetativo de forma tal que ingresa en el tubo polínico antes que las células

espermáticas (Heslop-Harrison y Heslop-Harrison, 1989), el ensamblado de mitocondrias y de partículas de polisacáridos en el *tip* (punta del tubo polínico) que es la zona donde se elongará el tubo (Mazina *et al.*, 2002); también se produce la selección de membrana plasmática de polen para la fusión *target* de vesículas secretorias y deposición de calosa en el sitio de emergencia del tubo (Johnson y McCormick, 2001). Una vez que se establece la polaridad interna del polen, relativa a una señal externa, el tubo polínico emerge del grano. En el caso de *Arabidopsis*, cuyo polen tiene tres colpos o aperturas, el tubo germina por una de ellas y queda en contacto con el estigma. Seguidamente, el grano debe reorganizar su citoplasma y citoesqueleto para que se pueda llevar a cabo la elongación del tubo polínico (revisado en Edlund *et al.*, 2004). El tubo emergente invade y penetra la pared celular de las células del estigma y crece hacia el estilo que, en el caso de *Arabidopsis* es una masa sólida de células. Luego de crecer a lo largo de los diferentes tejidos del pistilo, el tubo polínico entra al saco embrionario y allí descarga sus dos células espermáticas dando lugar a la doble fertilización típica de Angiospermas.

### **Crecimiento del tubo polínico**

El proceso de elongación del tubo polínico es rápido y altamente polarizado. Tradicionalmente se asocia al crecimiento limitado a la zona apical o del *tip* (Parton *et al.*, 2001). Sin embargo los últimos trabajos proponen que el crecimiento es en la zona subapical (revisado en Zonia y Munnik, 2009). El tubo polínico posee un mecanismo de determinación de la orientación dependiente de ciertas guías proporcionadas por los tejidos reproductivos femeninos, crucial para la reproducción sexual de la plantas. Actualmente se han descrito detalladamente varios aspectos característicos de este crecimiento, sin embargo el creciente esfuerzo depositado en dilucidar los mecanismos involucrados en este proceso llevaron también a constantes debates y controversias sobre los modelos que describen la elongación del tubo.

Para comprender el crecimiento del tubo en forma global existen varios aspectos importantes a tener en cuenta :

#### i- *gradiente y flujo de iones*

Se considera que los iones más importantes tanto para la elongación como para que los tubos polínicos alcancen los óvulos, son el calcio y los protones (Holdaway-Clarke *et al.*, 2003; Hepler *et al.*, 2006). Los otros dos iones que también recibieron atención son el cloro y el potasio (Holdaway-Clarke *et al.*, 2003; Campanoni y Blatt, 2007). La entrada de todos los iones al tubo polínico en crecimiento ocurre en la región apical. Dicha entrada es oscilante en todos los casos y genera un gradiente intracelular del ión a lo largo del tubo polínico. La entrada de calcio por el *tip* (punta del tubo polínico) genera un gradiente intracelular con alta

concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en la zona apical (de hasta 10  $\mu\text{M}$ ) y un decrecimiento de dicha concentración hacia la base del tubo (de alrededor de 200 nM) (Shang *et al.*, 2005; Cheung y Wu, 2007). La entrada de protones también ocurre en el ápice del tubo polínico. Sin embargo, a diferencia de lo observado para los iones de calcio, los protones muestran un flujo de salida marcada en los laterales del tubo en la zona subapical generando una región donde el pH puede ser de alrededor de 1 unidad mayor que en el extremo apical (banda alcalina) (Feijó *et al.*, 2001).

Tanto los gradientes de iones intracelulares como los flujos extracelulares, con excepción del eflujo extracelular de  $\text{Cl}^-$ , presentan oscilaciones similares a la del crecimiento del tubo pero fuera de fase (Messerli *et al.*, 2000; Feijó *et al.*, 2001; revisado en Holdaway-Clarke y Hepler 2003) (Figura 3).

#### ii- tráfico vesicular

El aparato de Golgi produce vesículas que contienen precursores de la pared celular, y siguiendo el flujo de corriente citoplasmática, estas vesículas viajan por el tubo hasta alcanzar el ápice donde se fusionan con la membrana plasmática y secretan sus contenidos a la pared celular (Lisboa *et al.*, 2003). Otra característica sobresaliente y esencial para el proceso de crecimiento del tubo es el movimiento de las organelas. Las organelas se desplazan a lo largo de los filamentos de actina por interacciones dinámicas con proteínas motoras. Este desplazamiento permite la distribución adecuada de las distintas organelas y la acumulación de vesículas secretoras en el ápice del tubo posibilitando el crecimiento del mismo (Cai y Cresti, 2008).

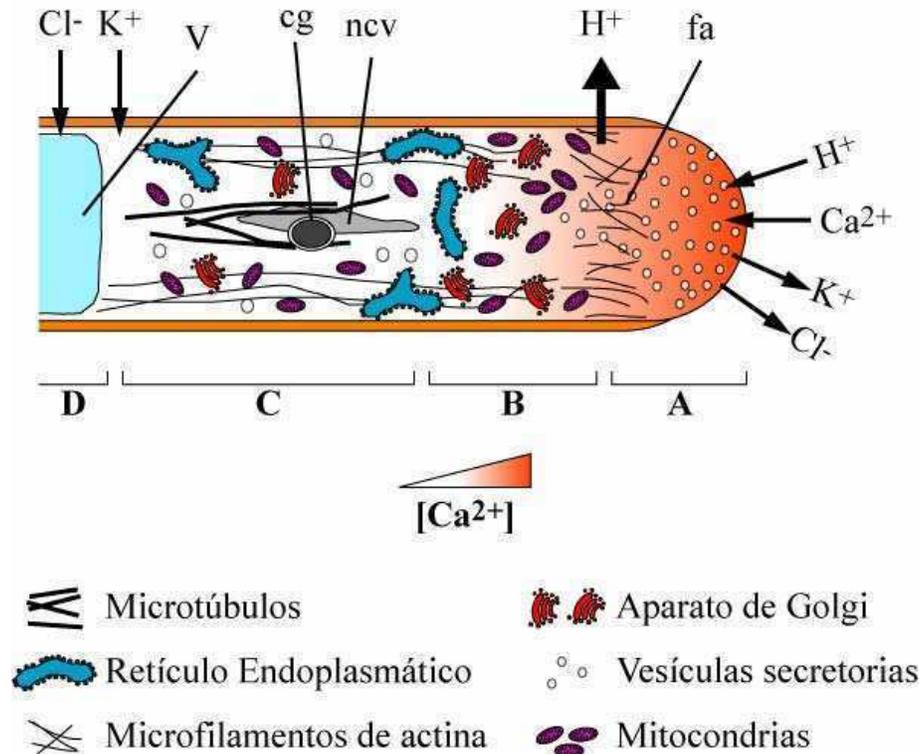
#### iii- presión hidrostática (o flujo hidrodinámico)

Recientes experimentos de estudios de regulación de volumen llevados a cabo con microscopía de fuerza atómica, permitieron postular la presión hidrostática generada en el tubo germinado como explicación del cambio entre el crecimiento estocástico que presenta el tubo hasta que alcanza un determinado largo y el crecimiento oscilatorio siguiente (Zonia y Munnik, 2009).

#### iv- señalización

La señalización mediada por fosfolípidos e inositol fosfato participa en numerosos procesos involucrados en la elongación del tubo incluyendo la regulación del citoesqueleto, el tráfico vesicular y la homeostasis de  $\text{Ca}^{2+}$  (Monteiro *et al.*, 2005 a y b; Malho *et al.*, 2006; Krichevsky *et al.*, 2007). La señalización que involucra los receptores quinasa asociado a membrana y activación de cascadas de señalización (Muschiatti *et al.*, 1998; Wengier *et al.*, 2003). Finalmente, la señalización mediada por pequeñas proteínas G involucradas en la regulación del

tráfico de vesículas y regulación de los microfilamentos de actina ambos procesos fundamentales en la elongación (Krichevsky *et al.*, 2007).



**Figura 3: Esquema de Tubo Polínico en crecimiento.** A, zona clara apical; B, zona subapical; C, zona nuclear; D, zona vacuolar; cg, célula generativa; fa, franja de actina; ncv, núcleo de la célula vegetativa; V, vacuola. Tomado de Tesis doctoral de D. Wengier

Todos estos factores mencionados actúan en forma coordinada permitiendo la elongación del tubo polínico. Como operan en forma de red, la perturbación de cualquiera de sus componentes altera el funcionamiento general y deriva en una importante reducción en la fertilidad y/o aberración fenotípica (Ren *et al.*, 2007; Malho *et al.*, 2006; Cheung *et al.*, 2004; Myers *et al.*, 2009). Para analizar la esterilidad o fertilidad de una planta se utilizan parámetros de mediciones tanto *in vivo* como *in vitro*. Como ejemplos de ensayos *in vivo* encontramos la segregación de un determinado alelo y el número de descendientes. Como estimadores *in vitro* se destacan la capacidad de germinar y el largo alcanzado por el tubo polínico en medios de crecimiento, las tinciones y observación de fenotipo. En los trabajos reportados por Johnson-Brousseau y McCormick, 2004; Boavida y McCormick, 2007; Boavida y colaboradores 2009, se describen distintas estrategias experimentales

para evaluar funcionalmente la fertilidad del gametofito masculino en *Arabidopsis*. Estos experimentos fueron tomados de modelo para caracterizar las plantas mutantes en esta tesis.

### **El entendimiento del desarrollo del polen con los recursos actuales**

En la última década, se alcanzaron progresos significativos en cuanto al entendimiento del desarrollo del gametofito masculino a nivel molecular. Estos logros fueron posibles por el impetuoso avance tecnológico de la genética y genómica. El ejemplo más destacado fue posiblemente “The *Arabidopsis* Genome Initiative, 2000”; este desarrollo proveyó cuantiosa información no solo por la secuenciación del genoma *Arabidopsis thaliana* en forma completa, sino también por la base de datos pública asociada de mutantes de inserción (Alonso *et al.*, 2003). Al mismo tiempo, el apogeo de las estrategias de genética reversa y directa con las mutantes de *Arabidopsis* tuvo un impacto positivo en el conocimiento de la funcionalidad e interacción de los genes y particularmente posibilitó la identificación de varios mutantes gametofíticos (revisados en Borg *et al.*, 2009).

Otro hito de alta envergadura sobre dicho avance es el conjunto de datos adquiridos a partir de ensayos de transcriptomas comprensivos de *Arabidopsis* (Zimmermann *et al.*, 2004). Los primeros datos adquiridos sobre el transcriptoma de polen utilizando microarreglos que contienen el 80% de los genes de *Arabidopsis* (Affymetrix 23K *Arabidopsis* ATH1 *array*) se obtuvieron entre los años 2004 y 2005 (Pina, *et al.*, 2005). Entre estos se destacan los microarreglos comparativos de cuatro estadios de desarrollo del polen: microesporas uninucleadas, polen binucleado, polen trinucleado y polen maduro (Hony y Twell, 2004; Bock *et al.*, 2006). Recientemente aportaron nueva y valiosa información los microarreglos que comparan polen maduro con polen germinado (Wang *et al.*, 2008) así como el transcriptoma de células espermáticas aisladas (Borges *et al.*, 2008).

Actualmente se dispone de herramientas que favorecen notablemente el trabajo bioinformático. No solo permiten las comparaciones de muchos *sets* de datos, sino que además permiten una visualización de la información en forma muy simple y gráfica. Utilizando estas herramientas y con la cuantiosa información pública sobre tejidos esporofíticos, se estudió la superposición de transcriptomas gametofito masculino-tejidos esporofíticos. El porcentaje estimado de genes específicos de polen resultó ser de un 5% del total de los genes expresados en *Arabidopsis* (Twell, 2006). Este porcentaje de genes específicos de polen varía dependiendo de los criterios e información utilizada para su estimación, sin embargo es en todos los casos estimado mayor que para los tejidos esporofíticos analizados (Ma, 2005). El alto número de genes específicos que se encuentra en el polen, refleja la especificidad funcional del gametofito masculino. Consistente con

esto, los genes específicos de polen se caracterizan por presentar también valores de expresión elevados.

Como se mencionó antes el desarrollo del polen se divide usualmente en dos fases, una fase temprana que comprende la microspora y el polen bicelular, y una fase tardía que incluye al polen tricelular y maduro. Estas fases también se diferencian claramente en sus perfiles transcripcionales. En la primera fase de la gametogénesis se expresan casi el doble de genes que en la segunda (Hony y Twell, 2004). La reducción de la complejidad y el cambio a la fase tardía está acompañado por un incremento en los genes involucrados en el metabolismo de la pared celular, citoesqueleto y señalización celular, importantes para la madurez del polen, germinación y elongación del tubo polínico (Twell, 2006; Borg *et al.*, 2009). Es por esto que suele afirmarse que el desarrollo del grano de polen está caracterizado por una represión génica a gran escala asociada. Dicha represión se vincula directamente con una activación selectiva de nuevos grupos de genes, que seguramente, se encuentran involucrados en los pasos finales de maduración y en interacciones con los tejidos femeninos del pistilo durante los eventos de polinización.

Lo arriba expuesto nos lleva a señalar que genes cuya expresión en polen maduro (MPG) sea alta y además específica, adquieren una importancia relevante para el estudio de los eventos posteriores a la maduración del grano de polen. Las interacciones célula-célula que el grano de polen establece en su corta vida son limitadas y definidas, una gran ventaja cuando se lo compara con otros tejidos de la misma planta. Así el polen durante su desarrollo interactúa con el tapete (tejido esporofítico) y en la fecundación con tejidos del órgano reproductivo femenino (pistilo y óvulo). Un entendimiento sobre la regulación de la hidratación del grano de polen, como control de la fecundación, requiere un estudio molecular, genético y funcional de los componentes de la superficie del grano de polen y del estigma.

## **Acuaporinas**

El movimiento del agua a través de las membranas celulares generó durante mucho tiempo grandes controversias (Boyer *et al.*, 1985). Desde los años '50 existen evidencias experimentales que sugieren la existencia de poros transportadores de agua (Paganelli y Solomon, 1957). Sin embargo el concepto de canal de agua capaz de proveer un mecanismo molecular que explique la permeabilidad al agua extremadamente alta de ciertas membranas, no se popularizó hasta el descubrimiento de la primera acuaporina (Agre, 1994. Lectura de Premio Nobel).

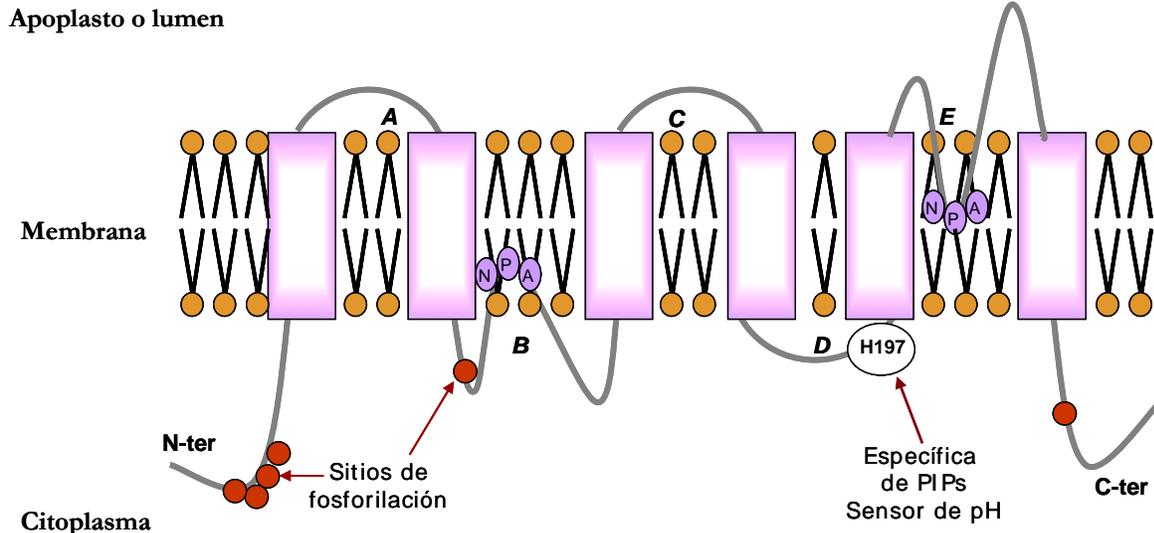
En 1992, un grupo de investigadores dirigido por Peter Agre identificó y caracterizó una proteína capaz de transportar agua en los glóbulos rojos: CHIP28 (ahora renombrada AQP1) (Preston *et al.*,

1992). Este descubrimiento resultó un punto de inflexión para los estudios de transporte de agua en la fisiología. Las investigaciones obtenidas en los años siguientes desafiaron a los fisiólogos vegetales con la detección de varias proteínas que se nombraron como homólogas a AQP1, cambiando definitivamente el concepto del papel de las membranas en el flujo de agua de las plantas. La primera acuaporina de plantas clonada y caracterizada funcionalmente fue  $\gamma$ -TIP (ahora *AtTIP1;1*) (Maurel *et al.*, 1993).

Las acuaporinas, al facilitar el flujo activo de agua, proporcionan una base molecular sólida para la regulación del transporte de agua a través de las membranas y de esta forma establecen conexiones fascinantes entre dicho transporte, el desarrollo de las plantas y sus respuestas adaptativas a las condiciones ambientales.

### **Estructura**

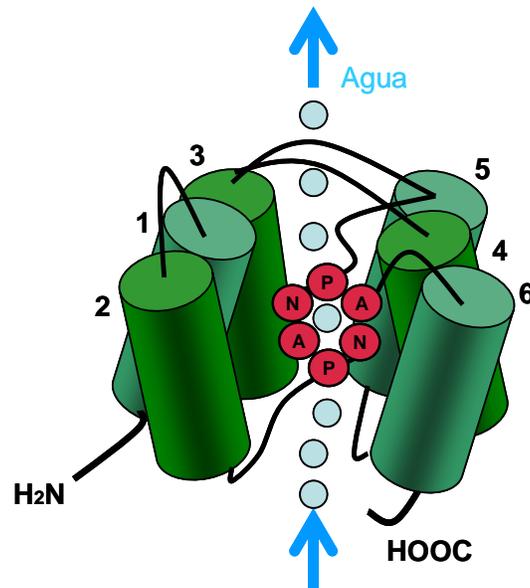
Las acuaporinas son proteínas altamente hidrofóbicas con un peso molecular que oscila entre los 23 y 31 kDa. Todos los miembros de esta familia presentan seis pasos transmembrana, conectados por cinco *loops* (identificados como *loop* A hasta E). Los extremos N- y C- terminal y los *loops* B y D presentan localización citoplasmática, mientras que los *loops* A, C y E se encuentran en el apoplasto en el caso de acuaporinas de membrana plasmática o en el interior de la organela o estructura citoplasmática cuando las acuaporinas en cuestión son de endomembranas (Figura 4). Los *loops* B (citoplasmático) y E (extracitoplasmático) contienen un motivo aminoacídico distintivo y altamente conservado en la familia de las acuaporinas: NPA (Asn-Pro-Ala), que se embeben en la membrana y darán origen al primer filtro de selectividad. Otra característica estructural definitoria de las acuaporinas es que se dividen en dos mitades muy similares orientadas en dirección opuesta en la membrana. El origen de esta simetría podría haber surgido de una duplicación interna de un gen ancestral anterior a la diversificación de la familia (Raizer *et al.*, 1993; Zardoya y Villalba, 2001).



**Figura 4:** Representación esquemática de la estructura de una acuaporina tipo. Los rectángulos representan los 6 pasos transmembrana conectados por los 5 loops (A-E). Los motivos conservados NPA se muestran como óvalos lilas y se marcan sitios representativos de regulación: el residuo histidina propuesto como sensor de pH en PIPs y posibles sitios de fosforilación (círculos colorados).

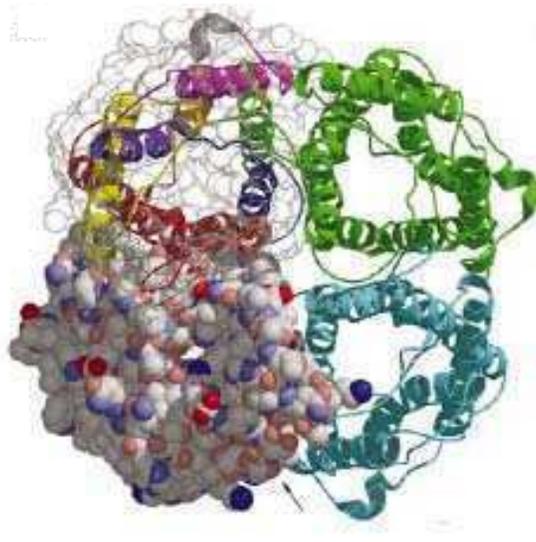
La acuaporinas se pueden dividir en dos grandes grupos funcionales: las acuaporinas específicas de agua u ortodoxas; y las gliceroporinas o acuagliceroporinas, que son capaces de transportar solutos (Agre *et al.*, 2002). De ambos grupos se dispone de un arquetipo con estructura conocida a nivel atómico obtenida por cristalografía de rayos-x, acuaporina1 (AQP1) de mamíferos perteneciente a las acuaporinas ortodoxas y la gliceroporina GlpF de *Escherichia coli* (Fu *et al.*, 2000; Sui *et al.*, 2001). Las estructuras develaron que tanto el plegamiento como la topología de ambas proteínas son marcadamente similares; esta observación se confirmó con las estructuras atómicas obtenidas posteriormente para otras acuaporinas (Fujiyoshi *et. al.*, 2002; Hedfalk *et. al.*, 2006). Las estructuras cristalográficas, junto con la información provista por los datos de dinámica molecular, han permitido especular acerca del funcionamiento y la selectividad de los canales de agua. Se propusieron dos características estructurales conservadas que actuarían como filtros de especificidad/selectividad. Una constricción central formada por los dos motivos conservados NPA (Figura 5) y una segunda barrera, más angosta, llamada constricción aromático/arginina (ar/R). La constricción central se forma cuando los loops que contienen ambos dominios NPA quedan embebidos por ambos lados de la membrana hasta quedar muy cercanos, formando el llamado séptimo dominio transmembrana (Figura 5). Este, en conjunto con los otros dominios transmembrana, contribuye a la formación del poro propiamente dicho. La segunda barrera se encuentra definida en AQP1 por cuatro residuos: Phe-56, His-180, Cys-189 y Arg-195 (H2, H5,

LE1 y LE2 respectivamente) (Fu *et al.*, 2000; Sui *et al.*, 2001; Thomas *et al.*, 2002). La barrera ar/R se relaciona generalmente con la selectividad del poro y se detallará más adelante.



**Figura 5: Esquema en 3-D de la orientación de una AQP modelo en la membrana. El monómero se pliega de tal modo que los motivos NPA se embeben en la membrana y junto con los 6 pasos transmembrana conforman el poro. Las moléculas de agua (círculos celestes) se ordenan en fila dentro del poro.**

Las acuaporinas se ensamblan como tetrámeros donde cada uno de los monómeros funciona como poro independiente. Este arreglo fue observado por primera vez en plantas a través de la microscopía crio-electrónica de cristales bidimensionales de  $\alpha$ -TIP de arveja (*PvTIP3;1*) (Daniels *et al.*, 1999) y *SoPIP2;1* de espinaca (Fotiadis *et al.*, 2001; Kukulski *et al.*, 2005). Recientemente fue observado por cristalografías de rayos X obtenidas a partir de cristales tridimensionales de *SoPIP2;1* (Figura 6) (Tornroth-Horsefield *et al.*, 2006). Las unidades tetraméricas pueden formarse como homotetrámeros o heterotetrámeros. Para los casos de AQP1 y GlpF la unidad funcional es un homotetrámero (Verkman y Mitra, 2000). Por el contrario, en plantas, hay evidencias experimentales que sugieren la existencia de heterotetramerización de acuaporinas. En experimentos de *cross-linking*, se han detectado heterooligómeros de dos TIPs de lenteja como estructuras básicas de membrana (Harvengt *et al.*, 2000) y también se ha demostrado que las isoformas PIP1 y PIP2 de maíz pueden interactuar físicamente, y de esta manera aumentar en forma sinérgica el transporte de agua (Fetter *et al.*, 2004).



**Figura 6: Estructura molecular de SoPIP2;1. Se muestra el rearreglo conservado de las acuaporinas como tetrámeros.**

Tomado de Tornroth-Horsefield *et al.*, 2006

### **Clasificación**

A diferencia de lo observado en mamíferos, los genomas de plantas muestran un gran número de acuaporinas. En los genomas de *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa* y *Zea mays* han sido detectados 35, 33 y 36 *loci*, respectivamente, que codifican para acuaporinas; mientras que solo 13 acuaporinas han sido identificadas en mamíferos.

Las acuaporinas vegetales se conocen como MIPs (*proteínas intrínsecas de membrana*) y han sido clasificadas, en cuatro subfamilias: PIPs (*proteínas intrínsecas de membrana plasmática*), con 13 miembros, TIPs (*proteínas intrínsecas de tonoplasto*), con 10 miembros, NIPs (*proteínas intrínsecas similares a Nod26*), con 9 miembros y SIPs, un pequeño grupo de proteínas pequeñas y básicas con solo 3 miembros (Figura 7). Esta clasificación, que es la aceptada, fue realizada en base al análisis de identidad de secuencia y la localización celular de los primeros miembros caracterizados de cada grupo que dieron origen a la nomenclatura (Johansson *et al.*, 2001; Quigley *et al.*, 2001; Sakurai *et al.*, 2005). Incluso, en algunos trabajos se han establecido relaciones evolutivas a partir de la “homología de secuencias” (Pao *et al.*, 1991, Reizer *et al.*, 1993, Froger *et al.*, 1998). Sin embargo, como explicara Zardoya en sus publicaciones, los criterios utilizados no son válidos para establecer relaciones filogenéticas (Zardoya y Villalba, 2001); por dicha razón

estas relaciones no deben considerarse correctas o por lo menos deben ser tomadas como controversiales. Tanto la clasificación como la nomenclatura serán analizadas en detalle en los resultados y discusión de esta tesis.

Cabe mencionar que si bien por identidad de secuencia se propone una localización determinada para las MIPs, es menester realizar ensayos de laboratorio para confirmarlo, como por ejemplo inmunolocalizaciones o fusiones a GFP. De la misma forma, para asegurar la actividad de un miembro de la familia es requisito evaluar empíricamente su capacidad como transportador ya sea de agua o solutos. En el caso de medición de actividad, el ensayo más utilizado es la expresión de la acuaporina en estudio en ovocitos de *Xenopus laevis* midiendo el cambio de volumen; estos experimentos se explican en detalle en la sección de materiales y métodos.

#### Subfamilia PIP

La subfamilia PIP recibe su nombre debido a la presunta localización de sus miembros en la membrana plasmática de las células vegetales. Hasta el momento la subfamilia más estudiada. La literatura separa a esta subfamilia en dos subclases, llamadas comúnmente isoformas PIP2 y PIP1. Tradicionalmente se asoció a PIP2 con valores de permeabilidad altos cuando son sobreexpresados en las membranas de ovocitos de *Xenopus* (Daniels *et al.*, 1994; Maurel *et al.*, 2008); por otro, lado los miembros de PIP1 eran considerados transportadores pobres o nulos en las mismas condiciones experimentales. Sin embargo, estas consideraciones cambiaron sustancialmente con los hallazgos recientes del grupo del Dr. Chaumont que demostraron que la isoforma PIP1 de maíz se localiza principalmente en el retículo endoplásmico y se relocaliza a membrana plasmática cuando se coexpresan las isoformas PIP1 y PIP2 (Zelazny *et al.*, 2007). Estos trabajos cuestionan las observaciones previas en donde se reportaba baja permeabilidad de los ovocitos expresando PIP1 y se atribuía la baja permeabilidad al agua a las características del canal y no a su localización (Fetter *et al.*, 2004; Temmei *et al.*, 2005).

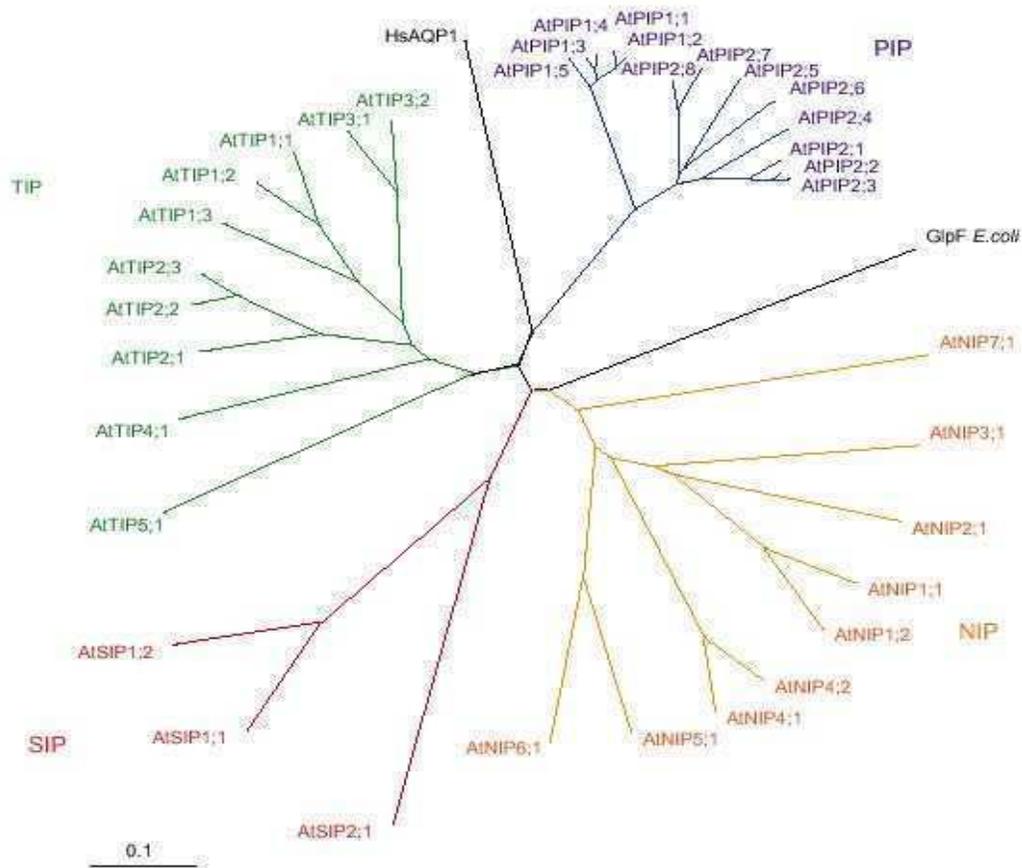


Figura 7: Árbol construido utilizando el programa Clusta-X/TreeView programs. Muestra la relación establecida para las 35 putativas acuaporinas de Arabidopsis. Se incluyeron como *outgroups* HsAQP1 (AQP1 humana) y *E. coli* GLP-F (facilitador de glicerol). El largo de cada rama es proporcional a la divergencia de secuencia de esa proteína con respecto a los otros miembros de la familia. La escala de distancia representa la distancia evolutiva, expresada como número de sustituciones por aa. Tomado de Quigley, F., *et al.*, 2002.

### Subfamilia TIP

En la subfamilia TIP se han identificado cinco subclases de proteínas, TIP1-TIP5 (Quigley *et al.*, 2001). Las distintas isoformas fueron relacionadas con localización en distintos subtipos de vacuolas. Por ejemplo, se determinó que la expresión de TIP1 se corresponde con vacuolas líticas mientras que la expresión de TIP2 está asociada con vacuolas vegetativas que almacenan proteínas y la subclase TIP3 suele estar asociada a vacuolas autofágicas (Moriyasu *et al.*, 2003). Una característica sobresaliente de la localización de estas proteínas es que las TIP3 junto con las TIP2 se encuentran por lo general en vacuolas que almacenan proteínas de semillas (Jauh *et al.*, 1999). Es

posible que esta distribución de las proteínas TIPs en vacuolas diferentes indique una participación activa de estas acuaporinas en la especialización de los subtipos vacuolares. Por su parte, la localización de los subtipos TIP4 y TIP5 aún no se ha determinado.

#### Subfamilia NIP

El primer miembro de la subfamilia NIP identificado fue NOD26 (Weaver *et al.*, 1994), una proteína expresada en la membrana peribacteroidal de los nódulos de raíces de soja. La localización subcelular de las proteínas homólogas que se han detectado sigue aún siendo incierta. Los análisis de secuencia hechos sobre el genoma de *Arabidopsis* indican que los miembros de la familia NIP tienen mayor identidad de secuencia con el transportador de glicerol de *E. coli* -GlpF-, que con las TIPs o PIPs (Quigley *et al.*, 2001).

#### Subfamilia SIP

El último grupo corresponde a la familia SIP. Este grupo de proteínas es el más diverso. Las SIPs presentan el N-terminal más corto de la familia y sustituciones en el *loop* B, siendo NPT o NPL las secuencias encontradas en lugar del característico motivo NPA presente en todas las acuaporinas. Los trabajos de expresión heteróloga en levaduras muestran que SIP1;1 y SIP1;2 pero no SIP2;1 son transportadores de agua y que los tres miembros de esta subfamilia se localizan en retículo endoplásmico (Ishikawa *et al.*, 2005; Maeshima *et al.*, 2008).

#### Selectividad del poro

Las acuaporinas fueron identificadas originalmente como proteínas eficientes en el transporte de agua. También comparten la particularidad de ser estrictamente restrictivas para los iones y totalmente impermeable a los protones. Sin embargo, varios miembros de esta gran familia pueden transportar pequeñas moléculas sin carga en lugar de o además de agua.

La resolución a nivel atómico que mostró la manera que las acuaporinas transportan agua y/o solutos, derivó de los estudios estructurales de los arquetipos mencionados previamente, AQP1 (acuaporina ortodoxa) y GlpF (acuagliceroporina). Inicialmente se asumió, como uno de los principales factores determinantes de la selectividad de las acuaporinas, la exclusión de las moléculas por su tamaño y en acuerdo con esto se identificaron los dos filtros de selectividad mencionados anteriormente. Como se ha indicado, la primera constricción se forma por las regiones NPA. Las simulaciones de dinámica molecular mostraron que las moléculas de agua forman una fila dentro del poro acuoso y se reorientan al interactuar con el residuo Asn del motivo NPA (Figura 4 y 5) (Tajkhorshid *et al.*, 2002). Este mecanismo sumado a un fuerte campo electrostático, proveen las

bases requeridas para la exclusión de protones (de Groot *et al.*, 2003). La segunda constricción, aromático/arginina (ar/R), se localiza en la boca extracitoplasmática del poro. El rearrreglo estructural funciona como filtro de selectividad, debido a efectos estéricos ya que el residuo R actúa como sitio de repulsión electrostática para los protones (Fujiyoshi *et al.*, 2002). Las estructuras también mostraron que la especificidad en el transporte de solutos está determinada por las redes de enlaces de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas entre los solutos y los residuos expuestos en el poro.

El trabajo de Wallace y Roberts de 2004 incluye como parámetros involucrados en la selectividad del poro, al diámetro, la polaridad y a una conjunción de ambos. En dicho trabajo, se modelan todas las acuaporinas de plantas por homología con las estructuras conocidas. Las 35 acuaporinas de *Arabidopsis* exhiben un plegamiento similar, pero pueden clasificarse según los criterios establecidos en Wallace y Roberts en 8 subgrupos dependiendo de la configuración del poro en la constricción Ar/R. Las características que se destacan son: i) todas las PIPs exhiben un poro angosto típico de acuaporinas con alta permeabilidad y selectivo para agua; ii) los poros de TIPs y NIPs no están tan conservados; iii) las acuaporinas que transportan solutos se caracterizan por una constricción más ancha y más polar que las ortodoxas; iv) la configuración del poro de SIPs es poco común. Esta teoría de selectividad del poro, basada en las particularidades estructurales de los transportadores, ofrece la base molecular para explicar los perfiles de selectividad que se han encontrado para las acuaporinas estudiadas funcionalmente hasta el momento; sin embargo, es menester aclarar que la relevancia fisiológica de la mayor parte de estas actividades es un tema aún no resuelto.

Para las cuatro subfamilias de acuaporinas de plantas se encontró por lo menos un miembro con actividad de transporte de agua cuando se las ensayó en sistemas heterólogos (revisado en Maurel, 2007). Sin embargo, cada vez se torna más claro el concepto que las acuaporinas no son estrictas transportadoras de agua. En plantas particularmente se conoce un amplio espectro de sustratos que pueden ser transportados, entre ellos: boro, antimonio, glicerol, urea, peróxido de hidrógeno y dióxido de carbono (revisado en Tyerman *et al.*, 2002). Sin embargo, la idea de que la principal función de alguna acuaporina no sea el transporte de agua, sino el transporte de algún pequeño soluto, recién encontró evidencias fuertes con la identificación de sustratos de relevancia fisiológica en la planta. Podemos citar como ejemplos: el transporte de  $\text{NH}_3$  y  $\text{CO}_2$  relativo al rol de las acuaporinas en la fijación de nitrógeno y carbono (Loque *et al.*, 2003; Uehlein *et al.*, 2003), el transporte de  $\text{H}_2\text{O}_2$  por *AtTIP1;1* y *AtTIP1;2* y su relación con las señales y respuesta a estrés (Bienert *et al.*, 2007) y el transporte de boro en *AtNIP5;1* y *AtNIP6;1* involucrado en la elongación de la raíz (Takano *et al.*, 2006).

## Regulación

La regulación de la actividad de las acuaporinas puede ocurrir a través de diversos mecanismos:

- Regulación transcripcional y cambios de expresión.

Las acuaporinas, como cualquier otro gen pueden regularse a nivel transcripcional. De esta forma, hay acuaporinas que se expresan constitutivamente y otras se inducen o inhiben su expresión ante un estímulo determinado. Este mecanismo de regulación ha sido muy explorado con el advenimiento de los microarreglos. Particularmente en el caso de *Arabidopsis*, se conocen los momentos específicos del desarrollo y estímulos que desencadenan la expresión e inhibición de los miembros de dicha familia ([www.geneinvestigator.com](http://www.geneinvestigator.com)). Para otras plantas con genomas no secuenciados, se dispone de herramientas desarrolladas recientemente para analizar la expresión de toda la familia de acuaporinas. Por ejemplo, la hibridación de ADNc con arreglos específicos para acuaporinas mostraron la inhibición coordinada de genes de acuaporinas en respuesta a estrés hídrico o por nutrientes que sufre una planta (Alexandersson *et al.*, 2005; Hachez *et al.*, 2006). El aporte de los estudios fisiológicos de las acuaporinas fue muy importante al probar que la sequía, las bajas temperaturas, la salinidad de los suelos, la luz, patógenos o los nutrientes pueden modificar el transporte de agua *in planta* (Steudle *et al.*, 2001; Tyerman *et al.*, 2002; Hachez *et al.*, 2006). Para intentar explicar cómo los canales de agua pueden estar involucrados en la respuesta de las plantas a distintas condiciones ambientales, las evidencias fisiológicas han sido complementadas con estudios de niveles de transcripción de genes que codifican para acuaporinas. Hormonas como ABA o giberelinas y determinados factores ambientales parecen ser los responsables de las modificaciones en los niveles de transcripción génica de algunas acuaporinas (Maurel *et al.*, 2002).

- Reubicación por relocalización, *targeting* o *trafficking*.

Tanto en plantas como en animales, la dinámica de la localización subcelular de las acuaporinas, representa un aspecto clave en su regulación y función. El tráfico de acuaporinas ha sido descrito ampliamente en células animales. Algunas acuaporinas de mamíferos, son llevadas desde vesículas intracelulares hasta la membrana plasmática y viceversa en función de niveles hormonales o estímulo de segundos mensajeros (Beitz, *et al.*, 2006; Noda, *et al.*, 2005; Tietz, *et al.*, 2006). Por ejemplo en las células renales el control del ajuste fino de la homeostasis está regulado por AQP3 y AQP4 expresadas en forma constitutiva en la membrana plasmática basolateral y AQP2, cuya localización a membrana plasmática se encuentra regulada por AVP (arginina-vasopresina) mediante la activación de la redistribución de de las vesículas intracelulares a la membrana plasmática; los mecanismos a través de los cuales ocurre son complejos e involucran varias proteínas (Nedvetsky *et al.*, 2009). Otro caso destacado ocurre en hepatocitos donde en condiciones normales AQP8 localiza en vesículas intracelulares (Calamita *et al.*, 2001) y en mitocondrias (Ferri

*et al.*, 2003); sin embargo cuando se estimula con la hormona glucagón o el segundo mensajero AMPc, la AQP8 intracelular se redistribuye a la membrana plasmática; esta traslocación está mediada por la activación de PI3K (*phosphoinositide 3-kinase*) (Gradilone *et al.*, 2005). En plantas, también se encontraron acuaporinas reguladas por este mecanismo siendo los ejemplos más concretos la redistribución de *McTIP1;2* (*Mc = Mesembryanthemum crystallinum*) a endosomas bajo estrés osmótico (Vera-Estrella *et al.*, 2004); y, la localización de *ZmPIP1;2* y *ZmPIP2;5* (ambas fusionadas a GFP) en membranas plasmáticas e intracelulares (Chaumont *et al.*, 2000).

- Regulación directa de la actividad de transporte

La vía directa de regulación de acuaporinas se entiende como las modificaciones conformacionales que promueven la apertura o cierre del poro llamando *gating*. Las modificaciones pueden ser por eventos de fosforilación/desfosforilación, por acción de protones o por acción de cationes divalentes.

La primera evidencia de activación de una acuaporinas por fosforilación se encontró en 1992 para NOD26 de soja (Miao *et al.*, 1992). Se ha visto que tanto las fases propias del desarrollo de una planta como factores ambientales pueden modular la fosforilación de acuaporinas y se ha propuesto que la fosforilación está directamente involucrada en el *gating* rápido y reversible de estos canales (Johansson *et al.* 2000). Los novedosos estudios de espectrometría de masa asociados a otros desarrollos de proteómica de membranas apoyan el concepto de patrones de modificaciones co y/o postraduccionales de acuaporinas. Particularmente en el caso de la regulación por fosforilación, estos estudios confirman que las acuaporinas de membrana plasmática de *Arabidopsis* pueden ser fosforiladas en múltiples sitios de los extremos terminales (Nuhse *et al.*, 2004). Experimentos de marcado e inmunodetección utilizando anticuerpos específicos para los péptidos fosforilados de acuaporinas, demuestran que los miembros de las subfamilias PIP, TIP y NIP son fosforilados en plantas (Aroca *et al.*, 2005; Johansson *et al.*, 1996; Santoni *et al.*, 2003). También se sostiene la hipótesis de la regulación del *gating* del poro por fosforilación utilizando el sistema heterólogo de ovocitos para miembros de las tres subfamilias principales de las acuaporinas, *PvTIP3;1* (Maurel *et al.*, 1995); *GmNod26* (Guenther *et al.*, 2003) y *SoPIP2;1* (Johansson *et al.*, 2000).

La regulación de acuaporinas por protones ha sido reportada para alguna de ellas cuando se expresan en sistemas heterólogos (Yasui *et al.*, 1999; Zeuthen y Klaerke, 1999; Nemeth-Cahalan y Hall, 2000). Los análisis de función realizados en torno a la estructura, demostraron que el residuo histidina 193 totalmente conservado en las PIPs, presente en el *loop D* cumpliría un papel central en el monitoreo del pH y el posible *gating* (Tournaire-Roux, *et al.*, 2003). Más detalladamente, la estructura de *SoPIP2;1* indicó que en estado cerrado, una leucina conservada cercana a la histidina 193, actúa como compuerta hidrofóbica obstruyendo el canal de agua del lado citoplasmático

(Tornroth-Horsefield *et al.*, 2006). La acuaporina puede permanecer en su conformación cerrada por redes de interacciones iónicas y puentes de hidrógeno entre residuos del *loop* D y del extremo N-terminal. En esta red se encuentran involucrados dos residuos ácidos y una serina potencialmente fosforilable. Los dos residuos ácidos actúan como sitios de unión de cationes divalentes donde los iones estabilizan la estructura en su conformación cerrada. Contrario a esto, la fosforilación de una serina del *loop*B libera al *loop* D y permite la apertura del canal. Es interesante resaltar que la fosforilación del extremo C-terminal también activa la apertura del canal. Cabe destacar que si bien existen evidencias mencionadas previamente, que sugieren que este tipo de regulación ocurre en acuaporinas aún es un tema que presenta en la literatura fuertes controversias.

La regulación de acuaporinas vía  $\text{Ca}^{2+}$  puede establecerse de dos maneras diferentes aunque no necesariamente excluyentes: i) el  $\text{Ca}^{2+}$  actúa en forma directa sobre el canal o, ii) el  $\text{Ca}^{2+}$  modifica la actividad del canal en forma indirecta modulando otras proteínas (quinasas y/o fosfatasa) que a su vez afectan directamente la actividad de las acuaporinas. Hay evidencias experimentales a favor de ambas posiciones (Johnson y Chrispeels, 1992; Johansson *et al.*, 1996; Gerbeau *et al.*, 2002).

Recientemente, utilizando técnicas proteómicas, se reveló la metilación de residuos lisina y glutamina en el extremo citosólico N-terminal de AtPIP2;1 (Santoni *et al.*, 2006). Sin embargo hasta la fecha no se ha relacionado esta modificación postraduccional con el *gating* del canal.

Todos estos datos obtenidos de la literatura demuestran que cada acuaporina de planta puede presentarse como una variedad de formas modificadas que posiblemente reflejan los intrincados mecanismos de regulación en su expresión y actividad.

Como hipótesis de trabajo en esta tesis planteamos que las proteínas del tipo acuaporinas expresadas específicamente en polen de *Arabidopsis* están involucradas en los procesos relacionados con la fertilidad masculina.

## Objetivos

Como se ha expuesto, en los últimos años el descubrimiento de las acuaporinas desafió los conceptos acerca del papel de las membranas en el flujo de agua en las plantas. Esto abarca procesos de especial interés para los estudios vinculados a la reproducción de las plantas entre los que se destacan principalmente la deshidratación para alcanzar la madurez del grano de polen y la posterior hidratación que permite la germinación y elongación del tubo polínico.

El propósito de esta tesis doctoral es lograr integrar y aportar más conocimientos acerca de las acuaporinas y las funciones que lleva adelante el polen durante los procesos relacionados con la fecundación. De esta forma se plantea como **objetivo principal** comprender el papel que juegan las proteínas del tipo acuaporinas en el desarrollo del grano de polen y en los procesos involucrados en la fecundación de *Arabidopsis thaliana*.

Esta propuesta de trabajo, incluyó las siguientes estrategias a fin de lograr una caracterización holística:

- Identificar los genes que codifican para proteínas del tipo acuaporinas específicos de polen maduro de *Arabidopsis thaliana*. que podrían estar involucradas en la fertilidad del polen.
- Caracterizar en forma funcional y molecular, en ovocitos de *Xenopus laevis*, la actividad de transporte de agua y solutos no cargados de las acuaporinas específicas de polen de *Arabidopsis*.
- Estudiar la localización subcelular de estas proteínas en plantas transgénicas de *Arabidopsis* transformadas con sus genes codificantes fusionados al gen *Gfp*.
- Obtener plantas de *Arabidopsis* homocigotas mutantes de inserción para los genes codificantes para acuaporinas específicas de polen. Estudiar su papel fisiológico. Analizar específicamente el fenotipo asociado a la polinización y reproducción en plantas mutantes.

Metodología

---

## Metodología

### Análisis Filogenético

La búsqueda de secuencias proteicas fue realizada con el programa BLASTP. El análisis filogenético fue desarrollado utilizando el programa MEGA 3.0. El alineamiento de secuencias proteicas se realizó utilizando el programa ClustalW, mientras que la construcción de árboles filogenéticos fue realizada con distintos métodos: neighbour-joining, minimum evolution, maximum parsimony y UPGMA (Kumar *et al.*, 2005).

### Elección de *Arabidopsis thaliana* como sistema de estudio

Las plantas de *Arabidopsis* presentan varias ventajas comparativas con cualquier otra planta que se quiera utilizar como modelo:

- Genoma pequeño, distribuido en sólo 5 cromosomas. Su genoma se encuentra completamente secuenciado desde diciembre de 2000 (*Arabidopsis* Genome Initiative, 2000) (125 Mb total, alrededor de 25.000 genes, el 70% tiene ya una función asignada).
- Ciclo de vida corto: alrededor de 9 semanas, en nuestras condiciones de crecimiento, entre la germinación y la aparición de semillas maduras.
- Fácil producción de semillas y fácil cultivo en condiciones de laboratorio. No requiere mucho espacio.
- Transformación eficiente con *Agrobacterium tumefaciens*.
- Genoma saturado de líneas mutantes disponibles.
- Numerosa información disponible proveniente de microarreglos. Además aporta la posibilidad de realizar microarreglos propios.

Como desventaja se consideró que su tamaño pequeño, es un limitante para estudiar en forma bioquímica sus tejidos, específicamente el trabajo con polen representa un desafío. Si bien *Arabidopsis* no ofrece un interés peculiar como planta de cultivo sus genes han sido encontrados en casi todas las especies de valor agronómico, facilitando la transferencia de ingeniería vegetal.

### Material vegetal

Para todos los experimentos se utilizaron plantas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia 0. Las semillas se sembraron en placas conteniendo agar-agua 0.8%. Para impedir completamente la entrada de luz, las placas se envolvieron en papel metálico. Para garantizar la germinación

sincronizada se conservaron a 4 °C durante 3-5 días. Luego se quitó el papel metálico de las placas y se las expuso a condiciones normales de luz y temperatura, 150  $\mu\text{mol}/\text{seg} \times \text{m}^2$  a 22 °C, en luz continua. Una vez germinadas las semillas, se transplantaron las plántulas a macetas con sustrato inerte (partes iguales de perlita, vermiculita y turba) y se las creció en cámaras de cultivo en las condiciones de luz y temperatura descritas. El esquema de riego que se siguió fue, tres veces por semana con agua corriente intercaladas con tres veces semanales con fertilizante natural comercial Hakafos (agroquímica la Rocca) preparada según las indicaciones del fabricante.

### Recolección de polen de Arabidopsis

Se recolectaron todas las flores de 200 plantas de cada genotipo y se agitaron en un tubo cónico plástico con 25 ml de *buffer* TE (Tris-EDTA). Posteriormente, se separaron las flores usando como filtro varias capas de gasa quirúrgica. Luego se centrifugó el sobrenadante a 3500xg durante 10 minutos y se conservó el polen recolectado a -70°C.

### Extracción de ARN

Los tejidos (raíz, hojas y polen) fueron procesados de igual forma. Inmediatamente luego de ser separados de la planta, el material se sumergió en N<sub>2</sub> líquido para lograr un congelamiento instantáneo y se lo conservó a -70°C. Luego los tejidos fueron disgregados con mortero en N<sub>2</sub> líquido y solamente en el caso del polen se agregaron 100  $\mu\text{l}$  de bolitas de vidrio de 425-600 micrones al polen resuspendido en *buffer* de extracción del *kit* que se utilizó. Se agitó con vortex durante 10 min. Seguidamente, la extracción de ARN total se llevó a cabo usando RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, Germany) siguiendo las instrucciones de los fabricantes.

### RT-PCR

A partir de 200 ng de ARN total de raíz, hojas y polen se realizaron transcripciones reversas en 20  $\mu\text{l}$  de reacción utilizando MMLV-RT (Promega, Madison, WI, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las siguientes reacciones de amplificación por PCR, se realizaron con 2  $\mu\text{l}$  de ADNc previamente obtenido en 25  $\mu\text{l}$  de reacción con 0,8  $\mu\text{M}$  de cada *primer*:

tip5;1f 5'GGACTAGTGAAATTGATGAGAAGAATGATTCC3';

tip5;1r 5'GGGAATTCAGTCATTACACACCAATGGCATC3';

tip1;3f 5'GGGAATTCCTAACTTAGAAATCATTAGAAGG3';

tip1;3r 5'GGACTAGTAACGATGCCTATCAACAGAATTGCG3'

nip4;1f 5'GGCCAAAAAATGTCTTCGCATAGTGATGAA3';

nip4;1r 5'GGAAAGATTAAGTCTTAGAACTAG3';

UREASA-F 5' TTGTTTGGCAGTTGCAGAAG3';

UREASA-R 5'TGGTTGATGACGGGAGTACA3'.

Las amplificaciones de cada ADNc específico fueron realizadas utilizando la ADN polimerasa recombinante Taq (Invitrogen, California, USA) según las indicaciones del proveedor.

### **Clonado de las acuaporinas de polen maduro de Arabidopsis**

Todos los clonados que se realizaron en esta tesis respetaron el siguiente esquema protocolar. Solamente se variaron los materiales utilizados en las construcciones (insertos, vectores, enzimas de restricción, antibióticos) y en cada caso se especifican.

**Amplificación del ADNc:** Se amplificaron los ADNc de los genes de acuaporinas de polen, *AtTIP1;3*, *AtTIP5;1* y *AtNIP4;1* a partir de ADNc de polen utilizando la polimerasa *Pfx* Platinum (Invitrogen, California, USA) se siguieron las indicaciones del proveedor.

**Purificación del ADNc:** Los productos de amplificación se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa 1% y luego se purificaron utilizando el *kit* comercial GFxPCR, DNA & Gel Purification (GE Healthcare Lifesciences) siguiendo las indicaciones de los fabricantes.

**Ligada ADNc-vector:** Los ADNc purificados fueron clonados en el vector pZErO-2 (Invitrogen, California, USA). Este plásmido posee un gen letal llamado *ccdB* que favorece ampliamente el muestreo de clones positivos para una inserción, ya que estas son las únicas bacterias capaces de crecer puesto que perdieron la capacidad de expresar la toxina letal al recibir la inserción. Para realizar el clonado se linealizó el vector con la enzima EcoRV (Promega, Madison, WI, USA) que deja extremos romos y se lo incubó con los productos de PCR purificados en presencia de la enzima T4 ligasa (Invitrogen, California, USA) siguiendo las condiciones sugeridas por los fabricantes.

**Transformación bacteriana:** Se transformaron bacterias *Escherichia coli* DH5a competentes preparadas con el método Inoue (Sambrook y Russell, 2006 a). Para esto se preparó una mezcla de 50 µl de bacterias competentes y 2 µl de ligada y se la conservó en hielo durante 30 min. Luego se aplicó durante 1 min. y 30 seg. un *shock* térmico de 42 °C e inmediatamente se sumergió el tubo en hielo. A continuación se rescataron las células con 800 µl de medio SOC (2 % peptona; 0,5 % extracto de levadura; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 20 mM glucosa) y se incubaron sin antibiótico a 37 °C durante una hora. Pasado este tiempo, se rastrillaron 100 µl de la solución bacteriana en placas de petri con LB agar y el antibiótico requerido en la concentración adecuada; en el caso de pZErO se utilizó kanamicina 50 µg/1. Se incubaron durante 16 hs. a 37 °C en oscuridad y posteriormente se observó la formación de colonias.

**Amplificación de las construcciones plasmídicas:** Se inoculó, con una colonia obtenida de los pasos anteriores, un cultivo de LB líquido con el antibiótico requerido (kanamicina 50 µg/1) se creció en agitación constante durante 16 hs. a 37 °C, en oscuridad. Luego se realizaron las purificaciones plasmídicas siguiendo un protocolo de lisis alcalina (Sambrook y Russell, 2006 a). Seguidamente se confirmó el correcto clonado a través de la liberación por restricción enzimática del inserto y/o por PCR utilizando *primers* específicos. La confirmación de las secuencias nucleotídica se llevó a cabo en todos los casos en Magrogen Inc., Korea.

### **Subclonado y expresión de las acuaporinas de polen en ovocitos**

El vector pSGEM es un vector útil para la expresión en ovocitos de *Xenopus laevis*, ya que deja el gen a ser expresado flanqueado por las regiones 5'UTR y 3'UTR del gen de la β-globina de *Xenopus*, lo cual otorga al ARNm inyectado en los ovocitos mayor estabilidad y favorece la traducción a proteína. Para subclonar los genes acuaporinas en el vector pSGEM, se liberaron los insertos de los vectores pZErO-*AtTIP5;1*, pZErO-*AtTIP1;3* y pZErO-*AtNIP4*; digiriendo durante 3 hs. a 37 °C con las enzimas de restricción SpeI y EcoRI (Promega, Madison, WI, USA) siguiendo las recomendaciones de los fabricantes. El vector pSGEM vacío se trató de la misma forma. Los pasos siguientes son como los explicados para el clonado en pZErO, difiriendo únicamente en el antibiótico utilizado como agente de selección, en este caso ampicilina 100 µg/l. A partir de colonias de las placas de transformación se corroboró la presencia del inserto de interés mediante PCR con *primers* específicos, restricción y secuenciación como se explicó en el esquema de clonado. A partir de las colonias que se confirmaron como positivas, se realizaron cultivos en medio LB líquido adicionado con el antibiótico correspondiente y se aisló el ADN plasmídico utilizando QIAGEN Plasmid Maxi Kit (QIAGEN).

### **Transcripción *in vitro***

Se realizaron las transcripciones *in vitro* a partir de los vectores pSGEM-pT7::*AtTIP5;1*, pSGEM-pT7::*AtTIP1;3* y pSGEM-pT7::*AtNIP4;1* de polen, previamente linealizados con SpeI y purificados mediante una extracción con (25:24:1) fenol: cloroformo: isoamílico, a partir de la cual se rescató la fase acuosa. Seguidamente se utilizó el *kit* “RiboMAXT7 Large scale RNA Production Systems-SP6 and T7” (Promega, Madison, WI, USA) que se basa en la acción de la ARN polimerasa del bacteriófago T7 que reconoce al promotor T7 (pT7) presente en las construcciones. Se siguió el protocolo de transcripción y purificación sugerido por los fabricantes. Se cuantificó la concentración de ARN obtenido mediante espectrofotometría UV a 260 nm y se confirmó la integridad

visualizandolo en luz UV luego de una corrida electroforética en un gel de agarosa 1% con BrEt 0,1% libre de ARNasas. Los ARN se mantuvieron a -20 °C hasta la realización de los experimentos.

### **Mutagénesis dirigida**

Para generar los vectores pSGEM T7::*AtTIP5;I* con las mutaciones puntuales seleccionadas H131A y H131D se diseñaron *primers* con el programa QuikChange® Primer Design Program disponible en <http://www.stratagene.com/qcprimerdesign>

Los *primers* utilizados fueron:

H131A UP 5'AAAGTAACCGTCATGGAACAGGCCGTACCGATTTATAAGATTGC 3';

H131ADOWN 5'GCAATCTTATAAATCGGTACGGCCTGTTCCATGACGGTACTTT 3';

H131D UP 5'GTAACCGTCATGGAACAGGACGTACCGATTTATAAGA 3';

H131DDOWN 5'TCTTATAAATCGGTACGTCCTGTTCCATGACGGTTAC 3'.

Luego se utilizó el *kit* comercial QuikChange® II-E Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, Germany) de acuerdo a las instrucciones de los fabricantes. La confirmación de las mutaciones se llevó a cabo por secuenciación de los vectores en Magrogen Inc., Korea

### **Expresión de acuaporinas de polen en ovocitos de *Xenopus laevis***

Todos los experimentos funcionales realizados en *Xenopus*, así como la preparación de los mismos se realizaron en el laboratorio de la Dra. Gabriela Amodeo en Facultad de Medicina, UBA y fueron supervisados por la Dra. Karina Alleva.

### **Preparación de *Xenopus* para la extracción de ovocitos**

La fuente de ovocitos fueron hembras adultas de *Xenopus laevis* adquiridas comercialmente (Nasco, Wisconsin, USA) y posteriormente mantenidas en un cuarto con temperatura controlada y con ciclo luz-oscuridad de 12 horas. Cada rana se crió en un recipiente de plástico con ranuras de ventilación en la tapa y lleno hasta la mitad de su capacidad con agua, lo que le permite al anfibio estar completamente sumergido para poder respirar en la superficie del agua. Los animales se alimentaron dos veces por semana y el agua se cambió tres veces por semana. El agua se filtró previamente utilizando carbón activado y recibió un tratamiento de dechloración que consiste en dejarla reposar en recipientes de 20 ls por tres días. Cada animal se identificó y se operó a intervalos de al menos cuatro semanas alternando en cada operación el ovario izquierdo del derecho.

### **Obtención de los ovocitos**

El protocolo para la obtención de ovocitos se realizó según Cao (Cao *et al.*, 1992). Brevemente, el animal se anestesió en hielo durante 25 min. previos a la operación. Una vez lograda la anestesia del mismo se extrajeron los lóbulos conteniendo ovocitos, para lo cual se realizó un corte en la región abdominal. Luego de la extracción de ovocitos y finalizada la operación, las hembras se suturaron con hilo quirúrgico. Los lóbulos se colocaron en solución OR2 (8,25 mM NaCl; 0,2 mM KCl; 0,5 mM HEPES; 0,1 mM MgCl<sub>2</sub> ajustada a pH 7,5). Los ovocitos se incubaron durante 1 hora con agitación suave a 18 °C en solución OR2 suplementada con 1 U ml/1 colagenasa (SIGMA St Louis, MO). Luego se realizaron lavados con solución OR2 + 0.1 % (p/v) BSA y se incubó en Tampón K (100 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O, 1 g/ l BSA, pH 6.5) durante 1 hora con agitación suave a 18 °C. Cada 15 min se pasaron los ovocitos por una pipeta tipo Pasteur de plástico con punta gruesa, para completar la liberación de la membrana. Posteriormente los ovocitos se lavaron con solución Barth's (88 mM NaCl; 0,1 mM KCl; 0,24 mM NaHCO<sub>3</sub>; 1 mM HEPES; 0,033 mM Ca (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> · 4H<sub>2</sub>O; 0,041 mM CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O y 0,082 mM MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, pH 7.4) suplementada con 0,1 % (p/v) BSA. Se seleccionan los ovocitos teniendo en cuenta: i) el tamaño (se descartan los más pequeños, esto es inferiores a 0,8 mm de diámetro); ii) la forma (descartando los deformes o aplastados); iii) la pigmentación (los polos deben distinguirse; los ovocitos no deben estar decolorados). Así los ovocitos seleccionados se colocaron en una placa de petri y se mantuvieron en solución Barth's suplementada con 1 µg/ml de gentamicina, para ser conservados a 18 °C hasta su empleo experimental.

### **Inyección de ARNc en ovocitos**

La inyección se realizó con un inyector comercial (Drumond Nanoject, USA) que permite inocular volúmenes fijos de 50 nl. Las pipetas se prepararon a partir de capilares (3,5" Drumond #3-000-203-G/X, Drumond Scientific Company, USA) utilizando un estirador de pipetas calibrado para obtener puntas de grosor adecuado (10 a 40 µm de diámetro) (microestirador PP-83, Narishigue Japan). Las pipetas se esterilizaron por calentamiento en estufa a 240 °C durante 2 hs. La pipeta se cargó en primer lugar con aceite mineral (Biodynamics) coloreado y luego con agua (control negativo) o con 1 µg/µl del ARNc correspondiente a la proteína a expresar. Las microinyecciones se hicieron en el citoplasma del ovocito, polo claro y luego los mismos se conservaron en Barth's suplementado con gentamicina a 18 ± 2 °C hasta el momento de los experimentos.

### Estudios funcionales de permeabilidad al agua de ovocitos inyectados con acuaporinas de polen

En cada experimento se inyectaron aproximadamente 40 ovocitos con el ARNc a estudiar (*AtTIP5;1*, *AtTIP1;3* y/o *AtNIP4;1*), 40 con agua y 10 con un ARNc control de una acuaporina ya estudiada (*AtPIP2;3*, Daniels *et al.*, 1994). Una vez inyectados los ovocitos se colocaron en placas estériles de 24 *wells* con solución Barth's, individualizando cada uno de ellos. Se incubaron a 18 °C durante 3 días. Se eliminaron aquellos ovocitos que estaban muertos o en los que se observaron cambios importantes en la pigmentación. Por experimento se trabajó con un número de ovocitos entre 10 y 30 por tratamiento. A su vez el experimento se repitió por lo menos tres veces (preparaciones independientes) en las mismas condiciones.

### Estudios de cambio de volumen

Para analizar el cambio de volumen y consecuentemente la expresión y actividad de las acuaporinas correspondientes a los ARNc inoculados, los ovocitos se sometieron a un *shock* osmótico, transfiriéndolos desde la solución Barth's (160 mOsmol/Kg) a una dilución 1/5 del mismo (32 mOsmol/Kg). Los cambios de volumen sufridos por el ovocito fueron monitoreados y videocapturados mediante un sistema de video-microscopía compuesto por una cámara de video MC-350 CCD (O'Rite Technology Co., Ltd) conectada a una lupa (Olympus SZ40; Olympus Co., Japan) a través un puerto USB. El sistema permite grabar un video digital eligiendo el formato de mayor calidad (sin compresión; RGB24 24 bit true color, 15 fps -cuadros por segundo- ) a partir del cual se pueden diseccionar los *frames* que lo componen e individualizar y seleccionar imágenes (en formato BMP) a diferentes intervalos de tiempo utilizando como utilitario al programa Virtual Dub (<http://www.virtualdub.org>). El tiempo de monitoreo de cada ovocito fue de 3 minutos. Las imágenes obtenidas mostraron al ovocito en un plano bidimensional, se visualizó un área circular y a partir del análisis de estas áreas se infirieron los volúmenes celulares utilizando un programa comercial (Image Tool version 3, <http://ddsdx.uthscsa.edu/dig/itdesc.html>, USA). El coeficiente de permeabilidad osmótica se calculó, siguiendo a Zhang *et al.* (1990):

$$P_f = V_0(dV/V_0) / S * V_a * (\Delta Osm)$$

donde:  $V_0$  es el volumen inicial del ovocito ( $9 \times 10^{-4} \text{ cm}^3$ ),

$S$  es la superficie medida del ovocito,

$V_a$  es el volumen molar parcial del agua ( $18 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$ ) y

$\Delta Osm$  es la diferencia de osmolaridad entre el interior y el exterior del ovocito.

### **Estudios funcionales de permeabilidad a solutos de ovocitos inyectados con acuaporinas de polen**

Estos experimentos se diseñaron en base a los trabajos propuestos por Schultz y Beitz (Beitz *et. al.*, 2004; Hansen *et. al.*, 2002). Brevemente la propuesta fue estudiar la capacidad de una acuaporina de transportar solutos (urea, glicerol y ácido bórico) en forma indirecta. Así se coinjectaron cARN 25ng en un mismo ovocito de la acuaporina de polen en estudio y de otra que presente en nuestras condiciones experimentales alta permeabilidad al agua pero no transporte solutos. Como control se inyectó cada acuaporina en forma individual. Los ovocitos inyectados se transfirieron a una solución Barth's iso-osmótica donde a una solución diluida 1/5 se agregó el soluto a evaluar hasta lograr que sea iso-osmolar con la solución original. De esta forma al ser transferidos de solución los ovocitos sufrieron primeramente un gradiente químico. Luego, si las acuaporinas a estudiar eran capaces de transportar el soluto, el flujo neto del soluto hacia el interior del huevo provoca un cambio en la osmolaridad del medio externo. Siguiendo este principio el gradiente químico se transforma a un *shock* hipo-osmótico que la acuaporina con alta permeabilidad al agua censa generando un cambio de volumen en el ovocito. El aumento de volumen se registró de la misma manera que en los ensayos de permeabilidad al agua.

En el trabajo de Hansen, *et. al.*, 2002 se había establecido experimentalmente que *AQP1* acuaporina muy estudiada, con alta permeabilidad al agua no era capaz de transportar solutos. Del mismo modo se decidió ensayar si *AtPIP2;3*, se comporta de igual manera. Nos resultó interesante continuar con la misma acuaporina que se utilizó como control positivo en los ensayos de permeabilidad al agua, y además *AtPIP2;3* es una acuaporina de plantas. Los resultados obtenidos (no mostrados) indicaron que tanto *AQP1* como *AtPIP2;3* no pueden transportar solutos cuando se inyectan en forma individual o conjunta, en nuestras condiciones experimentales.

### **Estudios de regulación de la permeabilidad al agua de ovocitos que expresan acuaporinas de polen:**

#### **Heterotetrámeros**

Para estudiar la activación por la existencia de tetrámeros mixtos se co-injectaron 25ng de ARNc de *AtTIP5;1* y *AtTIP1;3*; luego se procedió con los pasos del ensayo de aumento de volumen. Es importante destacar que estos experimentos no tienen como finalidad la evaluación de la interacción entre proteínas; sino la regulación de la actividad de las mismas por formación de heterotetrámeros.

#### **Fosforilación/desfosforilación**

Para promover la inhibición de la acción de fosfatasas de tipo 1 y 2A, los ovocitos que expresaban acuaporinas de polen fueron inyectados 30 min. antes del experimento con ácido okadaico (50 nM

de la sal de sodio del ácido okadaico (SIGMA St Louis, MO), 10 mM HEPES-KOH, pH 7,4) en su polo citoplasmático (Valenti, *et al.*, 2000). Luego el monitoreo del cambio de volumen fue el habitual.

Otro ensayo alternativo realizado fue promover la fosforilación a través de la incubación por 30 minutos de los ovocitos inyectados con un cóctel inductor que consiste en 0,5 mM 8-Br-cAMP, 50 µM forskolina y 0,5 mM IBMX (SIGMA, St Louis, MO). Experimento descrito en Maurel, 1995.

### pH

Para estudiar el efecto de pH externo sobre la permeabilidad se siguió el protocolo descrito en Tournaire-Roux *et al.*, 2003. Se preincubaron los ovocitos inyectados, durante 10 min. con las soluciones requeridas según el tratamiento, NaCl pH 7,5 o NaCl pH 6, luego se realizó un *shock* hipo-osmótico cambiando la solución de incubación por otra diluida 1/5 y se registraron los cambios de volumen sufridos por cada ovocito en función del tiempo.

### Construcciones de vectores binarios

**Por restricción-ligada:** Se realizaron construcciones fusionando el gen *eGFP* a *AtTIP5;1* y *AtTIP1;3*. Se utilizaron vectores adecuados para generar proteínas de fusión con eGFP ya sea en el extremo N-terminal (pEGAD con promotor *LeLAT52*) (Hicks *et al.*, 2004) o en el C-terminal (pBI121, Clontech). Los subclonados en el vector binario pEGAD se realizaron siguiendo los pasos descritos previamente; en este caso las restricciones se realizaron con las enzimas EcoRI y XmaI (Promega, Madison, WI, USA). El agente selectivo utilizado en bacterias fue kanamicina 50 µg/l. En el caso de los subclonados en pBI121, se debió realizar un paso previo para incorporar el promotor *LeLAT52* y el gen *eGFP* en el extremo C-terminal. El vector intermediario utilizado fue pPK100-52AL (obtenido del laboratorio de la Dra. McCormick). Las restricciones se llevaron a cabo con las enzimas NcoI y NotI (Promega, Madison, WI, USA) y el agente selectivo utilizado en este caso fue ampicilina 100 µg/l. Una vez que se obtuvieron los fragmentos subclonados en el vector intermediario, se removieron los *cassettes* completos conteniendo *pLAT52::AtTIP5;1-eGFP-t-nos* y *pLAT52::AtTIP1;3-eGFP-t-nos* digiriendo con HindIII y ligando al vector pBI121 vacío y previamente linealizado con HindIII (Promega, Madison, WI, USA). La metodología utilizada para los subclonados fue la descrita previamente en el esquema de clonado. Del mismo modo, la confirmación del correcto ensamblaje de las secuencias fue confirmado como se describió.

**Por recombinación:** Alternativamente se utilizó para generar vectores binarios, el sistema “Gateway® Recombination Cloning Technology” (Invitrogen, California, USA). Se realizaron construcciones fusionando el gen *eGFP* a los genes *AtTIP5;1* y *AtTIP1;3*. Se utilizaron vectores adecuados de destino para generar proteínas de fusión con eGFP en el extremo N-terminal (pZYO3)

y C-terminal (pZYO6), ambos vectores tienen el promotor de LAT52 y fueron gentilmente cedidos por la Dra. McCormick. Primeramente, los tres genes de acuaporinas fueron clonados en un vector de entrada del sistema, pENTR1A (Invitrogen, California, USA). Este plásmido tiene sitios de recombinación llamados *attL1* y posee además el gen letal *ccdB* que favorece ampliamente el muestreo de clones positivos. Los genes fueron subclonados por restricción con las enzimas *Sall* y *EcoRI* (Promega, Madison, WI, USA). Para el diseño de los *primers* se tuvieron en cuenta las siguientes indicaciones:

Construcciones con eGFP en el extremo N-terminal:

- No incluir el ATG de la secuencia de la acuaporina.
- Que el gen insertado quede en marco de lectura con *eGFP*.
- Incluir el codón *stop* propio de la proteína.

*Primers*: TIP5;1f: 5'GGGGTCGACAGAAGAATGATTCAAACATCG3'

TIP5;1r: 5'GGGGATATTAGTCATTACACACCAATGGCATC3'

TIP1;3f: 5'GGGGTCGACCCTATCAACAGAATTGTC3'

TIP1;3r: 5'GGGGATCCCAACGATGCCTATCAACAG3'

Construcciones con eGFP en el extremo C-terminal:

- Que eGFP quede en marco de lectura con el gen insertado.
- No se debe incluir el codón STOP de la proteína.

*Primers*: TIP5;1f: GGGGTCGACATGAGAAGAATGATTCAAACA

TIP5;1r:GGGGATATTTACACACCAATGGCATCACC

TIP1;3f: GGGGTCGACATGCCTATCAACAGAATTGC

TIP1;3r:GGGGATCCCGAAATCAGAAGGAAGTTC.

Utilizando los *primers* específicos se amplificaron los genes *AtTIP5;1* y *AtTIP1;3* por PCR utilizando la ADN polimerasa Pfx (Invitrogen, California, USA). Tanto los productos de amplificación como el vector de destino se digirieron con las enzimas de restricción *Sall* y *EcoRI* (Promega, Madison, WI, USA) siguiendo las instrucciones de los fabricantes se realizaron los subclonados como se explicó previamente, utilizando como antibiótico kanamicina 50 µg/l . Una vez que se confirmó el correcto subclonado en el vector de entrada se transfirieron los genes desde dichos vectores de entrada hasta los vectores de destino a través de una recombinación homóloga mediada por la recombinasa LR, siguiendo el protocolo propuesto por los fabricantes (Invitrogen, California, USA).

### **Bombardeo de polen de tabaco**

**Preparación de las micropartículas:** Se pesaron 500 µg de partículas de oro de 1 µm en un tubo *ependorf* agujereado en la tapa y se dejó evaporar a 95 °C toda la noche. Luego se agregaron 500 µl de etanol 70% y se agitó durante 5 minutos, se dejó reposar otros 15 minutos y se centrifugó brevemente a 1000xg. Luego se descartó el alcohol y se lavó con agua estéril agitando tres veces. Finalmente se agregaron 250 µl de glicerol 50% estéril.

**Preparación del material para bombardear (para 5 bombardeos):** Se agitó por 5 minutos el tubo con las partículas de oro previamente preparadas. Se tomaron 50 µl de suspensión y se agregaron los siguientes componentes sin dejar de agitar: 8 µl ADN plasmídico (2 µg/µl) + 50 µl CaCl<sub>2</sub> 2,5 M + 20 µl de espermidina 0,1 M. Seguidamente se continuó agitando vigorosamente por 20 min. a 4 °C. Mientras tanto se preparó el material vegetal; para ello en placas de agar 0,8% cubiertas con papel watman n°1 se ubicó un círculo de papel vinílico con un radio de 1,5 cm. Sobre el círculo dispuesto en la mitad de la placa se dispensaron 250 µl de una solución de polen resuspendido (5 µg de polen/ml) en medio de resuspensión (4%PEG; 20 mM MES pH6; 0,02%MgSO<sub>4</sub>; 0,01% KNO<sub>3</sub>; 0,01% H<sub>3</sub>BO<sub>4</sub>; 2% sacarosa 0,07%; Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>). Cumplido el tiempo de agitado se agregaron 200 µl de etanol 100%, se mezcló y se centrifugó por 1 minuto a 1000xg en frío. Se descartó el etanol. Este lavado se repitió 3 veces y luego el precipitado se resuspendió en 40 µl de etanol 100%.

**Bombardeo:** Se utilizó el cañón de bombardeo Biolistic PDS-1000He Particle Delivery System (BIORAD, U.S). Los parámetros de bombardeo y preparación del cañón, se utilizaron según lo indicado en el manual instructivo. Con las únicas variantes que en cada *macrocarrier* se cargaron 8 µl de preparación de micropartículas y cada muestra biológica se bombardeó dos veces para aumentar la eficiencia de la transformación. Luego el polen se retiró del papel vinílico con una espátula y se incubó en medio de germinación de tabaco (24%PEG; 20 mM MES pH6; 0,02%MgSO<sub>4</sub>; 0,01% KNO<sub>3</sub>; 0,01% H<sub>3</sub>BO<sub>4</sub>; 2% sacarosa 0,07%; Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) a temperatura ambiente y en oscuridad durante toda la noche.

### **Transformación de Arabidopsis mediante *Agrobacterium tumefaciens***

A partir de una colonia de *Agrobacterium* cepa GV31-01, transformada previamente con la construcción de interés y confirmada su transformación por PCR, se inoculó un pre-cultivo de 3 ml que se cultivó a 28 °C toda la noche en agitación y oscuridad. Con el precultivo crecido se inocularon 200 ml de LB suplementado con antibióticos (Rifampicina 150µg/ml y gentamicina 200µg/ml, a los que la cepa salvaje es resistente y estreptomycinina 50µg/ml y espectinomicina 50µg/ml por la tolerancia otorgada por los vectores) y se incubó en las mismas condiciones durante

16 horas. Pasado este tiempo, se confirmó que la densidad óptica del cultivo se corresponda con la fase exponencial de su crecimiento (D.O: 0,5-0,8) y se centrifugó por 10 min. a 3000xg. Luego se resuspendieron las bacterias en 200 ml de medio de inoculación (5% sacarosa; 0,055% silwet L-77(LEHLE DS)) y se vertió en una bandeja plástica donde se sumergieron las flores de Arabidopsis salvaje durante 40 segundos, dos veces seguidas. Luego se dispusieron las plantas transformadas en posición horizontal dos días envueltas para conservar la humedad y reparadas de la luz. Pasado este tiempo, se continuó con el crecimiento habitual de las plantas hasta que se las cosechó.

### **Selección de semillas transgénicas**

Las semillas de Arabidopsis transformadas previamente se sometieron a selección con glufosinato de amonio (SIGMA, St Louis, MO), ya que los vectores utilizados en la transformación confieren tolerancia a este agente activo de varios herbicidas comerciales (por ejemplo, BASTA). La concentración utilizada fue seleccionada en base a una curva de inhibición de crecimiento que se realizó previamente para semillas Arabidopsis salvajes. De esta forma, se sembraron entre 200 y 400 semillas de Arabidopsis transformadas con las diferentes construcciones en placas de agar- agua 0,8% suplementada con 12,5 mg/l de glufosinato de amonio. Se sincronizó su germinación conservándolas durante tres días en oscuridad y frío, y luego se las incubó en condiciones normales de luz y temperaturas. Pasados los 7 días de crecimiento, las plántulas transgénicas se distinguen de las salvajes por parecer más vigorosas y tener cotiledones verdes. Las semillas salvajes lograron germinar, pero sus cotiledones se observaron cloróticos. Las plántulas seleccionadas se transplantaron y crecieron en las condiciones descriptas previamente. Luego cuando la plantas maduraron y llegaron a florecer se realizaron las observaciones fenotípicas del polen por microscopía de epifluorescencia.

### **Germinación de polen de Arabidopsis**

El protocolo de germinación de polen de Arabidopsis, se tomó de Boavida y McCormick, (2007) y lo modificó hasta lograr resultados. En resumen, se sumergieron 15 flores en 100 µl de medio de germinación estándar (0,01% ácido bórico; 1mM MgSO<sub>4</sub>; 2 mM CaNO<sub>3</sub>; 18% sacarosa pH 6,5) dispuesto en tubos cónicos de vidrio de 5 ml. Se agitaron los tubos con las flores por 3 minutos para desprender el polen y luego se taparon con papel transparente; incubaron por 4 horas en cámara de cultivo en condiciones controladas de luz y temperatura. En algunos casos, indicados en el texto, el medio fue modificado. Así para evaluar el efecto de la fuente de nitrógeno, CaNO<sub>3</sub> fue reemplazada por CaCl<sub>2</sub>.

### Mediciones de longitud de tubo polínico

Se seleccionaron al azar 30 tubos polínicos para cada réplica. Luego, con el *software* ImageJ se midió el largo de los tubos sin considerar el grano de polen. El valor de longitud de tubo polínico para cada réplica se obtuvo del promedio de las 30 mediciones.

### Genotipificación de plantas mutantes de inserción

Para conocer los genotipos de las plantas mutantes de inserción y así seleccionar las plantas homocigotas mutantes de todas las líneas de inserción y la doble mutantes se siguió el siguiente esquema protocolar.

**Extracción de ADN de plantas de Arabidopsis:** Se cortaron dos hojas de una planta con 6 o más hojas en su roseta. Se machacó el material vegetal en un tubo *ependorf* con embolo. Luego se agregaron 350 µl de *buffer* de lisis (50mM Tris-HCl pH 8; 10 mM EDTA pH 8; 100 mM NaCl; 1% SDS; 10mM β-mercaptoetanol) y se continuó homogeneizando. Se incubó el tubo a 65 °C durante 10 min. y se neutralizó con la solución de neutralización (11 % ácido acético; 3 M KCOOCH<sub>3</sub>) mezclando por inversión. Luego se incubó en hielo por 20 minutos y se centrifugó en frío a 16000xg. El sobrenadante se traspasó a un nuevo tubo y se precipitó centrifugando por 15 min. a 16000xg con 1 volumen de isopropanol a 4 °C. Finalmente se lavó el *pellet* con etanol 80 %, y cuando se evaporó el alcohol se resuspendió en 25 µl de agua y se conservó a -20°C.

**PCR.** Para la genotipificación de cada línea mutante de inserción se diseñaron dos primers (PD y PI) específicos para la secuencia flanqueante a la inserción (ver esquema.). Los *primers* se diseñaron a partir de las líneas utilizando el *software* “iSect primer design tool” disponible en (SIGnAL; [signal.salk.edu](http://signal.salk.edu), Alonso *et al.*, 2003).

TIP5;1f 5'GAAATTGATGAGAAGAATGATTCC3';

TIP5;1r 5'AGTCATTACACACCAATGGCATC3';

RPTIP1;3 5'AAACAATAGCTGCAATGGCTG3'

LPTIP1;3 5'GAGAAACAGTAAAGCGCGTG3'

RPNIP4;1 5' AATGTCTTCGCATAGTGATGAA3'

LPNIP4;1 5'CGCACGATTATCGGTGGCAACTCCAGA3'

GABI 5'CCCATTTGGACGTGAATGTAGACAC3'

El *primer* Lba1: 5' TGGTTCACGTAGTGGGCCATCG 3' es específico del borde izquierdo del ADN de transferencia. Para cada planta se efectuaron dos reacciones de PCR. La primera, con los *primers* PI+PD, pone de manifiesto el alelo salvaje y por lo tanto sólo estará presente en plantas salvajes y heterocigotas. La segunda, con los *primers* PD +Lba1, evidencia el alelo que sufrió la

inserción y por esto está presente tanto en plantas homocigotas como heterocigotas para la inserción (ver figura 8).

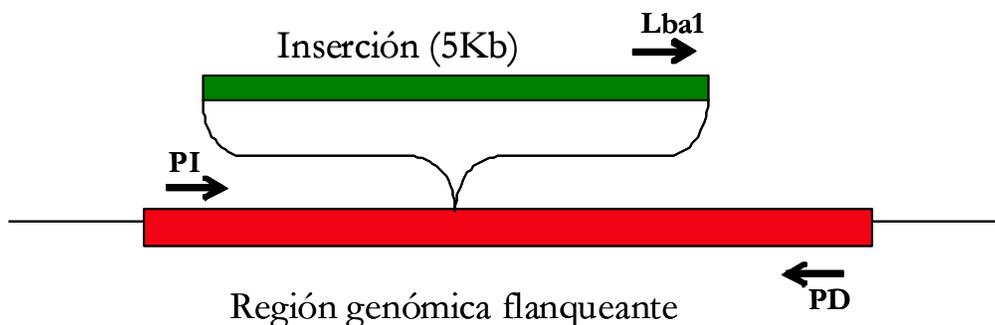


Figura 8:esquema que ilustra el diseño de genotipificación

### RT-PCR en tiempo real

La expresión diferencial del gen glutamino sintetasa GLN1;5 fue cuantificada por RT-PCR en tiempo real. Para ello se utilizaron extracciones de RNA total de polen de plantas Columbia salvaje y mutantes *tip5;1*. La generación de ADNc fue idéntica a la descrita previamente. Las amplificaciones de cada ADNc específico fueron llevadas a cabo en un termociclador Opticon2 (MJ Research). La mezcla de reacción consistió en 1 U Taq Platinum ADN polimerasa (Invitrogen); *buffer* Taq Platinum 10X; 0,25 mM de cada deoxinucleótido trifosfato; SybrGreen I (1:50,000; Molecular Probes); *primers* 0,4  $\mu$ M y  $MgCl_2$  2 mM.

Los *primers* utilizados fueron diseñados utilizando el programa Primer3:

At1g48470\_F 5' CCTTGGTTTGGGATAGAGCA3';

At1g48470\_R5' ATCGACAATGTCACGACCAA3'.

Las muestras fueron analizadas en dos diluciones 1/10 y por duplicado en tres experimentos independientes. La ausencia de contaminación y la eficiencia de la PCR fueron controladas en cada ensayo.

### Tinciones

**Mitotracker:** La versión utilizada es mito tracker orange CMTMROS (Invitrogen, Molecular Probes). Es una sonda permeable a las células y marca específicamente las mitocondrias. Tiene como espectro de excitación 554 nm y emisión 576 nm. Se incubaron 100  $\mu$ l de solución con granos de polen germinados 10  $\mu$ l de mitotracker 100 pM. Instantáneamente se observaron los tubos

polínicos en microscopio de epifluorescencia utilizando el filtro adecuado para la visualización en canal rojo.

**FM4-64:** Se utilizó FM4-64 (Invitrogen, Molecular Probes) que tiñe específicamente las vesículas que siguen la ruta endocítica. Tiene como espectro de excitación 554 nm y emisión 576 nm. Se incubaron 100  $\mu$ l de solución con granos de polen germinados con 1  $\mu$ l de FM4-64 1  $\mu$ M. Instantáneamente se observaron los tubos polínicos en microscopio de epifluorescencia utilizando el filtro adecuado para la visualización en canal rojo.

**DAPI:** esta tinción se une específicamente a ácidos nucleicos doble cadena y fluoresce azul al irradiarse con UV (Regan *et al.*, 1990). Se siguió el protocolo propuesto en Jonson-Brousseau y McCormick 2004.

### **Microscopia**

El polen se visualizó en un microscopio de epifluorescencia Bx41 (Olympus) utilizando diferentes filtros adecuados. En todos los casos las fotos fueron tomadas con objetivo de inmersión en aceite 100X.

### **Microscopia Confocal**

Las observación en microscopia fueron hechas en el microscopio confocal Nikon, C1. Con longitud de onda de excitación: 488nm y 544nm. Los filtros de emisión: 515-530nm y 570-LP. Las lentes utilizados para tomar las fotografías fueron: 60x/ AN 1.40 Oil ; 40x/0.95 AN (AN es la apertura numérica).

### **Deconvolución de mitocondrias**

La restauración se basa en algoritmos de deconvolución diferentes, que permiten la recuperación de objetos de imágenes que son degradadas por la confusión y el ruido. En la microscopía la confusión se debe principalmente a las imágenes de difracción limitada por el instrumento. Para llevar a cabo esta restauración se utilizó el software Huygens.

Luego con el programa ImageJ se midió el largo y diámetro de cada mitocondria individual y se calculó el volumen suponiendo morfología cilíndrica. Es decir que se utilizó la siguiente fórmula  
Vol. Mitocondrial=  $\pi$ \*radio<sup>2</sup>\*largo

### **Análisis estadístico**

Los resultados de mediciones de  $P_f$  fueron transformados con función logarítmica para lograr homocedacea de las varianzas y luego retro transformados para mostrar los valores. Por esta razón

se reportan los intervalos de confianza. Los resultados obtenidos en el resto de los experimentos se muestran como media  $\pm$  error estándar. En todos los casos que se realiza estadística se cumplen los supuestos necesarios. Todos los experimentos fueron repetidos por lo menos tres veces. Las diferencias significativas se calcularon en todos los casos con *t-test* o ANOVA seguido de contrastes. En todos los casos se indica en el texto.

Las desviaciones de la segregación mendeliana fueron evaluados mediante el test  $\chi^2$ .

# Resultados

---

## Resultados

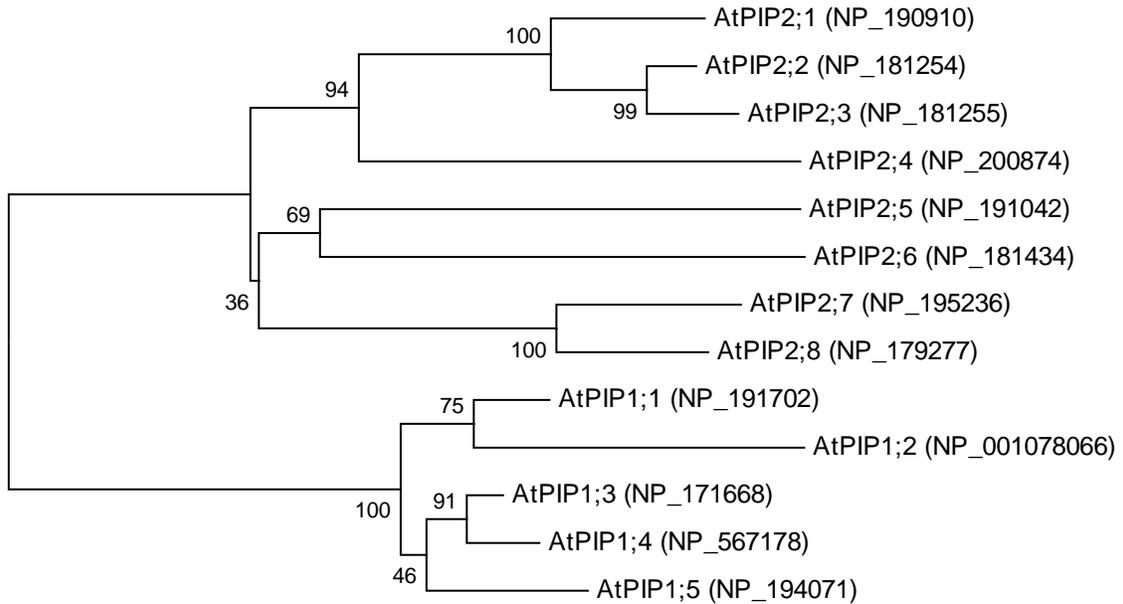
### Análisis filogenético de las acuaporinas de plantas.

A diferencia de los animales que sólo expresan 13 acuaporinas (Beitz, 2009), las plantas expresan un alto número de ellas. En el genoma de *Arabidopsis thaliana* se encuentran 35 loci que presentan alta identidad con genes codificantes de acuaporinas de otros organismos. Basando el análisis en la identidad de secuencia aminoacídica las acuaporinas de plantas, también llamadas MIPs (*membrane intrinsic proteins*), se clasifican en cuatro subfamilias: PIPs, TIPs, NIPs y SIPs (Quigley *et al.*, 2002).

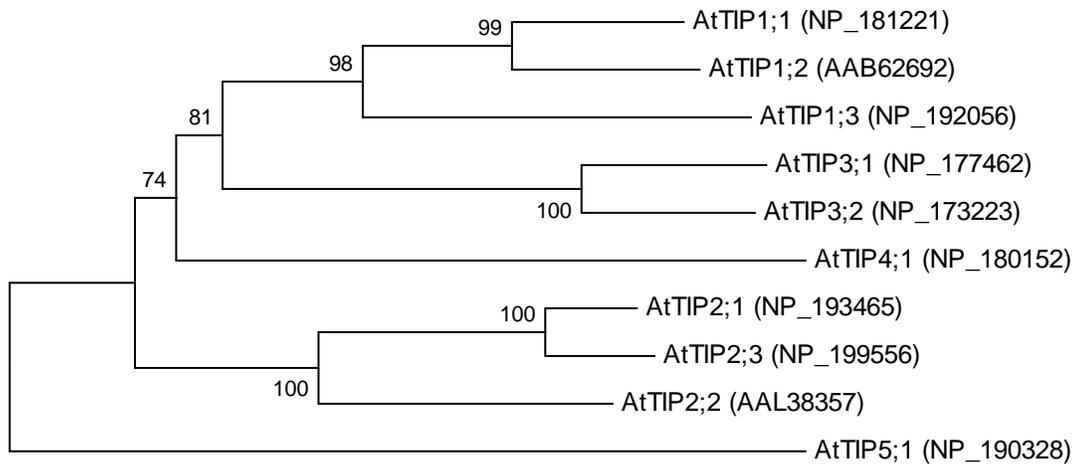
Para comenzar a detallar nuestro estudio consideramos necesario aclarar dos puntos clave y generadores de confusión a la hora de encarar el tema de las acuaporinas: la filogenia y la nomenclatura.

La literatura sobre acuaporinas está saturada de árboles filogenéticos que vinculan los cuatro subgrupos de acuaporinas, en el caso de las plantas y de los dos subgrupos funcionales en el caso de los mamíferos. Incluso muchos árboles vinculan acuaporinas de distintos reinos (Quigley *et al.*, 2002; Luu y Maurel, 2005; Gorelick *et al.*, 2006). Si bien estos gráficos pueden resultar ilustrativos para agrupar los distintos tipos de acuaporinas, no es válido suponer entre ellos una relación filogenética. La asignación de genes homólogos es un paso crítico en la reconstrucción de la historia evolutiva (Delsuc *et al.*, 2005). Normalmente, se considera que <25% de identidad aminoacídica es insuficiente para suponer que dos proteínas son homólogas (Jones, 1995). Además, se ha observado que un aumento de la distancia genética causa serios problemas en el alineamiento de las secuencias, resultando en árboles filogenéticos aberrantes (Hughes *et al.*, 2005a y b). Entre los diferentes grupos de acuaporinas TIPs, NIPs, PIPs y SIPs de *Arabidopsis thaliana* hay <25% de identidad aminoacídica, por lo tanto, las herramientas filogenéticas son insuficientes para determinar si todas las acuaporinas de plantas son homólogas entre sí. Incluso de serlo, no es conveniente juntar estos grupos de proteínas con tan baja identidad aminoacídica para la construcción de un mismo árbol filogenético. Sin embargo hay información muy valiosa que se puede rescatar del análisis de secuencias como los motivos y sitios específicos altamente conservados dentro de acuaporinas de la misma especie, en diferentes especies e incluso en distintos reinos. Estos motivos no nos aseguran un ancestro común para todos los canales de agua, pero sí nos permiten agrupar y suponer a la familia de proteínas, acuaporinas, con una funcionalidad común. Luego, las sustituciones otorgarán a los canales las distintas peculiaridades en su capacidad de transporte. Nuestro estudio filogenético muestra que las cuatro subfamilias de acuaporinas de plantas, forman verdaderos *cluster*. Es decir que puede suponerse que los miembros que los componen tienen sí un origen en común, por lo tanto

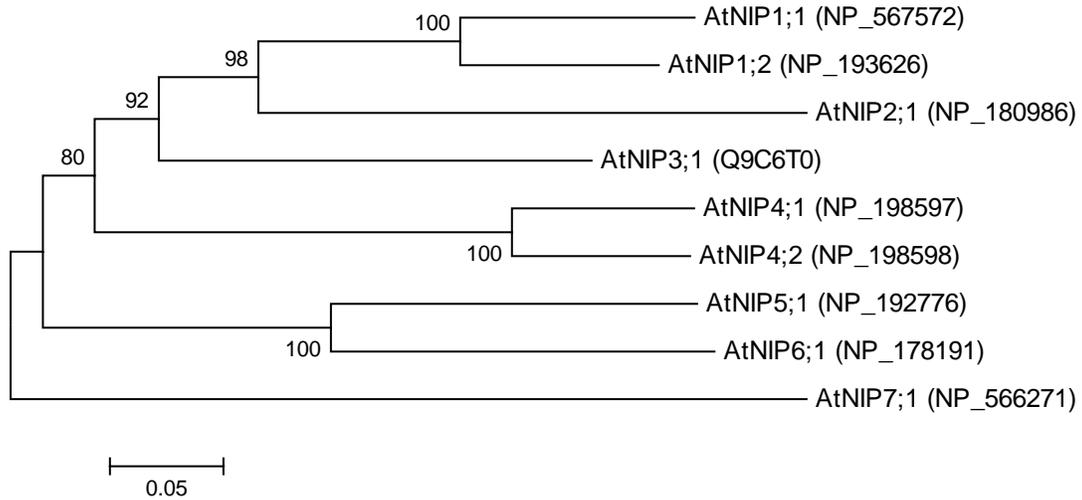
son homólogos y puede, mediante árboles filogenéticos, estudiarse la historia de cada uno de los grupos (Figura 9). En la figura 9 se mostraron los árboles filogenéticos solo para las sub-familias PIP, TIP y NIP ya que la sub-familia SIP en Arabidopsis tiene solo tres miembros y no es suficiente para construir un árbol.



0.02



0.05



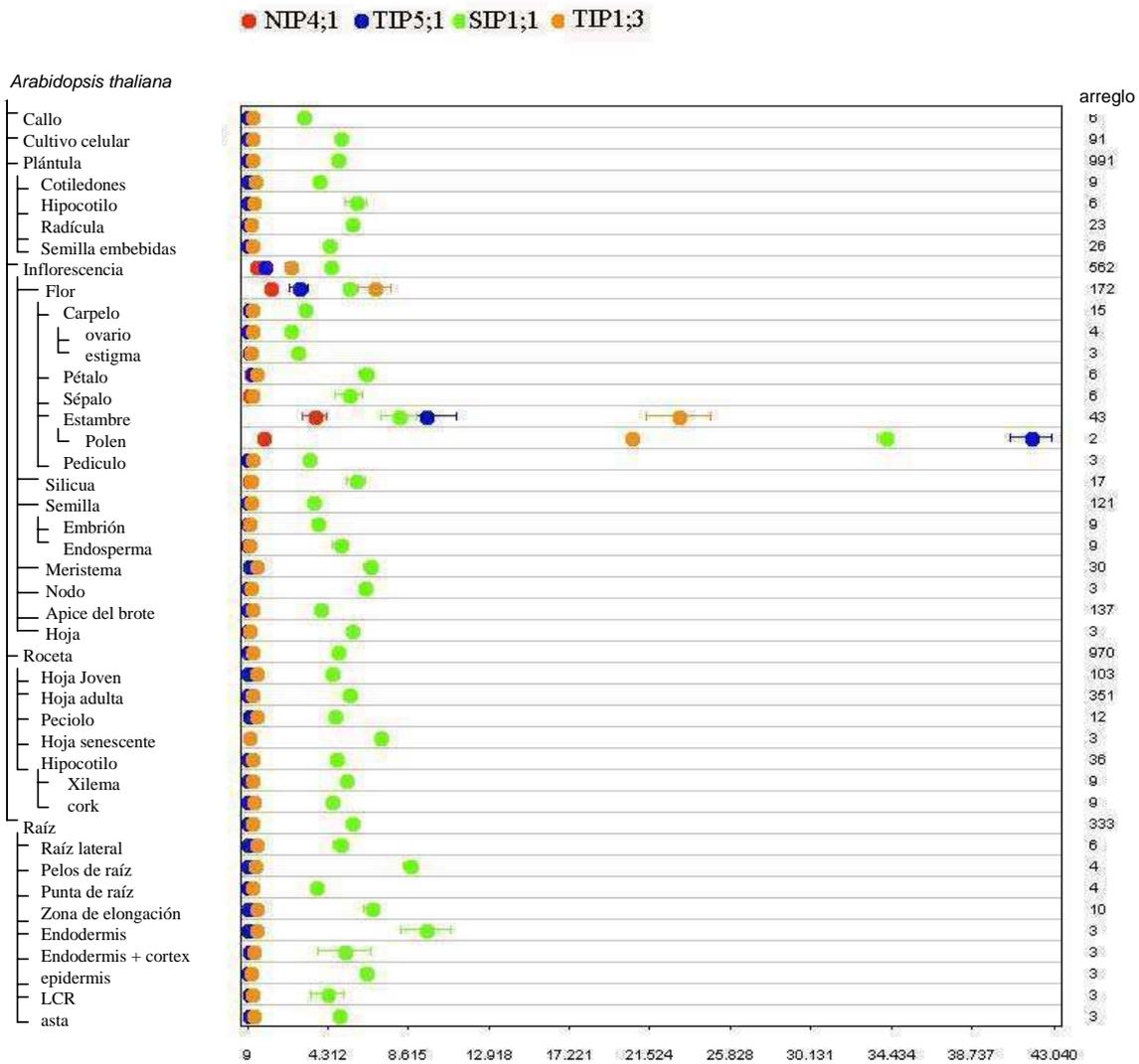
**Figura 9: Relaciones filogenéticas entre proteínas TIPs, NIPs y PIPs de *Arabidopsis thaliana*. Los árboles fueron construidos utilizando el método *neighbor-joining* y seleccionando los siguientes parámetros: *p-distance*, *bootstrap=1000 resamples*, y *root on midpoint*. Los porcentajes de *Bootstrap* son indicados en cada ramificación.**

Otra polémica que surge en torno a la agrupación de las acuaporinas de plantas es la nomenclatura pues la misma da idea de la localización subcelular y fue predicha en base a la identidad de secuencia. Para muchos casos aún resta comprobar que la predicción de la localización subcelular sea la correcta y de hecho, en algunos casos se ha visto que la localización observada no coincide con la predicha observándose patrones complejos de expresión (Barkla *et al.*, 1999; Kirch *et al.*, 2000; Chaumont *et al.*, 2000). De estas observaciones se desprende, que si bien la nomenclatura expuesta es la vigente, resulta en muchos casos confusa y por lo tanto inadecuada.

### **Acuaporinas en polen maduro de *Arabidopsis*.**

Como primer paso para integrar el transporte mediado por acuaporinas con el desarrollo y función del polen de *Arabidopsis*, se comenzó analizando los transcriptomas relacionados. Se abordó el análisis definiendo los criterios necesarios para considerar qué acuaporinas son específicas de polen maduro. Los criterios establecidos fueron: que los *loci* posean una expresión diferencial estadísticamente validada, estando presentes en polen y ausentes en otros tejidos. Se tomó en cuenta la información disponible sobre los perfiles de transcripción en granos de polen maduro a través del uso del microarreglo ATH1 (Becker *et al.*, 2003; Bock *et al.*, 2006; Borges *et al.*, 2008; Honys *et al.*, 2004; Pina *et al.*, 2005 y Wang *et al.*, 2008). Esta información se fue conociendo a lo largo del desarrollo de esta tesis y fue siendo incorporada a nuestro análisis a medida que esto ocurría.

En base a la información recopilada de los microarreglos encontramos que de los 35 genes de acuaporinas de Arabidopsis seis se expresan en polen maduro, *AtTIP5;1*, *AtTIP1;3*, *AtNIP4;1*, *AtSIP1;1*, *AtTIP1;* y *AtSIP1;2*. Luego se comparó la expresión *in silico* de todos ellos en los diferentes tejidos de la planta. Los resultados se obtuvieron utilizando el GENEVESTIGATOR (<http://www.genevestigator.ethz.ch>) y se muestran graficados en la figura 10. Se observa en polen los mayores niveles de expresión para *AtTIP5;1*, *AtTIP1;3* y *AtNIP4;1*, niveles moderados en flores, muchos más bajos en inflorescencias e indetectables en otros tejidos esporofíticos. *AtSIP1;1* en cambio presenta expresión elevada en polen, pero a diferencia de las tres acuaporinas mencionadas, se encuentra constitutivamente expresada en tejidos esporofíticos. *AtTIP1;1* y *AtSIP1;2*, no se han incorporado en la figura 10, pues presentan mayor expresión en tejidos esporofíticos que en polen. Resumiendo, solamente hay tres genes de acuaporinas en Arabidopsis que cumplen ambos criterios establecidos: *AtTIP5;1* (At3g47440), *AtTIP1;3* (At4g01470) y *AtNIP4;1* (At5g37810). A partir de aquí los denominaremos “acuaporinas específicas de polen” y por lo tanto son las proteínas de estudio de la presente tesis. *AtSIP1;1*, *AtTIP1;1* y *AtSIP1;2* no han sido incluidas en los análisis experimentales realizados. De todas formas se dispone de información sobre ellas dado que las tres han sido caracterizadas previamente por diferentes grupos de trabajo (Ma *et al.*, 2004; Ishikawa *et al.*, 2005; Bienert *et al.*, 2007 y Schüssler *et al.*, 2008).



**Figura 10: Expresión tejido específica de las acuaporinas que se expresan dentro del 10% superior en polen (gráfico obtenido de GENEVESTIGATOR (<http://www.genevestigator.ethz.ch>)). El número de microarreglos consultado se muestra en el eje y, margen derecho. El promedio de señal obtenida de los distintos microarreglos se muestra en el eje x.**

### Análisis transcripcional de las acuaporinas de polen.

Cuando se analizaron los datos de los microarreglos que incluían al tejido gametofítico masculino, para los tres genes de acuaporina específicos de polen, se encontraron peculiaridades en el perfil de expresión de cada uno de ellos (Ver tabla I).

<i>AtTIP5;1</i>	Polen uninucleado	Polen bicelular	Polen tritelular	Polen maduro	Polen hidratado	Polen germinado	Cels. espermáticas
HONYS	1017	1262	1981	3101			
WANG				6200	6200	4500	
BORGES				6118			23229

<i>AtTIP1;3</i>	Polen uninucleado	Polen bicelular	Polen tritelular	Polen maduro	Polen hidratado	Polen germinado	Cels. espermáticas
HONYS	852	1899	4791	1704			
WANG				550	500	1500	
BORGES				5397			68

<i>AtNIP4;1</i>	Polen uninucleado	Polen bicelular	Polen tritelular	Polen maduro	Polen hidratado	Polen germinado	Cels. espermáticas
HONYS	916	1141	1754	559			
WANG				35	35	6200	
BORGES				62			201

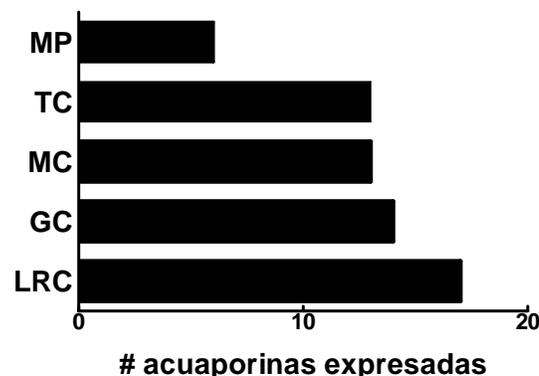
**Tabla I: Niveles de expresión de las acuaporinas de polen en los distintos estadios del desarrollo del polen, en los procesos involucrados en la fecundación (polen hidratado y germinado) y en las células espermáticas. Los valores indicados son los datos absolutos obtenidos en cada microarreglo: Honys (Honys y Twell, 2004), Wang (Wang *et al.*, 2008) y Borges (Borges *et al.*, 2008)**

De los experimentos realizados por Honys y colaboradores se evidencia que mientras *AtTIP5;1* aumenta su expresión a lo largo del desarrollo del polen hasta que alcanza la madurez; *AtTIP1;3* encuentra su máxima expresión antes de la deshidratación polínica, descendiendo cuando el grano de polen madura; por otro lado *AtNIP4;1* permanece durante todo el proceso de desarrollo y maduración del polen con niveles bajos de expresión y luego sorprende con un pico muy importante en su señal cuando el grano de polen germina dando lugar al tubo polínico (Wang *et al.*, 2008). Estas observaciones sugieren que cada acuaporina tendría su papel protagónico en diferentes momentos involucrados en los procesos de desarrollo de polen y fecundación.

En 2008 el grupo de Feijó generó microarreglos específicos de células espermáticas, allí se encontró que el gen que más se expresa en todo el microarreglo es *AtTIP5;1*. Los 34 genes restantes de

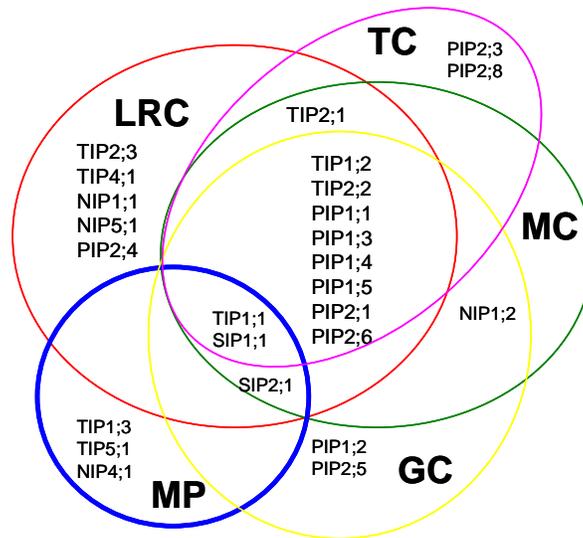
acuaporinas no evidenciaron una expresión significativa (Borges *et al.*, 2008). Este resultado nos genera la inquietud de si la alta señal que presenta esta acuaporina en todo el desarrollo del polen se debe a su alta expresión en el mismo, o es producto de su altísima expresión en las células espermáticas.

Considerando la simpleza del polen como tejido, nos pareció interesante llevar a cabo un estudio comparativo de la expresión de las acuaporinas entre polen maduro (MP) y otros tejidos consistentes en un solo tipo celular tales como las células de tricoma (TC), las células del mesófilo (MC), las células del estoma (GC) y células de la piloriza (LRC). Estas últimas se pudieron incluir utilizando la información disponible a partir de tecnologías que permiten evaluar los perfiles de transcripción independientes para cada tipo celular presente en un tejido complejo, tal como ocurre en raíz que se la subdivide en 15 tipos diferentes, entre ellos la mencionada LRC (Birnbaum *et al.*, 2003). Ya que no encontramos diferencias en la expresión de las acuaporinas en los distintos tipos celulares de raíz decidimos tomar LRC como ejemplo representativo. La figura 11 muestra que los tejidos esporofíticos, de acuerdo con los criterios utilizados por los diferentes autores, TC; MC, GC y LRC expresan un alto número de genes de acuaporinas (13, 13, 14 y 17 respectivamente) comparado con MP en el que sólo se expresan los 6 genes de acuaporinas antes mencionados. Estas evidencias confirman el carácter represivo del transcriptoma de polen. También surge del análisis, como se observa en el diagrama de Venn de la figura 12, que la divergencia de acuaporinas es mucho mayor en el caso del polen que en los otros tipos celulares; es decir que el tejido de polen tiene proporcionalmente un mayor número de acuaporinas específicas.



**Figura 11: Comparación del número de acuaporinas expresadas entre el polen y otros tipos celulares simples.**

**MP: polen maduro; TC: células de tricoma; MC: células del mesófilo; GC: células del estoma y LRC: células de la piloriza.**



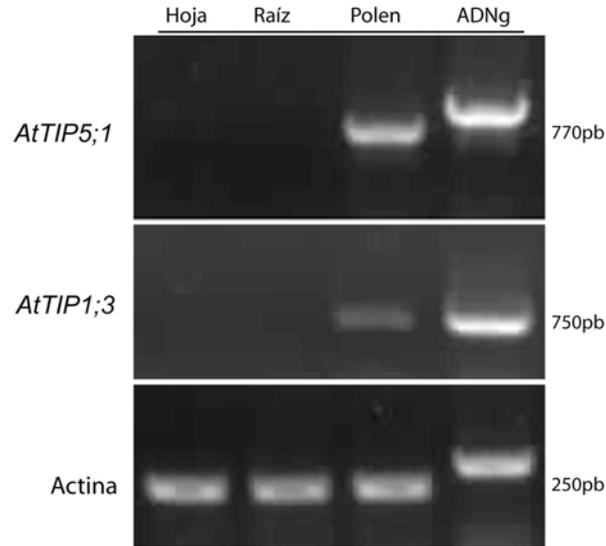
**Figura 12: Diagrama de Venn representado la superposición de genes de acuaporinas expresadas en los distintos tipos celulares simples.**

**MP: polen maduro; TC: células de tricoma; MC: células del mesófilo;**

**GC: células del estoma y LRC: células de la piloriza.**

Una característica inesperada del transcriptoma de polen es que es el único tejido de *Arabidopsis* en donde la subfamilia PIPs (miembro más destacado de la familia MIP) no se encuentra representado en forma significativa. Pese a que el gen *AtPIP2;8* se expresa durante el desarrollo del polen, su expresión es nula cuando éste alcanza la madurez. Por lo tanto la subfamilia TIP pareciera ser la más relevante en polen de *Arabidopsis*.

A continuación, para confirmar los datos de la expresión *in silico* arriba mencionados, se llevó a cabo una reacción de RT-PCR para los genes *AtTIP5;1*, *AtTIP1;3* y *AtNIP4;1* en tejidos de hoja, raíz y polen maduro de *Arabidopsis*. Tal como se muestra en la figura de 13 los datos ratifican los resultados de los microarreglos de manera tal que *AtTIP5;1* y *AtTIP1;3* se expresan específicamente en polen y no en los tejidos esporofíticos analizados, hojas y raíz. Los mismos resultados fueron obtenidos para el gen *AtNIP4;1* (resultados no mostrados).



**Figura 13: Análisis de la expresión de las acuaporinas específicas de polen en hojas, raíz y polen de Arabidopsis. Como control de reacción de ADNc, actina. Se incluyó ADN genómico como control de reacción.**

### Clonado de las acuaporinas de polen.

A partir del ARN total extraído de polen maduro de Arabidopsis, se subclonaron los tres genes de acuaporinas de polen en el vector pZERO (Invitrogen) para su secuenciación. Para *AtTIP5;1* (NP\_190328) y *AtTIP1;3* (NP\_192056) se comprobó que los fragmentos presentaban 100% de similitud con el publicado en bases de datos (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>); mientras que para *AtNIP4;1* (NP\_198597) se observaron 17 sustituciones nucleotídicas. En este último caso se realizó nuevamente una extracción de RNA y se repitió el subclonado del gen en el vector de secuenciación obteniéndose la misma secuencia nucleotídica que anteriormente (Figura 14).

```
>AtNIP4;1
MSSHSDIEEEEQISRIEKGKGDCHGGIETVICTSPSIVCLTQKLI AEMIGTYFIVFSGCGVVVVNVLYG
GTITFPGT CVTWGLIVMVMIIYSTGHI SGAHFNPVTVTFALFRRFPWHQVPLYIGA QFAGSLLASLTLRL
MFKVTP EAFFGTT PADSPARALVAEII ISFLLMFV I SGVATDNRAVGELAGI AVGMTIMLNVFVAGPITG
ASMNPARSLGPALVMGVYKHIWVYIVGPVLGVISGGFVYNLIRFTDKPLRELTKSASF SRAVSPSHKGSS
SKT
```

**Figura 14: Secuencia proteica deducida en base a la secuencia nucleotídica obtenida. En amarillo se observan las sustituciones aminoacídicas.**

En la figura 14 se señalan las sustituciones aminoacídicas deducidas a partir de las secuencias nucleotídicas obtenidas en nuestra secuenciación en relación a la disponible en base de datos. Las modificaciones observadas fueron Q25H (cambia residuo polar por positivo); I78T (cambia hidrofóbico por polar); V200L (cambia hidrofóbico por hidrofóbico); S209T (cambia polar por polar) y L268S (cambia hidrofóbico por polar).

### **Evaluación de la actividad de transporte de agua de las acuaporinas de polen.**

A continuación, los tres genes fueron subclonados en pSGEM, vector que por sus características resulta óptimo para la transcripción *in vitro* y posterior expresión de proteínas heterólogas en ovocitos de *Xenopus laevis* (ver metodología). A partir del ADNc plasmídico linealizado se sintetizaron los ARNm para *AtTIP5;1*, *AtTIP1;3* y *AtNIP4;1*. Se determinó la actividad biológica de las hasta ahora hipotéticas acuaporinas mediante el estudio de cambio de volumen de ovocitos. Para ello se inyectaron ovocitos con cada ARNc en forma individual y se los sometió luego a un *shock* osmótico. La figura 15 muestra que las membranas plasmáticas de los ovocitos expresando *AtTIP1;3* ( $P_f$ :  $12,9 \times 10^{-4}$  IC entre  $11,8$  y  $15,6 \times 10^{-4}$  cm/s, n=26) y *AtNIP4;1* ( $P_f$ :  $14,26 \times 10^{-4}$  IC entre  $12,85$  y  $17,2 \times 10^{-4}$  cm/s, n=13) tuvieron una permeabilidad al agua dos veces mayor que las membranas de los ovocitos inyectados con agua ( $P_f$ :  $6,6 \times 10^{-4}$  IC entre  $5,9$  y  $7,3 \times 10^{-4}$  cm/s, n=25); en tanto que para los ovocitos inyectados con *AtTIP5;1* ( $P_f$ :  $18 \times 10^{-4}$  IC entre  $15,8$  y  $21,5 \times 10^{-4}$  cm/s, n=25) la permeabilidad al agua de la membrana triplicó la obtenida para los ovocitos inyectados con agua. En estos experimentos *AtPIP2;3* fue incluida como control positivo ( $P_f$ :  $59,3 \times 10^{-4}$  IC entre  $56,8$  y  $62 \times 10^{-4}$  cm/s, n=13) (Figura 15). Los datos arriba expuestos indican que *AtTIP5;1*, *AtTIP1;3* y *AtNIP4;1* indujeron un cambio significativo en las permeabilidades de las membranas de los ovocitos analizados. Estos resultados nos permiten considerar a *AtTIP5;1*, *AtTIP1;3* y *AtNIP4;1* como acuaporinas capaces de transportar agua.

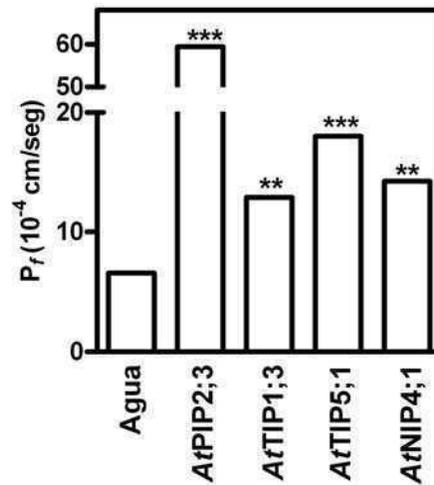


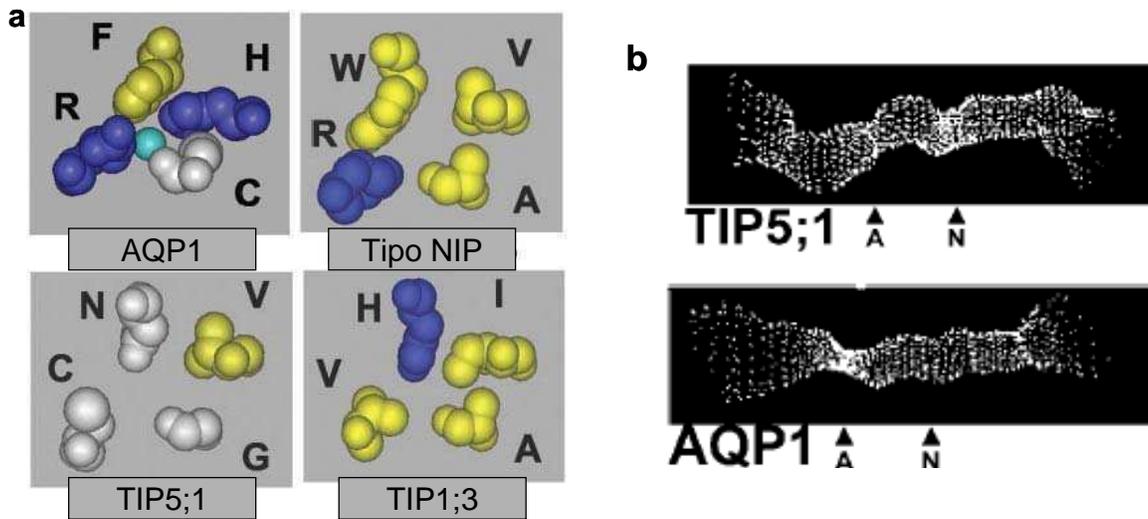
Figura 15: Permeabilidad al agua de ovocitos expresando AtTIP5;1, AtTIP1;3 y AtNIP4;1.

AtPIP2;3: control +. Agua: control -.

La significancia estadística está indicada con asteriscos. (t-test, \*\* $p < 0.01$  y \*\*\* $p < 0.001$ ).

### Evaluación de la actividad de transporte de solutos de las acuaporinas de polen

Como se ha mencionado en la introducción, las acuaporinas tienen dos características estructurales conservadas como filtros de selectividad. Una constricción central formada por dos motivos conservados NPA, contenidos en los *loops* B y E y una segunda barrera, más angosta, llamada constricción aromático/arginina (ar/R) (ver Figura 16). Esta barrera se encuentra definida en la AQP1, donde fue descrita, por cuatro residuos: Phe-56, His-180, Cys-189 y Arg-195 (H2, H5, LE1 y LE2 respectivamente) (Fu *et al.*, 2000; Sui *et al.*, 2001; Thomas *et al.*, 2002). Además de la repulsión de iones positivos por la carga positiva de la arginina, la selectividad del poro aparentemente se debe al tamaño de exclusión. Esta selectividad es la que define al grupo de MIPs capaz de mover pequeños solutos no cargados de un lado a otro de la membrana y en la mayoría de los casos también agua (Beitz *et al.*, 2006). Wallace y Roberts plantean como parámetros involucrados en la selectividad del poro, al diámetro, la polaridad o una conjunción de ambos (Wallace y Roberts, 2004). De acuerdo con esta teoría, basada en la estructura de estos transportadores, la arquitectura de la región selectiva ar/R, ubicaría a AtNIP4;1 como transportador de glicerol y agua, AtTIP1;3 como transportador de urea y agua y a AtTIP5;1 como transportador poco convencional con pocas posibilidades de formar puentes de hidrógeno con las moléculas transportadas pero con la peculiaridad de presentar el poro más ancho de todas las acuaporinas descritas al momento. En las tablas se destaca que la mayoría de los poros no tiene una función exclusiva aunque tampoco son no selectivos (Tablas II, III y Figura 16).



**Figura 16:** a) Comparación de las regiones de selectividad ar/R de las acuaporinas de polen. Esferas azules: aa hidrofílicos básicos; bolas blancas: aa hidrofílicos neutros; bolas amarillas aa hidrofóbicos y bolas celestes: grupos OH disponibles. b) Representación de la dimensión del poro de AtTIP5;1 comparado con AQP1 utilizando el programa HOLE (Smart *et al.*, 1993) y visualizado con InsightII. Tomado de Wallace, 2004

Proteína	H2	H5	LE1	LE2	Transporte	Localización	Fenotipo en mutante	Referencias
HsAQP1	F	H	C	R	Agua			Preston, 1992
AtPIP2;3	F	H	T	R	Agua			Daniels, 1994
<i>AfTIP1;1</i> (a)	H	I	A	V	Urea, agua y H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	tonoplasto cloroplasto	Sin fenotipo	Liu, 2003; Maurel, 1993; Bienert, 2007; Beebo, 2009; Loqué, 2005 : Hofte, 1992
<i>AfTIP1;2</i> (a)	H	I	A	V	Urea y H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	tonoplasto	Sin fenotipo	Liu, 2003; Bienert,2007; Beebo, 2009; Loqué, 2005.
<i>AfTIP1;3</i> (a)	H	I	A	V	Urea y agua	endomembranas	Asociado a reciclado de nitrógeno	Soto, 2008 y esta tesis
<i>AfTIP2;1</i> (b)	H	I	G	R	urea, NH <sub>3</sub> /NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , methylammonio	tonoplasto cloroplasto	Sin determinar	Liu, 2003; Bienert, 2007; Holm, 2005; Loque, 2005; Boursiac, 2005.
<i>AfTIP2;2</i> (b)	H	I	G	R	Sin determinar	tonoplasto	Sin determinar	Hicks, 2004
<i>AfTIP2;3</i> (b)	H	I	G	R	NH <sub>3</sub> /NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , methylammonio	tonoplasto	Sin determinar	Loque, 2005; Dynowski, 2008
<i>AfTIP3;1</i> (b)	H	I	A	R	Sin determinar	Autolisosomas Vacuolas de reserva	Asociado a desarrollo de semilla	Moriyasu, 2003 Maurel, 1997 Hunter, 2007
<i>AfTIP3;2</i> (b)	H	I	A	R	Sin determinar	Vacuolas de reserva	Asociado a desarrollo de semilla	Maurel, 1997
<i>AfTIP4;1</i> (b)	H	I	A	R	Urea	tonoplasto	Sin determinar	Liu, 2003; Loque, 2005
<i>AfTIP5;1</i> (c)	N	V	G	C	Urea y agua	mitocondria	Asociado a reciclado de nitrógeno	Soto, 2008 y esta tesis

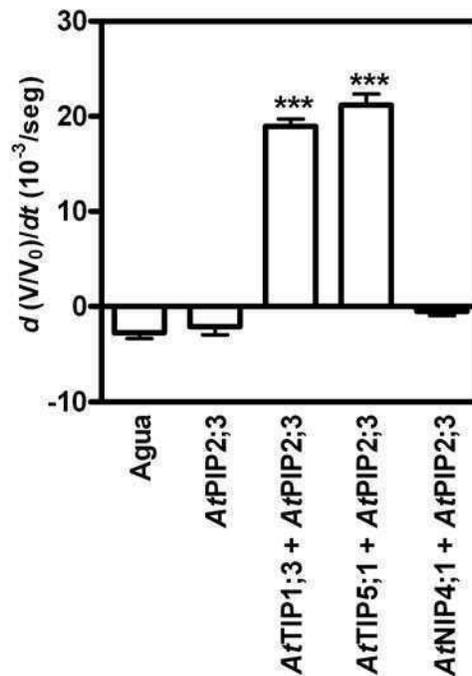
Proteína	H2	H5	LE1	LE2	Transporte	Localización	Fenotipo en planta	Ref
<i>GmNod26</i> (d)	W	I	A	R	Glicerol, Formamida y Agua	simbeosoma		Fortin, 1987
<i>AtNIP1;1</i> (d)	W		A	R	As(III), agua y glicerol	Membrana plasmática	Tolerancia a arsénico	Weig, 2000 ; Kamiya, 2009.
<i>AtNIP1;2</i> (d)	W		A	R	As(III) y glicerol	Sin determinar	No tolerancia a Arsénico	Weig, 2000 ; Kamiya, 2009.
<i>AtNIP2;1</i> (d)	W		A	R	Ácido láctico, no agua ni glicerol	Retículo endoplásmico (raíz)	Inducción por anoxia	Choi, 2007; Mizutani, 2006
<i>AtNIP3;1</i> (d)	W		A	R	Sin determinar	Sin determinar	Sin determinar	
<i>AtNIP4;1</i> (d)	W		A	R	Agua	Sin determinar	Sin determinar	Esta tesis
<i>AtNIP4;2</i> (d)	W		A	R	Sin determinar	Sin determinar	Sin determinar	
<i>AtNIP5;1</i> (e)	A		A o G	R	Ácido bórico, agua y As(III)	Membrana plasmática	Crecimiento en baja concentración de boro	Takano, 2006; Kamiya, 2008
<i>AtNIP6;1</i> (e)	A		A o G	R	Ácido bórico, glicerol y solutos mayores	Sin determinar	Sin determinar	Takana, 2008; Wallace, 2005
<i>AtNIP7;1</i> (e)	A		A o G	R	As(III), agua	Sin determinar	Tolerancia a arsénico	Isayenkov, 2008

**Tablas II y III: Agrupación de todos los miembros de las subfamilias TIP y NIP de acuerdo con sus motivos ar/R (a-e) definidos por alineamientos de secuencias y modelados por homología. Correlación de los subgrupos mencionados con su actividad y funcionalidad en plantas.**

Considerando que los modelados de los filtros de selección de las tres acuaporinas *AtNIP4;1*, *AtTIP1;3* y *AtTIP5;1* presentan características de transportadores de solutos, nos resultó interesante tratar de confirmar las predicciones con ensayos experimentales. Para comenzar esta etapa de la caracterización se evaluó la permeabilidad a urea, teniendo en cuenta que todas las TIPs de *Arabidopsis* caracterizadas hasta el momento son transportadoras de este soluto (ver Tabla II). La metodología implementada consistió en la coinyección de ovocitos de *Xenopus laevis* con ARNc de *AtTIP5;1*, *AtTIP1;3* y *AtNIP4;1* en forma individual junto con *HmAQP1* o *AtPIP2;3* (acuaporinas ortodoxas con alta permeabilidad al agua). Seguidamente se evaluó el cambio de volumen de los ovocitos cuando se los sometió a un shock de urea, es decir se les aplicó un gradiente químico

manteniendo la osmolaridad constante. Bajo estas condiciones, el aumento de volumen sería consecuencia del transporte de agua por medio de *AtPIP2;3* (la acuaporina control co-inyectada que solo transporta agua) al recibir, si la acuaporina de polen ensayada es capaz de transportar urea, un gradiente osmótico generado por el influjo inicial de urea al huevo.

Los ovocitos mostraron un notable aumento de volumen cuando *AtTIP5;1* o *AtTIP1;3*, pero no *AtNIP4;1*, se coinyectaron con *AtPIP2;3* (Figura 17 y Tabla IV). Cuando los mismos ARNc fueron inyectados con *AtTIP5;1*, *AtTIP1;3* o *AtNIP4;1* pero sin *HmAQP1* y/o *AtPIP2;3* no se observó cambio de volumen (datos no mostrados).



**Figura 17:** Permeabilidad a la urea de *AtTIP1;3*; *AtTIP5;1*; *AtNIP4;1* y *AtPIP2;3*. Las medias representan las pendientes iniciales tomadas a 80 segundos. Agua y *AtPIP2;3*: controles negativos. Los valores son media  $\pm$  S.E.M (n = 15-18 ovocitos). El experimento se repitió 3 veces. La significancia de las diferencias se evaluó con t-test y se indican con asteriscos (\*\*\*) p < 0.001).

En condiciones similares *AtTIP5;1* y *AtTIP1;3*, al igual que *AtNIP4;1*, no mostraron permeabilidad a glicerol ni ácido bórico, otros dos típicos solutos transportados por acuaporinas (Tabla IV). Estos resultados sugieren que *AtTIP5;1* y *AtTIP1;3* son acuaporinas capaces de transportar urea en forma específica.

	Transporte de urea	Transporte de ác. bórico	Transporte de glicerol
<b>Agua</b>	-2.76 ± 2.66	1.53 ± 2.31	-0.68 ± 1.12
<b><i>AtPIP2;3</i></b>	-2.12 ± 3.30	1.60 ± 3.25	-1.40 ± 1.06
<b><i>AtPIP2;3</i> + <i>AtTIP1;3</i></b>	18.94 ± 3.29	2.08 ± 3.30	-1.05 ± 1.00
<b><i>AtPIP2;3</i> + <i>AtTIP5;1</i></b>	21.18 ± 4.97	2.01 ± 3.02	-0.99 ± 1.90
<b><i>AtPIP2;3</i> + <i>AtNIP4;1</i></b>	-0.51 ± 1.72	2.50 ± 3.02	-1.02 ± 1.03

**Tabla IV: Permeabilidad de las acuaporinas específicas de polen a diferentes solutos ensayados. Las unidades de transporte son  $10^{-3}$ /seg. Los datos son expresados como la media ± SD. En los experimentos de urea se evaluaron 15-18 ovocitos (tres experimentos independientes) y en el caso de glicerol y ácido bórico 6 ovocitos (dos experimentos independientes).**

### Estudio de la regulación de las acuaporinas de polen

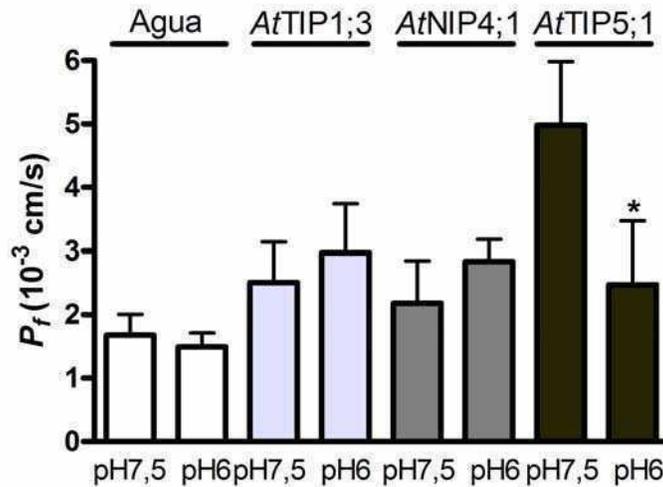
La regulación de las acuaporinas es un tema tan intrincado como interesante. Utilizando diversas técnicas que van desde la expresión heteróloga en ovocitos hasta estudios de protoplastos, se ha acumulado cuantiosa información sobre las vías y regulación de las acuaporinas. Nos resultó atractivo estudiar como se modificaba la actividad de las acuaporinas de polen en función de las rutas de regulación conocidas.

El grupo de Chaumont en 2004 demostró en maíz que las interacciones entre diferentes acuaporinas son necesarias para modular la actividad de transporte de agua (ver Introducción). Se demostró que la heterooligomerización de una acuaporina de tipo *ZmPIP1;2* con otra de tipo *ZmPIP2;5* resultaba esencial para el transporte de agua de la PIP1 (Fetter *et. al.*, 2004). Considerando la moderada permeabilidad al agua que mostraron *AtTIP1;3* y *AtTIP5;1* en nuestros ensayos, nos interesó conocer si ambas acuaporinas estaban reguladas de forma similar que las PIPs de maíz. Los resultados obtenidos demostraron que la permeabilidad al agua de *AtTIP1;3* y *AtTIP5;1* coinyectadas en ovocitos, no era superior a las de cada una en forma individual (datos no mostrados). Estos resultados indican que la actividad de *AtTIP1;3* y *AtTIP5;1* no se incrementa al actuar en forma heterotetramérica conjunta; de todas maneras, estos ensayos no son suficientes para descartar la formación de un tetrámero mixto (heterotetrámero) entre ambas acuaporinas.

Luego realizamos experimentos para ver si la actividad de *AtTIP1;3* y/o de *AtTIP5;1* se encontraba regulada por fosforilación, como se describió para ciertas acuaporinas (ver Introducción) (revisado en Maurel, 2008). Para llevar a cabo dicho análisis en nuestro sistema de estudio, ensayamos dos tipos de experimentos en ovocitos: En el primero, se estimuló la fosforilación utilizando un cóctel inductor de fosforilaciones (Maurel *et. al.*, 1995); mientras que en el segundo se promovió la inhibición de la acción de fosfatasa de tipo 1 y 2A (Valenti *et. al.*,

2000). En ninguno de los dos tipos de experimentos se evidenciaron cambios en la permeabilidad al agua de *AtTIP1;3* y *AtTIP5;1*, inducidos por mecanismos asociados a la fosforilación proteica (datos no mostrados).

Finalmente, se evaluó el efecto del pH ácido externo en la actividad de transporte de estas acuaporinas. Para eso, seguimos el protocolo descrito en Tournaire-Roux, 2003 brevemente modificado. Se incubaron ovocitos inyectados con agua, *AtNIP4;1*, *AtTIP1;3* o *AtTIP5;1* en forma individual en soluciones a pH 7,5 y a pH 6; luego de 10 minutos cada ovocito fue sometido a un *shock* hipo-osmótico como en el ensayo estándar de aumento de volumen. Los resultados mostraron que la actividad reportada para *AtTIP5;1* en condiciones normales, se inhibió en un 60% a pH externo ácido, pH 6. Mientras que tanto *AtTIP1;3* como *AtNIP4;1* son insensibles a la acidificación del medio externo en los ovocitos (Figura 18).



**Figura 18:** Efecto del pH ácido externo en la actividad de las acuaporinas de polen.

Los datos se expresan como media  $\pm$  S.E.M (n = 8-15 ovocitos). El experimento se repitió 3 veces.

La significancia de las diferencias se evaluó con t-test y se indican con asteriscos (\* p < 0.05).

A razón de estos resultados, se buscó en la secuencia aminoacídica de *AtTIP5;1* posibles residuos potencialmente involucrados en detectar el cambio de pH; los candidatos planteados en la literatura para dicho fin son las histidinas y lisinas debido a su naturaleza polar de carga positiva (Németh-Cahalan *et al.*, 2000; Weeks *et al.*, 2000). Se realizó un alineamiento de *AtTIP5;1* con las otras TIPs de *Arabidopsis* en busca de histidinas y lisinas ubicadas en los *loops* intermembrana A, C y E que, topológicamente, se disponen hacia el exterior del ovocito. Como se muestra en la figura 19 quedaron dos candidatos posibles: la histidina 131 y la lisina 136.

```

* * * * * * * *
AtTIP1;1 FNKLTEN----GATT ATGGLAVPAFGLSAGVGV GAFSGASMNPVAVFGPAVVSWTW
AtTIP1;2 FNKITDN----GATT ATGGEP I PAFGLSAGVGS GAFSGASMNPVAVFGPAVVSWTW
AtTIP1;3 YGKLTGD----GPAT STGGMETAAAFSLSYGVTP GAFD GASMNPVAVSFGPAVVS WIW
AtTIP2;1 FAKLTSD----AALD VTNGESVPT H GVAAGLGA GPFSGGSMNPARSFSGPAVVS GDF
AtTIP2;2 YAKLTSD----AALD VTGGLAVPT H SVAAGLGS GPFSGGSMNPARSFSGPAVAAGDF
AtTIP2;3 FAKLTSD----GALD VTNGKSVPT H GVSAGLGA GPFSGGSMNPARSFSGPAVVS GDL
AtTIP3;1 LDKLYWE H A A H AGTNT TTNGMRPVGFRLASGVGA GPFSGASMNPARA FGPALV GWRW
AtTIP3;2 LDKLYWDTAA H TGTNT ATNGLRPVGF H VASGVSE GPF D GASMNPARA FGPALV GWRW
AtTIP4;1 TDSL VGN-----T LTGGMGTPV H T LASGVSY GAFSGASMNPARSFSGPALVSGNW
AtTIP5;1 SRKLMAG---DVSGP TVMEQH VPI Y K I AGEMTG GPFSGGSMNPACAFGSAMVYGSF
          loop A                loop C                loop E

```

**Figura 19: Alineamiento de las regiones intermembrana A, C y E de todos los miembros de la subfamilia TIP.**

Los \* marcan los residuos conservados. En negro se resaltan los residuos histidina.

En azul se resalta la histidina 131 y la lisina 136.

Se recuadra el motivo sensor de pH en la AtTIP5;1 (ver Figura 20)

Con el fin de evaluar el contexto en el que encuentran estos residuos, se realizó otro alineamiento específico para la región flanqueante de ambos residuos y la región flanqueante de la histidina 197, postulado como sensor de pH (Tournaire-Roux *et al.*, 2003), entre AtTIP5;1 y las AtPIPs respectivamente.

En la figura 20 se propone un motivo conservado entre las PIPs reguladas por pH y TIP5;1, como motivo sensor de pH, que involucraría al residuo His131. La lisina 136 fue descartada porque su contexto no es coincidente con el de las PIPs.

motivo sensor de pH		-μHφφφ
AtTIP5;1	(NP_190328)	E Q H V P I 134
AtPIP2;1	(CAB67649)	D S H V P V 202
NtPIP2;1	(AAL33586)	D S H V P V 199
OsPIP2;1	(EAY86778)	D S H I P V 205
GhPIP	(ABK60195)	D S H V P V 201
CfPIP	(ABN11917)	D S H I P V 200
HvPIP	(BAE02729)	D S H I P V 206
LsPIP	(CAI79104)	D S H V P I 100

**Figura 20: Alineamiento de la región flanqueante a la histidina propuesta como sensor de pH en acuaporinas.**

En la primera fila se observa el motivo consenso propuesto como sensor de pH.

Donde: - es un residuo ácido, μ es un residuo polar no cargado, H es un residuo de histidina

y φ es un residuo hidrofobito. Nt [Nicotiana tabacum], Gh [Gossypium hirsutum],

Cf [Cucurbita ficifolia], Hv [Hordeum vulgare], Ls [Lactuca sativa].

Seguidamente, con el fin de evaluar si la His131 era verdaderamente un residuo sensor de pH, se realizaron dos mutaciones puntuales reemplazando la histidina 131 de *AtTIP5;1* por alanina (aminoácido pequeño y sin carga neta) y por ácido aspártico (de gran tamaño y carga negativa) (Tournaire-Roux *et al.*, 2003). Cuando la histidina se reemplazó por un aminoácido de similar tamaño pero de carga opuesta (ácido aspártico) aumentó un 40% la actividad de la acuaporina a pH ácido. Por otro lado al reemplazarse la histidina por alanina (aminoácido no polar y mucho más pequeño) la actividad de *AtTIP5;1* en condiciones externas ácidas aumentó un 60%). Los experimentos mostrados en la figura 21 sugieren que la histidina 131 podría ser importante en la regulación de la actividad de transporte por pH externo, sin embargo no son suficientes para determinar que característica/as de este residuo es/son la/s que le otorga dicha funcionalidad. Resultados similares han sido descriptos previamente en otros transportadores (ver discusión). En la figura 21 se evidencia que a pH neutro también se observa un aumento en la actividad de ambas mutantes; esto podría deberse a un cambio estructural en el aumento de actividad que estas mutaciones generan a la proteína en condiciones normales.

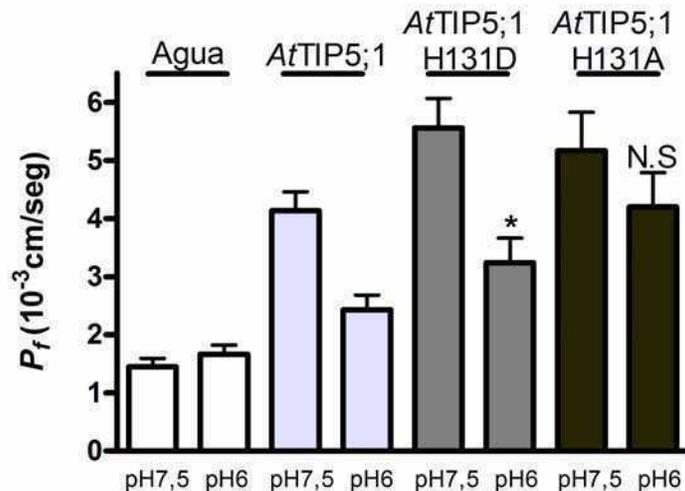


Figura 21.: Efecto del pH externo ácido sobre *AtTIP5;1* mutagenizada en la histidina 131.

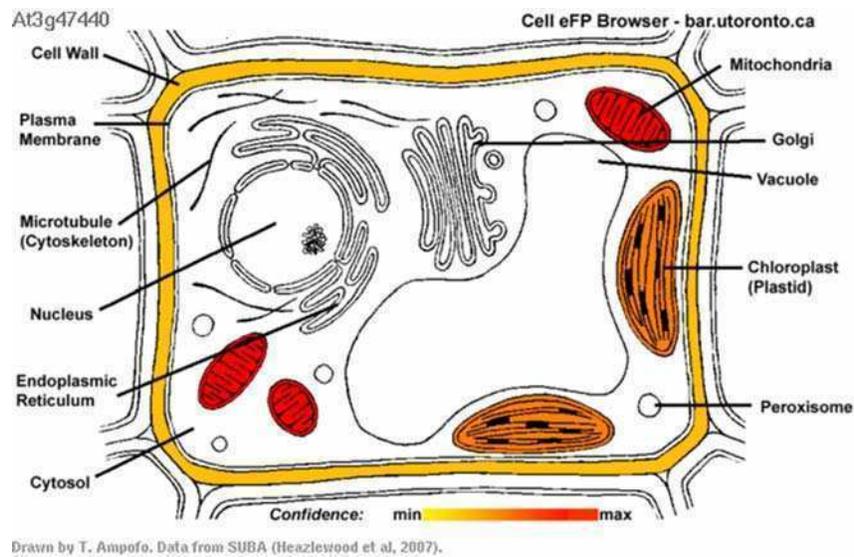
### Localización subcelular de las acuaporinas de polen.

Hemos discutido la importancia de conocer la localización de una proteína en un tejido para conocer mejor el papel que juega en la fisiología de la planta. De forma análoga también resulta relevante en el entendimiento del rol funcional, conocer la localización de la proteína en cuestión en su entorno celular. Consideramos entonces que tener información acerca de la ubicación subcelular de las acuaporinas de polen *in situ*, sería un aporte muy valioso.

Como se discutió previamente, *AtTIP5;1*, *AtTIP1;3* y *AtNIP4;1* se expresan en polen maduro de *Arabidopsis*. De acuerdo a la “homología de secuencias”, paradigma actual utilizado para clasificar las subfamilias de MIPs en plantas, los miembros de la subfamilia TIP deberían localizar en el tonoplasto; por otro lado, la localización de los miembros de la subfamilia NIP es incierta. Estas proteínas se caracterizan por expresarse en células y órganos muy especializados, como es el caso de su arquetipo, *soybean nodulin 26* (NOD26) caracterizado por Weaver y colaboradores en 1994, que se localiza en la membrana simbiótica/peribacteroidal de los nódulos presentes en la raíz de la leguminosa.

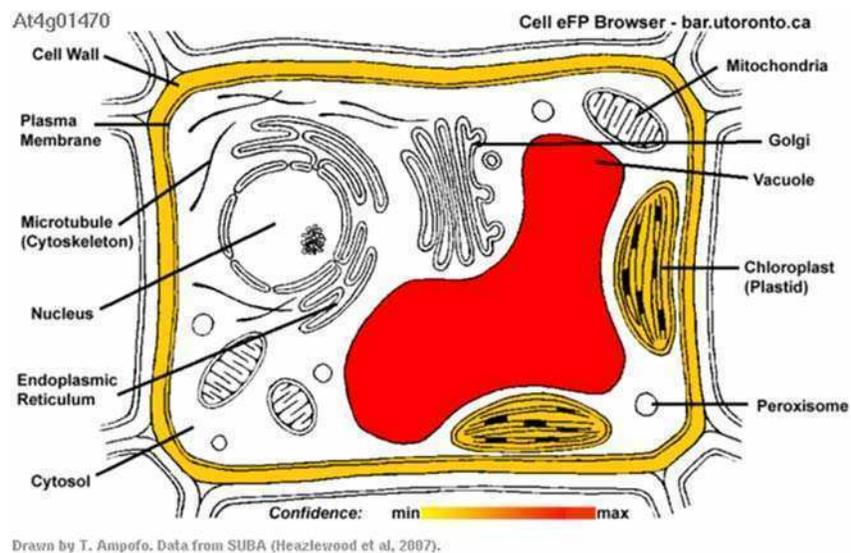
### **Predicción bioinformática de la localización subcelular de las acuaporinas de polen.**

En principio, se utilizaron herramientas bioinformáticas como aproximación para predecir la localización subcelular de las acuaporinas de polen. La función *Cell eFP (electronic fluorescent pictographic) Browser* disponible en <http://bar.utoronto.ca/> (Winter, 2007), muestra en forma esquemática y utilizando un código colorimétrico el patrón esperado de localización subcelular de cualquier proteína de *Arabidopsis*. Las predicciones se realizan sobre las bases de datos SUBA, que contemplan la identidad de secuencia, las secuencias de la señal y las secuencias de localización contenidas dentro de la proteína (Heazlewood, 2007). En la figura 22 se observa que *AtTIP5;1* (At3g47440) se predice preferencialmente en mitocondrias (rojo) y con menor probabilidad en plástidos (naranja).



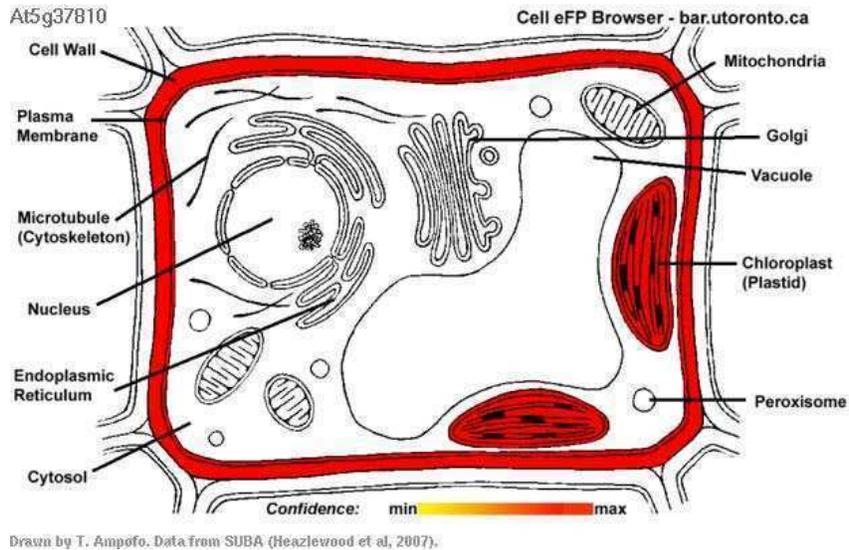
**Figura 22: Predicción de la localización subcelular de *AtTIP5;1* utilizando *Cell eFP Browser*. El gradiente colorimétrico de amarillo a rojo se utiliza para representar la confianza de la estimación. A mayor confianza de predicción más intenso el colorado.**

En el caso de *AtTIP1;3* (*At4g01470*) la predicción coincide con la esperada para los miembros de la subfamilia TIP, con la mayor probabilidad de localización en tonoplasto. Para ambas proteínas la probabilidad de localizarse en membrana plasmática es baja (amarillo).



**Figura 23: Predicción de la localización subcelular de *AtTIP1;3* utilizando *Cell eFP Browser*. El gradiente colorimétrico de amarillo a rojo se utiliza para representar la confianza de la estimación. A mayor confianza de predicción más intenso el colorado.**

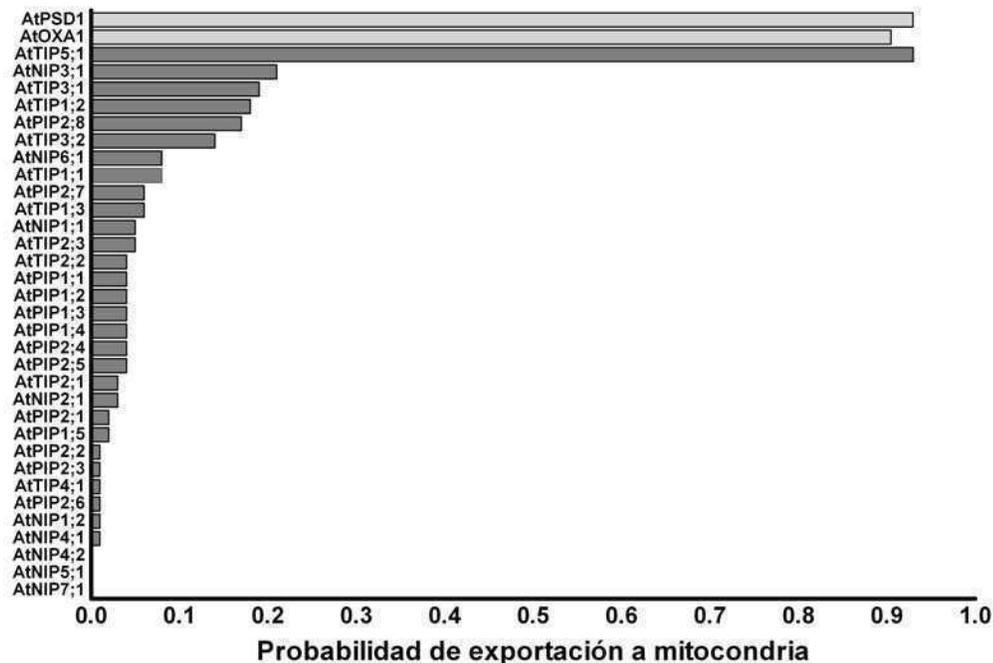
Bajo el mismo análisis, *AtNIP4;1* (At5g37810) se encontraría en la membrana plasmática y/o en algún plástido (Figura 24).



**Figura 24:** Predicción de la localización subcelular de *AtNIP4;1* utilizando *Cell eFP Browser*. El gradiente colorimétrico de amarillo a rojo se utiliza para representar la confianza de la estimación.

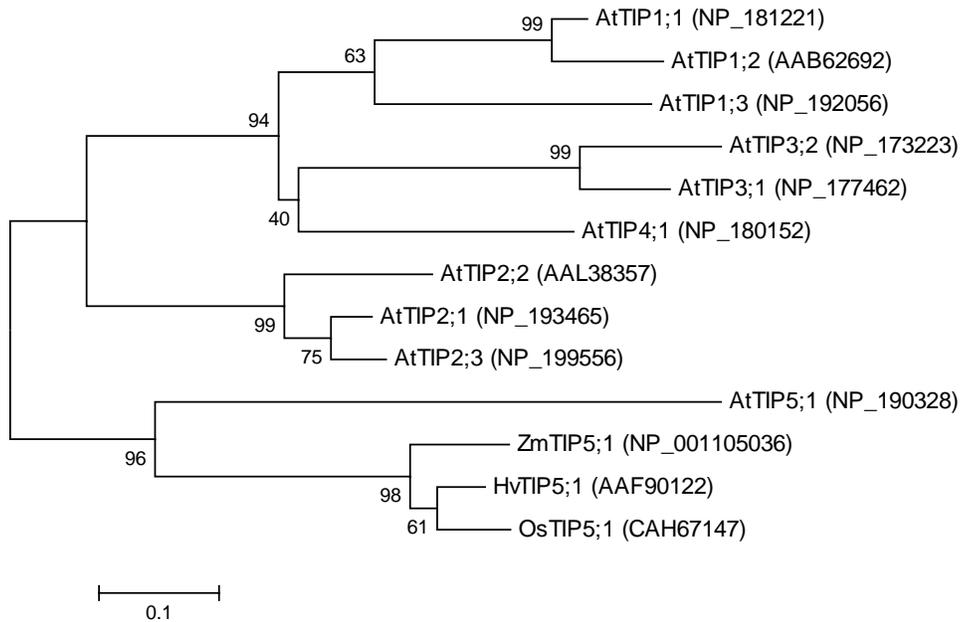
A mayor confianza de predicción más intenso el colorado.

Considerando que *AtTIP5;1* se ubicaría en mitocondria y que no hay ningún reporte sobre alguna acuaporina de plantas con localización mitocondrial, se utilizó "MITOPROT: Prediction of mitochondrial targeting sequences" (<http://ihg2.helmholtz-muenchen.de/ihg/mitoprot.html>) para predecir la probabilidad de exportación a la mitocondria. Encontramos que *AtTIP5;1* con un 93% es la única acuaporina de *Arabidopsis* cuya localización se predice en mitocondrias; este porcentaje es similar al observado para dos proteínas conocidas de localización mitocondrial *AtPSD1*(Rontein *et al.*, 2003) y *AtOXA1*(Sacamoto *et al.*, 2000) (Figura 25).



**Figura 25:** Probabilidad de exportación a la mitocondria para todas las acuaporinas de *Arabidopsis*. AtOXA1 y AtPSD1 proteínas de membrana interna mitocondrial utilizadas como controles positivos.

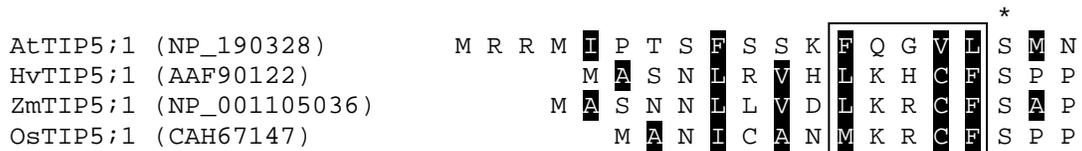
Considerando la importancia de este resultado, al encontrarnos ante la primera evidencia *in situ* de una acuaporina de localización mitocondrial, decidimos estudiar en detalle la secuencia proteica de *AtTIP5;1*. Primeramente, como se observa en la figura 34 encontramos en bases de datos los genes ortólogos de *TIP5;1*, los cuales fueron validados como tales mediante un árbol filogenético (Figura 26). De los cinco clusters de genes TIPs descritos en *Arabidopsis thaliana* (*AtTIP1*, *AtTIP2*, *AtTIP3*, *AtTIP4* y *AtTIP5*) y sus genes ortólogos encontrados, solamente el gen *AtTIP5;1* y sus genes ortólogos en *Hordeum vulgata*, *Zea mays* y *Oryza sativa* codifican para proteínas que poseen una señal de exportación a mitocondria cuya secuencia es  $\varphi\chi\chi\varphi\varphi$  donde  $\varphi$  es hidrofóbico y  $\chi$  es cualquier aminoácido (Figura 27). La posición de esta señal con respecto al primer dominio transmembrana (TMHMM Server v. 2.0) también se encuentra conservada en estas cuatro proteínas. El análisis estadístico demostró que los prepeptidos de proteínas mitocondriales de plantas son normalmente ricos en serina (17.1%), arginina (12.6%), alanina (12.0%) y leucina (10.6%) pero pobres en cisteína, histidina, triptofano y ácido glutámico (<2%) (Glaser *et al.*, 1998). Las cuatro secuencias proteicas descritas cumplen con estas características. La proteína *AtTIP5;1*, en particular, es principalmente rica en serina (20%) y arginina (10%) y no posee residuos aminoacídicos de cisteína, histidina, triptofano y ácido glutámico.



**Figura 26: árbol filogenético de la subfamilia TIP de Arabidopsis y genes ortólogos de TIP5;1 en monocotiledoneas. El análisis se realizó por el método de neighbor-joining.**

**Los porcentajes de Bootstrap son indicados en cada ramificación.**

(At: Arabidopsis thaliana, Hv: Hordeum vulgata, Zm: Zea mays y Os: Oryza sativa).



**Figura 27: Alineamiento de secuencias aminoacídicas codificadas por genes ortólogos al gen AtTIP5;1. Se muestra la secuencia proteica hasta el primer dominio transmembrana. En recuadro se describe el consenso de exportación a mitocondrias ( $\Phi\chi\chi\Phi\Phi$ ). Con fondo negro se señalan los aminoácidos hidrofóbicos y con asterisco se muestra el único aminoácido conservado, un residuo de serina. (At: Arabidopsis thaliana, Hv: Hordeum vulgata, Zm: Zea mays y Os: Oryza sativa).**

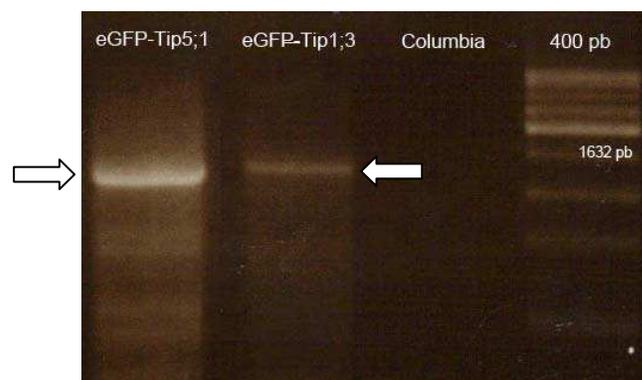
### Localización subcelular *in situ* de las acuaporinas de polen.

Para validar la localización subcelular sugerida por los métodos bioinformáticos, se analizó la localización *in situ* de los dos TIPs. Para ello, se desarrollaron dos tipos de construcciones quimera para los dos genes de la subfamilia TIP: una lleva la proteína eGFP en el extremo N-terminal (en pEGAD; Hicks *et al.*, 2004) y la otra en el C-terminal (utilizando el plásmido pBI121; Clontech).

En ambos casos se utilizó el promotor que corresponde al gen *LAT52* de polen de tomate el cual es un promotor fuerte, específico de polen (Muschietti *et al.*, 1994) y activo en polen de *Arabidopsis thaliana*.

A fin de confirmar la funcionalidad de las construcciones se decidió implementar como metodología la biobalística. Se bombardeó polen de tabaco con eGFP-*AtTIP5*;1, eGFP-*AtTIP1*;3, *AtTIP5*;1-eGFP y *AtTIP1*;3-eGFP, para evaluar de manera transitoria los niveles de expresión de las proteínas. Al realizar estos bombardeos de prueba se obtuvo una tasa de expresión muy baja, que no nos permitió analizar los resultados. Por lo tanto se resolvió cambiar de vectores de expresión en plantas y se optó por utilizar plásmidos binarios de la familia *Gateway System* (Curtis, 2003). Con estas modificaciones, utilizando nuevamente la expresión transitoria de polen de tabaco, la tasa de expresión proteica resultó adecuada para las construcciones con el eGFP en la región N-Terminal de la fusión, mientras que no se observaron granos de polen fluorescentes con las construcciones en donde el eGFP se encontraba en la región C-terminal. Las construcciones eGFP-AQP y el vector control con eGFP sólo, que fueron confirmadas como válidas, se utilizaron posteriormente en la transformación estable de plantas de *Arabidopsis thaliana*.

El método de transformación que se escogió fue la infiltración de inflorescencias mediante *Agrobacterium tumefaciens*, que es la metodología más utilizada hasta el momento en la transformación de *Arabidopsis* (ver metodología). Las semillas obtenidas se sometieron a selección con glufosinato de amonio siguiendo el protocolo ideado y publicado por Harrison y colaboradores en 2006; las plántulas más altas y con los cotiledones verdes se transplantaron. Posteriormente fueron crecidas en condiciones normales de nutrientes, luz y temperatura. Se confirmó la transformación de las plantas por PCR específica para el gen eGFP y para los genes específicos de cada fusión (Ver figura 28).

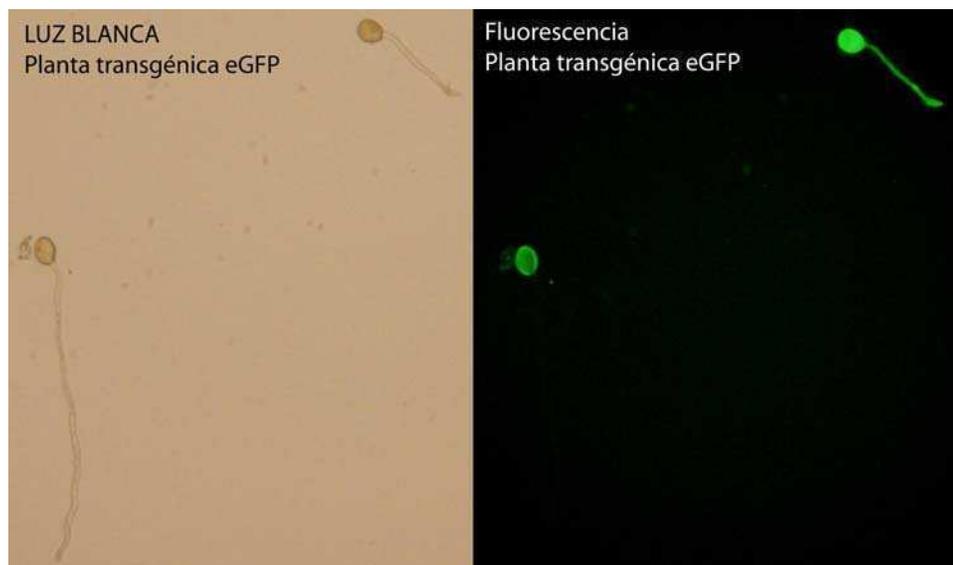


**Figura 28: Confirmación del carácter transgénico de las plantas por PCR específica para las fusiones. Las flechas señalan los productos de fusión. Columbia: control -. Analizada con los oligonucleótidos correspondientes para cada fusión.**

Con las plantas seleccionadas en flor, se realizaron germinaciones de polen *in vitro*, observándolo en epifluorescencia con el filtro adecuado para la visualización de GFP. Como se ve en la figura 29, los tubos polínicos de las plantas salvajes no exhiben autofluorescencia que sí es evidente en el grano. Las plantas transgénicas expresan GFP en el 50% de los granos de polen, ya que se trabajó con plantas heterocigotas con promotor de expresión en la célula vegetativa del polen y el mismo es haploide. En la figura 30 para una misma planta se distingue claramente el tubo polínico que expresa GFP del que no.



**Figura 29: Observación de granos de polen de plantas salvajes germinados de columbia en luz blanca y luz fluorescente con filtro para GFP.**



**Figura 30: Observación en luz blanca y luz fluorescente con filtro para GFP de granos de polen germinados de plantas transgénicas expresando eGFP.**

Se obtuvieron y evaluaron plantas transgénicas con las dos construcciones eGFP-AQP. Se analizaron (teniendo en cuenta la intensidad de fluorescencia y la resistencia al agente selectivo de la descendencia) 17, 20 y 11 líneas transgénicas independientes que expresan eGFP, eGFP-TIP5;1 y eGFP-TIP1;3, respectivamente. Mientras las plantas transgénicas para GFP presentaron una típica distribución homogénea de la fluorescencia en el citoplasma de los tubos polínicos (Figura 31 a), las transgénicas de ambas fusiones mostraron una distribución de GFP particulada, característica de proteínas de endomembranas (Figura 31 b y c). En estas primeras observaciones se evidencia también que, *AtTIP1;3* y *AtTIP5;1* no localizan ni en membrana plasmática ni en la membrana de la vacuola central del polen, ya que ambas estructuras se pueden reconocer fácilmente en luz blanca. Es interesante destacar que los patrones de fluorescencia generados por ambas proteínas de fusión resultaron diferentes entre sí en la mayoría de las visualizaciones realizadas. Las imágenes de la figura 31 corresponden a ejemplos representativos de cada fusión. Mientras las partículas fluorescentes correspondientes a la localización de eGFP-TIP5;1 se caracterizaron por presentar siempre un patrón similar con pequeñas partículas verdes distribuidas a lo largo de todo el tubo polínico; la fluorescencia correspondiente a la localización de eGFP-TIP1;3 resultó tener un patrón menos constante. En algunos casos hemos observado un patrón de partículas pequeñas similares a lo descrito para eGFP-TIP5;1 (ver figuras 32 y 35), pero en la mayoría de los casos se observan estructuras citoplasmáticas de mayor tamaño y forma variable, las cuales podrían ser algún tipo de vesícula o vacuola o tal vez alguna otra organela o cuerpo intracelular no identificado (Figura 31 c).

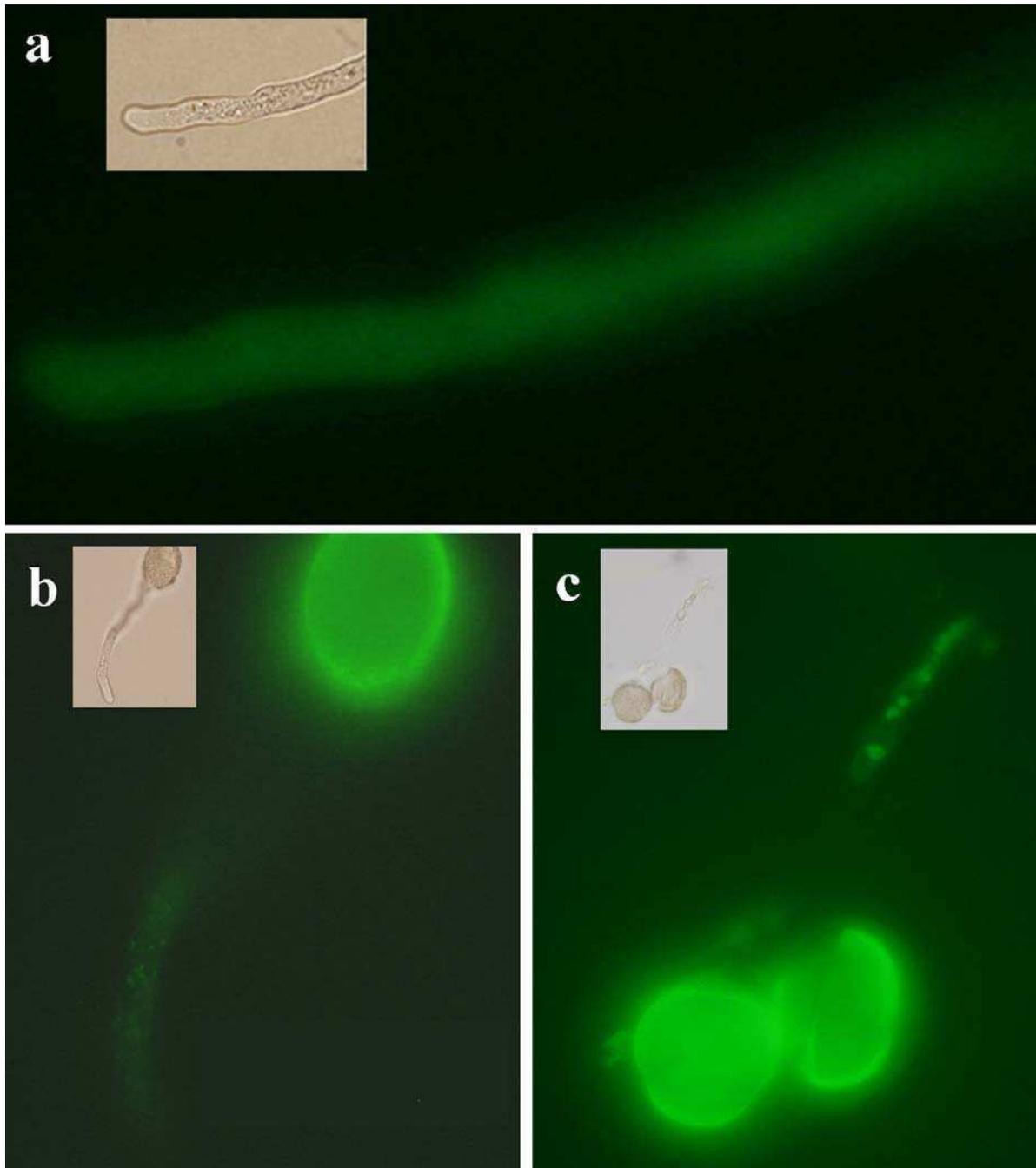
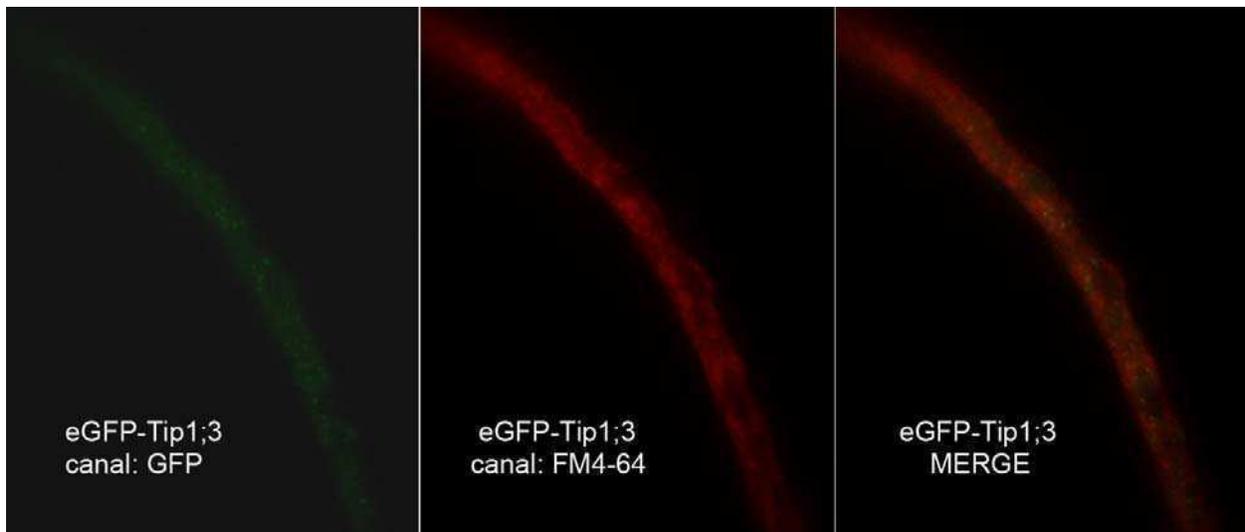
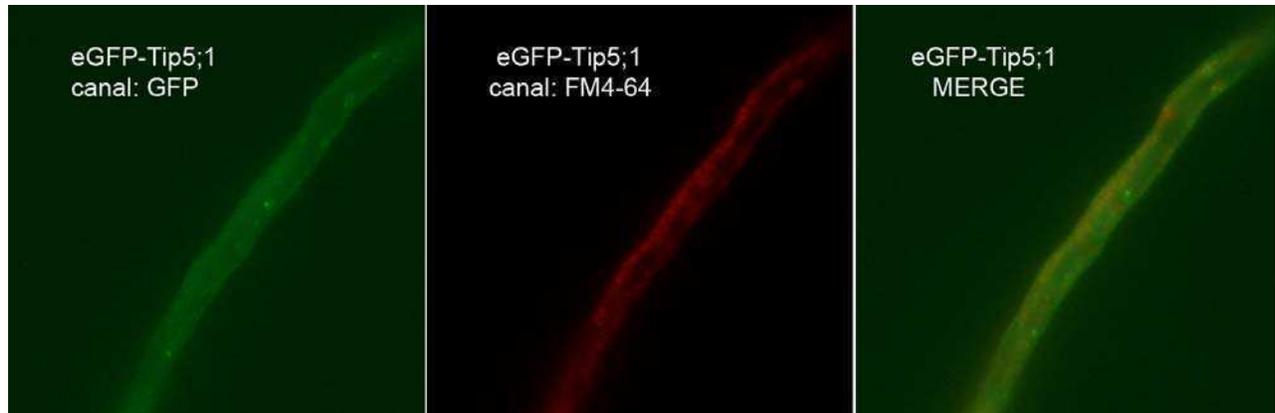


Figura 31: a) Observación de la distribución homogénea de GFP en plantas transgénicas. b) Observación de la distribución particulada de eGFP-TIP5;1 de las plantas transgénicas. c) Observación de la distribución particulada de eGFP-TIP1;3 de las plantas transgénicas.

A partir de aquí se continuó trabajando solamente con dos líneas independientes para cada genotipo. Seguidamente decidimos observar si *AtTIP5;1* y *AtTIP1;3* están reguladas por tráfico entre membranas. Este movimiento de proteínas entre membranas, si ocurriera, podría ser importante en el proceso de elongación del tubo polínico, en donde la membrana plasmática crece con la fusión de pequeñas vesículas a la punta del tubo. Para ello se utilizó la tinción lipofílica FM4-64, que marca con fluorescencia roja por contacto las membranas incorporándose a la célula por endocitosis de invaginaciones vesiculares. De esta forma, siguiendo las redes del tránsito vesicular el FM4-64 marca las organelas componentes de las rutas secretorias (Bolte *et al.*, 2004; Parton *et al.*, 2001 y Wang *et al.*, 2006). Por la naturaleza de esta tinción, específica de membranas, se tomó la precaución de establecer las condiciones que permitan observar en nuestro sistema los fenómenos de reciclado vesicular; para ello se realizaron los experimentos en tiempos muy cortos. En los ensayos con polen germinado *in vitro* se observó que si bien existe un movimiento particulado de la fluorescencia en las plantas transgénicas expresando eGFP-*AtTIP5;1* y eGFP-*AtTIP1;3*, el mismo no se asemeja al tránsito vesicular evidenciado por la tinción con FM4-64 (Figura 32 y 33) (Bolte *et al.*, 2004). Conjuntamente se capturaron las señales de fluorescencia en los canales adecuados; rojo para FM4-64 y verde para GFP. Los resultados de las imágenes superpuestas evidenciaron que prácticamente no existen puntos de coincidencia entre ninguna de las dos fusiones ensayadas y la tinción con FM4-64. Tomadas en conjunto, las observaciones mencionadas sugieren que la localización de *AtTIP5;1* y *AtTIP1;3* no es vesicular en polen y que el movimiento o *trafficking* sigue el flujo de las distintas organelas dentro del citoplasma, pero no forman parte de los procesos de endocitosis ni exocitosis (Figuras 32 y 33).

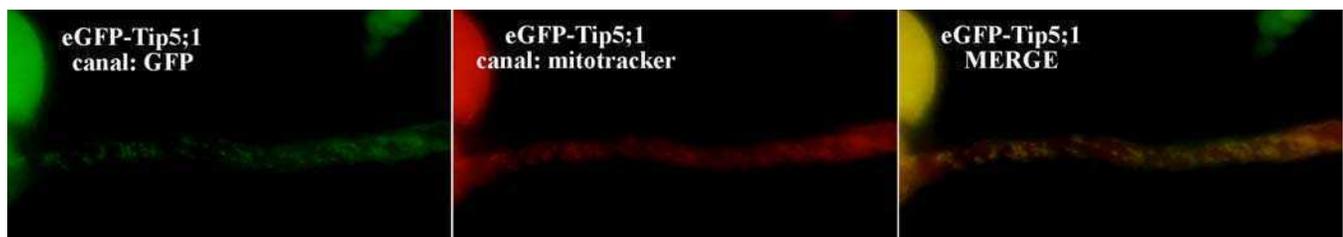


**Figura 32: Observación de eGFP-*AtTIP1;3* en los canales adecuados y superposición de las imágenes de ambos canales.**

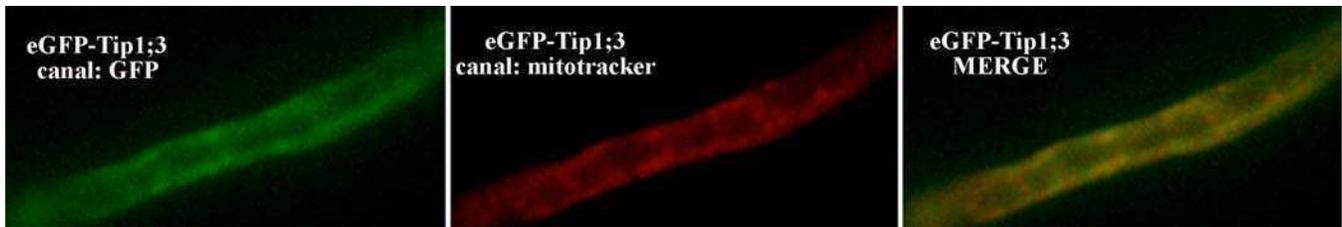


**Figura 33: Observación de eGFP-*AtTIP5;1* en los canales adecuados y superposición de las imágenes de ambos canales**

Luego con el fin de confirmar los resultados obtenidos *in silico*, se realizaron tinciones específicas para mitocondrias en tubos de polen de las plantas transgénicas. Con tal objetivo, se utilizó como marcador el Mito Tracker Red CMXROS que tiñe específicamente, de rojo fluorescente, las mitocondrias de las células vivas. Se adquirieron como imágenes las señales de fluorescencia en los canales adecuados, rojo para Mito Tracker y verde para GFP. En el caso de *AtTIP5;1* la superposición de imágenes de ambos canales (MERGE) evidenció una coincidencia total, lo cual apoya fuertemente que la localización subcelular de *AtTIP5;1* en polen de *Arabidopsis* es mitocondrial (Figura 34). En cuanto a *AtTIP1;3* también se observó una proporción de coincidencia, aunque en este caso no fue total. Es decir que parte de *AtTIP1;3* en polen estaría en mitocondrias y el resto de la proteína en alguna otra estructura subcelular no vesicular (Figura 35). Para el caso específico de *AtTIP1;3* es importante mencionar que estos experimentos se basan en la sobreexpresión de las proteínas con lo cual no se puede descartar que a causa de la cantidad excesiva de una proteína, la misma se localice en estructuras en las que no lo hace fisiológicamente.



**Figura 34: Localización de las fusiones eGFP-*AtTIP5;1* en tubos polínicos de plantas transgénicas. Las señales de fluorescencia se colectaron en canales independientes. a GFP, b rojo y c superposición**



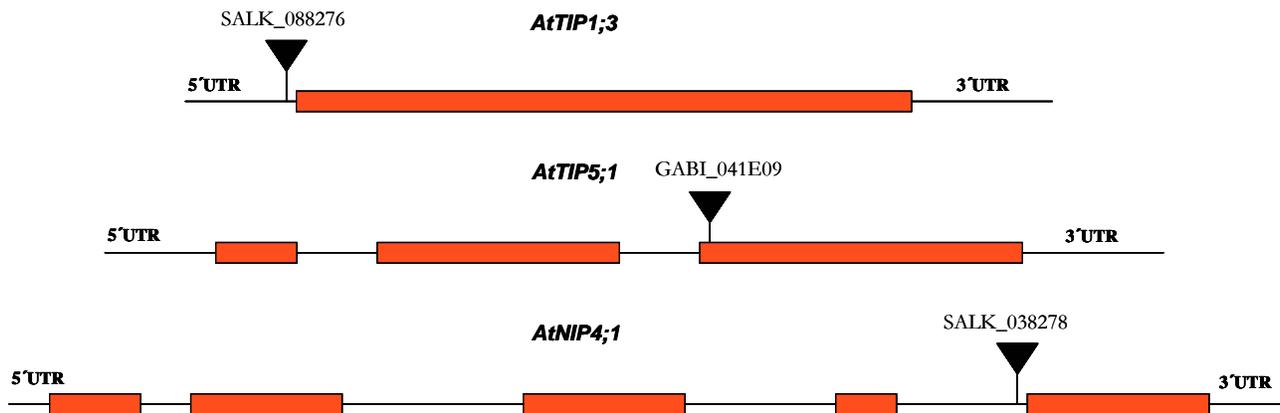
**Figura 35:** Localización de las fusiones eGFP-*ArTIP1;3* en tubos polínicos de plantas transgénicas. Las señales de fluorescencia se colectaron en canales independientes. A GFP, b rojo y c superposición.

Integrando toda la información que hemos obtenido hasta el momento, la hipótesis de que las dos acuaporinas de polen de la subfamilia TIP (*ArTIP1;3* y *ArTIP5;1*) tienen un papel redundante en polen se disipa, pero no se puede descartar completamente. Esta especulación se fundamenta en los resultados de la caracterización funcional en el *Xenopus*, donde *ArTIP5;1* y *ArTIP1;3* manifestaron características funcionales similares. Sin embargo, como se ha descrito en la primer parte de la tesis, hay que considerar que estas proteínas tienen un patrón de expresión diferente en el desarrollo del polen y al mismo tiempo *ArTIP5;1* se expresa de manera preferencial en células espermáticas. Además nuestros datos de localización subcelular indican que si bien ambas acuaporinas son de endomembranas no estarían localizadas en las mismas organelas y/o estructuras intracelulares. De este análisis se desprende la necesidad de evaluar como actúan fisiológicamente las acuaporinas en el polen. Para abordar este estudio nos propusimos obtener y evaluar los fenotipos de las plantas mutantes simples de las acuaporinas de polen y especialmente centramos en la obtención, si fuera posible, de plantas homocigota doble mutante para las dos TIPs.

#### **Obtención de plantas homocigotas mutantes simples de acuaporinas de polen.**

A fin de esclarecer el papel fisiológico de las acuaporinas de polen en el desarrollo del mismo y en los procesos de fecundación y polinización se estudiaron los fenotipos asociados a la fertilidad masculina de plantas mutantes para las tres acuaporinas de polen. Para obtener dichas mutantes, se consultó la biblioteca de mutantes de inserción en el genoma de *Arabidopsis* del “Salk Institute Genome Analysis Laboratory” en San Diego, CA, EEUU (SIGnAL; [signal.salk.edu](http://signal.salk.edu)) (Alonso, 2003). Esta base de datos se construyó saturando el genoma de *Arabidopsis* con ADN-T (“ADN de transferencia”) y luego identificando cada línea mutante. Las semillas de las líneas correspondientes están disponibles para cada una de las diferentes mutantes obtenidas con el mapa detallado que indica la posición aproximada de todas las inserciones.

Se adquirieron semillas con ADN-T insertados en los tres genes de acuaporinas de polen en “Arabidopsis Biological Resource Center” (ABRC; [www.biosci.ohio-state.edu/~plantbio/Facilities/abrc/abrchome.htm](http://www.biosci.ohio-state.edu/~plantbio/Facilities/abrc/abrchome.htm)) y GABI-Kat del “Max Planck Institute for Plant Breeding Research, Köln”, Alemania (<http://www.GABI-Kat.de>). Para *AtTIP1;3* se solicitó la línea SALK\_088276, con el ADN-T insertado en el 5'UTR; para *AtTIP5;1* la línea GABI\_041E09 que tiene la inserción en el tercer exón y para estudiar el gen *AtNIP4;1* se evaluó la línea SALK\_038278 que tiene la inserción localizada en el último intrón (Figura 36).



**Figura 36: Esquema de los tres genes de acuaporinas de polen y sus inserciones.**

Las líneas negras representan intrones, las cajas coloradas exones y los triángulos negros los sitios aproximados de inserción.

Se realizó el análisis genotípico de las plantas provenientes de las distintas líneas mutantes ya que, al ser generación F<sub>3</sub>, son una mezcla de los tres genotipos posibles: salvaje (sin inserción), heterocigotas u homocigotas para la inserción. Con tal propósito se diseñaron dos reacciones de PCR sobre el ADN genómico de las plantas específicas para cada línea: una para evidenciar los alelos salvajes y otra que permite detectar los alelos que sufrieron inserción (ver metodología). Se lograron obtener, por autofecundación, homocigotas mutantes fértiles para las tres líneas mutantes (Figura 37 y 38); esto permite inferir que la ausencia de *AtTIP1;3*, *AtTIP5;1* y *AtNIP4;1* en forma individual no afecta la fertilidad del polen ni impide la fecundación. Para confirmar que las inserciones en los genes generaron plantas *knock out*, se realizaron RT-PCR específicas de cada gen a partir de RNA total aislado de polen mutante (Figura 39).

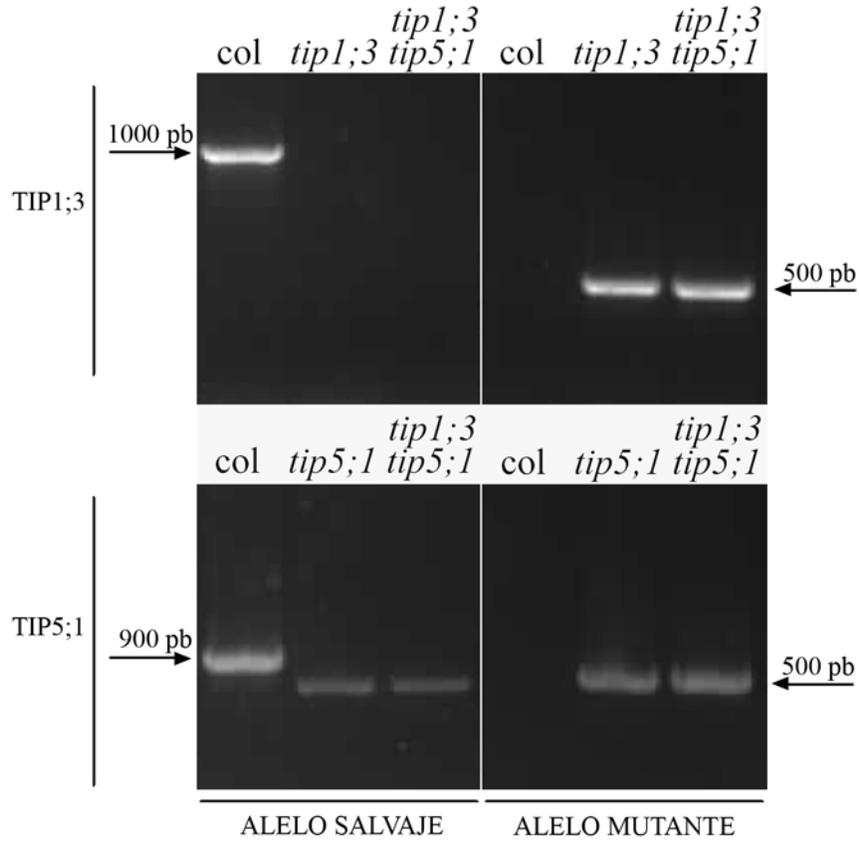


Figura 37: Genotipificación de las plantas mutantes por PCR específicas.

Las flechas señalan los productos de PCR.

col: Columbia salvaje. En itálica se marcan los genotipos homocigotas mutantes.

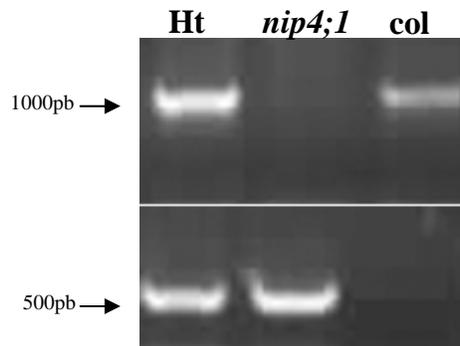


Figura 38: Genotipificación de las plantas mutantes *nip4;1* por PCR específicas.

Las flechas señalan los productos de PCR. Ht: heterocigoto.

En itálica se marcan los genotipos homocigotos mutantes.

El panel superior corresponde al alelo salvaje. El panel inferior corresponde al alelo mutante.

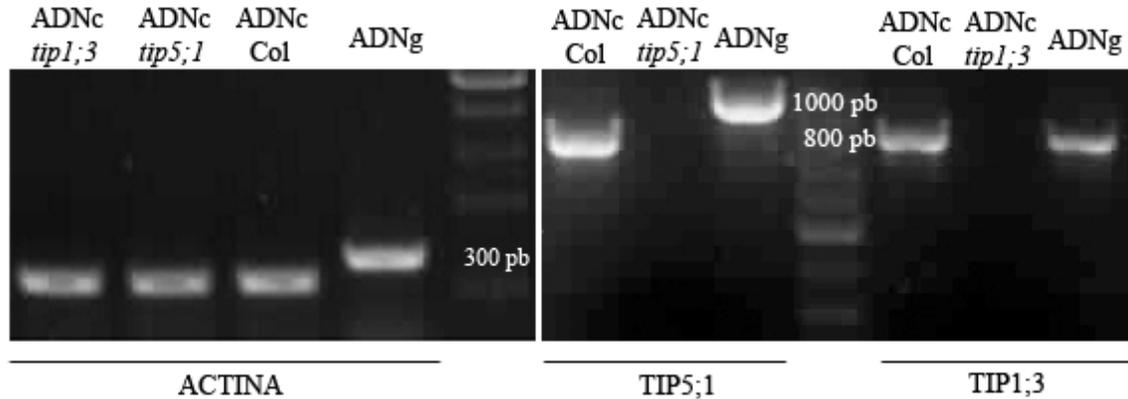


Figura 39: RT-PCR específica para ACTINA, TIP5;1 Y TIP1;3.

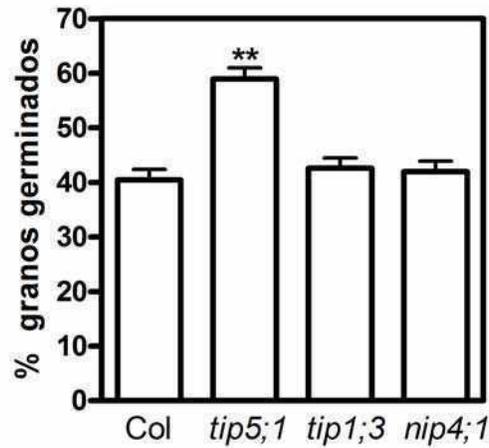
Se incluyó ADN genómico como control.

#### Caracterización funcional *in vitro* de las acuaporinas de polen.

Utilizando las plantas homocigotas simples mutantes, quisimos estudiar si las acuaporinas de polen están involucradas en procesos relativos a la polinización y/o reproducción. Para ello se comparó el fenotipo del polen mutante con el de plantas salvajes durante todo el desarrollo. Cuando se evaluó la capacidad de hidratación del grano de polen ninguna de las líneas mutantes mostró falla en este punto, ni en el tamaño del grano alcanzado ni el tiempo que toma completar la hidratación (datos no mostrados). Así mismo, tampoco se evidenciaron diferencias en la deshidratación que lleva a la madurez del grano (datos no mostrados). A continuación, utilizando medios de cultivo adecuados y condiciones controladas de luz; temperatura y humedad se evaluó la capacidad de germinación *in vitro* de los granos de polen provenientes de las plantas mutantes y se los comparó con la eficiencia de germinación del polen salvaje. Luego, se tomaron muestras que se analizaron bajo microscopio óptico, se obtuvieron 10 fotos al azar por muestra y sobre ellas se calculó el porcentaje de germinación y la longitud alcanzada por los tubos polínicos. Todos los ensayos de germinación y elongación *in vitro* se llevaron a cabo del mismo modo (ver metodología) solamente se varió el medio en que se incubó al polen y en algunos casos los tiempos.

En los ensayos de germinación en los que el polen fue incubado por cuatro horas en un medio que denominamos estándar (0,01% ácido bórico; 1mM MgSO<sub>4</sub>; 2 mM CaNO<sub>3</sub>; 18% sacarosa pH 6,5) (ver metodología), no se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de germinación de las mutantes nulas *tip1;3* y *nip4;1* comparadas con las plantas salvajes. En cambio, cuando se analizó el polen de las plantas homocigotas mutantes para *tip5;1* se

encontraron diferencias significativas, resultando que los granos de polen carentes de la proteína *AtTIP5;1* muestran un mayor porcentaje de germinación que los granos de polen salvajes (Figura 40). Este resultado sugiere que *AtTIP5;1* estaría de alguna manera involucrada en la germinación del polen.



**Figura 40: Efecto del genotipo sobre la germinación de los granos de polen.**

Los datos se expresan como media ± S.E.M (n = 9). La significancia de las diferencias se evaluó con t-test y se indican con asteriscos (\*\* p < 0.01).

Luego, para abordar el estudio de la participación de las acuaporinas de polen en los mecanismos que controlan la elongación del tubo polínico, se decidió evaluar como parámetro la longitud alcanzada por los tubos polínicos luego de cuatro horas de incubación en el medio estándar. Los resultados de la figura 41 muestran que los tubos de las plantas mutantes *tip1;3* son significativamente más cortos que los tubos de las plantas salvajes o mutantes para cualquier otra de las dos acuaporinas de polen.

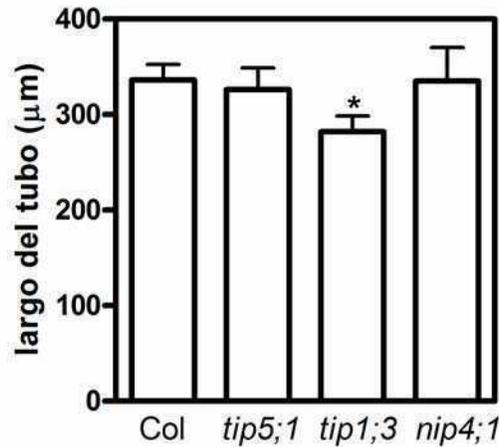
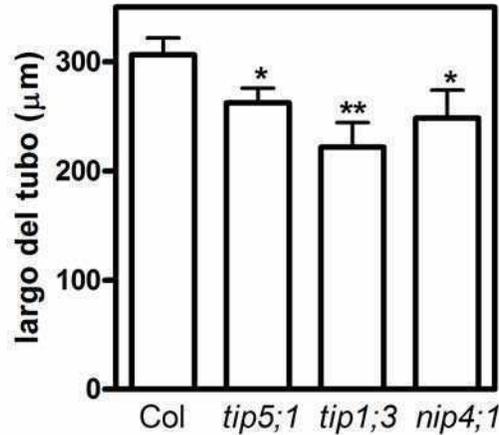


Figura 41: Efecto del genotipo sobre la elongación del polen en medio estándar.

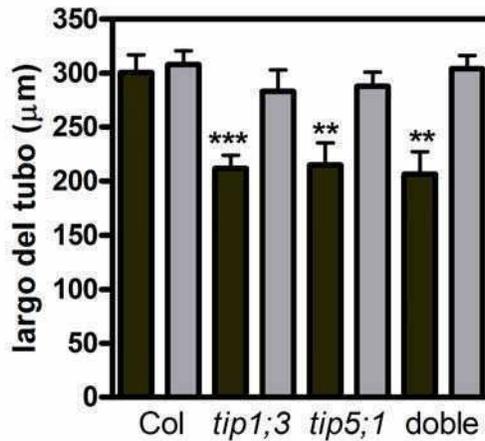
Los datos se expresan como media  $\pm$  S.E.M (n = 9). La significancia de las diferencias se evaluó con *t-test* y se indican con asteriscos (\*  $p < 0.05$ ).

Nos pareció interesante, considerando que *AtTIP5;1* y *AtTIP1;3* mostraron transportar urea en los experimentos de *Xenopus*, estudiar el efecto de los compuestos nitrogenados en la elongación del tubo. Así, se repitió el mismo procedimiento pero la incubación de los granos de polen se hizo en un medio estándar pero carente de toda fuente de nitrógeno. Las mediciones tomadas se graficaron en la figura 42. Aquí, se observa que los tres genotipos de plantas mutantes nulas mostraron tubos significativamente más cortos que lo observado para plantas salvajes. Estos resultados sugieren que las tres acuaporinas pueden estar involucradas en la elongación del tubo polínico cuando las condiciones de nitrógeno son limitantes.



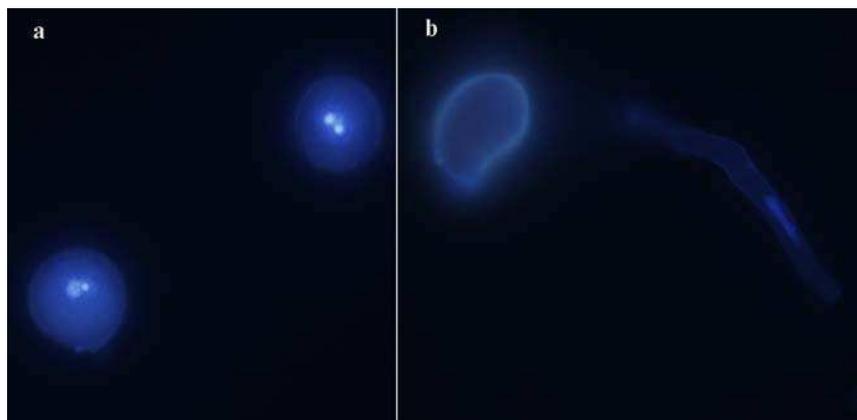
**Figura 42: Efecto del genotipo sobre la elongación del polen en medio estándar sin fuente de nitrógeno.**  
 Los datos se expresan como media  $\pm$  S.E.M (n = 9). La significancia de las diferencias se evaluó con t-test y se indican con asteriscos (\*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ).

Teniendo en cuenta las consideraciones mencionadas previamente en la tesis, sobre la posible redundancia génica entre ambos TIPs consideramos necesario continuar la caracterización trabajando con plantas dobles mutantes. Con tal objetivo generamos por cruzamiento manual y asistencia de PCR específica para la genotipificación, homocigotos dobles mutantes *tip5;1;tip1;3*. Para discernir si existe una relación directa entre la fuente de nitrógeno y la actividad funcional de estas proteínas en condiciones *in vitro*, decidimos repetir los experimentos anteriores en presencia y ausencia de fuente de nitrógeno en forma simultánea para poder comparar todos los datos. Los resultados se muestran en la figura 43 donde se observa que ambas mutantes individuales muestran mayor dificultad en la elongación del tubo polínico cuando son germinadas en condición de “hambre” de nitrógeno (este mismo comportamiento puede observarse en la figura 42). Esta dificultad para crecer en ausencia de fuente de nitrógeno no se evidencia en plantas salvajes. Estas observaciones sugieren fuertemente que ambas acuaporinas están involucradas en la ruta metabólica del nitrógeno intracelular o reciclado de nitrógeno durante la elongación del tubo polínico. Ambas acuaporinas están involucradas en forma indirecta con la elongación del tubo y su rol se pondría de manifiesto sólo en ciertas condiciones de estrés, como por ejemplo la de ausencia de nitrógeno. Finalmente, es importante resaltar que la acción de ambas acuaporinas no parece ser sinérgica al no incrementarse el efecto en la homocigota doble mutante.



**Figura 43:** Efecto del nitrógeno en la elongación del polen en los distintos genotipos. Las barras claras corresponden a los datos obtenidos en condiciones de crecimiento en el medio estándar y las barras oscuras corresponden a los datos obtenidos en el medio estándar pero en ausencia de fuente de nitrógeno. Los datos se expresan como media  $\pm$  S.E.M (n = 15). La significancia de las diferencias se evaluó con ANOVA y contrastes Bonferroni. Los asteriscos indican \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ .

A continuación, considerando la elevada expresión que *AtTIP5;1* muestra en los microarreglos de células espermáticas, decidimos visualizar si los núcleos de las plantas mutantes para dicho gen mostraban alguna peculiaridad, considerando que en los mismos *AtTIP5;1* no se encontraría presente. No se encontraron peculiaridades apreciables en la forma, ni en el tamaño de los núcleos cuando se compararon granos de polen y granos de polen germinados. Tampoco se observó dificultad en las células espermáticas de ninguna planta mutante en migrar hacia el ápice del tubo. En la figura 44 se observan los núcleos de los granos de polen y tubo polínico de una planta salvaje.



**Figura 44:** Tinción de núcleos de polen de plantas salvajes con DAPI. a) observación de granos de polen maduro. b) observación de tubos polínicos.

En la Figura 45 se observan los núcleos de los tubos polínicos de las diferentes plantas mutantes.

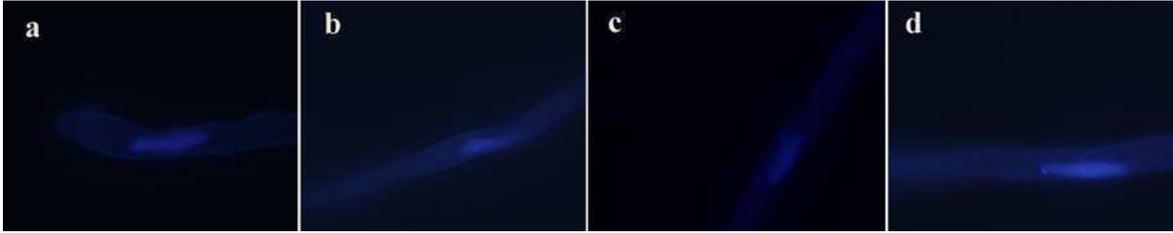


Figura 45: Tinción de núcleos de tubos polínicos de plantas salvajes y mutantes de acuaporinas de polen con DAPI. a) planta salvaje. b) *tip5;1*. c) *tip1;3*. d) *nip4;1*.

### Caracterización fisiológica de las acuaporinas de polen *in planta*.

La posibilidad de obtener homocigotos mutantes simples para los tres genes de acuaporinas de polen no significa que dichos genes no sean importantes para la reproducción ya que puede ocurrir que, aunque la falta de expresión de cada acuaporina en forma individual no convierta al grano de polen en estéril, alguna de las variables fisiológicas asociadas a la reproducción se vea afectada de alguna manera. Para evaluar la fertilidad de las plantas mutantes, se tomó como estimador de la capacidad de dejar descendencia el número de semillas por silicua. No se evaluó el número total de semillas, ya que éste se encuentra muy modificado por las condiciones de crecimiento y resulta ser muy variable. Los resultados se muestran en la figura 46, en donde se observa el mayor número de semillas por vaina en las plantas salvajes y se aprecia una disminución significativa, del 20%, en el número de semillas por vaina de la mutante *nip4;1*. De esta forma se ha encontrado que la ausencia de *AtNIP4;1* reduce en forma significativa la fertilidad de *Arabidopsis* sin transformarla en una planta estéril.

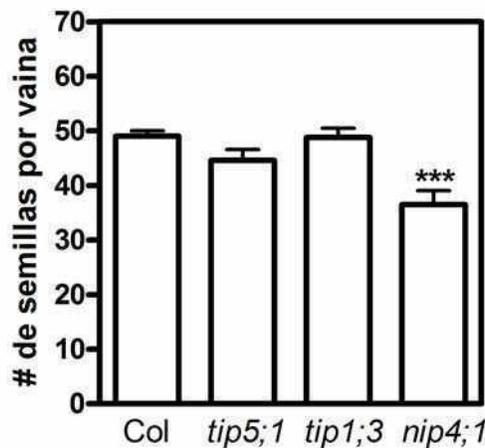


Figura 46: Efecto del genotipo sobre el número de semillas por vaina.

Los datos se expresan como media  $\pm$  S.E.M (n = 14- 20). La significancia de las diferencias se evaluó por ANOVA y contrastes Tukey. Las diferencias significativas se indican con asteriscos (\*\*\*)  $p < 0.001$ .

También se evaluó la descendencia genética de los mutantes simples *tip1;3* y *tip5;1*. En la Tabla V se observa que los resultados obtenidos son los esperados de acuerdo a la segregación mendeliana. Estos resultados indican que la ausencia de las acuaporinas TIP1;3 y TIP5;1 en forma individual no genera una disminución en la fertilidad.

Autocruza	# progenie	Genotipos		
		+/+	+/-	-/-
Esperado		25%	50%	25%
Tip1;3 +/-	150	24% (n.s)	48% (n.s)	28% (n.s)
Tip5;1 +/-	205	23% (n.s)	51% (n.s)	26% (n.s)

**Tabla V: Herencia en plantas mutantes *tip1;3* y *tip5;1*. Las diferencias significativas fueron evaluadas utilizando  $\chi^2$ . n.s: diferencia no significativa.**

Teniendo en cuenta las consideraciones mencionadas previamente en la tesis, sobre la redundancia génica, es menester trabajar con mutantes múltiples para poder continuar la caracterización y evaluar si la ausencia de acuaporinas en el polen provoca su esterilidad.

### **Rol de *AtTIP5;1* en el metabolismo del nitrógeno en polen de *Arabidopsis*.**

Considerando la peculiar localización subcelular de *AtTIP5;1*, en mitocondrias de polen. Nos resultó interesante continuar investigando centrándonos específicamente en *AtTIP5;1*.

Teniendo en cuenta los datos obtenidos sobre la funcionalidad de *AtTIP5;1* como transportador de agua y de urea en un sistema heterólogo. Además de la dificultad de las mutantes de inserción *tip5;1* de elongar los tubos polínicos en ausencia de nitrógeno. Decidimos entonces ahondar en los conocimientos del reciclado de nitrógeno en polen maduro.

En el metabolismo de la urea en plantas, existen tres enzimas claves: arginasa, glutamino sintetasa y ureasa (Kojima *et al.*, 2006). Comenzamos realizando una búsqueda bibliográfica para conocer el estado del conocimiento del reciclado de la urea en polen. Encontramos datos reportados solamente para arginasas: ARGAH1 (At4g08900) y ARGAH2 (At4g08870) son los únicos dos loci codificantes para estas arginasas en *Arabidopsis* que se encuentran expresados, aunque en un nivel indetectable en microarreglos de polen, pero funcionalmente activos en mitocondrias de polen maduro (Brownfield *et al.*, 2008; Flores *et al.*, 2008). Seguidamente, llevamos a cabo una búsqueda *in silico* para analizar la expresión de las otras dos enzimas claves, glutamino sintetasa y ureasa. Para ello, utilizamos el *software eFP Browser* (Wintter *et al.*, 2007). Esta tecnología bioinformática evalúa la presencia o

expresión de un gen en relación a su expresión en otros tejidos en los que es funcionalmente activo a partir de toda la información disponible, lo cual brinda la ventaja de detectar genes que a pesar de no tener necesariamente una alta expresión son funcionales.

Nombre	Locus	Tejido de mayor expresión	Señal	Señal en polen	eFP Browser
<b>glutamina sintetasa</b>					
GLN1;5	At1g48470	Semilla seca	1726.7	406.46	+
GLN1;2	At1g66200	Estambres	2807	19.23	-
GLN1;3	At3g17820	Estambres	1850	486	+
GLN1;4	At5g16570	Hoja	1003	15.55	-
GLN1;1	At5g37600	Hoja senescente	3243.06	4.25	-
<b>ureasa y co-enzimas</b>					
ureasa	At1g67550	Hoja senescente	66.78	15.81	+
ureF	At1g21840	Ubicua	83.48	61.68	+
ureG	At2g34470	semilla	580	14.95	-

**Tabla VI: Expresión de enzimas claves en el reciclado del nitrógeno en polen de Arabidopsis. Herencia en plantas mutantes tip1;3 y tip5;1.+:presencia; -:ausencia.**

En la Tabla VI se muestran los miembros de las dos familias enzimáticas claves en el metabolismo del nitrógeno, expresadas en polen maduro. Dos de los 5 loci que codifican para glutamino sintetasa sólo GLN1;5 y GLN1;3 se expresarían en polen maduro. Con respecto a la ureasa, considerada en la literatura como una enzima de baja expresión pero ubicua, encontramos que a pesar de su baja señal en los microarreglos, según el software se encontraría presente en polen. Para comprobarlo se realizó una RT-PCR de polen salvaje seguida de secuenciación de la banda obtenida (Figura 47). La secuencia obtenida correspondió a la del gen de la ureasa, confirmando así que dicho gen se expresa en polen de Arabidopsis.

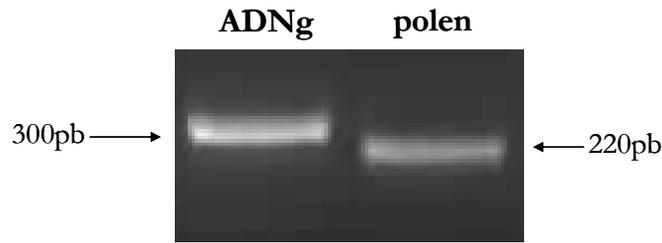


Figura 47: RT-PCR específica para ureasa. Como control se utilizó ADN genómico.

Los estados aumentados de reciclado de nitrógeno están caracterizados por aumentos en la actividad citosólica de las glutamino sintetasas, probablemente como prerequisite de generación y re-fijado de nitrógeno de la urea (Masclaux *et al.*, 2000; Witte *et al.*, 2002; Kojima *et al.*, 2006). Como parámetro indicador de la actividad de reciclado de nitrógeno evaluamos mediante RT-PCR en tiempo real los niveles de expresión de GLN1;5, con alta expresión en polen maduro de acuerdo al microarreglos. La figura 48 muestra la estimación de la expresión diferencial de GLN1;5 en polen salvaje y mutante *tip5;1*. La cuantificación evidencia una disminución de un 87% de la expresión de GLN1;5 en el polen mutante. En condiciones salvajes del polen se generaría un *feed back* positivo entre el reciclaje activo de nitrógeno y la expresión elevada de GLN1;5. De acuerdo a esto, la evidencia de metabolismo de nitrógeno disminuido en polen carente de *tip5;1* apoya la hipótesis de que TIP5;1 estaría involucrada en el reciclado del nitrógeno en polen maduro de Arabidopsis lo cual se pone en evidencia en este experimento como una disminución en la expresión de GLN1;5.

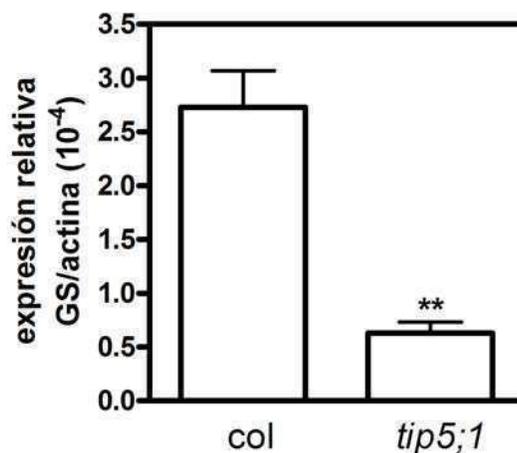
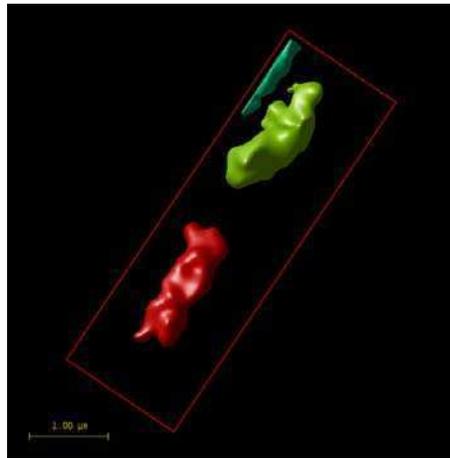


Figura 48: Análisis de la expresión diferencial de GLN1;5 en polen salvaje y mutante *tip5;1* por RT-PCR en tiempo real. Se realizaron tres experimentos independientes.

Como última aproximación para caracterizar el papel de TIP5;1 en el metabolismo del nitrógeno en mitocondrias de polen maduro, realizamos una observación volumétrica de las mitocondrias presentes en los tubos polínicos de plantas salvajes y homocigotas mutantes de *tip5;1*. Los experimentos fueron llevados a cabo en medios de germinación con y sin fuente de nitrógeno. Como las técnicas de microscopía confocal de fluorescencia y microscopía electrónica presentan numerosas desventajas para medir volumen mitocondrial (revisado en Kaasik *et al.*, 2007) utilizamos una aproximación que combina microscopía electrónica con análisis en 3D por deconvolución de imágenes de manera de evaluar los cambios volumétricos en forma más precisa (Safiulina *et al.*, 2006). En la Figura 49 se muestra una imagen en 3D de mitocondrias salvajes de polen de *Arabidopsis* deconvolucionadas.



**Figura 49: Imágenes de mitocondrias de polen salvaje tomadas por microscopía confocal y deconvolucionadas.**

Cuando comparamos los volúmenes mitocondriales se observó una disminución del volumen mitocondrial del 40% en los tubos polínicos de las plantas mutantes *tip5;1* comparados con los salvajes, cuando se los germina en un medio con nitrógeno (Figura 50). Cuando los granos de polen fueron germinados en ausencia de nitrógeno en el medio, la disminución del volumen mitocondrial fue incluso mayor cercano a un 80% (Figura 51).

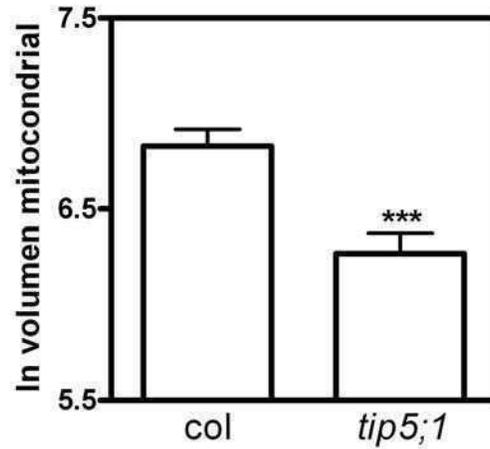


Figura 50: Efecto del genotipo en el volumen de las mitocondrias de polen en presencia de fuente de nitrógeno en el medio. Los datos fueron transformados para lograr homocedacea. Los datos se expresan como media  $\pm$  S.E.M. La significancia de las diferencias se evaluó con t-test y se indican con asteriscos (\*\*\*)  $p < 0.001$ .

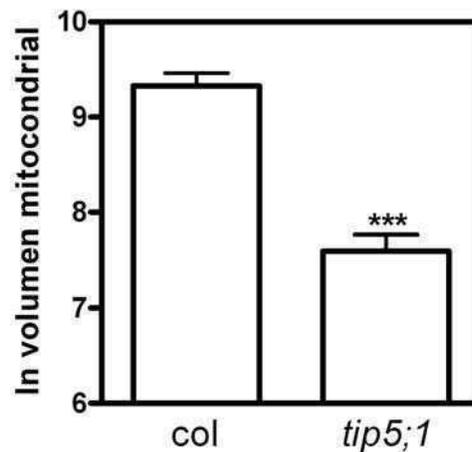


Figura 51: Efecto del genotipo en el volumen de las mitocondrias de polen en ausencia de fuente de nitrógeno en el medio. Los datos fueron transformados para lograr homocedacea. Los datos se expresan como media  $\pm$  S.E.M. La significancia de las diferencias se evaluó con t-test y se indican con asteriscos (\*\*\*)  $p < 0.001$ .

El impedimento estérico del *swelling* mitocondrial puede tener una serie de repercusiones en distintas y múltiples funciones celulares, como ser el movimiento de la mitocondria a su lugar de

destino celular en donde se requiere síntesis de ATP. Considerando que en este medio de germinación los tubos mutantes tienen disminuida su posibilidad de elongación, una posibilidad por lo menos para *tip5;1* es que la dificultad en la elongación tenga un origen energético mediada por la mitocondria.

## Discusión

En esta tesis llevamos a cabo la caracterización de las proteínas del tipo acuaporinas expresadas específicamente en polen maduro de *Arabidopsis thaliana*.

En la primera parte de este trabajo de tesis, hemos realizado un análisis informático de la familia de las acuaporinas (MIP), del transcriptoma de polen y de la conjunción de ambos.

En cuanto a la caracterización de la familia proteica MIP, hemos visto cómo las características estructurales de 6 pasos transmembrana y la presencia de motivos conservados NPA son las que definen a los miembros de la familia acuaporina. Esta agrupación es válida considerando que se analizan zonas altamente conservadas en la secuencia proteica y por lo tanto sugieren una funcionalidad en común que por supuesto debe probarse experimentalmente. Cuando decimos que estos motivos son alta o plenamente conservados, nos referimos a que se encuentran prácticamente sin excepciones en todas las acuaporinas de una especie y que se mantienen presentes en los distintos reinos: microbios, plantas y animales.

Por otro lado, continuando con el mismo análisis, hemos encontrado que en la literatura se ha tratado sin la debida rigurosidad el hecho de formar parte de la familia proteica de acuaporinas y de las proteínas homólogas. Así encontramos que se han agrupado los miembros de las acuaporinas utilizando árboles filogenéticos, los cuales son herramientas muy útiles para contar la historia de un gen o proteína pero solo tienen validez cuando se cumplen los supuestos necesarios. Esto es, los árboles filogenéticos pueden realizarse solamente con proteínas que compartan un ancestro en común es decir que sean homólogas. Como explicáramos en resultados no podemos decir que todas las acuaporinas son homólogas entre sí ni confeccionar un árbol que las agrupe a todas, pero sí son válidos siguiendo los mismos criterios, los árboles individuales para cada subfamilia de MIPs: PIPs; TIPs; NIPs y SIPs. Los resultados de los árboles filogenéticos individuales que realizamos, ponen de manifiesto la inexistencia de los dos *clusters* de PIPs, ya que se observa que si bien los miembros de PIP1 forman un *cluster* con un valor de *bootstrap* de 100, las PIP2 no constituyen en realidad un grupo sólido (y por lo tanto no tienen valor de *bootstrap*) sino que se agrupan solamente por diferenciarse de las PIP1. Para el caso de la subfamilia TIP y NIP la situación es similar, pero a diferencia de la subfamilia PIP, en estos casos sí se nombraron los distintos grupos en congruencia con *clusters* reales.

Luego analizamos el perfil transcripcional de las 35 acuaporinas de *Arabidopsis thaliana* con especial interés en el desarrollo del polen. Encontramos que solamente tres genes de acuaporinas se expresan específicamente en polen maduro: *AtTIP5;1* (At3g47440), *AtTIP1;3* (At4g01470) y

*AtNIP4;1* (At5g37810). Las secuencias nucleotídicas de los tres genes eran ya conocidas gracias a que *Arabidopsis* tiene el genoma secuenciado completamente (*Arabidopsis-Genome-Initiative*, 2000). Sin embargo *AtTIP5;1*, *AtTIP1;3* y *AtNIP4;1* fueron clonadas y estudiadas por primera vez en esta tesis. Hemos visto que los perfiles transcripcionales de las tres acuaporinas de polen en plantas salvajes son diferentes. Esta apreciación sugiere que los roles de las acuaporinas no serían redundantes, de todas formas como discutiremos más adelante, hemos encontrado algunas evidencias que podrían indicar lo contrario. En nuestro análisis comparativo de la familia de las acuaporinas en polen comparados con otros tipos celulares simples se confirmó la naturaleza represiva y específica del perfil transcripcional del polen maduro. También se destacó que el grano de polen es el único tejido de *Arabidopsis* en donde no se encuentra expresado ningún miembro de la subfamilia PIP.

En este contexto es interesante comentar otro aspecto relacionado con la nomenclatura de esta familia proteica. Como hemos mencionado previamente las acuaporinas de plantas se dividen en cuatro subfamilias: PIPs proteínas intrínsecas de membrana plasmática, TIPs proteínas intrínsecas de tonoplasto; NIPs proteínas similares a Nod26 asociadas originalmente a membranas peribacteroidales y SIPs proteínas intrínsecas pequeñas. Esta nomenclatura no tan precisa, como hemos detallado en resultados, puede llevar a confusiones. Tomando el caso particular del polen podemos ver que al mencionar que en este tejido maduro y/o germinado no se expresa ningún miembro de la subfamilia PIP, esto sugeriría que no se expresan proteínas del tipo acuaporina en la membrana plasmática del polen. Sin embargo recientemente se han caracterizado dos miembros de la subfamilia NIP de *Arabidopsis*, NIP1;1 (Kamiya et al., 2009) y NIP5;1 (Kamiya et al., 2008) con localización en membrana plasmática; la mayor parte de los otros miembros de esta subfamilia no han sido caracterizados aún en cuanto a su localización. Particularmente NIP4;1 único miembro expresado en polen y con un notable aumento de expresión en polen germinado, no tiene su localización confirmada; sin embargo los datos obtenidos en esta tesis *in silico*, sugieren que podría localizar en la membrana plasmática del polen (Figura 24). Más aún, considerando la disminución en la fertilidad de las mutantes nulas para este gen resulta muy atractivo hipotetizar que NIP4;1 podría ser una acuaporina de membrana plasmática de polen asociada, de alguna manera, a los procesos de fertilización. Resulta muy interesante continuar con la caracterización de este gen para evaluar el mecanismo por el cuál ocurre esta disminución de la fertilidad. ¿Tiene que ver directamente con una dificultad en la elongación por la regulación de la entrada y/o salida de agua? ¿Está relacionado a la fusión del gametofito masculino con el femenino? Estudiar la localización de la proteína NIP4;1 de la misma manera que hicimos con las dos TIPs es esencial para comenzar a responder estos interrogantes.

Antes de continuar con nuestro análisis consideramos necesario detenernos en la redundancia genética, un fenómeno común que caracteriza a los genomas de plantas. Esto ha sido muy estudiado en *Arabidopsis* a partir del genoma completamente secuenciado. A la redundancia genética se le atribuye en general la ausencia de fenotipo en la mayoría de los mutantes pérdida de función de plantas (Briggs *et al.*, 2006). En los genomas vegetales es muy usual encontrar familias génicas con muchos miembros y alta identidad de secuencia entre los genes homólogos sugiriendo redundancia funcional. Una de las razones predominantes que explica, por ejemplo en *Arabidopsis*, el alto número de genes homólogos es la duplicación de largos segmentos de los cromosomas que ocurrió durante la evolución (Martinoia *et al.*, 2002). El 58% del genoma de *Arabidopsis thaliana* se encuentra duplicado posiblemente debido a eventos de duplicación parcial (*Arabidopsis Genome Initiative*, 2000). Algunos ejemplos de estas familias son los transportadores ABC que juegan un rol protagónico en el crecimiento de las plantas y procesos relacionados al desarrollo (Martinoia *et al.*, 2002), los genes involucrados en la biosíntesis de las auxinas (Cohen *et al.*, 2003) y receptores de ABA (Park *et al.*, 2009) entre otros. Las acuaporinas, con 35 miembros en el genoma de *Arabidopsis* y alta identidad de secuencia entre los miembros de cada subfamilia, se convierten en candidatas a sufrir redundancia funcional y por lo tanto a enmascararse los fenotipos asociados a las ausencias de función de cada gen en forma individual.

Continuando con nuestro estudio *in silico*, decidimos comparar los datos transcripcionales de las acuaporinas expresadas en el desarrollo del polen con la gametogénesis masculina en mamíferos. Como ya hemos mencionado en la introducción, los animales (particularmente los mamíferos) tienen en su genoma 13 genes que codifican para acuaporinas, mientras que en las plantas existen alrededor de 35 genes de acuaporinas. Sin embargo cuando nos enfocamos en la línea germinal masculina encontramos que sólo se expresan 4 de las 13 acuaporinas de mamíferos (31%); mientras que en *Arabidopsis*, solamente 6 de los 35 genes (17%) se expresan en el desarrollo del polen. Otra diferencia importante es que mientras en polen encontramos 3 acuaporinas específicas de este tejido, en los espermatozoides no se encuentra ninguna en forma específica. Concluimos entonces que el perfil transcripcional de las acuaporinas de la línea germinal masculina de animales, no presenta las características distintivas de “represivo y específico” que discutimos previamente para polen.

De las cuatro acuaporinas expresadas durante la gametogénesis masculina de mamíferos, dos son acuaporinas ortodoxas AQP1 (Lu Danyu *et al.*, 2008) y AQP8 (Tani *et al.*, 2001); las dos restantes son acuaglicerolporinas AQP7 (Ishibashi *et al.*, 1997) y AQP9 (Ishibashi *et al.*, 1998). Para todas se encuentran datos funcionales de ratones *knock out*. Por ejemplo, los mutantes *aqp1* tienen problemas en otros tejidos donde se expresa pero no se encontró ningún fenotipo en testículos, a

pesar de que por su función en reabsorción de agua se había postulado un rol importante en la reproducción y maduración de la línea germinal masculina (Lu Danyu *et al.*, 2008). La proteína AQP8 se localiza en muchos tejidos y particularmente se detectó en las células de Sertoli de los testículos, las cuales se encargan de la secreción de factores involucrados en el cuidado, alimento y protección de los espermatozoides; AQP8 también se expresa en el epitelio germinativo donde maduran los espermatozoides secundarios y las células espermáticas (Tani *et al.*, 2001). Los ratones *aqp8 knock out* no mostraron ningún parámetro de fertilidad disminuido, solamente se observó que los testículos exhiben mayor tamaño (Yang *et al.*, 2005). AQP9 es una acuagliceroporina de testículos que transporta agua y urea pero no glicerol (Ishibashi *et al.*, 1998); los animales *aqp9 knock out* no presentaron en testículos ningún fenotipo aberrante. Finalmente, la acuaglicerolporina AQP7 que transporta agua, glicerol, amonio y urea, se expresa en testículos, túbulos seminíferos y es la única acuaporina expresada en células espermáticas y espermatozoides (Ishibashi *et al.*, 1997). Los ratones *aqp7 knock out* no presentaron ningún fenotipo asociado a la fertilidad (Sohara *et al.*, 2007); sin embargo, ensayos clínicos demostraron que los espermatozoides de los hombres estériles con los que se trabajó no expresan AQP7 (Saito, 2004). Esta información debe tenerse muy en cuenta en el momento de tratar de dilucidar el rol fisiológico de una acuaporina utilizando organismos homocigotos mutantes, ya que puede llevarnos como en este último caso, a conclusiones erróneas por analizar el sistema en forma simplificada. Esto es, gran parte de los organismos *knock out* para acuaporinas no evidenció un fenotipo aberrante en el tejido en donde se expresa la acuaporina (ver tablas en resultados). Esto no necesariamente implica que la acuaporina no posea un rol fisiológico importante sino que de alguna forma, ya sea por redundancia génica o de mecanismos de acción, el organismo logra compensar esta falla ofreciendo un balance fisiológico que se manifiesta como fenotipo normal. Así, solamente en los casos en los que el organismo está enfermo y no logra compensarse, se evidencian de forma más clara algunos roles funcionales. Un ejemplo de esto se manifiesta en la ausencia de NIP5;1 en raíz de Arabidopsis en las cuales solamente se evidencia una dificultad en el crecimiento de la raíz cuando las plantas crecen en bajas concentraciones de boro (Takano *et al.*, 2006). Algo similar ocurre en el caso de las mutantes nulas para *AtTIP5;1* en las que solamente se evidencia una disminución en la elongación del tubo polínico comparado con el salvaje, cuando se encuentra en condiciones desfavorables tales como ausencia de nitrógeno en el medio (Figuras 40, 41 y 42). En este contexto, es interesante destacar que tanto en las células espermáticas de mamíferos como en las de Arabidopsis solamente se expresa una acuaporina, AQP7 y *AtTIP5;1* respectivamente. A pesar de ser las únicas acuaporinas de las células espermáticas, tanto las plantas homocigotas mutantes obtenidas en esta tesis como los ratones *knock out aqp7* mencionados previamente, no tienen disminuido ningún parámetro de fertilidad.

En cuanto a los resultados del transcriptoma de células espermáticas, es importante tener en cuenta que *AtTIP5;1* no sólo es el único gen de acuaporina que se expresa, sino que es el gen que más se expresa en todo el microarreglo. Esta evidencia nos generó una duda en cuanto a la expresión de esta proteína: ¿Se expresa *AtTIP5;1* en la célula vegetativa del polen? ¿O la expresión en el grano de polen es producto de su expresión en las células espermáticas? Para responder estas preguntas, sería muy útil estudiar el promotor de esta acuaporina. De todas formas, los experimentos que comparan el volumen mitocondrial de polen *tip5;1* con el de polen salvaje sugieren que *AtTIP5;1* se expresa tanto en la célula vegetativa como en las espermáticas ya que las mitocondrias del tubo polínico son más pequeñas que las del polen salvaje (Figuras 50 y 51).

Como primera aproximación experimental para caracterizar funcionalmente las acuaporinas de polen, estudiamos su actividad de transporte en el sistema heterólogo más utilizado para tal fin, la expresión en ovocitos de *Xenopus laevis*. Encontramos que *AtTIP5;1*, *AtTIP1;3* y *AtNIP4;1* tienen actividad de transportador de agua. Por otro lado *AtTIP5;1* y *AtTIP1;3* son acuaporinas capaces de transportar urea en forma específica mientras que, *AtNIP4;1* no parecería ser un transportador de urea. Interesantemente ninguna de las tres acuaporinas estudiadas resultó ser capaz de transportar ácido bórico, aunque este soluto es esencial para la elongación del tubo polínico. Luego analizamos distintos posibles mecanismos de regulación de acuaporinas previamente descritos y no encontramos variación en la actividad de transporte de agua ni por fosforilación ni por heterotetramerización. Finalmente, a pesar de existir reportes que sugieren que los miembros de la subfamilia TIP no son regulables por pH como se reportó para algunos miembros del grupo PIP (Liu *et al.*, 2003, Tournaire-Roux *et al.*, 2003) decidimos evaluar que ocurría para *AtTIP5;1* y *AtTIP1;3*. Nuestros resultados demuestran que *AtTIP5;1* es el único miembro de la subfamilia TIP de *Arabidopsis* regulable por pH. En el caso de las PIPs regulables por pH, el cambio de un residuo histidina del *loop D* (posición 196) por alanina o ácido aspártico revirtió la sensibilidad a pH interno (Tournaire-Roux *et al.*, 2003). Posteriormente otro grupo de trabajo, demostró que protoplastos de levaduras expresando PIPs de tabaco en su forma salvaje mostraban un patrón de permeabilidad al agua que decrecía con el cambio en el pH citoplasmático (Matthias, *et al.*, 2008). Cuando se reemplazó la histidina 196, se evidenció la pérdida de sensibilidad a pH de estas PIPs. De acuerdo a nuestros resultados, *AtTIP5;1* es sensible a cambios de pH del medio externo. En esta tesis detectamos a la histidina 131 como un posible residuo sensor de pH y luego investigamos su rol a través de la caracterización de los efectos que genera la sustitución de este residuo. Cuando se reemplazó His131 por aspartato, un residuo cargado negativamente, el perfil de sensibilidad a pH se modificó pero no en forma significativa. En cambio cuando His131 se reemplazó con alanina, un

residuo pequeño, no polar y no capaz de formar puentes de hidrógeno, la actividad acuaporina de *AtTIP5;1* perdió su dependencia con el pH. Estos resultados son similares a los encontrados en el transportador (antiporter) *NhaA* (Rimon *et al.*, 1995). De los resultados, proponemos que al igual que en el transportador *NhaA*: la polaridad, la habilidad de formar puentes de hidrógeno o ambos factores son esenciales en la activación-inactivación de *AtTIP5;1* por pH. En la figura 20 postulamos un motivo sensible a pH (o de sensibilidad a pH), que incluye a la histidina 131, conservado entre acuaporinas de plantas regulables por pH. Este motivo, con residuos cargados y polares podría ser importante en el transporte de moléculas cargadas positivamente. En base a los mismos ensayos también es interesante destacar que ambas mutantes H131D y H131A mostraron mayor permeabilidad al agua que *AtTIP5;1* salvaje en las condiciones normales de pH neutro. Esto puede significar que las mutaciones podrían generar cambios conformacionales o en el tamaño del poro, y de esta forma influenciar la actividad de transportadora de *AtTIP5;1*.

#### *¿Cuál es la localización subcelular de las acuaporinas en el polen?*

Conocer la localización de una proteína, a nivel celular y subcelular, es muy importante para dilucidar su papel fisiológico. Por esto una de las aproximaciones de nuestra caracterización consistió en el estudio de la localización subcelular de ambas *TIP1;3* y *TIP5;1*. En este trabajo de tesis encontramos que *AtTIP5;1* localiza en mitocondrias. Para *AtTIP1;3* observamos un patrón de localización restringido a estructuras de endomembranas sin haber podido distinguir específicamente en que estructura u organela localiza. Considerando que la elongación del tubo polínico es un proceso dinámico donde el mismo crece por la fusión de vesículas secretorias a la membrana plasmática del *tip* (punta del tubo) decidimos evaluar si *AtTIP1;3* y *AtTIP5;1* están involucradas en dichos procesos secretorios. Para ello utilizamos una tinción de membranas, FM4-64, que permite visualizar el *trafficking* subcelular que involucra la endocitosis y exocitosis vesicular característica del reciclado de membrana que ocurre durante la elongación del tubo (Parton *et al.*, 2001). Además este reciclado de membranas ha sido reportado para varias acuaporinas de membranas de animales, algunos ejemplos hemos mencionado en introducción. Sin embargo, nuestros resultados experimentales con fusiones a eGFP muestran que ni *AtTIP1;3* ni *AtTIP5;1* se encuentran reguladas por estos mecanismos de reciclaje y en ningún caso llegan a localizar en membrana plasmática (Figura 31, 32 y 33).

A lo largo de esta tesis utilizando distintas aproximaciones informáticas, hemos predicho la localización de *AtTIP5;1* en mitocondrias (Figura 22, 24 y 27). Los experimentos de colocalización con MITOTRACKER confirmaron la localización de *AtTIP5;1* en mitocondrias de polen (Figura 34).

En cuanto a *AtTIP1;3* también se observó una proporción de localización en mitocondrias sugiriendo un rol redundante de las dos TIPs; sin embargo hay que tener en cuenta que gran parte de la fusión eGFP-TIP1;3 no colocalizó en mitocondrias y que esta acuaporina no tiene señal para alcanzar la mitocondria, con lo cual debe considerarse la posibilidad de que sea un efecto de la sobreexpresión. Por lo tanto, la localización de *AtTIP1;3* permanece incierta aún. ¿Dadas sus características funcionales y estructurales, será *AtTIP1;3* una acuaporina que se exprese en alguna estructura de reserva intracelular?

En las figuras 9 y 26 los árboles filogenéticos que hemos realizado para la subfamilia TIP ponen de manifiesto la divergencia de TIP5;1 con respecto a los demás miembros de la subfamilia. Que la historia de esta acuaporina sea la menos común de las TIPs sugiere que su función y/o rol podría ser peculiar. En el año 2004 Wallace y Roberts a través de un estudio de modelado de acuaporinas de plantas postularon que el poro de *AtTIP5;1* es el más ancho de todas las acuaporinas vegetales y animales analizadas. Además, establecieron que de acuerdo a los residuos que integran el filtro de selectividad ar/R sería incapaz de formar puentes de hidrógeno y por lo tanto de transportar moléculas tales como agua y urea pero que no tendría restricciones en cuanto al transporte de moléculas no cargadas de mayor masa. Nuestros resultados experimentales no concuerdan con estas predicciones ya que *AtTIP5;1* es capaz de transportar agua. Sí coinciden con lo reportado para las mutantes generadas a partir de la acuaporina ortodoxa *AtPIP2;1*; las mutaciones en los residuos que definen el filtro ar/R imitan a *AtTIP5;1* y a *AtTIP1;3*. Las construcciones quimeras fueron introducidas en una cepa de levadura incapaz de tomar urea, las levaduras transformadas pudieron crecer sin dificultad en medio selectivo sugiriendo de esta forma que los residuos del filtro de selectividad ar/R son los responsables de la capacidad de transporte de urea de *AtTIP5;1* y *AtTIP1;3* (Dynowski *et al.*, 2008). Igualmente a pesar de la actividad de transporte de agua y urea de *AtTIP5;1*, no podemos descartar su peculiaridad en cuanto a los solutos que es capaz de transportar, ya que al no ser el objetivo de esta tesis los experimentos no han sido realizados.

De todas formas considerando otros resultados obtenidos en nuestro trabajo podemos proponer que *AtTIP5;1* es una acuaporina poco convencional; esto es debido a que no sólo es el único miembro de la subfamilia TIP regulable por pH (Kojima *et al.*, 2006) sino que además es la única acuaporina de plantas (por lo menos de las descritas hasta el momento) que localiza en mitocondrias. Más aún, es el único miembro de esta subfamilia con localización no vacuolar confirmada (revisado en Wudick *et al.*, 2009). En este punto consideramos conveniente aclarar que en animales existen evidencias que sugieren que AQP8 y AQP9 pueden localizar también en mitocondria (revisado en Gena *et al.*, 2009) con lo cual TIP5;1 no sería la única acuaporina mitocondrial. Sin embargo, la

localización mitocondrial de AQP8 y AQP9 es un tema aún controversial entre los diferentes grupos de trabajo involucrados (Yang *et al.*, 2005).

Otro aspecto a tener en cuenta en cuanto al mecanismo de acción de *AtTIP5;1* en polen son los resultados obtenidos de los experimentos de mediciones de volúmenes mitocondriales en los cuales encontramos que las mitocondrias de los tubos polínicos *tip5;1* son un 40% más pequeñas que las mitocondrias de los tubos salvajes. Además hemos observado que estas diferencias se duplican cuando los granos de polen son germinados en ausencia de fuente de nitrógeno en el medio. Estos resultados sugieren que *AtTIP5;1* favorece la entrada de agua a las mitocondrias del polen. De esta forma *AtTIP5;1* estaría involucrado también en mantener o regular la homeostasis del volumen mitocondrial. Esta homeostasis tiene una función *housekeeping* ayudando a mantener los procesos biológicos como la capacidad oxidativa, liberación de citocromo c y señales y el mantenimiento de la integridad de la organela (Gena *et al.*, 2009). Consistentes con los resultados del *swelling* mitocondrial en condiciones restrictivas de nitrógeno, es importante remarcar que el fenotipo de elongación de tubo polínico disminuido en polen *tip5;1* solamente se ponía de manifiesto en ausencia de nitrógeno en el medio de germinación. En este contexto resultaría muy atractivo estudiar nuevamente los parámetros de fertilidad *in vivo* de las plantas carentes de *tip5;1* crecidas en condiciones desfavorables en relación a la fuente externa de nitrógeno.

#### *¿Cuál es el rol de las acuaporinas en el polen?*

En esta tesis se evaluó la fertilidad de las plantas de *Arabidopsis thaliana* mutantes para las únicas tres acuaporinas específicas de polen comparandolas con las plantas salvajes. Desde una aproximación fisiológica evaluamos posibles papeles que pueden jugar *AtTIP5;1*, *AtTIP1;3* y *AtNIP4;1* en los procesos involucrados tanto en el desarrollo del polen como en la fecundación. Primeramente observamos que ninguna de las líneas mutantes presentó morfologías peculiares en los distintos estadios del desarrollo de polen y que todos los granos lograron alcanzar exitosamente la deshidratación requerida para su madurez, con lo cual concluimos que ninguna de las proteínas es esencial para el desarrollo del polen. Luego estudiamos los procesos involucrados en la fecundación. Para ello analizamos la capacidad de hidratarse de los granos de polen mutantes sin encontrar para ningún caso diferencias con los granos salvajes. Seguidamente analizamos la capacidad de germinar de los granos de polen y en este caso no todas las líneas mutantes se comportaron de igual manera. Los granos procedentes de las plantas mutantes nulas *AtTip5;1* mostraron un porcentaje de germinación superior al resto de las líneas incluyendo a las plantas salvajes. Con estos resultados *AtTIP5;1* parece ser la única acuaporina específica de polen involucrada en la germinación tal vez como regulador negativo (Figura 39). Finalmente, evaluamos

la capacidad de elongación de los tubos polínicos de plantas mutantes nulas para las tres acuaporinas de polen. Encontramos que en el medio estándar de germinación de polen solamente los tubos provenientes de las mutantes *tip1;3* resultaron significativamente más cortos que el resto de las líneas incluyendo las plantas salvajes. Cuando se quiso evaluar el efecto de la fuente de nitrógeno en la elongación, eliminando el nitrógeno del medio de germinación, se observó una mayor dificultad en la elongación de todos los tubos polínicos mutantes, siendo los tubos polínicos de la mutante *tip1;3* nuevamente los más afectados. Debe destacarse que de todas maneras los tubos de las plantas mutantes lograron elongarse. De acuerdo a estos datos, las tres acuaporinas de polen parecen estar involucradas en los procesos de elongación del tubo, observándose el efecto más drástico para los tubos mutantes *tip1;3* (Figuras 40, 41 y 42). Sin embargo ninguno de los parámetros de fertilidad evaluados en los experimentos *in vitro*, fueron lo suficientemente drásticos en condiciones naturales para generar plantas estériles masculinas, ya que no sólo se obtuvieron plantas homocigotos mutantes para todas las líneas sino que la descendencia se comportó de acuerdo a lo esperado según la genética mendeliana (Tabla V).

Cuando estudiamos el comportamiento de la elongación del tubo polínico del doble mutante obtenido *tip5;1 tip1;3* encontramos que no se intensificaron los efectos individuales (Figura 43). Las plantas doble homocigotos mutantes fueron obtenidas en la proporción esperada acuerdo a las leyes mendelianas y su descendencia fue fértil, sugiriendo que la ausencia de ambas proteínas tip en el polen no conlleva a la esterilidad de la planta. Teniendo en cuenta lo que hemos discutido sobre la redundancia funcional en plantas, es menester trabajar con mutantes múltiples para poder aseverar si las distintas subfamilias de acuaporinas están relacionadas a la fertilidad del polen o generan plantas estériles. Por lo tanto si bien decidimos comenzar nuestro trabajo de investigación de acuaporinas de polen caracterizando *AtTIP1;3* y *AtTIP5;1*, únicas TIPs expresadas en forma específica en polen, debemos considerar que también *AtTIP1;1* se expresa en polen maduro y por sus características funcionales también podría estar cumpliendo el rol de las TIPs ausentes tanto sea como transportador de agua como de urea (Maurel *et al.*, 1993; Liu *et al.*, 2003).

Debe señalarse por otro lado, que las plantas mutantes *nip4;1* presentaron un número de semillas significativamente menor que las plantas mutantes lo cual es un indicio directo de fertilidad disminuida. Este efecto puede deberse a lo observado *in vitro* o tal vez a otros procesos como por ejemplo la fusión de membrana requerida para la doble fecundación.

Considerando la tan elevada expresión de *AtTIP5;1* en células espermáticas, es extraño pensar que la ausencia de expresión no genere un fenotipo detectable. Sobre todo considerando que es la única acuaporina detectada en los microarreglos específicos. Una posibilidad es que esta acuaporina esté

bajo un efecto de “parental de origen” reportado para el gen SSP cuyos transcriptos se sintetizan en las células espermáticas del polen maduro, sin embargo no se traducen hasta que no llegan al cigoto y endosperma vía célula espermática (Bayer *et al.*, 2009). Esta posibilidad se vuelve más factible si examinamos los experimentos desarrollados en el laboratorio Del Dr. Maurel donde por primera vez se encontró el transcripto TIP5;1 en un tejido no gametofítico. En estos experimentos, los mensajeros de *AtTIP5;1*, *AtTIP3;1* y *AtTIP3;2* se detectaron en semillas secas y su expresión decayó abruptamente en semillas germinadas de dos días (Vander Willigen *et al.*, 2006). En otros microarreglos específicos para semillas no se detectó la expresión de TIP5;1 posiblemente debido a que las semillas se encontraban embebidas en agua, lo cual aparentemente es suficiente para anular la presencia del transcripto. En este contexto, una posibilidad es que *AtTIP5;1* se transcriba tanto en polen como en semilla; aunque también surge como hipótesis que la transcripción de *AtTIP5;1* comienza durante el desarrollo del polen y luego parte del transcripto es transportado a los tejidos de la semilla donde se traduce a proteína, a través de las células espermáticas.

¿Es posible entonces, que la inactivación de proteínas con un rol fisiológico importante, no presenten fenotipos aberrantes? ¿Es una cuestión de redundancia proteica? No es sorprendente, encontrar la ausencia de fenotipo inviable como factor común de la mayoría de las mutantes de acuaporinas. Los procesos que en conjunto dan vida a una planta son complejos y requieren una fina regulación que involucra mucho más de una proteína, incluso redes interconectadas de caminos metabólicos; esto garantiza que los procesos de los que dependen la supervivencia no solo de un individuo sino de una especie, como son los relacionados a la reproducción, se lleven a cabo con éxito aún con la ausencia de expresión de un gen que en condiciones normales de una planta salvaje se encuentra sobreexpresado.

Un ejemplo es el trabajo con plantas mutantes del único transportador de amonio específico de polen de *Arabidopsis AtAMT1;4* los cuales no muestran ningún fenotipo. La explicación que encuentran los investigadores que llevaron a cabo este trabajo, es que puede ser compensado por *AtAMT1;1* otro transportador de amonio expresado en polen pero en menor medida y en forma no específica, o tal vez por transportadores de aminoácidos que pueden proporcionar al polen fuente orgánica de nitrógeno (Yuan *et al.*, 2008). Si se considera la incorporación de fuente externa de nitrógeno como prerequisite esencial para el funcionamiento del polen, no es extraño entonces que la función está llevada a cabo por varias proteínas de membrana. El mismo grupo de trabajo proporcionó evidencias que soportan esta teoría al caracterizar varios miembros de la familia AMT de raíz de *Arabidopsis*, donde se encontraron funciones no superpuestas pero si aditivas relativas a la nutrición de nitrógeno (Yuan *et al.*, 2007).

*¿Se relaciona el mecanismo de acción de las acuaporinas en el polen con el metabolismo del nitrógeno o con su actividad de transporte de agua?*

El desarrollo de polen, germinación y crecimiento del tubo es crítico durante la reproducción de las plantas. En estos estadios en particular el polen requiere grandes cantidades de carbono y nitrógeno. Pero como el grano de polen se desarrolla como un órgano aislado sin conexiones de plasmodesmos con otros órganos que sirvan de fuente, entonces se requiere de transportadores a nivel membrana plasmática para incorporar fuentes de carbono y nitrógeno al polen. Se considera que la principal fuente de nitrógeno proviene de la importación de aminoácidos, particularmente prolina (Yuan *et al.*, 2008). Tanto en tomate como en *Arabidopsis* se identificaron los transportadores de prolina presentes en la membrana plasmática del polen, y se observó que tanto el grano maduro como el tubo polínico es capaz de tomar prolina del medio extracelular (Schwacke *et al.*, 1999; Foster *et al.*, 2008). Además debe mencionarse que en el transcriptoma de polen se identificaron varios transportadores de aminoácidos (Bock *et al.*, 2006) (enumerados en Wang *et al.*, 2006). El rol de la prolina en el grano de polen está vinculado a la deshidratación comportándose como soluto compatible (Nakasashima *et al.*, 1998), a la producción de energía primaria y a la síntesis de proteínas (Schwacke *et al.*, 1999). En polen y en semillas existe una prolina deshidrogenasa (ProDh) mitocondrial que cataliza la conversión de prolina a ácido glutámico. Además, tanto en polen como en semilla se han encontrado evidencias de que el glutamato generado puede reciclarse o degradarse a arginina. ARGAH1 (At4g08900) es una arginasa ubicua que degrada la arginina regenerando ornitina y liberando urea. Su actividad y expresión han sido demostradas en polen (Brownfield *et al.*, 2008). Esta arginasa ARGAH1 es también una enzima mitocondrial según ensayos de colocalización con MITOTRACKER (Flores, 2008) similares a los utilizados en esta tesis. ¿Qué ocurre con la urea generada en la mitocondria de polen? Los avances realizados en el estudio del metabolismo de nitrógeno en polen hasta el momento no contestan este interrogante. Sin embargo, es posible realizar un paralelismo entre el polen y la semilla, describiendo ambos órganos como las dos estructuras de latencia de la planta, ambas aisladas del resto de los órganos, con metabolismo reducido, transcriptoma reprimido, bajo contenido de agua y en constante y paciente espera de situaciones favorables. Podemos hipotetizar entonces que el metabolismo del nitrógeno se comporta de manera similar para polen y semilla.

El primer paso para la hidrólisis de urea para dar amonio y ácido carbónico esta catalizado por una ureasa dependiente de níquel conservadas entre diferentes organismos. Las ureasas permiten a la planta el reciclado del nitrógeno de la urea proveniente de la ruptura de arginina, y del catabolismo de los ureidos y purinas. Estas enzimas fueron descritas primeramente en microorganismos (revisado en Sirko y Bodzik, 2000). En el genoma de *Arabidopsis* existe un solo gen que codifica

para una ureasa (At1g67550), sin embargo para la activación de la misma hay por lo menos tres enzimas absolutamente necesarias: UreD (At2g35035), UreF (At1g21840) y UreG (At2g34479) (Witte *et al.*, 2005). En semillas secas de *Arabidopsis* se observó un pico inicial de ureasa que cae abruptamente cuando la semilla se hidrata y germina, como se observó también para *AtTIP5;1* (Vander Willigen *et al.*, 2006). Esto sugiere que ambas proteínas estarían involucradas en la germinación. Luego de la germinación de la semilla se reactivan tanto la transcripción como la actividad de la ureasa. La actividad arginasa por su parte, coincide con el pico de actividad de ureasa luego de la germinación de la semilla, sugiriendo que ambas enzimas están involucradas en el reciclado de nitrógeno a partir de la urea acumulada en los estadios tempranos de desarrollo de la plántula (Zonia *et al.*, 1995). La compartimentalización vacuolar, o en otra organela de reserva específica, puede representar una forma beneficiosa y transitoria de almacenar urea, que de otra forma se acumularía en el citoplasma con la consecuente toxicidad que resultaría letal para cualquier célula (Krogmeier, 1989).

En semilla se observó que mientras la arginasa localiza en mitocondria (Goldraij y Polacco, 2000) la acción de la ureasa ocurre en citoplasma. La urea debe atravesar la membrana mitocondrial para llegar al citoplasma por un mecanismo de transporte aún no conocido (Kojima *et al.*, 2006). *AtDUR3*, único transportador de urea de *Arabidopsis*, ofrece un mecanismo de transporte dependiente del gradiente de protones y por dicha razón no se puede postular como candidato para el transporte mitocondrial. Además su localización se presume en membrana plasmática, y por la información disponible a partir de los microarreglos no se lo encuentra expresado en polen.

Considerando además que dicha acuaporina es capaz de transportar urea y que por experimentos de RT-PCR demostramos la expresión de ureasa en polen maduro, es posible pensar que *TIP5;1* estaría involucrado en el reciclado de nitrógeno proveniente de la urea en polen de *Arabidopsis*. Los experimentos de PCR en tiempo real mostraron la expresión marcadamente disminuida de la glutamino sintetasa *GLN1;5* en polen *tip5;1* comparado con polen salvaje lo cual es indicativo de que el metabolismo de nitrógeno activo del polen está mediado de alguna forma por *tip5;1*.

Por las características estudiadas y analizadas a lo largo de esta tesis, postulamos a *AtTIP5;1* como candidato a transportar la urea generada en las mitocondrias por catabolismo de la arginasa al citoplasma, donde puede degradarse por acción de la ureasa o tal vez puede almacenarse en alguna estructura de reserva transitoria intracelular por *AtTIP1;3* (Figura 54).

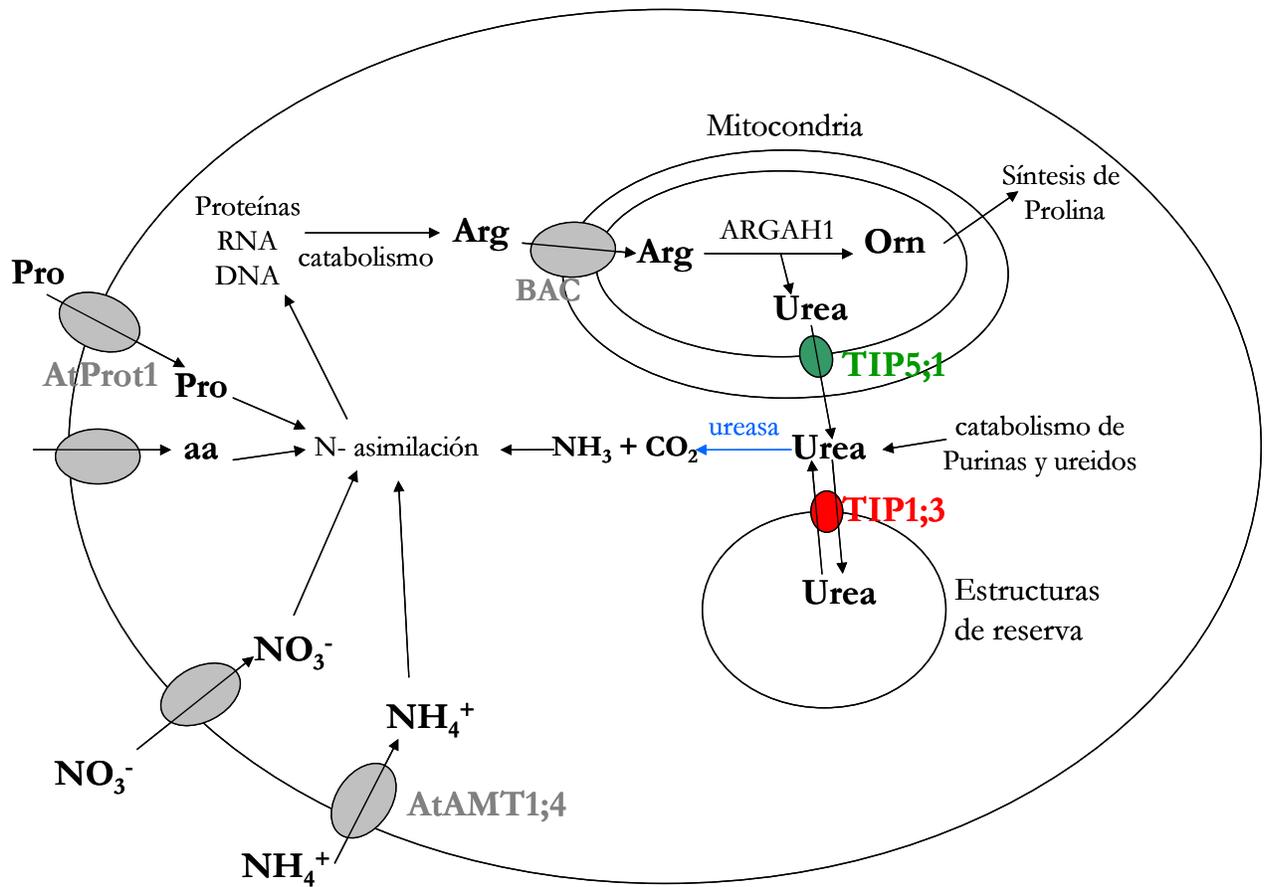


Figura 53: Modelo de acción propuesto para TIP5;1. *AtTIP5;1* es una acuaporina bifuncional que transporta urea y agua y localiza en mitocondrias de polen de Arabidopsis.

## Referencias

---

## Referencias

- Alonso J.M., et al.** *Genome-wide insertional mutagenesis of Arabidopsis thaliana*. Science, 2003. 301(5633): p. 653-7.
- Alexandersson E., et al.** *Whole gene family expression and drought stress regulation of aquaporins*. Plant Mol. Biol., 2005. 59(3): p. 469-84.
- Agre P, King LS, Yasui M, Guggino WB, Ottersen OP, Fujiyoshi Y, Engel A, Nielsen S.** *Aquaporin water channels--from atomic structure to clinical medicine*. J Physiol. 2002 Jul 1;542(Pt 1):3-16. Review.
- Arabidopsis-Genome-Initiative.** *Analysis of the genome sequence of the flowering plant Arabidopsis thaliana*. Nature, 2000. 408(6814): p. 796-815.
- Aroca R, Amodeo G, Fernandez-Illescas S, Herman EM, Chaumont F, Chrispeels MJ.** *The role of aquaporins and membrane damage in chilling and hydrogen peroxide induced changes in the hydraulic conductance of maize roots*. Plant Phys 2005. 137, 341-53.
- Bayer M, Nawy T, Giglione C, Galli M, Meinnel T, Lukowitz W.** *Paternal control of embryonic patterning in Arabidopsis thaliana*. Science, 2009. 13;323(5920):1485-8
- Barkla BJ, Vera-Estrella R, Pantoja O, Kirch HH, Bohnert HJ.** *Aquaporin localization - how valid are the TIP and PIP labels?* Trends Plant Sci, 1999. 4(3):86-88.
- Becker J.D., Boavida L.C., Carneiro J., Haury M., y Feijo J.A.** *Transcriptional profiling of Arabidopsis tissues reveals the unique characteristics of the pollen transcriptome*. Plant Physiol, 2003. 133(2): p. 713-25.
- Beitz E., Wu B., Holm L.M., Schultz J.E., y Zeuthen T.** *Point mutations in the aromatic/arginine region in aquaporin 1 allow passage of urea, glycerol, ammonia, and protons*. Proc Natl Acad Sci, 2006. 103(2): p. 269-74.
- Beitz E.** *Aquaporins*. Preface. Handbook of Experimental Pharmacology ISSN 0171-2004.
- Bienert, G.P., Moller, A.L., Kristiansen, K.A., Schulz, A., Moller, I.M., Schjoerring, J.K. y Jahn, T.P.** *Specific aquaporins facilitate the diffusion of hydrogen peroxide across membranes*. J. Biol. Chem., 2007. 282, 1183-92.
- Birnbaum K, Shasha DE, Wang JY, Jung JW, Lambert GM, Galbraith DW, Benfey PN.** *A gene expression map of the Arabidopsis root*. Science, 2003. 12;302(5652):1956-60.
- Boavida L., et al.,** *Gametophyte interaction and sexual reproduction: how plants make a zygote*. Int J Dev Biol,(2005 a). 49(5-6): p. 615-32.8

- Boavida L., Becker J y Feijo J.** *The making of gametes in higher plants.* Int J Dev Biol, (2005 b). 49(5-6): p. 595-614.
- Boavida LC, Shuai B, Yu HJ, Pagnussat GC, Sundaresan V, McCormick S.** *A collection of Ds insertional mutants associated with defects in male gametophyte development and function in Arabidopsis thaliana.* Genetics. 2009 181(4):1369-85.
- Boavida L.C. y McCormick S.** *Temperature as a determinant factor for increased and reproducible in vitro pollen germination in Arabidopsis thaliana.* Plant J, 2007. 52(3): p. 570-82.
- Bock K.W., et al.,** *Integrating membrane transport with male gametophyte development and function through transcriptomics.* Plant Physiol., 2006. 140(4): p. 1151-68.
- Bolte S, Talbot C, Boutte Y, Catrice O, Read ND, Satiat-Jeunemaitre B.** *FM-dyes as experimental probes for dissecting vesicle trafficking in living plant cells.* J Microsc., 2004. 214(Pt 2):159-73.
- Borg M, Brownfield L y Twell D.** *Male gametophyte development: a molecular perspective.* J Exp Bot., 2009. 60(5):1465-78.
- Borges F., et al.** *Comparative transcriptomics of Arabidopsis thaliana sperm cells.* Plant Physiol., 2008. 10.1104/pp.108.125229.
- Cai G, Cresti M.** *Organelle motility in the pollen tube: a tale of 20 years.* J Exp Bot. 2009; 60(2):495-508. Epub 2008 Dec 26.
- Calamita G, Mazzone A, Bizzoca A, Cavalier A, Cassano G, Thomas D, Svelto M.** *Expression and immunolocalization of the aquaporin-8 water channel in rat gastrointestinal tract.* Eur J Cell Biol. 2001 Nov;80(11):711-9.
- Campanoni, P. and M.R. Blatt,** *Membrane trafficking and polar growth in root hairs and pollen tubes.* J Exp Bot, 2007. 58(1): p. 65-74.
- Cao Y, Anderova M, Crawford NM, Schroeder JI.** *Expression of an outward-rectifying potassium channel from maize mRNA and complementary RNA in Xenopus oocytes.* Plant Cell, 1992. 4(8):961-9.
- Chaumont F, Barrieu F, Jung R, Chrispeels MJ.** *Plasma membrane intrinsic proteins from maize cluster in two sequence subgroups with differential aquaporin activity.* Plant Physiol., 2000. 122(4), 1025-34.
- Cheung, A.Y. and H.-M. Wu,** *Structural and functional compartmentalization in pollen tubes.* J. Exp Bot, 2007. 58(1): p. 75-82.
- Cheung, A.Y. y H.M. Wu.** *Overexpression of an Arabidopsis formin stimulates supernumerary actin cable formation from pollen tube cell membrane.* Plant Cell, 2004. 16(1): p. 257-69.

**Curtis MD, Grossniklaus U.** *A gateway cloning vector set for high-throughput functional analysis of genes in planta.* Plant Physiol, 2003. 133(2):462-9.

**Daniels MJ, Mirkov TE, Chrispeels MJ.** *The plasma membrane of Arabidopsis thaliana contains a mercury-insensitive aquaporin that is homolog of the tonoplast water channel protein TIP.* Plant Phys, 1994 106, 1325-1333.

**Daniels MJ, Chrispeels MJ, Yeager M.** *Projection structure of a plant vacuole membrane aquaporin by electron cryo-crystallography.* J Mol Biol., 1999. 294(5):1337-49.

**Danyu L, Ying L, Zhenwu B, Heming Y, Xuejun L.** *Aquaporin 1 expression in the testis, epididymis and vas deferens of postnatal ICR mice.* Cell Biol Int., 2008. 32(5):532-41.

**de Groot BL, Frigato T, Helms V, Grubmüller H.** *The mechanism of proton exclusion in the aquaporin-1 water channel.* J Mol Biol., 2003. 333(2):279-93.

**Delsuc F, Brinkmann H, Philippe H.** *Phylogenomics and the reconstruction of the tree of life.* Nat. Rev. Genet., 2005. 6:361-375.

**Dixit R, Rizzo C, Nasrallah M y Nasrallah J.** *The brassica MIP-MOD gene encodes a functional water channel that is expressed in the stigma epidermis.* Plant Mol Biol. 2001. 45(1):51-62.

**Dynowski M, Mayer M, Moran O, Ludewig U.** *Molecular determinants of ammonia and urea conductance in plant aquaporin homologs.* FEBS Lett. 2008 Jul 9;582(16):2458-62.

**Edlund AF, Swanson R, Preuss D.** *Pollen and stigma structure and function: the role of diversity in pollination.* Plant Cell., 2004. 16 Suppl:S84-97.

**Elleman CJ, Dickinson HG.** *Pollen-stigma interactions in Brassica. IV. Structural reorganization in the pollen grains during hydration.* J Cell Sci., 1986. 80:141-57.

**Feijó JA, Sainhas J, Holdaway-Clarke T, Cordeiro MS, Kunkel JG, Hepler PK.**

*Cellular oscillations and the regulation of growth: the pollen tube paradigm.* Bioessays. 2001. 23(1):86-94.

**Ferri D, Mazzone A, Liquori GE, Cassano G, Svelto M, Calamita G.** *Ontogeny, distribution, and possible functional implications of an unusual aquaporin, AQP8, in mouse liver.* Hepatology. 2003 Oct;38(4):947-57.

**Fetter K., Van Wilder V., Moshelion M., y Chaumont F.** *Interactions between plasma membrane aquaporins modulate their water channel activity.* Plant Cell, 2004. 16(1): p. 215-28.

**Flores T, Todd CD, Tovar-Mendez A, Dhanoa PK, Correa-Aragunde N, Hoyos ME, Brownfield DM, Mullen RT, Lamattina L, Polacco JC.** *Arginase-negative mutants of Arabidopsis exhibit increased nitric oxide signaling in root development.* Plant Physiol. 2008. 147(4):1936-46.

- Fotiadis D, Suda K, Tittmann P, Jenó P, Philippsen A, Müller DJ, Gross H, Engel A.** *Identification and structure of a putative Ca<sup>2+</sup>-binding domain at the C terminus of AQP1.* J Mol. Biol., 2002. 318, 1381-1394.
- Froger A, Tallur B, Thomas D, Delamarche C.** *Prediction of functional residues in water channels and related proteins.* Protein Sci., 1998. (6), 1458-68.
- Fu D, Libson A, Miercke LJ, Weitzman C, Nollert P, Krucinski J, Stroud RM.** *Structure of a glycerol-conducting channel and the basis for its selectivity.* Science, 2000. 290(5491):481-6.
- Fujiyoshi Y, Mitsuoka K, de Groot BL, Philippsen A, Grubmüller H, Agre P, Engel A.** *Structure and function of water channels.* Curr. Opin. Struct. Biol., 2002. 12(4):509-15. Review.
- Gena P, Fanelli E, Brenner C, Svelto M, Calamita G.** *News and views on mitochondrial water transport.* Front Biosci. 2009. 1;14:4189-98. Review.
- Gerbeau P, Amodeo G, Henzler T, Santoni V, Ripoche P, Maurel C.** *The water permeability of Arabidopsis plasma membrane is regulated by divalent cations and pH.* Plant Journal, 2002. 30, 71-81.
- Glaser E, Sjöling Sm Tanudji M, Whelan J.** *Mitochondrial protein import in plants.* Plant Molecular Biology, 1998. 0: 311–338.
- Goldraj A, Polacco JC.** *Arginine degradation by arginase in mitochondria of soybean seedling cotyledons.* Planta, 2000. 210(4):652-8.
- Gorelick DA, Praetorius J, Tsunenari T, Nielsen S, Agre P.** *Aquaporin-11: a channel protein lacking apparent transport function expressed in brain.* BMC Biochem. 2006. May 1;7:14.
- Guenther JF, Chanmanivone N, Galetovic MP, Wallace IS, Cobb JA, Roberts DM.** *Phosphorylation of soybean nodulin 26 on serine 262 enhances water permeability and is regulated developmentally and by osmotic signals.* Plant Cell, 2003. 15, 981-991.
- Gradilone SA, Carreras FI, Lehmann GL, Marinelli RA.** *Phosphoinositide 3-kinase is involved in the glucagon-induced translocation of aquaporin-8 to hepatocyte plasma membrane.* Biol Cell. 2005 Nov;97(11):831-6.
- Hachez C, Zelazny E, Chaumont F.** *Modulating the expression of aquaporin genes in planta: A key to understand their physiological functions?.* Biochim Biophys Acta, 2006. 1758(8), 1142-56.
- Hansen, M., Kun, J.F., Schultz, J.E. y Beitz, E.** *A single, bi-functional aquaglyceroporin in blood-stage Plasmodium falciparum malaria parasites.* J. Biol. Chem., 2002. 277, 4874-82.
- Harrison SJ, Mott EK, Parsley K, Aspinall S, Gray JC, Cottage A.** *A rapid and robust method of identifying transformed Arabidopsis thaliana seedlings following floral dip transformation.* Plant Methods, 2006. 6;2:19.

- Harvengt P, Vlerick A, Fuks B, Wattiez R, Ruyschaert JM, Homble F.** *Lentil seed aquaporins form a hetero-oligomer which is phosphorylated by a Mg(2+)-dependent and Ca(2+)-regulated kinase.* *Biochem J.*, 2000.11:183-90.
- Heazlewood J, Verboom R, Tonti-Filippini J, Small I y Millar H.** *SUBA: the Arabidopsis Subcellular Database.* *Nucleic Acids Research*, 2007, Vol. 35, Database issue D213–D218.
- Hedfalk K, Tornroth-Horsefield S, Nyblom M, Johanson U, Kjellbom P, Neutze R.** *Aquaporin gating.* *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 2006. (4), 447-56.
- Hepler, P.K., Vidali, L. y Cheung, A.Y.** *Polarized cell growth in higher plants.* *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2001. **17**: p. 159-87.
- Heslop-Harrison J.** *Recognition and response in the pollen-stigma interaction.* *Symp. Soc. Exp. Biol.*, 1978. 32:121-38. Review.
- Heslop-Harrison J, y Heslop-Harrison Y.** *Surfaces and secretions in the pollen-stigma interaction: a brief review.* *J Cell Sci Suppl.* 1985. 2:287-300. Review.
- Hicks G.R., Rojo E., Hong S., Carter D.G., y Raikhel N.V.** *Geminating pollen has tubular vacuoles, displays highly dynamic vacuole biogenesis, and requires VACUOLESS1 for proper function.* *Plant Physiol*, 2004. 134(3): p. 1227-39.
- Holdaway-Clarke, T.L. and P.K. Hepler,** *Control of pollen tube growth: role of ion gradients and fluxes.* *New Phytologist*, 2003. **159**(3): p. 539-563.
- Holdaway-Clarke TL, Weddle NM, Kim S, Robi A, Parris C, Kunkel JG, Hepler PK.** *Effect of extracellular calcium, pH and borate on growth oscillations in Lilium formosanum pollen tubes.* *J Exp Bot.* 2003. 54(380):65-72.
- Honys D. y Twell D.** *Transcriptome analysis of haploid male gametophyte development in Arabidopsis.* *Genome Biol*, 2004. 5(11): p. R85.
- Hughes AL, Ekollu V, Friedman R, Rose JR.** *Gene Family Content-Based Phylogeny of Prokaryotes: The Effect of Criteria for Inferring Homology.* *Syst. Biol.*, 2005. 54:268-276.
- Ishibashi K, Kuwahara M, Gu Y, Kageyama Y, Tohsaka A, Suzuki F, Marumo F, Sasaki S.** *Cloning and functional expression of a new water channel abundantly expressed in the testis permeable to water, glycerol, and urea.* *J Biol. Chem.*, 1997. 15;272(33):20782-6.
- Ishikawa F, Suga S, Uemura T, Sato MH, Maeshima M.** *Novel type aquaporin SIPs are mainly localized to the ER membrane and show cell-specific expression in Arabidopsis thaliana.* *FEBS Lett.*, 2005. 579 (25) 5814-20.
- Jauh GY, Phillips TE, Rogers JC.** *Tonoplast intrinsic protein isoforms as markers for vacuolar functions.* *Plant Cell*, 1999. 11,1867-82.

**Johnson KD, Chrispeels MJ.** *Tonoplast-bound protein kinase phosphorylates tonoplast intrinsic protein.* Plant Phys., 1992. 100, 1787-1795.

**Johansson I, Karlsson M, Johansson U, Larsson C and Kjellbom P.** *The role of aquaporins in cellular and whole plant water balance.* Biochim. Biophys. Acta, 2000. 1465, 324-342.

**Johansson I, Larsson C, Ek B, Kjellbom P.** *The major integral proteins of spinach leaf plasma membranes are putative aquaporins and are phosphorylated in response to Ca<sup>2+</sup> and apoplastic water potential.* Plant Cell, 1996. 8, 1181-1191.

**Johanson U., et al.** *The complete set of genes encoding major intrinsic proteins in Arabidopsis provides a framework for a new nomenclature for major intrinsic proteins in plants.* Plant Physiol, 2001. 126(4): p. 1358-69.

**Johnson S.A. y McCormick S.** *Pollen germinates precociously in the anthers of raring-to-go, an Arabidopsis gametophytic mutant.* Plant Physiol, 2001. 126(2): p. 685-95.

**Johnson-Brousseau S.A. y McCormick S.** *A compendium of methods useful for characterizing Arabidopsis pollen mutants and gametophytically-expressed genes.* Plant J, 2004. 39(5): p. 761-75.

**Jones DT.** *Progress in protein structure prediction.* Curr. Opin. Struct. Biol., 1997. 7:377-387.

**Knepper MA, Inoue T.** *Regulation of aquaporin-2 water channel trafficking by vasopressin.* Curr. Opin. Cell Biol., 1997. 9(4):560-4.

**Kirch HH, Vera-Estrella R, Golldack D, Quigley F, Michalowski CB, Barkla BJ, Bohnert HJ.** *Expression of water channel proteins in Mesembryanthemum crystallinum.* Plant Physiol. 2000. 123(1):111-24.

**Kojima S, Bohner A, von Wirén N.** *Molecular mechanisms of urea transport in plants.* J. Membr. Biol., 2006. 212(2):83-91.Review.

**Krichevsky, A., et al.,** *How pollen tubes grow.* Dev Biol, 2007. 303(2): p. 405-20.

**Krogmeier MJ, McCarty GW, Bremner JM.** *Phytotoxicity of foliar-applied urea.* Proc. Natl. Acad. Sci. U S A., 1989. 86(21):8189-8191.

**Kukulski W, Schenk AD, Johanson U, Braun T, de Groot BL, Fotiadis D, Kjellbom P, Engel A.** *The 5A structure of heterologously expressed plant aquaporin SoPIP2;1.* J. Mol. Biol., 2005. 22;350(4):611-6.

**Kumar S, Tamura K, Nei M.** *MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment.* Brief. Bioinform., 2004. 5:150-163.

- Lisboa, S., G.E. Scherer, and H. Quader**, *Localized endocytosis in tobacco pollen tubes: visualisation and dynamics of membrane retrieval by a fluorescent phospholipid*. *Plant Cell Rep*, 2007. 27(1): p. 21-28.
- Liu LH, Ludewig U, Gassert B, Frommer WB, von Wirén N**. *Urea transport by nitrogen-regulated tonoplast intrinsic proteins in Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, 2003.133(3):1220-8.
- Lolle SJ, Hsu W y Pruitt RE**. *Genetic analysis of organ fusion in Arabidopsis thaliana*. *Genetics.*, 1998. 149(2):607-19.
- Loque, D., Ludewig, U., Yuan, L. y von Wiren, N**. *Tonoplast intrinsic proteins AtTIP2;1 and AtTIP2;3 facilitate NH<sub>3</sub> transport into the vacuole*. *Plant Physiol.*, 2005. 137, 671-80.
- Lu Danyu, Ying L, Zhenwu B, Heming Y, Xuejun L**. *Aquaporin 1 expression in the testis, epididymis and vas deferens of postnatal ICR mice*. *Cell Biol Int*. 2008 May;32(5):532-41. Epub 2008 Jan 25.
- Ma H**. *Plant reproduction: GABA gradient, guidance and growth*. *Curr. Biol.*, 2003. 28;13(21):R834-6. Review.
- Ma H**. *Molecular genetic analyses of microsporogenesis and microgametogenesis in flowering plants*. *Annu Rev Plant Biol.*, 2005. 56:393-434. Review.
- Maeshima M, Ishikawa F**. *ER membrane aquaporins in plants*. *Pflugers Arch*. 2008. 456(4):709-16.
- Malho, R., et al.**, *Signalling pathways in pollen germination and tube growth*. *Protoplasma*, 2006. 228(1-3): p. 21-30.
- Maurel C., Reizer J., Schroeder J.I., y Chrispeels M.J**. *The vacuolar membrane protein gamma-TIP creates water specific channels in Xenopus oocytes*. *Embo J*, 1993. 12(6): p. 2241-7.
- Maurel C., Kado R.T., Guern J., M.J y Chrispeels**. *Phosphorylation regulates the water channel activity of the seed-specific aquaporin alpha-TIP*. *Embo J*, 1995. 14(13): p. 3028-35.
- Maurel C**. *Plant aquaporins: novel functions and regulation properties*. *FEBS Lett.*, 2007 25;581(12):2227-36.
- Maurel C., Verdoucq L., Luu D.T., y Santoni V.**, *Plant aquaporins: membrane channels with multiple integrated functions*. *Annu Rev Plant Biol*, 2008. 59: p. 595-624.
- Mazina SE, Matveeva NP, Ermakov IP**. *Determination of a position of a functional pore in the tobacco pollen*. *Tsitologiya*, 2002. 44(1):33-9
- McCormick S**. *Control of male gametophyte development*. *Plant Cell.*, 2004.16 Suppl:S142-53.
- Messerli MA, Créton R, Jaffe LF, Robinson KR**. *Periodic increases in elongation rate precede increases in cytosolic Ca<sup>2+</sup> during pollen tube growth*. *Dev Biol*. 2000. 222(1):84-98.

**Miao GH, Hong Z, Verma DP.** *Topology and phosphorylation of soybean nodulin-26, an intrinsic protein of the peribacteroid membrane.* J Cell Biol., 1992. 118(2):481-90.

**Monteiro, D., et al.,** *Modulation of endocytosis in pollen tube growth by phosphoinositides and phospholipids.* Protoplasma, 2005. 226 (1-2): p. 31-8.

**Monteiro, D., et al.,** *Phosphoinositides and phosphatidic acid regulate pollen tube growth and reorientation through modulation of  $[Ca^{2+}]_c$  and membrane secretion.* J Exp Bot, 2005. 56(416): p. 1665-74.

**Moriyasu Y, Hattori M, Jauh GY, Rogers JC.** *Alpha tonoplast intrinsic protein is specifically associated with vacuole membrane involved in an autophagic process.* Plant Cell Physiol., 2003. 44(8):795-802.

**Muschietti J., Dircks L., Vancanneyt G., y McCormick S.** *LAT52 protein is essential for tomato pollen development: pollen expressing antisense LAT52 RNA hydrates and germinates abnormally and cannot achieve fertilization.* Plant J, 1994. 6(3): p. 321-38.

**Muschietti, J., Y. Eyal, and S. McCormick,** *Pollen tube localization implies a role in pollen-pistil interactions for the tomato receptor-like protein kinases LePRK1 and LePRK2.* Plant Cell, 1998. 10(3): p. 319-30.

**Myers C, Romanowsky SM, Barron YD, Garg S, Azuse CL, Curran A, Davis RM, Hatton J, Harmon AC, Harper JF.** *Calcium-dependent protein kinases regulate polarized tip growth in pollen tubes.* Plant J. 2009. 59(4):528-39.

**Nakashima K, Satoh R, Kiyosue T, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K.** *A gene encoding proline dehydrogenase is not only induced by proline and hypoosmolarity, but is also developmentally regulated in the reproductive organs of Arabidopsis.* Plant Physiol., 1998. 118(4):1233-41.

**Nedvetsky PI, Tamma G, Beulshausen S, Valenti G, Rosenthal W, Klussmann E.** *Regulation of aquaporin-2 trafficking.* Handb Exp Pharmacol. 2009;(190):133-57. Review.

**Németh-Cahalan KL, Hall JE.** *pH and calcium regulate the water permeability of aquaporin 0.* J. Biol. Chem., 2000. 275(10):6777-82.

**Nemeth-Cahalan KL, Kalman K, Hall JE.** *Molecular basis of pH and  $Ca^{2+}$  regulation of aquaporin water permeability.* J Gen Physiol., 2004. 123, 573-80.

**Noda Y, Sasaki S.** *Trafficking mechanism of water channel aquaporin-2.* Biol Cell 2005.12:885-92.

**Nühse TS, Stensballe A, Jensen ON, Peck SC.** *Phosphoproteomics of the Arabidopsis plasma membrane and a new phosphorylation site database.* Plant Cell, 2004. 16(9):2394-405.

- Paganelli C y Solomon A.** *The rate of exchange of tritiated water across the human red cell membrane.* J. Gen Physiol., 1957. 41 (2), 259-77.
- Pao GM, Wu LF, Johnson KD, Hofte H, Chrispeels MJ, Sweet G, Sandal NN, Saier MH Jr.** *Evolution of the MIP family of integral membrane transport proteins.* Mol Microbiol., 1991. 5 (1), 33-7.
- Parton, R.M., et al.,** *Dynamics of the apical vesicle accumulation and the rate of growth are related in individual pollen tubes.* J Cell Sci, 2001. 114(Pt 14): p.2685-95.
- Preston, G.M., Carroll, T.P., Guggino, W.B. y Agre, P.** *Appearance of water channels in Xenopus oocytes expressing red cell CHIP28 protein.* Science, 1992. 256, 385-7.
- Pina C., Pinto F., Feijo J.A., y Becker J.D.** *Gene family analysis of the Arabidopsis pollen transcriptome reveals biological implications for cell growth, division control, and gene expression regulation.* Plant Physiol, 2005. 138(2): p. 744-56.
- Saito K, Kageyama Y, Okada Y, Kawakami S, Kihara K, Ishibashi K, Sasaki S.** *Localization of aquaporin-7 in human testis and ejaculated sperm: possible involvement in maintenance of sperm quality.* J Urol., 2004. 172:2073-6.
- Santoni V, Vinh J, Pflieger D, Sommerer N, Maurel C.** *A proteomic study reveals novel insights into the diversity of aquaporin forms expressed in the plasma membrane of plant roots.* Biochem J., 2003. 373:289-96.
- Santoni V, Verdoucq L, Sommerer N, Vinh J, Pflieger D, Maurel C.** *Methylation of aquaporins in plant plasma membrane.* Biochem J., 2006. 400(1):189-97.
- Shang, Z.L., et al.,** *Ca<sup>2+</sup> influx into lily pollen grains through a hyperpolarization-activated Ca<sup>2+</sup>-permeable channel which can be regulated by extracellular CaM.* Plant Cell Physiol, 2005. 46(4): p. 598-608.
- Sohara E, Ueda O, Tachibe T, Hani T, Jishage K, Rai T, Sasaki S, Uchida S.** *Morphologic and functional analysis of sperm and testes in Aquaporin 7 knockout mice.* Fertil Steril., 2007. 87(3):671-6.
- Steudle E.** *The cohesion-tension mechanism and the acquisition of water by plant roots.* Ann Rev in Plant Physiol and Plant Mol Biol, 2001.52, 847-875.
- Quigley F., Rosenberg J.M., Shachar-Hill Y., y Bohnert H.J.,** *From genome to function: the Arabidopsis aquaporins.* Genome Biol, 2002. 3(1): p. RESEARCH0001.
- Regan SM, Moffatt BA.** *Cytochemical Analysis of Pollen Development in Wild-Type Arabidopsis and a Male-Sterile Mutant.* Plant Cell, 1990. 2(9):877-889.

**Reizer J, Reizer A, Saier MH Jr.** *The MIP family of integral membrane channel proteins: sequence comparisons, evolutionary relationships, reconstructed pathway of evolution, and proposed functional differentiation of the two repeated halves of the proteins.* Crit Rev Biochem Mol Biol, 1993. 28(3): 235-57.

**Ren H y Xiang Y.** *The function of actin-binding proteins in pollen tube growth.* Protoplasma. 2007; 230(3-4):171-82.

**Rimon A, Gerchman Y, Olami Y, Schuldiner S, Padan E.** *Replacements of histidine 226 of NhaA-Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter of Escherichia coli. Cysteine (H226C) or serine (H226S) retain both normal activity and pH sensitivity, aspartate (H226D) shifts the pH profile toward basic pH, and alanine (H226A) inactivates the carrier at all pH values.* J Biol Chem., 1995. 270(45):26813-7.

**Sakurai J, Ishikawa F, Yamaguchi T, Uemura M, Maeshima M.** *Identification of 33 rice aquaporin genes and analysis of their expression and function.* Plant Cell Physiol., 2005. 46(9):1568-77.

**Sambrook y Russell.** *A The Inoue Method for Preparation and Transformation of Competent E. Coli: "Ultra-Competent".* Cold Spring Harbor Protocols, 2006. pdb.prot3944

**Sambrook and Russell.** *Preparation of Plasmid DNA by Alkaline Lysis with SDS: Maxipreparation.* Cold Spring Harbor Protocols, 2006. pdb.prot4090

**Sarker RH, Elleman CJ, Dickinson HG.** *Control of pollen hydration in Brassica requires continued protein synthesis, and glycosylation is necessary for intraspecific incompatibility.* Proc Natl Acad Sci U S A., 1988. 85(12):4340-4344.

**Schüssler MD, Alexandersson E, Bienert GP, Kichey T, Laursen KH, Johanson U, Kjellbom P, Schjoerring JK, Jahn TP.** *The effects of the loss of TIP1;1 and TIP1;2 aquaporins in Arabidopsis thaliana.* Plant J., 2008. 56(5):756-67.

**Schwacke R, Grallath S, Breitzkreuz KE, Stransky E, Stransky H, Frommer WB, Rentsch D.** *LeProT1, a transporter for proline, glycine betaine, and gamma-amino butyric acid in tomato pollen.* Plant Cell., 1999. 11(3):377-92.

**Sirko A, Brodzik R.** *Plant ureases: roles and regulation.* Acta Biochim Pol. 2000;47(4):1189-95. Review.

**Soto G., Alleva K., Mazzella M.A., Amodeo G., y Muschietti J.P.** *AtTIP1;3 and AtTIP5;1, the only highly expressed Arabidopsis pollen-specific aquaporins, transport water and urea.* FEBS Lett, 2008. 582(29): p. 4077-82.

**Sui H, Han BG, Lee JK, Walian P, Jap BK.** *Structural basis of water-specific transport through the AQP1 water channel.* Nature, 2001. 414 :(6866), 872-8.

- Rontein D, Wu WI, Voelker DR, Hanson AD.** *Mitochondrial phosphatidylserine decarboxylase from higher plants. Functional complementation in yeast, localization in plants, and overexpression in Arabidopsis.* Plant Physiol. 2003 Jul;132(3):1678-87.
- Takano J, Wada M, Ludewig U, Schaaf G, von Wirén N, Fujiwara T.** *The Arabidopsis major intrinsic protein NIP5;1 is essential for efficient boron uptake and plant development under boron limitation.* Plant Cell., 2006. 18(6):1498-509.
- Tajkhorshid E, Nollert P, Jensen MØ, Miercke LJ, O'Connell J, Stroud RM, Schulten K.** *Control of the selectivity of the aquaporin water channel family by global orientational tuning.* Science, 2002. 19;296(5567):525-30.
- Tani T, Koyama Y, Nihei K, Hatakeyama S, Ohshiro K, Yoshida Y, Yaoita E, Sakai Y, Hatakeyama K, Yamamoto T.** *Immunolocalization of aquaporin-8 in rat digestive organs and testis.* Arch Histol Cytol., 2001. 64(2):159-68.
- Temmei Y, Uchida S, Hoshino D, Kanzawa N, Kuwahara M, Sasaki S, Tsuchiya T.** *Water channel activities of Mimosa pudica plasma membrane intrinsic proteins are regulated by direct interaction and phosphorylation.* FEBS Lett., 2005. 579 (20), 4417-22.
- Tietz PS, McNiven MA, Splinter PL, Huang BQ, Larusso NF.** *Cytoskeletal and motor proteins facilitate trafficking of AQP1-containing vesicles in cholangiocytes.* Biol Cell, 2006. 98(1), 43-52.
- Tiwari SC, Polito VS.** *The initiation and organization of microtubules in germinating pear (Pyrus communis L.) pollen.* Eur J Cell Biol., 1990. 53(2):384-9.
- Thomas D, Bron P, Ranchy G, Duchesne L, Cavalier A, Rolland JP, Raguene-Nicol C, Hubert JF, Haase W, Delamarche C.** *Aquaglyceroporins, one channel for two molecules.* Biochim Biophys Acta, 2002. 1555(1-3), 181-6.
- Tournaire-Roux C, Sutka M, Javot H, Gout E, Gerbeau P, Luu DT, Bligny R, Maurel C.** *Cytosolic pH regulates root water transport during anoxic stress through gating of aquaporins.* Nature, 2003. 425, 393-397.
- Tornroth-Horsefield S, Wang Y, Hedfalk K, Johanson U, Karlsson M, Tajkhorshid E, Neutze R, Kjellbom P.** *Structural mechanism of plant aquaporin gating.* Nature, 2005. 439(7077), 688-94.
- Twell D.** *A blossoming romance: gamete interactions in flowering plants.* Nat Cell Biol., 2006. 8(1):14-6.
- Tyerman SD, Niemietz CM, Bramley H.** *Plant aquaporins: multifunctional water and solute channels with expanding roles.* Plant Cell Envir, 2002. 25, 173-194.
- Uehlein N, Lovisolo C, Siefritz F, Kaldenhoff R.** *The tobacco aquaporin NtAQP1 is a membrane CO<sub>2</sub> pore with physiological functions.* Nature, 2003. 425(6959):734-7.

**Valenti, G. et al.**, *The phosphatase inhibitor okadaic acid induces AQP2 translocation independently from AQP2 phosphorylation in renal collecting duct cells.* J Cell Sci, 2000. 113 1985-92.

**Vander Willigen C, Postaire O, Tournaire-Roux C, Boursiac Y, Maurel C.** *Expression and inhibition of aquaporins in germinating Arabidopsis seeds.* Plant Cell Physiol., 2006. 47(9):1241-50.

**Vera-Estrella, R., Barkla, B.J., Bohnert, H.J. y Pantoja, O.** *Novel regulation of aquaporins during osmotic stress.* Plant Physiol., 2004. 135, 2318-29.

**Verkman AS, Mitra AK.** *Structure and function of aquaporin water channels.* American J Physiol, 2000. 278, F13-28.

**Wallace I.S. y Roberts D.M.** *Homology modeling of representative subfamilies of Arabidopsis major intrinsic proteins. Classification based on the aromatic/arginine selectivity filter.* Plant Physiol, 2004. 135(2): p. 1059-68.

**Wang F, Yuan QH, Shi L, Qian Q, Liu WG, Kuang BG, Zeng DL, Liao YL, Cao B, Jia SR.** *A large-scale field study of transgene flow from cultivated rice (*Oryza sativa*) to common wild rice (*O. rufipogon*) and barnyard grass (*Echinochloa crusgalli*).* Plant Biotechnol J., 2006. 4(6):667-76.

**Wang Y., et al.** *Transcriptome analyses show changes in gene expression to accompany pollen germination and tube growth in Arabidopsis.* Plant Physiol., 2008. 10.1104/pp.108.126375.

**Weaver CD, Shomer NH, Louis CF, Roberts DM.** *Nodulin 26, a nodule-specific symbiosome membrane protein from soybean, is an ion channel.* J Biol Chem. 1994. 269 (27), 17858-62.

**Weeks RS, Vanderwerf SM, Carlson CL, Burns MR, O'Day CL, Cai F, Devens BH, Webb HK.** *Novel lysine-spermine conjugate inhibits polyamine transport and inhibits cell growth when given with DFMO.* Exp Cell Res., 2000. 25;261(1):293-302.

**Wengier, D., et al.**, *The receptor kinases LePRK1 and LePRK2 associate in pollen and when expressed in yeast, but dissociate in the presence of style extract.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(11): p. 6860-5.

**Winter D., Vinegar B., Nahal H, Ammar R, Wilson G, Provart G.** *An "Electronic Fluorescent Pictograph" Browser for Exploring and Analyzing Large-Scale Biological Data Sets.* PloS, 2007. 8 718-730

**Witte CP, Rosso MG, Romeis T.** *Identification of three urease accessory proteins that are required for urease activation in Arabidopsis.* Plant Physiol., 2005. 139(3):1155-62.

**Wudick MM, Luu DT, Maurel C.** *A look inside: localization patterns and functions of intracellular plant aquaporins.* New Phytol. 2009 Oct;184(2):289-302. Epub 2009 Aug 11. Review.

- Yang B, Song Y, Zhao D, Verkman AS.** *Phenotype analysis of aquaporin-8 null mice.* Am J Physiol Cell Physiol., 2005. 288(5):C1161-70.
- Yasui M, Hazama A, Kwon TH, Nielsen S, Guggino WB, Agre P.** *Rapid gating and anion permeability of an intracellular aquaporin.* Nature, 1999. 402 (6758), 184-7.
- Yuan QH, Shi L, Wang F, Cao B, Qian Q, Lei XM, Liao YL, Liu WG, Cheng L, Jia SR.** *Investigation of rice transgene flow in compass sectors by using male sterile line as a pollen detector.* Theor Appl Genet., 2007. 115(4):549-60.
- Yuan L, Graff L, Loqué D, Kojima S, Tsuchiya YN, Takahashi H, von Wirén N.** *AtAMT1;4, a pollen-specific high-affinity ammonium transporter of the plasma membrane in Arabidopsis.* Plant Cell Physiol., 2009. 50(1):13-25.
- Zardoya R, Villalba S.** *A phylogenetic framework for the aquaporin family in eukaryotes.* J Mol Evol., 2001. 52 (5), 391-404.
- Zelazny E, Borst JW, Muylaert M, Batoko H, Hemminga MA, Chaumont F.** *FRET imaging in living maize cells reveals that plasma membrane aquaporins interact to regulate their subcellular localization.* Proc Natl Acad Sci U S A. 2007. 24;104(30):12359-64.
- Zeuthen T, Klaerke DA.** *Transport of water and glycerol in aquaporin 3 is gated by H<sup>+</sup>.* J Biol Chem, 1999. 274 (31), 21631-6.
- Zhang RB, Logee KA, Verkman AS.** *Expression of mRNA coding for kidney and red cell water channels in Xenopus oocytes.* J Biol Chem, 1990. 265 (26), 15375-8.
- Zonia L y Munnik.** *Uncovering hidden treasures in pollen tube growth mechanics.* Trends Plant Sci., 2009 14(6):318-27.
- Zonia LE, Stebbins NE, Polacco JC.** *Essential role of urease in germination of nitrogen-limited Arabidopsis thaliana seeds.* Plant Physiol., 1995. 107(4):1097-103.
- Zimmermann, P., Hirsch-Hoffmann, M., Hennig, L. y Gruissem, W.** *GENEVESTIGATOR. Arabidopsis microarray database and analysis toolbox.* Plant Physiol., 2004. 136, 2621-32