

Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**Estudio de la permeabilidad al agua y
solutos y sus mecanismos de regulación
en *Beta vulgaris***

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

Autora: **Lic. Moira Romina Sutka**

Director de tesis: Dra. Gabriela Amodeo

Lugar de trabajo: Laboratorio de Biomembranas. Departamento
de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires

Buenos Aires, 2005

Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**Water and solute permeability studies and
its regulatory mechanisms in
*Beta vulgaris***

Thesis work presented to obtain Doctoral degree
University of Buenos Aires

Author: **Lic. Moira Romina Sutka**

Director: Dra. Gabriela Amodeo

Laboratorio de Biomembranas. Departamento de Fisiología,
Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires

Buenos Aires, 2005

Agradecimientos

Al FONCYT, CONICET y UBA por los subsidios otorgados al laboratorio que hicieron posibles la realización de los proyectos.

A la ANPCyT y al CONICET por las becas que me otorgaron, las cuales hicieron posible el desarrollo de mi tesis.

A Mario Parisi, por haberme dado la oportunidad de trabajar en su Laboratorio, por su experiencia y por las discusiones enriquecedoras.

A toda la gente del Laboratorio de Montpellier:

A Christophe Maurel por su trato cálido y por estar al lado mío en la mesada enseñándome lo que leí en sus papers !!

A Colette por el tiempo que me dedicó y porque al principio repitió las cosas tantas veces como quise para que el francés me fuera más fácil de entender.

A Veronique y Doan por los consejos prácticos del laboratorio.

A Hélène, Tobias y Sam porque se preocuparon por mí durante los seis meses, para que el estar lejos de casa no fuera tan difícil.

A todos en general por hacerme sentir una integrante más de *Aqua*.

A Gabriela, por haberme elegido para seguir este camino que me dio tantas satisfacciones. Por confiar en mí y dejarme crecer. Al uso del mail, que me ayudó a estar "conectadas" durante la escritura.

A mis compañeros del laboratorio con quienes he compartido un largo camino a lo largo de todos estos años y hacen tan placentero el clima de todos los días:

A Claudia, por su forma de ser siempre dispuesta a darte una mano, su compromiso y su rectitud. Y la ayuda que me brindó con una de las primeras versiones de esta tesis.

A Pauli, por su trato, su franqueza, por ser tan criteriosa y por ayudarme al final con la lectura de la tesis. Ah, y la picadita de Bariloche!

A Roxana, por sus consejos y charlas enriquecedoras que hacen ver las cosas desde otro punto de vista.

A Ricardo, por ser buena persona, por la calma que transmite, por ayudarme con la lectura de los capítulos y por resolver de inmediato cada problema informático!

A Valeria, por compartir todos estos años desde que entre al laboratorio. Y por estar dispuesta siempre a dar una mano.

A Osval: por su risa sincera que se escucha en todo el laboratorio y contagia una sonrisa, por darse cuenta cada vez que algo me pasa y preocuparse por mí, por hacer entendible cada fórmula y por los Don Satur salados, Chara!!!

A Karin: por compartir tantos experimentos juntas, por divertirnos tanto en la mesada, por aprender a leer el pensamiento de la otra, por las charlas de nuestros temas..., y por la amistad que logramos.
Gracias por ayudarme con la tesis.

A Marce: por su visión de las cosas, su tranquilidad y sus mates de la tarde que vienen siempre tan bien.

A Paula: por el infaltable mate de la mañana tan necesario para empezar bien el día!
Y las frutillas!!

A Pilar: no nos conocemos mucho, pero gracias por bancar mis días de escritura y la toma del escritorio.

A María: por su dulzura, su fuerza y sus ganas de seguir trabajando!

A Rosalía: por que es macanuda y dispuesta. Y por que su super eficiencia nos ayuda en el trabajo diario.

A mis amigas Carito y Lore;

Caro, por estar siempre, y por nuestros almuerzos.

Lore, por bancarse siempre que sea tan olvidadiza para el teléfono y por nuestras tardes de mate.

A mi familia, lo más grande, por estar siempre para lo que sea!

Papá y Mamá quienes me ensañaron que el trabajo y verdad son lo más importante, porque me guiaron, confiaron en mí y porque son un ejemplo.

A Diego, que lo tengo lejos pero está cerca, por todo lo que me quiere y por incentivarme siempre a seguir adelante. Y por la hermosa familia que construyó.

A Esteban, mi bombón chiquito, por su forma de ser increíble, su espíritu alegre, porque que es un orgullo para mí y una gran personita.

A Osqui, por compartir nuestras vidas, por confiar en mí, por apoyarme y darme fuerza en el siguiente paso que me resulta tan duro (a pesar de que para el también lo sea) y por el abrazito de cada mañana.

Estudio de la permeabilidad al agua y solutos y sus mecanismos de regulación en *Beta vulgaris*

El descubrimiento en el mundo vegetal de canales para el movimiento de agua (acuaporinas) ha establecido un debate que abre las puertas a nuevas investigaciones que permitan dilucidar su papel. El objetivo de la presente tesis doctoral se centró por lo tanto en el estudio funcional y molecular del transporte de agua en la vía celular usando como modelo la membrana de la vacuola (tonoplasto) del parénquima de raíz de remolacha (*Beta vulgaris*).

Estudios a nivel de la vacuola, muestran que el cambio de volumen a largo plazo fue reversiblemente inhibido por mercurio y acidificación externa (citoplasmática), siendo nulo a pH 6.6. Se observa además una alta permeabilidad a urea, también sensible a pH.

Estudios a nivel del tonoplasto muestran un alto valor de permeabilidad al agua, inhibición por mercurio y baja energía de activación, parámetros que caracterizan la presencia acuaporinas, corroborado con anticuerpos específicos contra acuaporinas de tonoplasto (TIPs).

Estudios a nivel molecular, con la sobreexpresión de una TIP en ovocitos de *Xenopus* mostraron actividad funcional pero no efecto de pH. Sin embargo, acuaporinas de membrana plasmática (PIPs), sobreexpresadas en el mismo sistema, fueron fuertemente inhibidas por la acidificación intracelular. Mediante mutagénesis dirigida se localizó el residuo sensor de pH, una histidina, fuertemente conservada y responsable de la sensibilidad a pH de estas acuaporinas.

Este trabajo aporta por lo tanto evidencias que permiten fundamentalmente replantear el papel de la vía celular y establecer al pH como un importante mecanismo de regulación del pasaje de agua en plantas.

Palabras Claves: *Beta vulgaris*, acuaporinas, pH, tonoplasto, histidina, transporte de agua, acidificación, TIPs.

Water and solute permeability studies and its regulatory mechanisms in *Beta vulgaris*

The discovery of channels that facilitate water movement in plant cells has established a new debate that opens the possibility of new research work than can help to elucidate their role in plant water transport.

The objective of this thesis work is therefore to characterize at a functional and molecular level water transport in the cellular pathway employing as a model the vacuole membrane (tonoplast) of red beet (*Beta vulgaris*) root parenchyma.

At the cellular level, our findings showed that long term volume changes was reversibly inhibited by mercury chloride and external acidification, being abolished at pH 6.6. A high permeability to urea, also blocked by low pH was also observed.

At the level of the tonoplast, our findings showed high water permeability, mercurial inhibition, low activation energy, parameters that are consistent with the presence of functional aquaporins, which were also confirmed by antibodies against tonoplast aquaporins or TIPs.

At the molecular level, studies overexpressing a TIP clon in *Xenopus* oocytes showed functional aquaporin activity but lack of a pH response. On the other hand, overexpression of plasmalemma aquaporins or PIPs was highly sensitive to cytoplasmic acidification. Site directed mutagenesis allowed to localize the residues responsible of the pH sensing, a histidine, highly conserved in PIPs.

The described work allowed us to revisit the role of the cellular pathway in water transport and that to postulate that cytoplasmic acidification is an important regulatory mechanism involved in plant water transport.

Key words: *Beta vulgaris*, acuaporins, pH, tonoplast, histidin, water transport, acidification, TIPs.

Indice General

Indice de Figuras.....	5
Indice de Tablas.....	8
Abreviaturas.....	9
.....	
CAPITULO I: Introducción general.....	12
1.1 El agua y el modelo compuesto propuesto para su movimiento	13
1.2 El agua y su pasaje a través de una membrana biológica: rol de las acuaporinas.....	15
1.3 Caracterización funcional de las acuaporinas.....	18
1.4 La abundancia de las acuaporinas en el mundo vegetal.....	21
1.5 Regulación de las acuaporinas y su contribución al movimiento de agua en la planta.....	26
1.6 Las acuaporinas y el transporte de agua a nivel de la raíz.....	28
1.7 Objetivos de la presente tesis doctoral.....	30
CAPITULO II: Movimiento de agua y solutos en vacuolas: efecto de la acidificación citoplasmática	32
2.1 Introducción.....	32
2.1.1 La vacuola vegetal.....	32
2.1.2 Mecanismos de regulación del transporte de agua	34
2.1.3 Selectividad de transporte a través de acuaporinas.....	37
2.2 Materiales y métodos.....	39
2.2.1 Aislamiento de vacuolas de parénquima de raíces de remolacha.....	39
2.2.2 Estudio de los cambios de volumen mediante videomicroscopía.....	40
A-Medición a tiempos largos.....	40
Protocolo experimental.....	42

B- Medición a tiempos cortos.....	44
2.2.3 Medida de la permeabilidad osmótica.....	45
2.3 Resultados.....	46
2.3.1 Caracterización de la población vacuolar.....	46
2.3.2 Estudios de los cambios de volumen a tiempos largos . .	47
Efectos de un <i>shock</i> hiposmótico.....	47
Inhibición por reactivos mercuriales.....	48
Ajustes del volumen a diferentes pHs.....	51
Papel de la urea en los cambios de volumen.....	54
2.3.3 Estudios de los cambios de volumen a tiempos cortos...	57
Efectos de un <i>shock</i> hiposmótico: medición de P_f	57
Inhibición del P_f por compuestos mercuriales.....	58
Efectos del pH sobre el P_f	59
2.4 Discusión.....	60
CAPITULO III: Estudios de permeabilidad al agua en vesículas de tonoplasto y su regulación por pH.....	68
3.1 Introducción.....	68
3.2 Materiales y métodos.....	71
3.2.1 Aislamiento de vesículas de tonoplasto.....	71
3.2.2 Caracterización de vesículas de tonoplasto.....	73
Medición de proteínas.....	73
Ensayos de marcadores de membrana.....	73
a) ATPasas.....	73
b) IDPasa.....	74
c) Citocromo C.....	75
Microscopía electrónica.....	76
.....	
3.2.3 Experimentos de cambio de volumen mediante dispersión luminosa: espectrofotometría de <i>Stopped Flow</i>	77
Efecto de diferentes gradientes sobre el cambio de volumen	79
Efecto de la temperatura: energía de activación.....	79
Inhibición por compuestos mercuriales.....	79
Efecto del pH.....	80

3.2.4 Estudios de <i>Western Blot</i>	80
3.3 Resultados.....	82
3.3.1 Caracterización de vesículas de tonoplasto.....	82
Ensayos de marcadores de membrana.....	82
Microscopía electrónica.....	84
3.3.2 Medición de la permeabilidad osmótica en vesículas de tonoplasto.....	85
Efecto de la temperatura: energía de activación.....	87
Inhibición por compuestos mercuriales.....	87
Efecto del pH sobre el P_f	88
3.3.3 Detección molecular de acuaporinas en vesículas de tonoplasto.....	90
3.4 Discusión.....	92

CAPITULO IV: Estudios de cambio de volumen en ovocitos

expresando acuaporinas: mecanismo de regulación por pH.....	96
4.1 Introducción.....	96
4.2 Materiales y métodos.....	99
4.2.1 Obtención de los Clones.....	99
4.2.2 Mutagénesis dirigida mediante el método de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	100
PCR primaria.....	101
PCR secundaria.....	102
Purificación del producto de PCR y clonado del nuevo fragmento.....	102
Digestión.....	102
Ligación.....	103
Trasformación bacteriana.....	103
<i>Screening</i> de la mutación.....	103
4.2.3 Aislamiento de plásmidos y transcripción <i>in vitro</i>	103
4.2.4 Obtención de ovocitos	105
4.2.5 Inyección de ARNc en ovocitos de <i>Xenopus</i>	106
4.2.6 Estudios de cambio de volumen.....	107

Efecto del pH.....	108
4.3 Resultados.....	109
4.3.1 Expresión de TIPS de <i>Beta vulgaris</i> y estudio del efecto del pH	109
4.3.2 Expresión de acuaporinas con residuos histidina altamente conservados: efecto del pH.....	116
4.3.3 Análisis de secuencias y expresión de acuaporinas mutantes.....	118
4.4 Discusión.....	122
CAPITULO V: Conclusiones y perspectivas futuras.....	125
5.1 Conclusiones generales.....	125
5.2 Perspectivas futuras.....	131
Bibliografía.....	132
Trabajos Publicados.....	146

Índice de Figuras

Figura 1: Vías propuestas para el movimiento de agua.....	14
Figura 2: Estructura típica de una acuaporina.....	18
Figura 3: Esquema de las propiedades de pasaje de agua a través de una membrana.....	19
Figura 4: Comparación filogenética de los 35 genes MIP presentes en <i>Arabidopsis thaliana</i>	23
Figura 5: Organización del tejido de raíz.....	29
Figura 6: Sistema de medición de cambios de volumen mediante videomicroscopía: medición a tiempos largos.....	41
Figura 7: Sistema de medición de cambios de volumen mediante videomicroscopía: medición a tiempos cortos.....	45
Figura 8: Caracterización de la población vacuolar.....	47
Figura 9: Cambios de volumen inducidos por un gradiente hiposmótico: medición a tiempos largos	48
Figura 10: Efecto de compuestos mercuriales en condiciones isosmóticas	49
Figura 11: Efecto de compuestos mercuriales en condiciones hiposmóticas.....	50
Figura 12: Reversibilidad del efecto producido por compuestos mercuriales.....	51
Figura 13: Efecto del pH externo sobre las propiedades osmóticas.....	52
Figura 14: Reversibilidad del efecto del pH.....	54
Figura 15: Cambios de volumen asociados a la urea.....	55
Figura 16: Efecto del pH sobre los cambios de volumen asociados a la urea.....	56
Figura 17: Cambios de volumen inducidos por un gradiente hiposmótico: medición de P_f	58
Figura 18: Efecto de compuestos mercuriales sobre el P_f	59

Figura 19: Efecto del pH sobre el P_f	60
Figura 20: Esquema de aislamiento de vesículas purificadas de tonoplasto de <i>Beta vulgaris</i>	72
Figura 21: Esquema del equipo de espectrofotometría de <i>stopped flow</i>	78
Figura 22: Caracterización de la fracción enriquecida de tonoplasto de <i>Beta vulgaris</i>	84
Figura 23: Mediciones de cambios de volumen en las vesículas de tonoplasto	85
Figura 24: Dependencia de la permeabilidad al agua con el gradiente osmótico.....	86
Figura 25: Dependencia de la permeabilidad al agua con la temperatura	87
Figura 26: Efecto de compuestos mercuriales sobre la permeabilidad al agua.....	88
Figura 27: Efecto del pH sobre la permeabilidad al agua.....	89
Figura 28: Mediciones de permeabilidad al agua a diferentes valores de pH.....	90
Figura 29: Análisis de <i>Western Blot</i> de extractos de raíces de remolacha (<i>Beta vulgaris</i>).....	91
Figura 30: Esquema de mutagénesis dirigida mediante PCR.....	101
Figura 31: Valores de P_f para ovocitos control.....	107
Figura 32: Efecto de la concentración externa de protones sobre el pH interno del ovocito.....	109
Figura 33: Efecto del pH citoplasmático sobre TIPs de <i>Beta vulgaris</i> expresadas en ovocitos de <i>Xenopus</i>	110
Figura 34: Efecto del pH extracitoplasmático sobre TIPs de <i>Beta vulgaris</i> expresadas en ovocitos de <i>Xenopus</i>	111
Figura 35: Efecto del pH sobre TIP1;1 de <i>Arabidopsis thaliana</i> expresada en ovocitos de <i>Xenopus</i>	112
Figura 36: Alineamientos de secuencias de TIPs de <i>Beta vulgaris</i> y <i>Arabidopsis thaliana</i>	113

Figura 37: Patrón de conservación de histidinas.....	115
Figura 38: Efecto del pH sobre PIPs de <i>Arabidopsis thaliana</i> expresadas en ovocitos de <i>Xenopus</i>	117
Figura 39: Sensibilidad de PIP2;2 a la acidificación citoplasmática.....	118
Figura 40: Efecto del pH sobre ovocitos expresando la mutante H264A	119
Figura 41: Sensibilidad de la <i>wild type</i> (WT) y las mutantes PIP2;2 a la acidificación citoplasmática.....	120
Figura 42: Sensibilidad de la <i>wild type</i> (WT) y las dobles mutantes PIP2;2 a la acidificación citoplasmática.....	121
Figura 43: Modelo de redistribución simplástica del agua frente a la acidificación citoplasmática	130

Indice de Tablas

Tabla I: Isoformas TIPs marcadoras de los diferentes tipos de vacuolas.....	25
Tabla II: Caracterización bioquímica de la fracción microsomal y purificada de tonoplasto.....	83
Tabla III: Datos informados para el sensado de pH en diferentes canales	98

ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxiribonucleico
ADNasa: Desoxiribonucleasa
AQP: Acuaporina
ARN: Ácido ribonucleico
ARNasa: Ribonucleasa
ARNc: Ácido ribonucleico complementario
ATP: Adenosina trifosfato
BME: β -Mercaptoetanol
Brij: Polioxietilen 20 cetil éter
BSA: Albúmina bovina sérica
CTP: Citosina trifosfato
DEPC: Dietilpirocarbonato
dNTPs: Deoxi-nucleótidos trifosfato
DTT: Ditioneitol
Ea: Energía de activación
EDTA: Ácido etilen-diamino-tetraacético
GTP: Guanosina trifosfato
HEPES: Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina-etanosulfónico
M: Fracción microsomal
MES: 2-(N-Morpholino) Ethanesulfonic acid
MIP: Membrane Intrinsic Protein
MIT: Mitocondria
MP: Membrana plasmática
NIP: NOD26-like Intrinsic Protein
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
 P_d : Coeficiente de permeabilidad difusional
 P_r : Coeficiente de permeabilidad osmótica
PIP: Plasma membrane Intrinsic Protein
Pvp-40: Polivinilpirrolidona
RE: Retículo endoplasmático
SDS-PAGE: Sodium Dodecil Sulfato-Electroforesis en gel de poliacrilamida
SEM: Error estándar de la medio
SIP: Small basic Intrinsic Protein
TIP: Tonoplast Intrinsic Protein
TP: Tonoplasto
UTP: Uracilo trifosfato

CAPITULO I

Introducción general

Las plantas terrestres dependen del suministro de agua para su crecimiento y desarrollo y dado que son organismos sésiles han establecido diferentes mecanismos que les permiten mantener un equilibrio hídrico y sobrevivir en ambientes que muchas veces les son adversos (Bohnert *et al.*, 1995).

Por cada kilogramo de materia orgánica que fabrican los vegetales, su sistema de raíces puede absorber entre 500 y 1000 kg de agua, la mayoría de la cual se pierde por medio de la transpiración o evaporación a través de las hojas. Este flujo de agua puede ser muy intenso dado que en un día soleado una hoja puede transpirar su peso de agua en aproximadamente una hora (Raven *et al.*, 2000).

Las plantas terrestres evolucionaron gracias a barreras altamente efectivas contra la desecación. Por ejemplo, las partes aéreas de las plantas están recubiertas por la cutícula la cual es esencialmente impermeable a gases y agua. Para que se produzca eficientemente el intercambio gaseoso con la atmósfera, hay estructuras especiales llamadas estomas. Estos poros deben estar abiertos para permitir la entrada del dióxido de carbono que será utilizado en la fotosíntesis. Sin embargo, durante este tiempo las moléculas de vapor de agua escapan hacia afuera dado que existe un gradiente que favorece su salida. El agua que se pierde a través de las hojas debe ser reemplazada y es finalmente tomada desde el suelo por medio de las raíces. Entonces, cuando los estomas están abiertos existe una corriente continua de transpiración lo cual crea

gradientes de potencial agua que impulsan su movimiento, su entrada desde el suelo y su transporte a lo largo de la planta. Así, en los vegetales el agua asciende por los vasos conductores del xilema desde la raíz hasta las hojas movilizadas por el gradiente creado por la corriente transpiratoria. A la noche, por ejemplo, cuando los estomas están cerrados, la transpiración se reduce y son los gradientes osmóticos los que preponderan el movimiento de agua dentro de la planta (Steudle, 2000).

A pesar de todos estos complejos mecanismos desarrollados para minimizar la pérdida de agua por las hojas, controlar la transpiración y permitir la reposición del agua evapotranspirada, la falta de agua es uno de los factores ambientales que más afecta el crecimiento y desarrollo de las plantas. Esta puede producirse por sequía o salinidad del suelo, que junto con la temperatura son los factores abióticos que más afectan la agricultura en general. La comprensión de la regulación del transporte de agua en plantas en respuesta a las demandas fisiológicas y a las condiciones adversas del medio ambiente es uno de los temas de estudio de la fisiología vegetal que pueden proveer respuestas y soluciones que permitan en el futuro mejorar la capacidad de la planta a sobrellevar situaciones en las que el agua es el factor limitante.

1.1 El agua y el modelo compuesto propuesto para su movimiento

En la actualidad, se postula que existen tres vías diferentes por las cuales el agua puede recorrer los diferentes tejidos una vez que es absorbida por las raíces (Steudle, 1994, 1997) (Figura 1): *apoplástica*, definido como lo "externo" a la membrana plasmática, incluyendo pared celular, espacios intercelulares y vasos; *simplástica*, pasaje atravesando los citoplasmas celulares interconectados

a través de los plasmodesmos (uniones citoplasmáticas entre células) y que excluyen a la vacuola; y *transcelular*, donde el agua se mueve atravesando todas las membranas celulares, incluyendo tanto la plasmática como la de la vacuola (tonoplasto). Las vías simplástica y transcelular son conocidas en forma asociada como *vía célula-célula* o *vía celular* dado que es imposible separarlas experimentalmente.

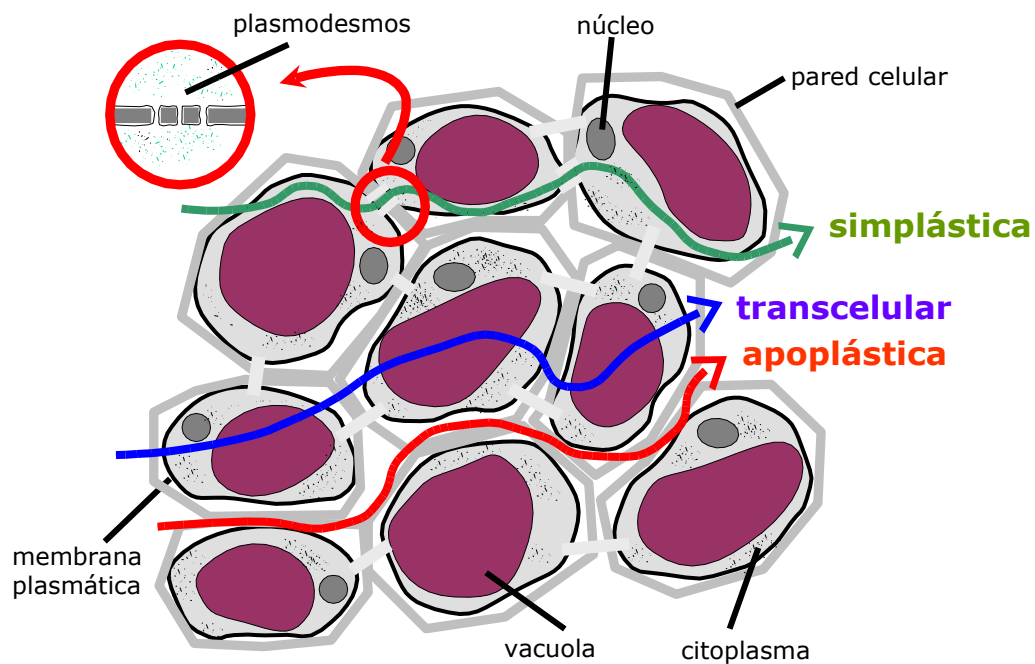


Figura 1: Vías propuestas para el movimiento de agua

En el esquema se muestran los caminos que puede seguir el agua en un tejido. Vía apoplástica (rojo), simplástica (verde) y transcelular (azul). Estas dos últimas se conocen conjuntamente como *vía célula-célula* o *celular*.

Desde el punto de vista teórico, la cantidad de agua que se desplaza a través de cada camino depende del flujo total de agua y especialmente del tipo de fuerza impulsora. Frente a una transpiración elevada, cuando los estomas están abiertos, hay fuertes gradientes de presión debido a la demanda por evaporación y entonces el agua se mueve en su mayoría a través del apoplasto ya que éste es el camino que ofrece menor resistencia. En ausencia de

transpiración el agua puede desplazarse además a través de la vía célula-célula por fuerza osmótica utilizando plasmodesmos y membranas semipermeables, que ofrecen una resistencia variable al flujo de agua.

En los estudios de transporte de agua, la atención siempre había estado enfatizada en el papel del apoplasto, considerada la vía principal para el movimiento de agua. Sin embargo las evidencias actuales tienden a demostrar que la vía celular puede tener un papel más importante (Baiges *et al.*, 2002, Jang *et al.*, 2004). Se propone además que los caminos interaccionan uno con el otro y que son estas interacciones las responsables de la regulación de la circulación de agua en la planta (Steudle, 2000).

1.2 El agua y su pasaje a través de una membrana biológica: rol de las acuaporinas

El replanteo del papel de la vía celular en el movimiento de agua de los vegetales ha reabierto el estudio del transporte de agua a través de las membranas biológicas.

Podemos preguntarnos, ¿cuál es el beneficio de utilizar esta vía? Si como barreras ofrecen resistencia variable al pasaje de agua, ¿qué es lo que determina la velocidad a la cual se mueve el agua a través de una membrana de una célula?

El estudio del transporte de agua a través de las membranas biológicas fue durante mucho tiempo un tema de especial interés pero generador de grandes controversias (Boyer, 1985). Durante muchos años se asumió que el agua atravesaba las membranas biológicas únicamente por difusión simple a través de la bicapa lipídica. Sin embargo, las evidencias experimentales

indicaban que la permeabilidad al agua¹ de algunas membranas era extremadamente alta para ser explicada únicamente por difusión.

En la década del 50, Koefoed-Johnsen y Ussing sugirieron por primera vez la posible existencia de poros o canales en eritrocitos humanos y en los años 60 se discutió la existencia de estos mismos poros en las células de las plantas (Ray, 1960; Dainty, 1963). En ambos casos, debido a problemas técnicos fue imposible confirmar la hipótesis. Años más tarde, Parisi y colaboradores observaron en ciertos tejidos un alto coeficiente de permeabilidad osmótica, lo que hacía pensar nuevamente en la existencia de una vía alternativa específica para el pasaje de agua a través de la membrana independiente de la bicapa lipídica (Parisi y Bourguet, 1985).

Recién cuarenta años después de que se plantearan las hipótesis de la existencia de canales se identifica por primera vez un poro específico para el movimiento de agua. Una proteína muy abundante llamada CHIP28, fue aislada de glóbulos rojos sin poder resolver al principio su función hasta que se observara que al ser expresada en ovocitos de *Xenopus laevis* estos aumentaban rápidamente su volumen en respuesta a un gradiente hiposmótico. Esta fue la primera demostración unívoca de que esta proteína favorece el transporte de agua a través de la membrana (Preston *et al.*, 1992). Este canal para agua recibió posteriormente el nombre de acuaporina o AQP (Agre *et al.*, 1993), y por homología de su secuencia se verificó que pertenece a una gran familia: MIP (*Membrane Intrinsic Protein*). A partir de ese momento diferentes acuaporinas fueron encontradas en distintos organismos: mamíferos, insectos, plantas,

¹ Las membranas poseen dos propiedades intrínsecas importantes con respecto a la permeabilidad al agua: la permeabilidad osmótica (P_o), que determina el flujo direccional de agua que se da a través de una membrana sometida a un gradiente de presión osmótica, y la permeabilidad difusional (P_d), que es una medida del flujo de agua a través de una membrana en ausencia de gradiente (Finkelstein, 1987).

levaduras y bacterias (Preston *et al.*, 1992; Le Cahérec *et al.*, 1996; Maurel *et al.*, 1993; Laize *et al.*, 1999; Calamita *et al.*, 1995).

Todas las MIPs pueden ser clasificadas en una gran familia basándose en rasgos típicos de la secuencia (Park y Saier, 1996). Si bien entre ellas varía el grado de homología el perfil de hidrofobicidad es invariable.

Estructuralmente, estas proteínas poseen seis dominios transmembrana separados por cinco *loops* conectores (identificados *loops* A hasta E) con los extremos amino y carboxi terminal del lado citoplasmático (Figura 2 a). Generalmente poseen una secuencia que es de aproximadamente 250 a 300 aminoácidos y una masa molecular que varía entre 27 y 31 kDa. La proteína presenta dos mitades homólogas orientadas en dirección opuesta en la membrana. El origen de estas dos partes simétricas podría deberse a una duplicación intragénica anterior a la divergencia de procariontes y eucariotes (Reizer *et al.*, 1993). Todas las MIPs contienen secuencias de residuos altamente conservados. Una de ellas es la secuencia NPA que se encuentra en los *loops* B y E. Por estudios de mutagénesis dirigida se demostró que este triplete de nucleótidos está involucrado en la formación del poro del canal selectivo para agua. Recientemente estudios de mayor resolución de la estructura terciaria muestran que los *loops* B y E se hunden en la membrana como medias hélices e interaccionan para formar una séptima hélice que reviste el canal conductor de agua (Murata *et al.*, 2000).

Según el modelo molecular del reloj de arena (*hourglass*), el cual deriva de estudios en acuaporinas de mamíferos, cada uno de los monómeros forma en la membrana agregados tetraméricos con una depresión central creada por la

interacción de los *loops* B y E (Jung *et al.*, 1994). La unidad conductiva, cuatro por tetrámero, está ubicada en el centro de esta estructura (Figura 2 b).

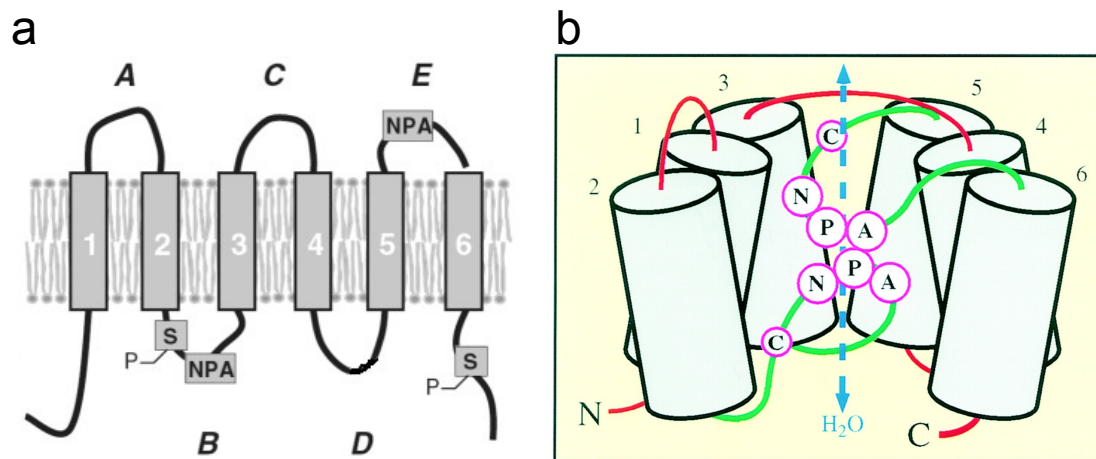


Figura 2: Estructura típica de una acuaporina

a) Esquema representativo de la estructura de un monómero de acuaporina con los seis dominios transmembrana (1-6) y los cinco *loops* conectores (A-C-E del lado apoplástico o vacuolar y B-D citoplasmáticos). Se muestran las secuencias NPA altamente conservadas e involucradas en la formación del poro y los sitios de fosforilación (residuos serina, S) en los *loops* B y extremo C-terminal. *Adaptado de Luu y Maurel, 2005.*

b) Estructura tridimensional de la acuaporina mostrando la participación de los sitios NPA en la formación del poro por donde pasa el agua.

1.3 Caracterización funcional de las acuaporinas

La presencia de estas proteínas permitió sentar las bases de los estudios moleculares del transporte de agua en las membranas celulares y abrió las puertas a la búsqueda de los posibles mecanismos de regulación.

Sin embargo, a diferencia de los canales iónicos, no existe para el estudio de las acuaporinas una técnica directa como las electrofisiológicas (*patch-clamp*) que permiten estudiar en forma unívoca la actividad del canal. El desarrollo de una técnica de estas características resulta muy dificultoso debido a dos hechos nada despreciables: la molécula de agua que atraviesa la acuaporina no tiene

carga, por lo que hace imposible medir una corriente eléctrica, y segundo las membranas nativas en las cuales se encuentran las acuaporinas tienen en general una permeabilidad al agua que es importante.

Es por ello que el estudio de acuaporinas se lleva a cabo considerando una serie de parámetros para verificar su presencia en una membrana (Tyerman *et al.*, 1999). A continuación se enumeran los más utilizados y se menciona la evidencia experimental esperable si la membrana tuviera acuaporinas activas (Figura 3):

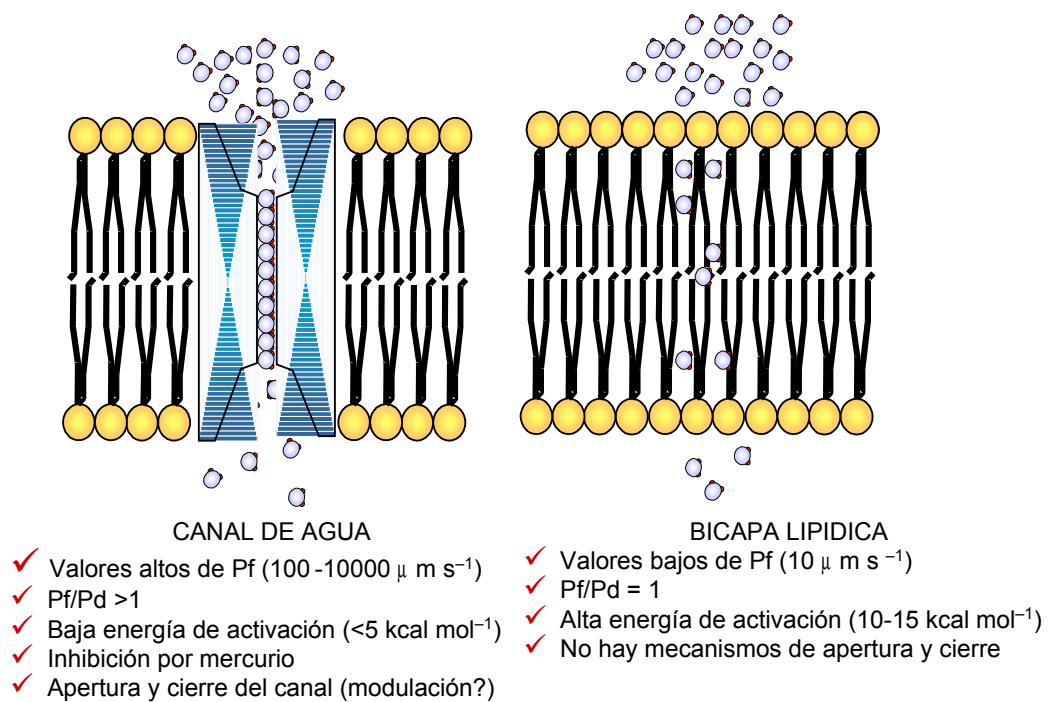


Figura 3: Esquema de las propiedades de pasaje de agua a través de una membrana

Se muestra el paso de agua a través de la bicapa lipídica o de canales específicos (acuaporinas) y los parámetros que caracterizan cada uno de estos caminos. Adaptado de Capurro *et al.*, 2004.

- a) *La permeabilidad osmótica deber ser muy superior a la difusional.* La relación P_f/P_d caracteriza el camino predominante del movimiento de agua. En el caso de que el agua se mueva únicamente atravesando los lípidos de la bicapa la relación P_f/P_d sería igual a 1 mientras que la relación es mucho mayor en membranas que contienen acuaporinas (Ye y Verkman, 1989).
- b) *La permeabilidad osmótica debe ser muy alta.* En sistemas de baja permeabilidad se describen bajos P_f . El reportado para vesículas de membrana apical de vejiga de sapo en ausencia de hormona antidiurética es de $3.9 \mu\text{m s}^{-1}$ (van Os *et al.*, 1994) y por ejemplo, de $6 \mu\text{m s}^{-1}$ para células de cebolla (Url, 1971). En cambio, membranas con canales de agua como la membrana del eritrocito, que posee AQP1, la permeabilidad es de $200 \mu\text{m s}^{-1}$ (Macey, 1984). Valores de P_f han sido informados para membranas vegetales, para el tonoplasto los valores oscilan entre 86 y $600 \mu\text{m s}^{-1}$ (Maurel *et al.*, 1997; Niemiety y Tyerman, 1997).
- c) *La energía de activación debe ser baja.* El transporte a través de una proteína específica tiene una energía de activación de Arrhenius (E_a) mucho menor que la que existe cuando el agua debe difundir a través de la bicapa (Tyerman *et al.*, 1999). Los valores observados experimentalmente muestran que la E_a del transporte a través de poros es menor a 5 kcal mol^{-1} mientras que esta varía entre 10 y 15 kcal mol^{-1} cuando las moléculas de agua difunden a través de los lípidos.

d) *Inhibición de los canales de agua.* Finalmente, el transporte a través de acuaporinas generalmente es inhibido por la presencia de compuestos mercuriales. Mediante estudios de mutagénesis dirigida se demostró que existe un residuo particular de cisteína (Cys189) sobre el cual el mercurio induce modificaciones covalentes dentro del poro de la proteína y en otras regiones de la molécula causando así un bloqueo o cambio conformacional que llevan a la inhibición del transporte de agua (Preston *et al.*, 1993; Zhang *et al.*, 1993; Daniels *et al.*, 1996). La desventaja es que su inespecificidad puede provocar un efecto desestabilizador sobre la membrana y no directamente sobre la proteína. Para descartar esta posibilidad experimentalmente se prueba la reversibilidad del efecto de mercurio con un agente reductor como el β -mercaptoetanol (Ishibashi *et al.*, 1994; Maggio y Joly, 1995). Más recientemente, Tyerman y colaboradores demostraron que el NO_3Ag también inhibe el transporte de agua (Niemietz y Tyerman, 2002). Sin embargo, el mercurio sigue siendo el inhibidor más utilizado.

1.4 La abundancia de las acuaporinas en el mundo vegetal

En mamíferos se han descubierto hasta el momento 11 acuaporinas, que se identifican con números de 0 a 11, esto es -AQP0 a AQP11- (Takata *et al.*, 2004). En plantas, la diversidad es asombrosamente mayor ya que luego de la secuenciación del genoma de *Arabidopsis thaliana* (Arabidopsis Genome Initiative, 2000) se han identificado 35 genes para la familia MIP en esta especie. A diferencia de la nomenclatura animal de acuaporinas, en plantas, los

dos principales grupos separados por homología de secuencias fueron nombrados de acuerdo a su localización celular, PIP (*Plasma Membrane Intrinsic Protein*) en membrana plasmática y TIP (*Tonoplast Intrinsic Protein*) en la membrana de la vacuola. La tercer subfamilia recibe actualmente el nombre de NIP (Heymann y Engel, 1999), y reúne a las *NOD26-like Intrinsic Protein*, ya que la primer proteína identificada de esta subfamilia (NOD26) se localizó en los nódulos de la membrana peribacteroidal de simbiosomas fijadores de nitrógeno de las raíces de leguminosas (Fortin *et al.*, 1987). Recientemente, se describió una cuarta subfamilia llamada SIP (*Small Intrinsic Protein*). Su nombre se debe a que son proteínas relativamente pequeñas, similares a las TIP, pero también a las PIP. Todavía no se conoce ni su localización ni su especificidad de sustrato. De los 35 genes encontrados 13 codifican para PIPs, 10 para TIPs, 9 para NIPs y 3 para SIPs.

Johanson utilizó las secuencias completas de todas las MIPs de *Arabidopsis thaliana* (AtMIPs) y construyó un árbol filogenético que permitió confirmar las cuatro subfamilias y distinguir, dentro de cada una de estas, grupos de proteínas relacionadas (Figura 4) (Johanson *et al.*, 2001). Para PIP y SIP hay solo dos grupos mientras que para TIP y NIP hay cinco y siete respectivamente debido a la gran divergencia dentro de las subfamilias. El grupo de las PIPs constituye el más homogéneo, se subdivide en PIP1 y PIP2, la diferenciación entre estos está dada por ensayos específicos de aminoácidos al nivel de los extremos amino y carboxi terminales.

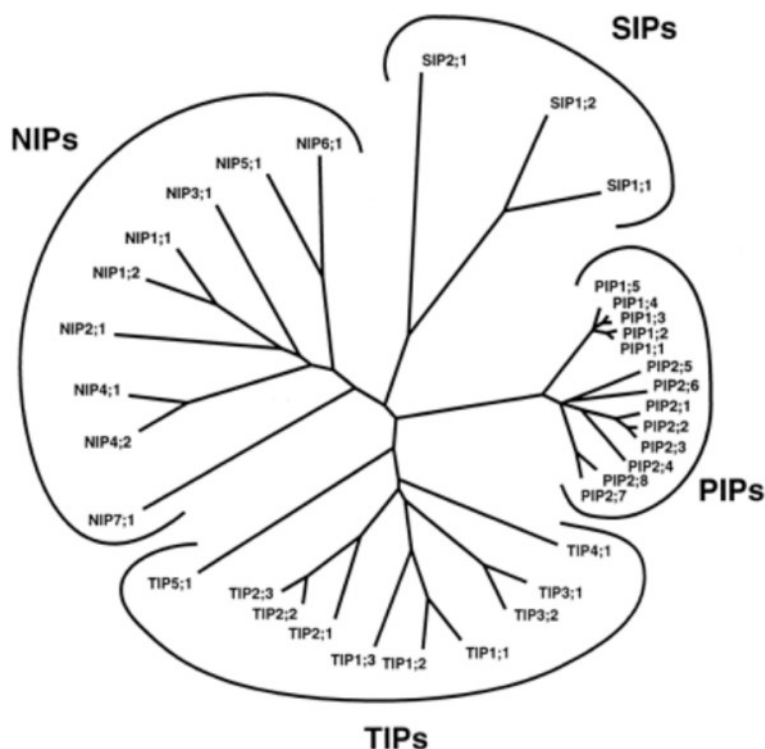


Figura 4: Comparación filogenética de los 35 genes MIP presentes en *Arabidopsis thaliana*

Los homólogos MIPs son divididos en cuatro subfamilias: PIPs, TIPs, NIPs y SIPs de acuerdo a su localización subcelular. El primer número indica el grupo al que pertenece y el segundo genes diferentes. Las subfamilias se dividen en diferentes grupos, las PIPs y SIPs poseen dos grupos, las TIPs cinco y las NIPs siete. (Adaptado de Johanson *et al.*, 2001)

Según los estudios iniciales sobre las acuaporinas se asumió la localización específica de PIP y TIP en membrana plasmática y tonoplasto respectivamente. En concordancia con esto, recientemente se verificó que diferentes homólogos de TIPs y PIPs unidos a la GFP muestran una localización en tonoplasto y superficie celular respectivamente (Cutler *et al.*, 2000). Sin embargo, esto fue cuestionado por estudios realizados usando anticuerpos contra distintas MIPs de *Mesembryanthemum crystallinum* donde se probaron diferentes fracciones de membrana separadas por gradiente de densidad de sacarosa (Barkla *et al.*, 1999; Kirch *et al.*, 2000). Anticuerpos contra TIP marcaron específicamente la fracción de tonoplasto pero los anticuerpos contra PIP reaccionaron con

fracciones subcelulares diferentes de membrana plasmática mostrando un complejo patrón de expresión. PIP1 es acumulada preferencialmente en invaginaciones de membrana plasmática llamadas plasmalemosomas, que están casi en contacto con la vacuola (Robinson *et al.*, 1996), las cuales podrían facilitar el pasaje de agua o solutos entre la vacuola y el apoplasto con mínimas perturbaciones del citoplasma. También se ha demostrado que un homólogo de PIP1 se ubica en la región perinuclear además de la membrana plasmática (Chaumont *et al.*, 2000). La acumulación de ciertas PIPs en compartimentos intracelulares podría deberse a que las proteínas siguen la ruta normal del camino secretorio o a que exista un tráfico entre vesículas intracelulares y membrana plasmática como ocurre en el riñón con la expresión de AQP2 inducida por vasopresina (Gustafson *et al.*, 1998). En plantas, esto último fue recientemente investigado para la MctIP1;2 regulada durante estrés osmótico (Vera-Estrella *et al.*, 2004).

Es interesante remarcar además que por similitud de secuencia se estableció que las homólogas MIP son acuaporinas, pero son pocas las proteínas así clasificadas que han sido caracterizadas funcionalmente como transportadoras de agua. PIP2 y γ -TIP han sido expresadas en ovocitos de *Xenopus laevis* (Chaumont *et al.*, 2000; Fetter *et al.*, 2004; Maurel *et al.*, 1993) produciendo un importante cambio de volumen. PIP1, en cambio, muestra una baja permeabilidad osmótica al ser expresada en el mismo sistema (Chaumont *et al.*, 2000; Johansson *et al.*, 1998). Se postula que estas podrían estar involucradas en el transporte de otras sustancias todavía no identificadas. Por ejemplo, hay evidencias que indican que NtAQP1 de tabaco transporta glicerol en adición al agua (Biela *et al.*, 1999) mientras que NtTIP1 transporta agua, glicerol y urea (Gerbeau *et al.*, 1999).

Mientras que las PIPs se dividen en dos grandes grupos antes mencionados, las TIPs presentan un mayor número de isoformas (Figura 4). Estudios de localización de estas diferentes isoformas de acuaporinas de tonoplasto (llamadas α -TIP, γ -TIP, y δ -TIP) muestran que están asociadas con diferentes tipos de vacuolas (Tabla I) apoyando además el concepto de que las TIP no serían únicamente transportadoras de agua. Otra característica saliente de las TIPs es que son muy abundantes en el tonoplasto. Por ejemplo, en raíces de rabanito, γ -TIP alcanza el 30-50% de la proteína total de la membrana mientras que la H⁺-ATPasa constituye solo el 10% (Higuchi *et al.*, 1998). Esta gran cantidad de proteína sería mucho más de la necesaria únicamente para el transporte de agua y esto también ha sugerido que podría tener otras funciones (Higuchi *et al.*, 1998; Hill *et al.*, 2004).

Tipo de vacuola	Isoforma TIP	Referencia
PSV	α -TIP y δ -TIP ó α -TIP, γ -TIP, y δ -TIP	Jauh <i>et al.</i> , 1999
Líticas	γ -TIP	Paris <i>et al.</i> , 1996
Pigmentos y proteínas vegetativas	δ -TIP ó δ -TIP y γ -TIP	Jauh <i>et al.</i> , 1998
Autofágicas	α -TIP	Moriyasu <i>et al.</i> , 2003

Tabla I: Isoformas TIPs marcadoras de los diferentes tipos de vacuolas

La tabla muestra las isoformas de TIPs presentes en cada tipo particular de vacuolas. Más de una isoforma puede estar presente en una misma vacuola. PSV vacuolas almacenadoras de proteínas.

1.5 Regulación de las acuaporinas y su contribución al movimiento de agua en la planta

Nos preguntábamos cuál es el beneficio del transporte de agua a través de poros específicos y la respuesta está asociada a la capacidad de regulación de la velocidad del movimiento de agua. A diferencia del transporte de agua que se da a través de la bicapa lipídica, el hecho de que existan poros específicos para el pasaje de agua da la base molecular para la presencia de mecanismos capaces de regularlos.

Los mecanismos de regulación hasta ahora descriptos pueden ser agrupados en varios niveles:

- Cambios en la expresión (constitutiva o inducida) del gen o de la proteína
- Tráfico y reubicación de acuaporinas de vesículas intracelulares a la membrana plasmática
- Control directo de la actividad de la acuaporina (referido como activación del canal, gatillado² *-gating-*)

De todos estos mecanismos, el campo en el que más se ha avanzado es el de los estudios involucrados en los cambios de expresión. Se ha visto que las acuaporinas pueden expresarse constitutivamente o ante un estímulo determinado ya sea en un tipo celular o en muchos tipos celulares de diferentes órganos (Sarda *et al.*, 1997; Karlsson *et al.*, 2000).

Las que se expresan constitutivamente pueden alcanzar el 20% de la proteína total de la membrana plasmática o del tonoplasto (Johansson *et al.*,

² El término gatillado o *gating* se refiere a los cambios conformacionales que sufre la proteína para determinar la apertura o cierre del poro y por lo tanto permitir o no el pasaje de sustancias. Este tema está muy bien estudiado en canales iónicos (Blatt 1991, Czempinski *et al.*, 1999) pero todavía no es claro cómo operaría este mecanismo en canales de agua.

1996; Karlsson *et al.*, 2000). En algunos casos la expresión es específica de un determinado órgano y está correlacionada con células a través de las cuales se dan grandes flujos de agua como por ejemplo la α -TIP de cotiledones de poroto y la TobRB7 de raíces de tabaco (Johnson *et al.*, 1989; Conkling *et al.*, 1990). Otras son expresadas en células en crecimiento como So- δ -TIP de espinaca (Karlsson *et al.*, 2000) y δ -VM23 y γ -VM23 de rabanito (Higuchi *et al.*, 1998).

Por otro lado, la expresión de las acuaporinas puede ser regulada transcripcionalmente ante una situación fisiológica determinada. Algunas acuaporinas son inducidas por sequía (Guerrero *et al.*, 1990; Fray *et al.*, 1994) a través de dos vías diferentes, una activada por la presencia de ABA exógeno (Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 1997) y otra independiente de ABA. Otras son reguladas por luz (Kaldenhoff *et al.*, 1993) y hormonas como las giberelinas (Suga *et al.*, 2002). También se ha reportado que el ARNm de un homólogo de AtPIP1 en *Lotus japonicus* varía su expresión a lo largo del día (Henzler *et al.*, 1999). Una homóloga MIP de membrana vacuolar de la leguminosa *Medicago truncatula* es inducida después de la infección con un hongo (Roussel *et al.*, 1997; Krajinski *et al.*, 2000). El estrés salino, al igual que la falta de agua y de nutrientes, produce una fuerte reducción en la permeabilidad al agua de las raíces (Azaizeh *et al.*, 1992; Carvajal *et al.*, 1996).

El caso de regulación de la permeabilidad al agua por translocación de acuaporinas a la membrana plasmática está muy bien documentado en la AQP2 humana (Sasaki *et al.*, 1998). En plantas, las primeras evidencias de un mecanismo semejante se ha documentado por primera vez en McTIP1;2 asociada a situaciones de estrés osmótico (Vera Estrella *et al.*, 2004).

Por ultimo, la regulación del transporte de agua puede darse en forma más rápida por diferentes mecanismos que actúan directamente sobre la proteína y que trataremos con más detalle en el capítulo II.

1.6 Las acuaporinas y el transporte de agua a nivel de la raíz

La raíz es un órgano de vital importancia para la planta dado que su función es anclarla al suelo y absorber nutrientes y agua. Para llegar desde el suelo hasta los vasos del xilema, el agua debe atravesar una serie de capas celulares concéntricas (Figura 5 a). Estas incluyen la epidermis, exodermis (solo en algunas raíces), varias capas de células de parénquima cortical, endodermis, periciclo, células parenquimáticas del xilema y finalmente los vasos (Steudle y Peterson, 1998). Las células de la endodermis y exodermis poseen una estructura particular llamada bandas de Caspari (Figura 5 b) las cuales consisten en depósitos de suberina o lignina que restringen el movimiento radial de agua en el apoplasto. Luego de ser absorbida desde el suelo, el agua se desplazará de acuerdo al modelo compuesto descrito en la Sección 1.1 pero a la altura de las bandas de Caspari, para llegar al xilema, el agua debe necesariamente entrar al simplasto, lo que implica cruzar las membranas celulares. Hace muchos años se pensaba que la vía celular era importante únicamente a la altura de la endodermis dado que no había otra alternativa de paso posible. Una vez alcanzado el tejido vascular, el agua se mueve axialmente hacia las partes aéreas de la planta.█

a

b

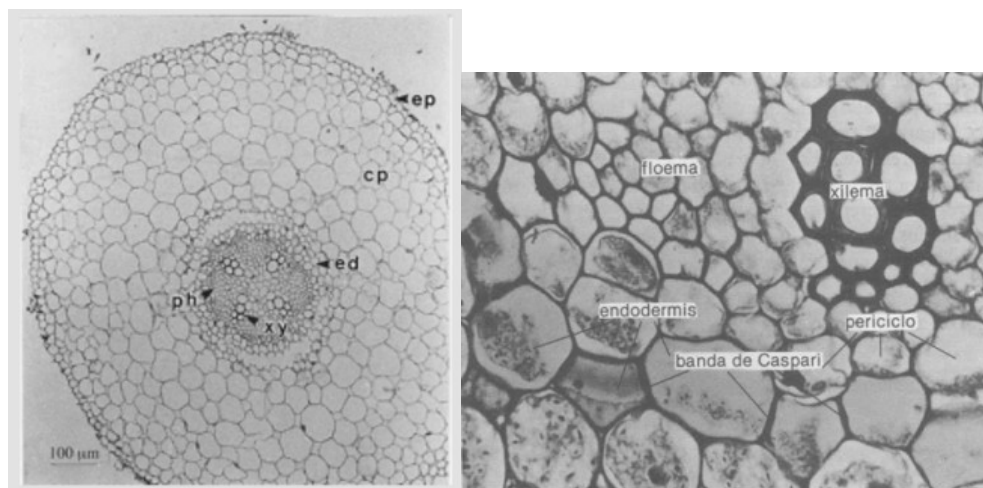


Figura 5: Organización del tejido de raíz

a) Fotografía de un corte de raíz principal de soja con las capas celulares concéntricas: ep epidermis, cp parénquima cortical, ed endodermis, xy xilema, ph floema. Tomado de Javot y Maurel, 2002.

b) Fotografía mostrando en detalle la endodermis con las paredes celulares engrosadas. Tomado de Jensen y Salisbury, 1988.

Luego del descubrimiento de las acuaporinas se replantea el papel de la vía celular en todo el movimiento de agua. Las evidencias indicarían que la función predominante de las acuaporinas en las raíces pareciera ser la entrada de agua, y existe una relación entre cambios rápidos en la permeabilidad y la expresión de estas proteínas (Henzler *et al.*, 1999; Clarkson *et al.*, 2000). Si bien la entrada de agua es necesaria para un óptimo crecimiento de la planta es clave tener un sistema de raíces altamente regulado en condiciones de estrés para reducir la entrada o pérdida desde el suelo. Se necesitan estudios más profundos que permitan clarificar un poco más la función de las acuaporinas en la raíz y su relación con el balance de agua en la planta entera.

Usando como modelo experimental la raíz almacenadora de remolacha (*Beta vulgaris* L.) se iniciaron en el Laboratorio de Biomembranas los primeros trabajos de estudio del transporte de agua, poniendo el énfasis en la

contribución de la vía celular. Empleando secciones de parénquima de raíces de remolacha y aplicando una técnica desarrollada en el laboratorio (Dorr *et al.*, 1997) se realizaron mediciones de flujo de agua utilizando cortes transversales (camino axial) y longitudinales (camino radial) para poder discriminar ambos caminos. Empleando compuestos mercuriales se pudo bloquear en forma reversible el flujo de agua en cortes longitudinales en respuesta a un gradiente osmótico, lo que indica la presencia de canales de agua sensibles a mercurio involucrados en el pasaje de agua en el camino radial (Amodeo *et al.*, 1999).

1.7 Objetivos de la presente tesis doctoral

Decidimos entonces estudiar en detalle el transporte de agua a través de la vía celular de la raíz y sus posibles mecanismos de regulación, centrandos nuestro interés en aquellos que controlan directamente la actividad de la acuaporina o *gating* del canal.

La estrategia de trabajo consistió en llevar a cabo un estudio comparativo respetando los diferentes niveles de organización para poder diseccionar las bases moleculares y el mecanismo acoplado de señalización. Es por ello que se realizaron estudios de cambio de volumen en vacuolas aisladas del parénquima de raíz de remolacha (*Beta vulgaris*), sistema de trabajo que más se aproxima a la condición *in vivo* (Capítulo II). Estudiamos el comportamiento osmótico de las vacuolas y como se afecta el cambio de volumen en presencia de mercurio o pH ácido. Posteriormente, se trabajó con vesículas aisladas de tonoplasto, preparaciones en las cuales quedaron expuestas las acuaporinas en su membrana nativa, lo que permitió independizarnos del contenido vacuolar y la composición del medio tanto intra como extravacuolar (Capítulo III). Probamos

el efecto de la acidificación del medio sobre el coeficiente de permeabilidad osmótica y detectamos molecularmente la presencia de acuaporinas. Finalmente, centramos los estudios en la sobreexpresión de la acuaporina (TIPs y PIPs) en un sistema heterólogo (ovocitos de *Xenopus laevis*) para así poder manipular directamente a la proteína y analizar cómo el pH participa de la regulación directa sobre la acuaporina (Capítulo IV).

CAPITULO II

Movimiento de agua y solutos en vacuolas: efecto de la acidificación citoplasmática

2.1 Introducción

2.1.1 La vacuola vegetal

Las células vegetales se caracterizan por poseer una pared celular rígida básicamente compuesta de celulosa, cloroplastos involucrados en el proceso de fotosíntesis y una gran vacuola central. En células maduras las vacuolas pueden ocupar entre el 80 y 90% del volumen total, quedando el citoplasma restringido a una fina capa que rodea la vacuola (Marty, 1999).

Las vacuolas vegetales son organelas multifuncionales centrales para el desarrollo celular. En tejidos meristemáticos son menos prominentes y están siempre presentes como pequeñas provacuolas. Estas son producidas por brotación y fusión de vesículas de la cara *trans* del aparato de Golgi (Taiz y Zeiger, 1998). A medida que la célula se expande, las provacuolas se van fusionando gradualmente hasta formar la gran vacuola central característica de la célula vegetal madura. Son compartimientos líticos, (semejante a los lisosomas animales) ya que contienen en su interior proteasas, ribonucleasas y glicosidasas, las cuales están relacionadas con senescencia (Smart *et al.*, 1994), germinación, produciendo la ruptura de las proteínas almacenadas, y con otros

procesos vinculados con la detoxificación celular. Funcionan también como reservorio de una variedad de metabolitos incluyendo azúcares (Rausch, 1991), ácidos orgánicos (Ting, 1985), y proteínas (Chrispeels, 1991) los cuales pueden ser recuperados y utilizados en los diferentes caminos metabólicos. Algunas vacuolas acumulan sustancias que en altas concentraciones podrían resultar tóxicas para la célula como por ejemplo cadmio (Vogeli-Lange y Wagner, 1990) y sodio (Blumwald, 2000; Blumwald y Poole, 1985). También almacenan pigmentos, en general flavonoides solubles en agua llamados antocianinas. En particular, las vacuolas de *Beta vulgaris* almacenan betaxantinas (amarillas) y betacianinas (rojas). Estas últimas constituyen un 90% del pigmento total. La más importante de las betacianinas es la betaína, que confiere el color púrpura característico que posee la raíz (<http://www.agsci.ubc.ca>).

Otra función importante de la vacuola es la relacionada con respuestas celulares al ambiente y factores bióticos que provocan estrés. Está descrito que las células de las plantas producen un grupo de compuestos antibacteriales fenólicos o terpenoides conocidos como fitoalexinas (Ersek y Kiraly, 1986) que por ejemplo en soja son producidos cuando la planta es amenazada por un patógeno causando la disfunción de la membrana (Giannini *et al.*, 1990).

Por otro lado son las encargadas del mantenimiento de la homeostasis iónica y del pH dado que las reacciones en el citoplasma son muy sensibles a los cambios en estos parámetros. La concentración de calcio citoplasmática es mantenida en niveles extremadamente bajos (100 nM) a costa de la vacuola que almacena calcio alcanzando una concentración mucho mayor (1 mM).

Uno de los roles básicos de las vacuolas es la osmorregulación. En este proceso están involucrados dos componentes físicos: la presión osmótica y la presión de turgencia. La primera es la presión necesaria para impedir el movimiento de agua a través de una membrana semipermeable (membrana únicamente permeable al agua) mientras que la presión de turgencia está relacionada directamente con la presión que ejercen los componentes de la célula sobre la pared celular. El proceso de osmorregulación le permite a la célula sobrevivir bajo un amplio rango de presiones osmóticas ejercidas por las células vecinas y por cambios en el apoplasto derivados del ambiente. Podemos mencionar dos mecanismos de osmorregulación vacuolar: uno en el cual un aumento o disminución de la presión osmótica es revertido por la síntesis o degradación de osmolitos almacenados en la vacuola y otro en el cual movimientos de iones y agua a través del tonoplasto rápidamente restauran cualquier cambio osmótico (Bacon *et al.*, 1965; Leigh *et al.*, 1979).

2.1.2 Mecanismos de regulación del transporte de agua

Las TIPs son muy abundantes en vacuolas y se piensa que son las responsables de los movimientos rápidos de agua que se producen a través de las mismas. ¿Qué mecanismos son los que se disparan para regular su funcionamiento? Como vimos sección 1.5 del capítulo I, las acuaporinas pueden expresarse constitutivamente o ante un estímulo determinado, siendo esta una forma de regulación a nivel transcripcional, materia en la que se han realizado grandes avances (Luu y Maurel, 2005).

En particular, nos interesó investigar los mecanismos de regulación menos explorados que son los que pueden darse a nivel postraducciona, es decir directamente sobre la proteína. Dentro de estos mecanismos, uno de los primeros propuestos fue la *fosforilación*. Se ha observado que la NOD26 de soja, la α -TIP de poroto y la PM28A de espinaca son fosforiladas *in vivo* (Miao *et al.*, 1992; Johnson y Chrispeels, 1992; Johansson *et al.*, 1998). Por estudios de mutagénesis dirigida se sabe también que la α -TIP es fosforilada en la Ser 7 del extremo N-terminal mientras que la NOD26 y la PM28A son fosforiladas en el extremo C-terminal en las Serinas 264 y 272 respectivamente. Usando expresión heteróloga en ovocitos de *Xenopus*, los mismos autores mostraron que la fosforilación de PM28A y α -TIP en estos sitios causa un aumento en la actividad de transporte de agua (Johansson *et al.*, 1998; Maurel *et al.*, 1995) mientras que la fosforilación de la NOD26 no fue correlacionada con un incremento de la actividad del canal (Weaver y Roberts, 1992). También se ha informado que *in vivo* un alto potencial agua apoplástico puede disparar la fosforilación de la serina 274 en la PM28A (Johansson *et al.*, 1996, 1998). A menor potencial agua, como por ejemplo durante la sequía, la proteína estaría menos fosforilada y por lo tanto disminuiría la actividad de transporte de agua, como se sugiere por experimentos de expresión en ovocitos. La proteína kinasa que fosforila la PM28A está asociada a membrana plasmática y es dependiente de Ca^{+2} (Johansson *et al.*, 1996) al igual que la que fosforila la α -TIP (Johnson y Chrispeels, 1992).

Otro mecanismo de regulación de acuaporinas propuesto está relacionado con la *presencia de cationes divalentes*. Recientemente se ha demostrado que el

coeficiente de permeabilidad al agua (P_f) de vesículas de membrana plasmática de *Arabidopsis thaliana* y *Beta vulgaris* disminuye fuertemente en presencia de calcio (Gerbeau *et al.*, 2002; Alleva *et al.*, 2004) y en menor proporción frente a otros cationes. Otros trabajos muestran que el calcio compensaría el efecto producido por el estrés salino (Carvajal *et al.*, 2000), sugiriendo un efecto directo de este ion sobre la acuaporina. En animales existen evidencias para la acción directa del calcio sobre la proteína ya que se propone un sitio de unión a calcio en el extremo C-terminal de la AQP1 fundamentado en la alta homología de secuencia encontrada entre este extremo y el "EF-hands" de las proteínas que unen calcio de la familia de la calmodulina (Fotiadis *et al.*, 2002). Otra evidencia muestra que la disminución de calcio aumenta la permeabilidad al agua y que esta sensibilidad se pierde en la mutante His40 de la AQP0 (Németh-Cahalan y Hall, 2000).

Un nuevo mecanismo de regulación recientemente investigado propone el gatillado del canal mediante estimulo mecánico (Wan *et al.*, 2004).

Por último, hace ya muchos años se propuso que la permeabilidad al agua en tejidos animales en los cuales ahora se sabe se expresan normalmente las AQP2, AQP3 y AQP4 era regulada por la acidificación del medio (Parisi *et al.*, 1983; Parisi y Bourguet, 1984; Parisi y Wietzerbin, 1984). Más recientemente se descubrió que la concentración de protones puede regular la permeabilidad osmótica de ovocitos de *Xenopus laevis* expresando AQP3 (Zeuthen y Klaerke, 1999) y AQP0 (Németh-Cahalan y Hall, 2000). Sin embargo, hasta el inicio de la presente tesis no había evidencias de la dependencia del pH de los canales de

agua en las plantas. Este tipo de regulación sería de gran importancia para las plantas ya que muchos procesos asociados con el metabolismo, transporte de solutos o factores ambientales provocan perturbaciones en el pH. Por ejemplo, el pH citoplasmático es afectado bajo condiciones de salinidad y anoxia (Katsuhara *et al.*, 1989; Felle, 2001). Entonces, la relación entre el movimiento de agua y la concentración de protones permitiría regular rápidamente el transporte evitando pérdidas o recuperando agua según sea la necesidad de la planta.

2.1.3 Selectividad de transporte a través de acuaporinas

Respecto a la selectividad de transporte de las acuaporinas y debido a que las vacuolas son organelas con funciones de osmoregulación y acumulación de solutos resulta interesante analizar además si el transporte de agua está asociado a solutos. Se ha demostrado recientemente que algunas acuaporinas transportarían pequeños solutos no cargados en adición al agua, por ejemplo la urea (Gerbeau *et al.*, 1999) que es un importante compuesto nitrogenado. Después del carbono, el nitrógeno es el elemento más limitante en la nutrición de las plantas y es uno de los macronutrientes esenciales. Sólo una pequeña parte está presente en el suelo mayoritariamente en forma orgánica y de la cantidad de nitrógeno total sólo un 5% está directamente disponible para las plantas principalmente como nitrato (NO_3^-) y amonio (NH_4^+). Parte del amonio presente en el suelo proviene de la degradación de urea por la enzima ureasa. La urea es un compuesto que se genera a partir de la detoxificación de compuestos nitrogenados en humanos y animales y de fertilizantes basados en esta molécula

(<http://www.fertilizer.org/ifa/publicat/techpprs/techdx3.asp>). De todas maneras, la concentración de urea en el suelo es baja debido a la degradación producida por los microorganismos.

La mayor parte del nitrógeno derivado de urea entraría a las raíces de las plantas en forma de amonio (Marschner, 1995) aunque hay evidencias de que podría entrar como urea antes de su degradación (Hine y Sprent, 1988; Gerendás *et al.*, 1998). Recientemente se demostró la presencia del cotransportador urea-H⁺ (AtDUR3) en plantas superiores, expresado diferencialmente en raíces bajo deficiencia de nitrógeno (Liu *et al.*, 2003). Además de ser una fuente de nitrógeno externa, la urea es sintetizada en el interior de las células de las plantas durante la degradación de la arginina vía la arginasa, en el ciclo de la ornitina (Polacco y Holland, 1993).

Por todo lo expuesto, las vacuolas representan un modelo ideal para estudiar transporte de agua. Como describiéramos en el Capítulo I, las TIPs son muy abundantes en vacuolas y se piensa que los movimientos rápidos de agua se dan a través de las mismas. En particular, en nuestro material de estudio Marty-Mazars y colaboradores identificaron TIPs en el parénquima de remolacha (Marty-Mazars *et al.*, 1995). Los estudios fueron de identificación y localización pero no funcionales y menos aún de regulación.

En una primera etapa de nuestro trabajo nos centramos en la caracterización de los movimientos de agua y solutos que podrían formar parte de los procesos de osmoregulación tomando como modelo vacuolas aisladas del

parénquima de la raíz de remolacha. Estudiamos además si la concentración de protones, más específicamente la acidificación citoplasmática, estaría involucrada de alguna manera en la regulación del comportamiento osmótico.

2.2 Materiales y Métodos

2.2.1 Aislamiento de vacuolas de parénquima de raíces de remolacha

Para los experimentos se utilizaron remolachas (*Beta vulgaris* L.) adquiridas comercialmente, las cuales fueron mantenidas en el laboratorio en condiciones de humedad en pots con un suelo fértil hasta la realización de los experimentos. El material fue utilizado en un lapso de tres semanas.

Las vacuolas se aislaron mecánicamente de acuerdo al método de Leigh y Branton (Leigh y Branton, 1976). Se separaron las raíces de las plantas de remolacha, se lavaron, se cortaron en secciones de 1 cm³ y se incubaron durante 20 minutos en una solución 2 M sacarosa. Estas secciones se colectaron y se apoyaron sobre un material absorbente para eliminar el exceso de solución. Luego de secarlas se transfirieron a la solución control (400 mM manitol, 1 mM EDTA, 20 mM Tris-MES, pH 7.6) donde se cortaron finamente con un bisturí nuevo u hoja de afeitar tipo Gillette, lo que permitió la liberación de las vacuolas al medio. El aislamiento se realizó el mismo día del experimento y las vacuolas obtenidas se mantuvieron en la solución control a temperatura ambiente hasta la realización de los mismos. Todas las mediciones se realizaron dentro de las 4 horas del aislamiento.

2.2.2 Estudio de los cambios de volumen mediante videomicroscopía

A- Medición a tiempos largos

Para estudiar los cambios relativos de volumen de vacuolas individualizadas, se utilizó un soporte de observación construido especialmente en plexiglas. El mismo presenta una perforación central en forma de cono abierto que es mayor en la parte superior (15 mm) y que se reduce dejando en la parte inferior una abertura de 10 mm de diámetro. Esto permite colocar en la parte inferior un cubreobjetos de 12 mm de diámetro, cuyo borde hace contacto con la base de la perforación de la cámara y que se recubre con silicona (Silicon Argentina). El cubreobjetos se sostiene con una placa de metal que a través de imanes queda adherida a la cámara de plexiglas (Figura 6 b). La presencia de silicona y la placa de metal impiden pérdidas o filtraciones cuando se llena la cámara con solución (volumen total 500 μl). El cubreobjetos de la base se reemplaza por uno nuevo en cada experimento.

La preparación fue perfundida mediante un sistema formado por tres jeringas de 60 ml con catéteres que llevan solución a la cámara donde se encuentra la solución con vacuolas. Posee un sistema de válvulas que se regulan para garantizar un flujo fijo continuo y otras que permiten el intercambio fácil para seleccionar la solución que llega a la cámara sin perturbar la vacuola seleccionada. Un catéter pequeño conectado a una bomba retira el exceso de solución (Figura 6 a). Se realizaron perfusiones con soluciones con colorantes para calcular los flujos y espacios muertos del sistema. El flujo de perfusión fue de 430 $\mu\text{l min}^{-1}$ y el espacio muerto fue de 250 μl . La solución en la cámara de

observación alcanza el 95% de la concentración de la de perfusión en 60 segundos. El sistema de esta manera garantiza poder mantener la perfusión durante todo el experimento y poder medir el cambio de volumen en función del tiempo en vacuolas aisladas suspendidas en el medio apropiado.

Las vacuolas se observan con un microscopio invertido Olympus IMT-2 utilizando un aumento de 300X. Una conexión a través de una cámara de video digital (Electrim EDC-1000) permite visualizar las imágenes en una computadora y digitalizarlas a determinados tiempos (amplificación total 1300X) (Figura 6 a).

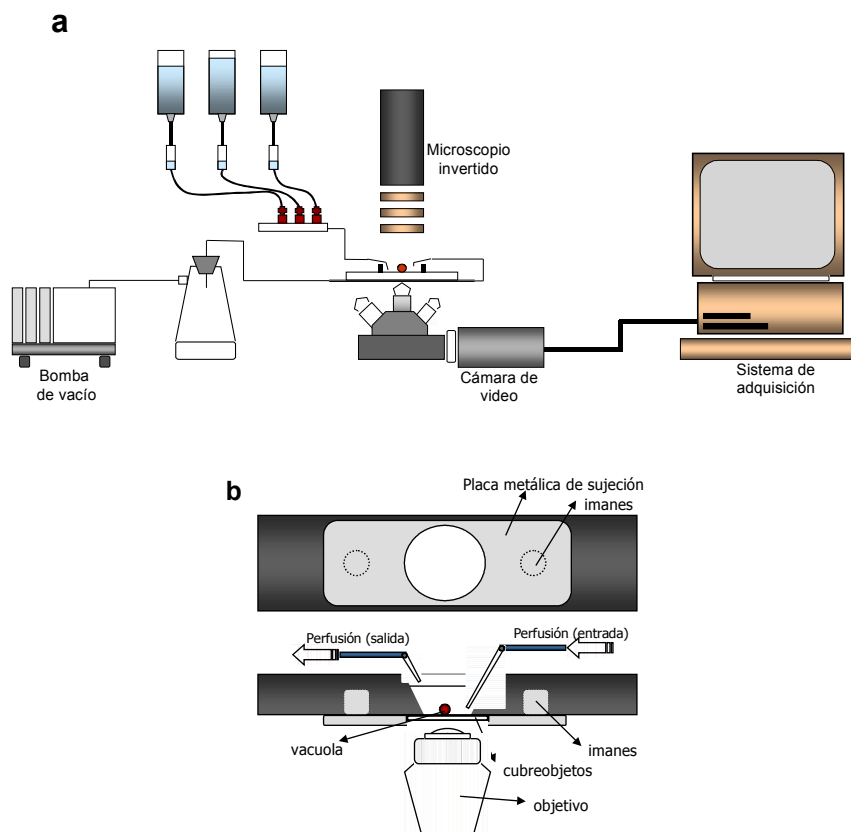


Figura 6: Sistema de medición de cambios de volumen mediante videomicroscopía: medición a tiempos largos

a) Sistema de perfusión: consta de tres jeringas que llevan solución a la cámara de observación y una bomba que retira el exceso de solución. El microscopio está conectado a una cámara de video por medio de la cual se realiza la adquisición de imágenes.

b) Detalle de la cámara de observación conteniendo la vacuola.

Una vez finalizado el experimento, los diámetros de las vacuolas se midieron a partir de las imágenes almacenadas empleando el programa Optimetric (Bioscan, USA). Para la calibración interna se utilizó un portaobjetos especial con una regla micrométrica con la cual se registraron imágenes para así poder convertir las unidades de píxeles en unidades métricas. Utilizando el programa de análisis de imágenes, el diámetro de cada vacuola se midió tres veces y los volúmenes se calcularon considerando la fórmula de la esfera.

Protocolo experimental

Para estudiar los cambios relativos de volumen de vacuolas individuales en medios externos hiposmóticos, se colocaron 10 μl de la solución conteniendo las vacuolas en la cámara de observación. Para comenzar el experimento, una vez que las vacuolas sedimentaron se seleccionó una al azar. Primero fue perfundida con una solución isosmótica durante 6 min (adquiriendo imágenes cada 1 min) y luego se aplicaron diferentes protocolos cambiando la solución de perfusión (las imágenes fueron digitalizadas a intervalos de 30 s).

Los cambios de osmolaridad de la solución³ a la cual fue expuesta la vacuola se hicieron modificando la concentración final de manitol, desde la isosmolaridad (490 mOsm Kg^{-1}) a una condición hiposmótica (290 mOsm Kg^{-1}). En algunos experimentos la isosmolaridad se mantuvo constante (490 mOsm Kg^{-1}) pero el

³ A lo largo del texto se utilizará la expresión *shock osmotico* para referirse al cambio de osmolaridad del medio al que es expuesta la vacuola luego de una preincubación en una solución isoosmolar

manitol se reemplazó parcialmente por 100 mM de urea, con la finalidad de estudiar la permeabilidad a este soluto.

Para probar inhibición a través de compuestos mercuriales, las vacuolas se incubaron durante 5 min en presencia de diferentes concentraciones finales de HgCl_2 (0.3, 3, 30 y 300 μM). Luego se comenzó la perfusión y se aplicó el gradiente osmótico siempre en presencia del inhibidor. La reversibilidad se estudió preincubando las vacuolas durante 5 min con 300 μM HgCl_2 , y después perfundiendo con 5 mM de β -mercaptoetanol antes y durante el cambio osmótico. Las soluciones de HgCl_2 fueron preparadas para cada experimento a partir de una solución madre 0.1 mM. La osmolaridad de la solución final fue medida para confirmar que ésta permaneció inalterada luego del agregado del inhibidor.

Para estudiar el efecto del pH externo, el cual aquí representa el pH citosólico, las vacuolas fueron sometidas a condiciones hiposmóticas (200 mOsm Kg^{-1}) a diferentes concentraciones de protones. Para esto se manipuló el pH del *buffer* empleado, 20 mM Tris-MES, pH 7.6, aumentando o disminuyendo su valor a 6.6, 6.8, 7 o 8.6.

Para verificar la reversibilidad del pH, las jeringas del sistema de perfusión se cargaron con medio isosmótico (pH 7.6), hiposmótico (pH 6.6) e hiposmótico (pH 7.6). La misma vacuola fue así perfundida a lo largo del experimento alternando la solución perfundida sin perturbarla.

Todas las osmolaridades de las soluciones empleadas fueron medidas usando un osmómetro (Wescor 5100C).

Todos los experimentos se hicieron a temperatura ambiente. Se realizaron de tres a cinco aislamientos independientes para probar cada condición experimental. Los resultados son expresados como cambios relativos de volumen en función del tiempo.

B- Medición a tiempos cortos

Para medir la permeabilidad al agua en vacuolas aisladas se empleó además una técnica rápida que permite minimizar el tiempo de transferencia desde un medio isosmótico a uno hiposmótico. Para ello, una pequeña gota de 20 μl de solución conteniendo vacuolas se colocó en el medio de un portaobjetos, cercana a una segunda gota de igual volumen conteniendo únicamente solución. Una vacuola es seleccionada al azar y enfocada con el microscopio. Luego se usa una pipeta pequeña para coleccionar la vacuola seleccionada y transferirla a la segunda gota, que puede contener una solución iso (control) o hiposmótica (Figura 7). La manipulación con la pipeta y la disposición de ambas gotas permite realizar una transferencia rápida y minimizar el tiempo de un reenfoque.

Se realizaron controles de osmolaridad en función de tiempo para ver posibles cambios por evaporación. Se observó que la evaporación causó menos del 1% de incremento en la osmolaridad en 120 segundos. Como todas las mediciones fueron hechas dentro de los primeros 20 segundos se asume que la osmolaridad final permaneció constante.

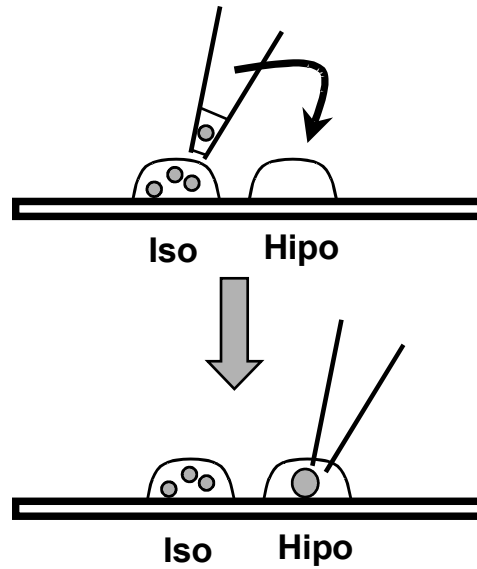


Figura 7: Sistema de medición de cambios de volumen mediante videomicroscopía: medición a tiempos cortos

Sistema experimental: una pequeña pipeta se utiliza para tomar la vacuola elegida de la primera gota (Iso) y transferirla a la segunda (Hipo).

2.2.3 Medida de la permeabilidad osmótica

El flujo de agua transmembrana (J_v) fue calculado de la pendiente de la porción lineal del gráfico de cambio relativo de volumen en función del tiempo. El coeficiente de permeabilidad osmótica aparente se calculó con la siguiente ecuación:

$$P_{\text{fap}} = J_v / [V_a \cdot S \cdot (\text{Osm}_i - \text{Osm}_e)]$$

donde V_a es el volumen molar parcial del agua, S es la superficie inicial de la vacuola y $(\text{Osm}_i - \text{Osm}_e)$ el gradiente osmótico aplicado.

Debido a la transferencia de la vacuola con una pipeta, en nuestras condiciones experimentales existe probablemente una "capa de agua adherente" transferida junto con la vacuola a la gota hiposmótica. Es por ello que consideramos más apropiado utilizar el término de coeficiente de permeabilidad osmótica aparente.

2.3 Resultados

2.3.1 Caracterización de la población vacuolar

El método utilizado para aislar las vacuolas permitió obtener preparaciones que pudieron ser empleadas tanto para el método de medición a tiempos cortos como para el de perfusión. Para verificar que a partir de la preparación se obtiene una población homogénea se adquirieron imágenes de vacuolas recién aisladas elegidas al azar y se midió posteriormente su diámetro. En la Figura 8 se presenta el histograma con la distribución de frecuencia de los diámetros medidos. Los resultados muestran que la preparación obtenida mediante el aislamiento mecánico contiene una población de vacuolas homogéneas con un diámetro promedio de $27.47 \pm 0.37 \mu\text{m}$ (n=140).

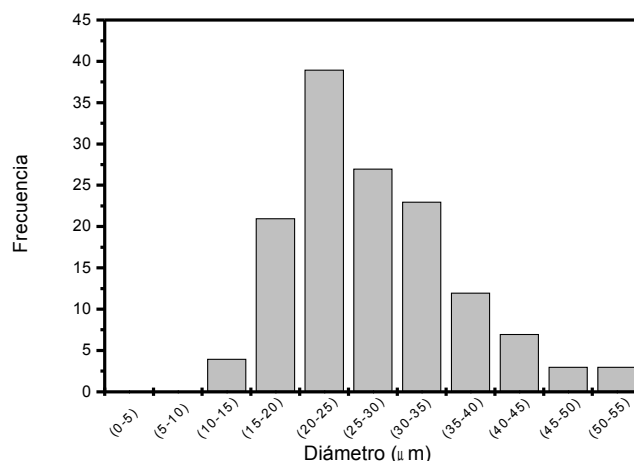


Figura 8: Caracterización de la población vacuolar
Distribución de frecuencias de los diámetros obtenidos para las vacuolas aisladas. La preparación contiene una población homogénea.

2.3.2 Estudios de los cambios de volumen a tiempos largos

Efectos de un *shock* hiposmótico

En nuestros primeros experimentos utilizamos el sistema de perfusión para estudiar el cambio de volumen de vacuolas aisladas cuando se sometían a una solución hiposmótica (290 mOsm Kg^{-1}).

En los experimentos controles se realizaron mediciones intercambiando las soluciones que perfundían la cámara pero sin modificar la osmolaridad del medio. Como se puede observar en la Figura 9, condiciones Iso-Iso, las vacuolas alcanzaron un equilibrio osmótico sin que se produzcan cambios de volumen detectables aún en períodos prolongados (mayor de 10 minutos). En el resto de los experimentos, se llevó a cabo siempre un período de equilibración inicial perfundiendo con la solución isosmótica. A los 6 minutos, se intercambió la solución de perfusión por una solución hiposmótica en la cual únicamente se

redujo la concentración de manitol en el medio externo. En estas condiciones, se observó un aumento de volumen relativo del 8% (Figura 9, Iso-Hipo).

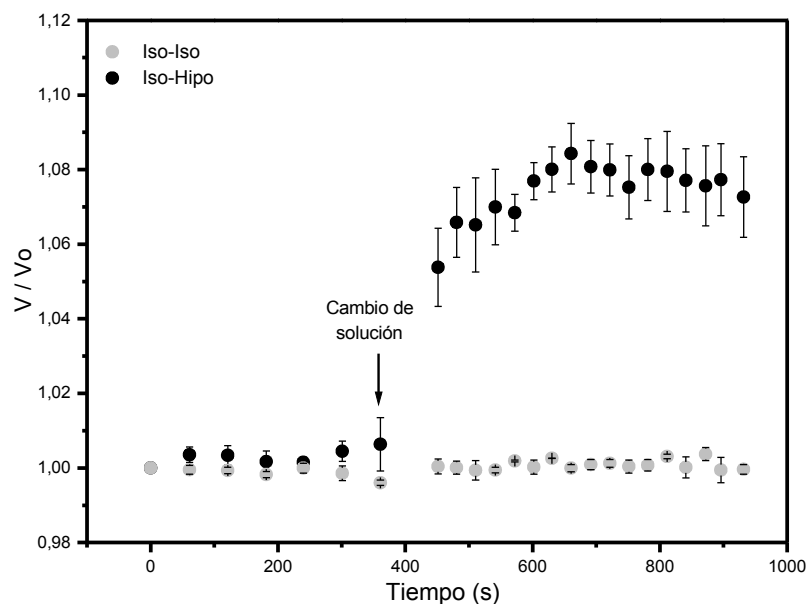


Figura 9: Cambios de volumen inducidos por un gradiente hiposmótico: medición a tiempos largos

En condiciones control (círculos grises) la solución de perfusión fue isosmótica durante todo el experimento (490 mOsm kg^{-1}). En la condición experimental (círculos negros), después de un período de equilibración inicial de 360 s, se realizó un cambio osmótico reemplazando la solución por una hiposmótica (290 mOsm kg^{-1}). Se muestra la media del cambio de relativo de volumen \pm SEM para 12-14 vacuolas obtenidas de 3-4 preparaciones independientes.

Inhibición por reactivos mercuriales

Para verificar si los cambios de volumen eran afectados por la presencia de HgCl_2 (conocido inhibidor de acuaporinas) se llevaron a cabo experimentos preincubando con el bloqueante en condiciones isosmóticas (control). De esta manera, se observó que cuando las vacuolas fueron preincubadas durante 5 min en $300 \mu\text{M HgCl}_2$ y luego perfundidas con la misma solución, siempre en

presencia del inhibidor, no se produjo ningún cambio de volumen (Figura 10). Los resultados fueron idénticos a los experimentos control en donde se perfundía con solución isosmótica en ausencia de mercurio.

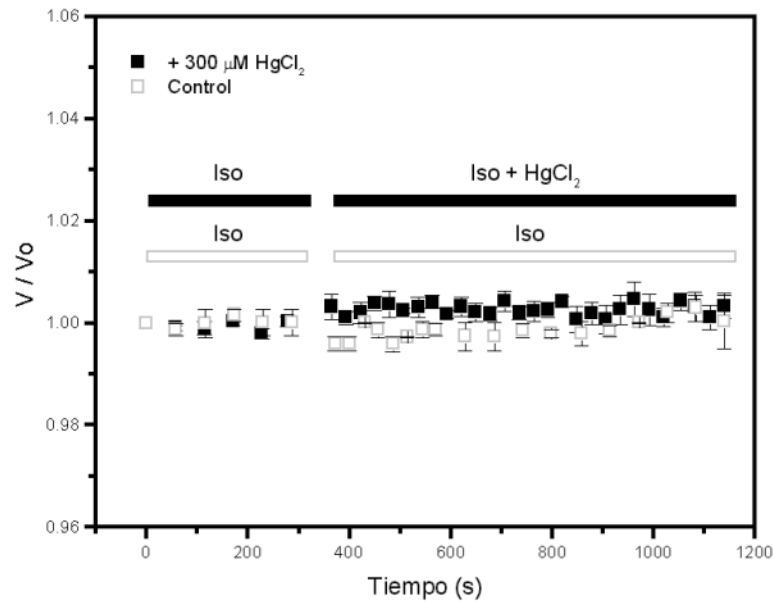


Figura 10: Efecto de compuestos mercuriales en condiciones isosmóticas

En condiciones control (cuadrados grises) las vacuolas fueron perfundidas durante todo el experimento con una solución isosmótica. En la condición experimental, primero se perfundió con la solución control y luego esta fue cambiada a una conteniendo 300 µM HgCl₂ manteniendo siempre la misma osmolaridad (cuadrados negros) (n= 12 vacuolas de 5 preparaciones independientes).

En cambio, cuando se aplicó un gradiente hiposmótico similar al descrito anteriormente a vacuolas preincubadas en condiciones isosmóticas con HgCl₂, se observó una marcada inhibición del cambio de volumen (Figura 11 a). Al igual que en el control, el HgCl₂ estuvo presente durante todo el experimento. La Figura 11 b muestra que la inhibición del cambio de volumen fue función lineal

de la concentración de HgCl_2 utilizada. Cuando la concentración de HgCl_2 llegó a $300 \mu\text{M}$ el cambio de volumen se anuló completamente.

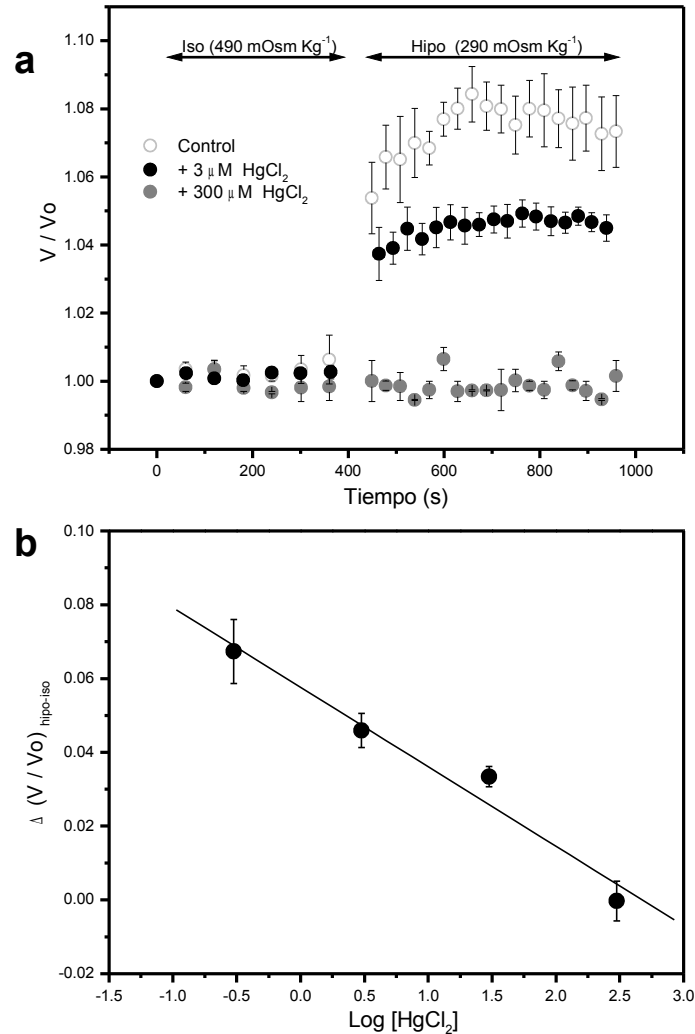


Figura 11: Efecto de compuestos mercuriales en condiciones hiposmóticas

a) Las vacuolas fueron preincubadas por 5 minutos en solución control (círculos abiertos) o con diferentes concentraciones de HgCl_2 (círculos cerrados negros y grises) antes de aplicarles el *shock* osmótico.

b) Curva dosis respuesta para valores finales de cambio de volumen en presencia de diferentes concentraciones de HgCl_2 (0.3, 3, 30 y $300 \mu\text{M}$). Cada punto representa la diferencia media entre V/Vo en condiciones hiposmóticas ($t=720 \text{ s}$) y V/Vo en condiciones isosmóticas ($t=0 \text{ s}$).

Vo en condiciones isosmóticas (t=180 s) (n= 4 a 14 vacuolas obtenidas de 2-5 preparaciones independientes).

La formación de uniones disulfuro causadas por compuestos mercuriales puede ser revertida con agentes reductores como el β -mercaptoetanol. La Figura 12 muestra que cuando las vacuolas fueron preincubadas en $300 \mu\text{M}$ HgCl_2 y luego perfundidas durante el experimento con 5 mM de β -mercaptoetanol la inhibición por mercurio fue completamente revertida. Esto sugiere fuertemente que no se afectó la integridad de la membrana.

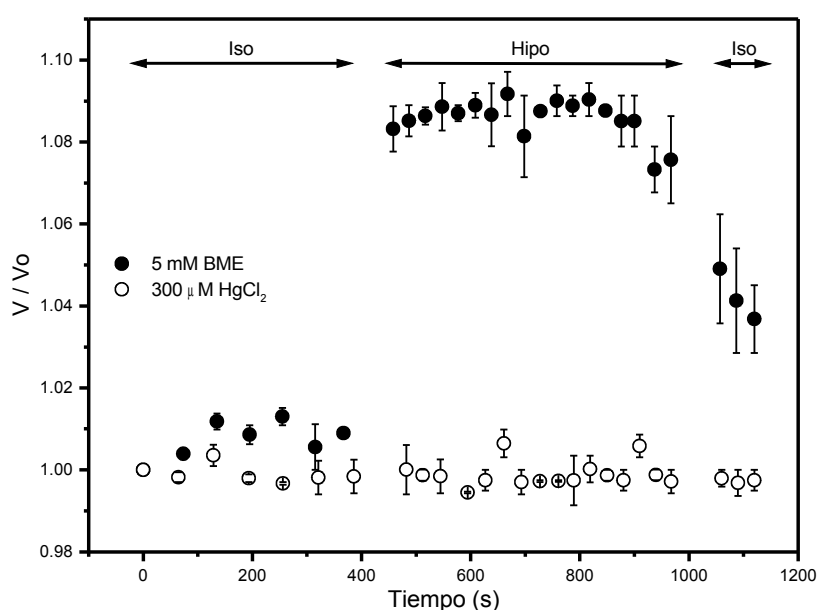


Figura 12: Reversibilidad del efecto producido por compuestos mercuriales

En la condición control (círculos abiertos) las vacuolas fueron perfundidas en presencia de $300 \mu\text{M}$ HgCl_2 durante todo el experimento. En la condición experimental las vacuolas fueron preincubadas con $300 \mu\text{M}$ HgCl_2 durante 5 minutos y después perfundidas con 5 mM de β -mercaptoetanol antes y durante el cambio osmótico (círculos cerrados). Media \pm SEM para 4 vacuolas obtenidas de 2 preparaciones independientes.

Ajustes del volumen a diferentes pHs

En los experimentos de perfusión, las vacuolas fueron sometidas a variaciones de pH en ausencia de gradiente (condiciones isosmóticas) lo que nos permitió descartar un efecto *per se* del pH. Este se redujo a 6.6 o se incrementó a 8.6 sin afectar el volumen de la vacuola (Figura 13 a) lo que confirma que el modificar el gradiente de protones no produce ninguna alteración en el volumen.

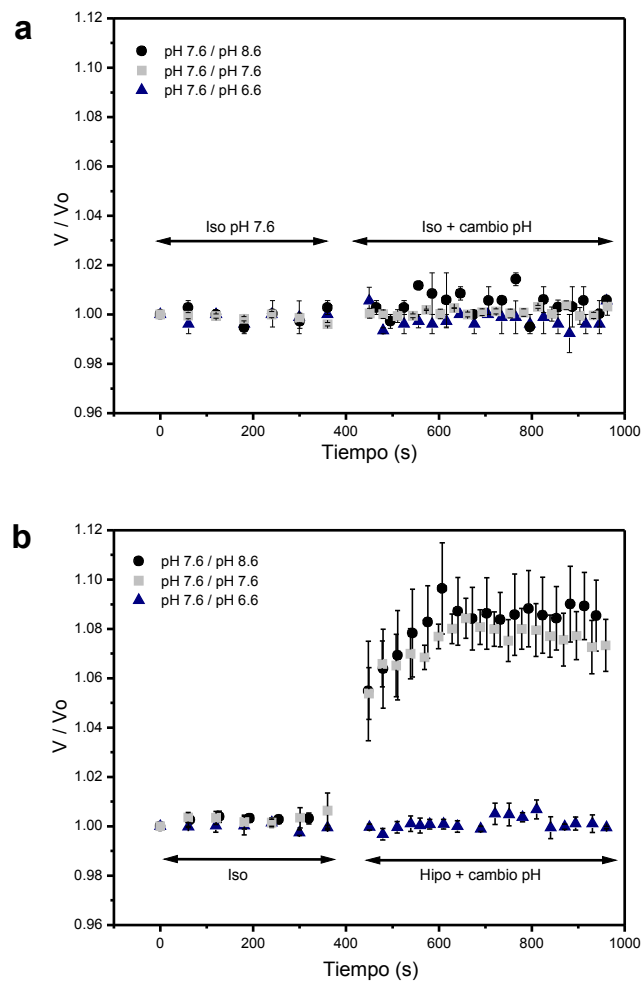


Figura 13: Efecto del pH externo sobre las propiedades osmóticas

a) Después de un período de perfusión inicial en condiciones isosmóticas (Iso pH 7.6) las vacuolas fueron sometidas a diferentes pHs (Iso + cambio pH; 6.6, 7.6 y 8.6) manteniendo la isosmolaridad de la solución.

b) Después de un período de perfusión inicial en condiciones isosmóticas a pH 7.6 (Iso) las vacuolas fueron sometidas a un gradiente osmótico de 200 mOsm Kg⁻¹ a diferentes pHs (Hipo + cambio pH; 6.6, 7.6 y 8.6).
Media ± SEM para 6-14 vacuolas obtenidas de 3-4 preparaciones independientes.

Sin embargo, los cambios de volumen inducidos por una condición hiposmótica (290 mOsm Kg⁻¹) fueron fuertemente dependientes del pH del medio (Figura 13 b). Cuando el gradiente fue aplicado a pH 8.6 no hubo diferencias en el volumen con respecto a la condición control, por lo que podemos decir que el pH alcalino no altera la respuesta de las vacuolas al *shock* osmótico. En cambio, cuando el gradiente fue aplicado en un medio a pH 6.6 no se produjo cambio de volumen, siendo la respuesta a la hiposmolaridad del medio completamente nula (Figura 13 b).

Para probar si el efecto del pH sobre el volumen era reversible, las vacuolas fueron inicialmente equilibradas en condiciones isosmóticas a pH 7.6, luego se aplicó el gradiente hiposmótico a pH 6.6 y al igual que antes no se registraron cambios de volumen (Figura 14). Finalmente, se perfundió con la solución hiposmótica a pH 7.6 observándose un aumento en el volumen de la vacuola semejante al observado en la condición control (Figura 9). Este experimento verifica la reversibilidad del efecto de pH y muestra que no se indujeron alteraciones irreversibles de la estructura de la membrana durante la acidificación del medio.

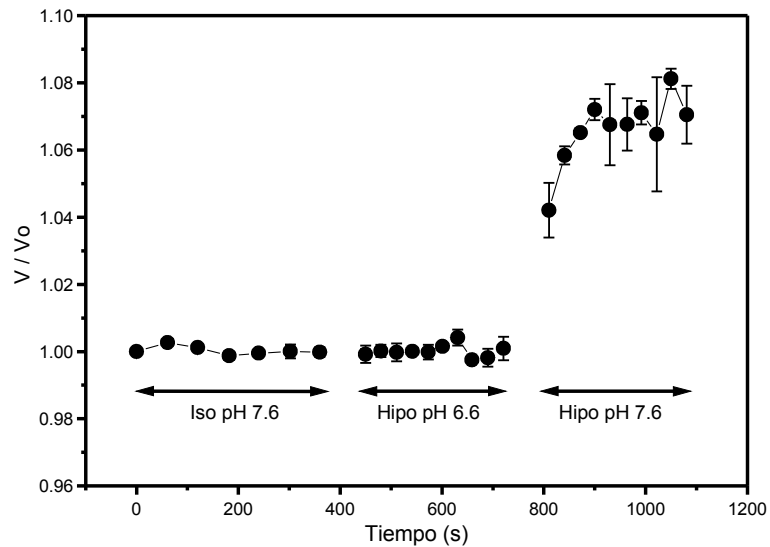


Figura 14: Reversibilidad del efecto del pH

Las vacuolas fueron inicialmente incubadas en condiciones isosmóticas a pH 7.6 (Iso pH 7.6). Luego se aplicó simultáneamente un gradiente hiposmótico y un cambio de pH (Hipo pH 6.6) y finalmente las vacuolas fueron perfundidas nuevamente a pH 7.6 pero manteniendo el gradiente osmótico (Hipo pH 7.6). Media \pm SEM para 6 vacuolas obtenidas de 3 preparaciones independientes.

Papel de la urea en los cambios de volumen

La siguiente figura muestra experimentos en los cuales, luego de un período de equilibración inicial en la solución control la perfusión se realizó con una solución donde el manitol fue reemplazado parcial e isosmóticamente por 100 mOsm Kg⁻¹ de urea (osmolaridad final 490 mOsm Kg⁻¹). Las vacuolas presentaron un aumento de volumen de un 6% que fue revertido cuando la solución de perfusión contenía únicamente manitol (Figura 15 a).

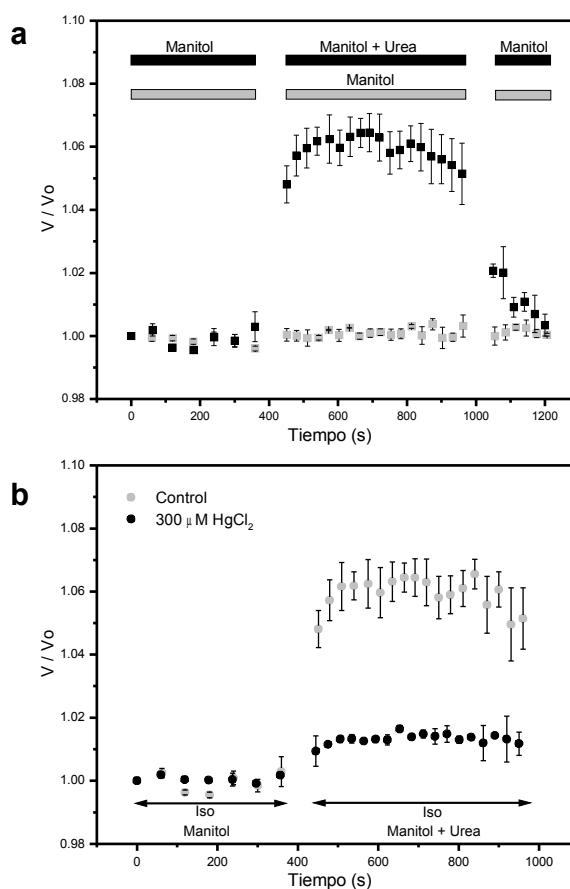


Figura 15: Cambios de volumen asociados a la urea

a) Luego de un período de equilibración inicial en la solución conteniendo manitol, este soluto fue parcialmente reemplazado por 100 mM urea. Finalmente, las vacuolas son nuevamente perfundidas con la solución inicial (cuadrados negros). En la condición control las vacuolas fueron perfundidas con la misma solución de manitol a lo largo de todo el experimento (cuadrados grises).

b) Vacuolas preincubadas durante 5 minutos en 300 μ M $HgCl_2$ fueron perfundidas con la solución de manitol y luego de manitol más urea como de igual forma que en la parte a).

Nuestro siguiente paso fue estudiar si el movimiento de urea era afectado por compuestos mercuriales. Para ello las vacuolas fueron incubadas durante 5 min en presencia de 300 μ M $HgCl_2$ y luego sometidas al mismo esquema experimental siempre con el agregado del mercurio. En este caso el cambio de

volumen desarrollado anteriormente tuvo una fuerte inhibición que alcanzó el 95% (Figura 15 b).

Finalmente, probamos si el pH tenía algún efecto sobre el transporte de urea. Para ello la concentración de protones fue modificada cuando las vacuolas fueron expuestas a soluciones isosmóticas preparadas con urea y manitol como osmolitos. La Figura 16 muestra que el incremento en volumen observado cuando la solución contiene urea fue completamente nulo a pH 6.6. Cuando las vacuolas son nuevamente perfundidas a pH 7.6 se observa un aumento del volumen semejante al desarrollado en la condición control (Figura 15 a) lo cual muestra que el efecto del pH sobre el movimiento de urea es totalmente reversible.

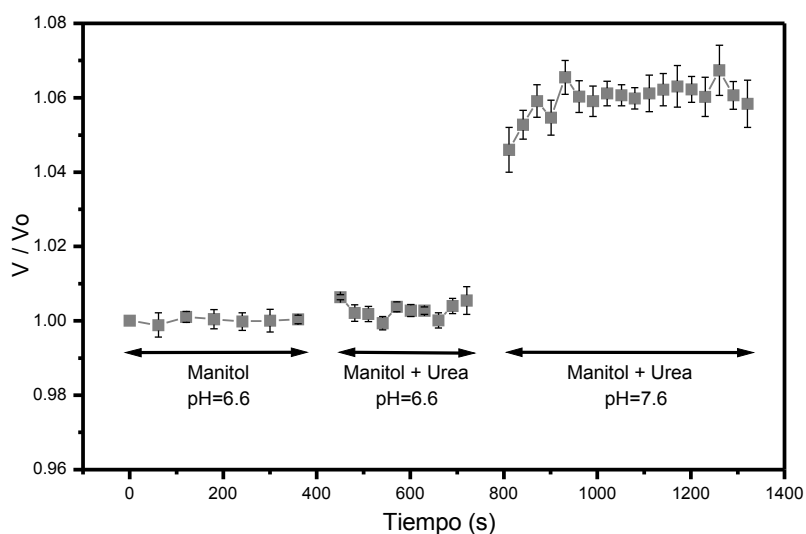


Figura 16: Efecto del pH sobre los cambios de volumen asociados a la urea

Luego de un período de equilibración inicial en una solución isosmótica de manitol pH 6.6, este fue reemplazado parcialmente por 100 mM urea manteniendo la osmolaridad y el pH. Finalmente, el pH del medio fue cambiado a 7.6. Media \pm SEM para 10 vacuolas obtenidas de 4 preparaciones independientes.

2.3.3 Estudios de los cambios de volumen a tiempos cortos

Efectos de un *shock* hiposmótico: medición de P_f

La técnica utilizada hasta aquí nos permitió estudiar la respuesta de las vacuolas frente a condiciones hiposmóticas a largo plazo y analizar el estado estacionario que alcanzan en las diferentes condiciones experimentales mencionadas.

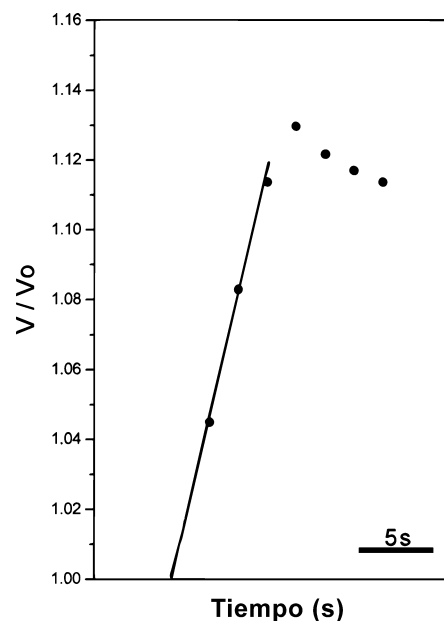
Para comprender un poco más acerca de lo que ocurre a tiempos cortos empleamos un método rápido de medición utilizado anteriormente en nuestro laboratorio para medir permeabilidad en ovocitos de rata (Ford *et al.*, 2000).

En los experimentos controles las vacuolas inicialmente inmersas en una solución isosmótica fueron transferidas a una gota conteniendo la misma solución. En estas condiciones no se observaron cambios de volumen (el volumen relativo a los 20 s de realizada la transferencia de la vacuola fue de 1.006 ± 0.002).

Cuando las vacuolas fueron sometidas a un *shock* hiposmótico, es decir, que fueron transferidas a una gota conteniendo la misma solución con una osmolaridad de 290 mOsm kg^{-1} , estas aumentaron su volumen rápidamente, siendo el cambio relativo de 14 %, 20 s después de aplicado el gradiente (Figura 17).

Figura 17: Cambios de volumen inducidos por un gradiente hiposmótico: medición de P_f

Experimento representativo mostrando la variación del volumen a lo largo del tiempo para una vacuola transferida desde un medio isosmótico a uno hiposmótico.



La pendiente obtenida al graficar el cambio relativo de volumen en función del tiempo nos permitió calcular la permeabilidad osmótica aparente (P_{fap}) que fue $19.87 \pm 2.21 \mu\text{m s}^{-1}$ (\pm SEM, $n=6$). Este valor es inferior al informado en la literatura para vacuolas de remolacha ($270 \pm 104 \mu\text{m s}^{-1}$, Morillón y Lasalles, 1999), donde se emplea una técnica que minimiza el efecto de las capas no mezcladas. Es por ello que consideramos en nuestro caso la contribución de este efecto con la posibilidad de estar subestimando el valor de P_f debido a la presencia de estas capas arrastradas con la transferencia de la vacuola a la gota hiposmótica.

Inhibición del P_f por compuestos mercuriales

Probamos si había alguna modificación del P_{fap} en presencia de compuestos mercuriales. Para ello las vacuolas fueron incubadas durante 10 min en una gota de solución isosmótica en presencia de $300 \mu\text{M HgCl}_2$ antes de transferirla a la

siguiente gota para aplicarle el *shock* hiposmótico (Figura 18). La permeabilidad osmótica aparente fue en esta condición de $3.18 \pm 0.59 \mu\text{m s}^{-1}$ (media \pm SEM, $n=4$), lo que implica una reducción de la misma en un 84%.

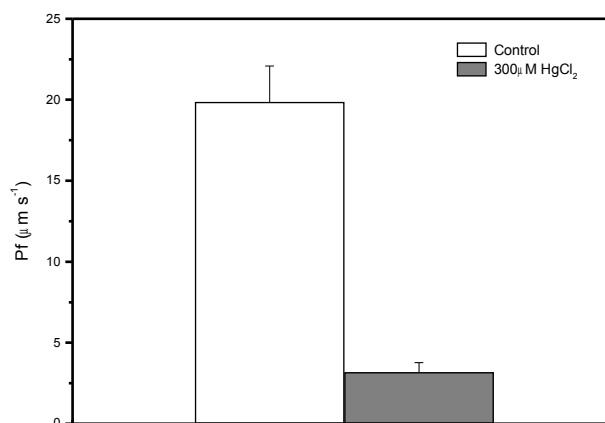


Figura 18: Efecto de compuestos mercuriales sobre el P_f

Valores de coeficiente de permeabilidad calculados para vacuolas incubadas en solución isosmótica (barra blancas) o en 300 $\mu\text{M HgCl}_2$ (barra gris) antes de ser sometidas a un gradiente osmótico. Los datos son expresados como media \pm SEM, $n=4$.

Efectos del pH sobre el P_f

Para estudiar cuál era el efecto del pH sobre la permeabilidad al agua realizamos experimentos en los cuales las vacuolas fueron transferidas desde una gota en condiciones isosmóticas a pH 7.6 a otra conteniendo una solución hiposmótica a pH 6.6. En este caso el cambio de volumen se redujo en un 55% y el valor de permeabilidad osmótica fue $8.89 \pm 3.35 \mu\text{m s}^{-1}$ (media \pm SEM, $n=4$) (Figura 19).

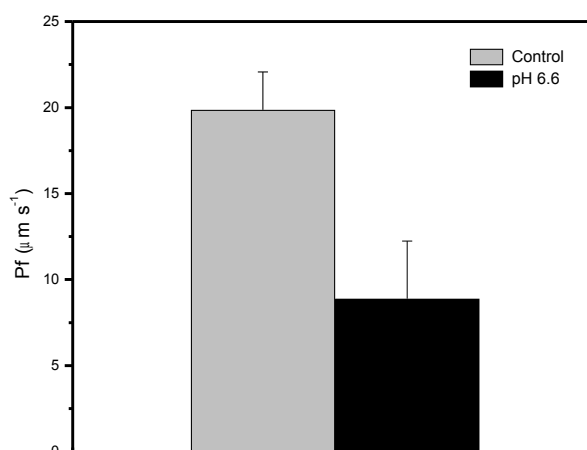


Figura 19: Efecto del pH sobre el P_f

Valores de coeficiente de permeabilidad calculado para vacuolas incubadas en solución isosmótica (barra gris) o a pH 6.6 (barra negra) antes de ser sometidas a un gradiente osmótico. Los datos son expresados como media \pm SEM, n=4.

2.4 Discusión

Con el objetivo de estudiar cual era la respuesta osmótica de vacuolas de remolacha aisladas realizamos experimentos de cambio de volumen tratando de discriminar la vía a través de la cual pasaba el agua.

Para ello empleamos dos técnicas que tienen como ventaja en común que no se utiliza la información del promedio de una población de vacuolas en situación control o tratadas sino que se sigue en función del tiempo la imagen de una vacuola individualizada. Este aspecto es esencial para el estudio de transporte de agua. En el caso de la técnica de perfusión además, al ser continua durante toda la experiencia se impide acumulación de osmolitos en la solución extravacuolar o aquellos que puedan producir cambios de composición.

Los experimentos muestran que independientemente de la técnica utilizada existe un cambio de volumen ante un *shock* hiposmótico el cual es reversiblemente inhibido por HgCl₂. Estos resultados sugieren la presencia de canales específicos para el paso del agua.

En los experimentos de perfusión, las vacuolas alcanzaron el equilibrio osmótico en condiciones control ya que en los primeros seis minutos muestran un volumen constante. La permeabilidad de la membrana vacuolar al manitol generalmente es considerada como muy baja siendo su coeficiente de reflexión⁴ (σ) cercano a uno. Esto se observó por ejemplo en experimentos con vesículas de tonoplasto de tabaco (Gerbeau *et al.*, 1999). Se descarta entonces que en los experimentos propuestos se produzcan flujos de manitol, siendo los cambios de volumen debidos únicamente al movimiento de agua hacia el interior de la vacuola.

Una de las observaciones más interesantes es que la repuesta al *shock* hiposmótico no fue la misma con las dos técnicas empleadas. Cuando las vacuolas fueron expuestas a un gradiente hiposmótico estas aumentaron su volumen en un 8% llegando a un valor estacionario o *plateau* luego de aproximadamente 5 min. En cambio, cuando fueron expuestas al mismo gradiente en los experimentos rápidos, las vacuolas aumentaron su volumen un 14% dentro de los 20 s de realizado el cambio. Estos resultados indican que la forma de aplicar el gradiente influye sobre la respuesta de las vacuolas ante el gradiente hiposmótico y que posiblemente la modificación de la permeabilidad al

⁴ El coeficiente de reflexión tiene en cuenta la permeabilidad de la membrana a un determinado soluto. Varía en entre 0 (soluto totalmente permeable) y 1 (soluto totalmente impermeable).

agua previene el aumento de volumen excesivo durante el *shock* osmótico. Se ha sugerido que las vacuolas podrían ayudar a minimizar fluctuaciones a corto plazo del volumen citoplasmático evitando daños estructurales o metabólicos (Tyerman *et al.*, 1999). En el tejido parenquimático de raíz de *Beta vulgaris* está descrita la presencia de acuaporinas (Marty-Mazars *et al.*, 1995), por lo que podríamos suponer, junto con resultados previos a nivel de raíz entera (Amodeo *et al.*, 1999) que en estos movimientos rápidos de agua podrían estar involucradas estas proteínas. En la primera referencia que se menciona no se realizaron estudios funcionales mientras que en la segunda el bloqueo de flujo de agua afectó la vía celular sin poder discriminar dentro de ella la membranas plasmática o el tonoplasto como podemos hacer al aislar vacuolas. Dada esta información previa realizamos experimentos en presencia de mercurio que es el bloqueante más utilizado para los canales de agua. En los experimentos rápidos las vacuolas incubadas con HgCl_2 redujeron el valor de permeabilidad osmótica en un 84% (Figura 18). Cuando las vacuolas fueron perfundidas en presencia de HgCl_2 se vio una reducción totalmente reversible del cambio de volumen dependiente de la concentración de mercurio utilizada, que se hizo completamente nula cuando se alcanzó 300 μM . Experimentos control mostraron que el mercurio por sí mismo no afecta el cambio de volumen de la vacuola. La inhibición dosis dependiente y reversible del valor *plateau* producida por el mercurio puede ser parcialmente atribuida a un efecto bloqueante sobre las acuaporinas. Es importante remarcar el hecho de que un cambio únicamente en la permeabilidad osmótica llevaría a un cambio en la pendiente del cambio de

volumen en el tiempo y no en el valor final alcanzado. Entonces los resultados no pueden ser explicados únicamente con un efecto sobre la permeabilidad, sino que debe existir algún otro mecanismo responsable de esta disminución. Probablemente el hecho de que el gradiente sea aplicado más lentamente le permite a la vacuola reacomodar su composición interna de osmolitos para regular su volumen más rápidamente.

Con la técnica rápida de medición, a partir de la pendiente del cambio de volumen relativo en función del tiempo, calculamos el coeficiente de permeabilidad osmótica al que denominamos "aparente". El valor obtenido fue significativamente más bajo que el reportado previamente en la literatura utilizando otra técnica y el cual tiene un rango de dispersión muy grande ($270 \pm 104 \mu\text{m s}^{-1}$) (Morrillón y Lasalles, 1999). Si bien con nuestro sistema experimental probablemente estamos subestimando el verdadero valor de P_f , pudimos observar un efecto de mercurio sobre la permeabilidad al agua.

Estos resultados nos muestran que las vacuolas de raíz de *Beta vulgaris* responden rápidamente a cambios osmóticos generándose movimientos de agua que podrían ocurrir a través de canales específicos como las acuaporinas. Esto es avalado por el hecho de que el cambio de volumen se reduce significativamente en presencia de un inhibidor utilizado ampliamente para estos canales. Si bien en los experimentos de perfusión a largo plazo existiría un mecanismo que le permite a la vacuola regular efectivamente el cambio de volumen, podemos concluir que las acuaporinas son responsables de los movimientos de agua observados.

Como vimos, la vacuola es una organela multifuncional y es clave fundamentalmente en mantener el equilibrio osmótico con el citoplasma, evitando que este sufra cambios bruscos (Wink, 1993; Deepesh, 2000). Por otro lado la diferencia de pH observada entre el citoplasma (7-7.2) y la vacuola (5-5.5) es mantenida por las bombas y transportadores presentes en el tonoplasto y es de vital importancia para el metabolismo celular (Taiz, 1992). Es por eso que nos pareció interesante estudiar como estaban relacionados el pH y los movimientos de agua impulsados por gradientes osmóticos.

Como control se realizaron experimentos en los cuales las vacuolas fueron sometidas a diferentes pHs, observando que si el cambio de pH era realizado en ausencia de gradiente las vacuolas permanecían en equilibrio, confirmando que la concentración de protones por sí misma no genera una respuesta de cambio de volumen (Figura 13 a).

Luego de un *shock* hiposmótico el pH alcalino tampoco produjo ningún efecto mientras que los experimentos a pH 6.6 muestran claramente que el cambio de volumen fue totalmente inhibido en forma completamente reversible. El pH ácido inhibe el movimiento de agua en las vacuolas. Debido a que la manipulación del pH se llevó a cabo a través del sistema de perfusion, el pH corresponde al medio externo, que representa para la vacuola el lado citoplasmático. Por lo tanto este efecto equivaldría a exponer a la vacuola a una acidificación citoplasmática.

En los experimentos rápidos, cuando las vacuolas fueron sometidas a las mismas condiciones de gradiente osmótico y pH el valor de P_f se redujo

significativamente con respecto a la condición control, a un 55%. Nuestra interpretación es que un efecto bloqueante de la acuaporina es la principal razón para este resultado.

Los resultados presentados demuestran que 1) a bajo pH, la permeabilidad al agua fue fuertemente reducida (como se confirma por las mediciones de P_f , Figura 19) y 2) cuando el valor de pH volvió a los valores controles la respuesta osmótica fue igual a la observada en los experimentos controles. El efecto del pH sobre el cambio de volumen es totalmente reversible. Esta reversibilidad también prueba la integridad del tonoplasto.

En el caso de los experimentos de perfusión sería irreal suponer que la permeabilidad al agua fue completamente bloqueada. Teniendo en cuenta los resultados presentados podríamos especular sobre la existencia de un mecanismo compensatorio que modificaría la respuesta de volumen de la vacuola frente a un gradiente osmótico. Este sería el mismo que planteamos en el caso de los resultados obtenidos con $HgCl_2$. Si el gradiente osmótico es aplicado progresivamente, como en el caso de los experimentos de perfusión, a pH bajo o bajo el efecto de mercurio la eficiencia de este mecanismo compensatorio es del 100%. La hipótesis sería que tanto a pH ácido como después del agregado de $HgCl_2$ la permeabilidad al agua es lo suficientemente baja como para que el movimiento de solutos permeables pueda compensar el flujo osmótico. Desde un punto de vista teórico esto es equivalente a una fuerte reducción en el coeficiente de reflexión de los solutos permeables que en ciertas circunstancias puede ser considerado cercano a cero. Existen claras evidencias en la literatura

que indicarían que la concentración de TIP en la membrana de la vacuola es extremadamente alta (Higuchi *et al.*, 1998), por lo que la superficie de bicapa lipídica “libre” sería relativamente baja. Esto podría explicar por que la permeabilidad al agua después del bloqueo de las acuaporinas es tan baja.

En cuanto a la especificidad de transporte se sabe que las TIPs permiten el pasaje de pequeños solutos no cargados en adición al agua. Realizamos entonces experimentos empleando urea como osmolito. En estos experimentos parte del manitol fue reemplazado isosmolarmente por urea. La Figura 15 muestra una evidencia clara y clásica de que su coeficiente de reflexión es menor que para el manitol (Zadunaisky *et al.*, 1963). En presencia de 300 μM HgCl_2 la respuesta osmótica a la urea se redujo. Una de las posibles explicaciones para esta observación experimental es que la urea y el agua se mueven por el mismo poro. En la literatura hay descritos canales para agua en plantas que además de transportar agua tienen alta permeabilidad a solutos no cargados como urea y glicerol (Gerbeau *et al.*, 1999, Biela *et al.*, 1999). También se caracterizó una acuaporina animal (AQP9) capaz de mover simultáneamente agua, urea y manitol (Ishibashi *et al.*, 1998). Más recientemente levaduras mutantes carentes del transportador de urea restablecieron la capacidad de utilizarla como fuente de nitrógeno al ser complementadas con δ -TIP, γ -TIP y CpNIP1 (Klebl *et al.*, 2003).

Otra observación importante fue que el cambio de volumen que sufren las vacuolas en condiciones isosmolares con urea fue inhibido a pH ácido (Figura 16), siendo este efecto totalmente reversible. El pH tuvo el mismo efecto que el

mercurio sobre los cambios de volumen que involucran urea. Este resultado también apoyaría la idea de que la urea se está moviendo por el mismo poro que utiliza el agua para atravesar la membrana. Sin embargo, otra posibilidad sería que la urea ingrese a las vacuolas por una vía independiente y si bien genera un gradiente para la entrada de agua, la baja permeabilidad de la membrana a esta, ya sea por efecto del mercurio o del pH, provoca un menor aumento de volumen. Recientemente se ha descrito un transportador de urea en *Arabidopsis thaliana* (Liu *et al.*, 2003).

Dado que las acuaporinas están abundantemente expresadas y ampliamente distribuidas, el transporte de otras moléculas en adición al agua sería una importante función para la fisiología de las plantas.

CAPITULO III

Estudios de permeabilidad al agua en vesículas de tonoplasto y su regulación por pH

3.1 Introducción

Si bien hace muchos años se conocían las múltiples funciones de las vacuolas, los estudios de transporte a través del tonoplasto eran limitados debido a que no era posible lograr un sistema de medición adecuado. El desarrollo de métodos de obtención de grandes cantidades de vacuolas aisladas libres de contaminación citoplasmática hizo posible el estudio de transporte de solutos y caracterización de actividades enzimáticas del tonoplasto (Wagner y Siegelman, 1975; Leigh *et al.*, 1976). Más aún, se identificaron funciones enzimáticas características de esta membrana en preparaciones de vacuolas que podían ser utilizadas luego como marcadoras durante el proceso de aislamiento (Leigh y Walker, 1980).

La ventaja de utilizar vacuolas aisladas es que permite aproximarse más a lo que ocurre fisiológicamente. La membrana conserva todo el conjunto de transportadores y bombas presentes *in vivo* y el contenido vacuolar permanece en principio inalterable. Esto permite evaluar las posibles interacciones entre los distintos componentes y un acercamiento interesante a la visión completa del sistema, pero lo vuelve mucho más complejo y a veces de difícil acceso a la proteína de interés.

El estudio y caracterización de sistemas de transporte requiere un dispositivo experimental que permita controlar y manipular a ambos lados de la membrana algunos parámetros como pH, potencial de membrana y concentración iónica. Buscando un sistema que cumpliera con estos requisitos se desarrollaron métodos para aislar vesículas selladas de membrana a partir de homogenatos de tejidos de plantas (Sze *et al.*, 1980). Las vesículas son fragmentos de membrana, rotas durante la homogeneización del tejido, las cuales se sellan espontáneamente para formar esferas huecas. En particular, después de la homogeneización del tejido los fragmentos de tonoplasto se resellan más rápidamente que fragmentos derivados de otras membranas.

Las vesículas de tonoplasto tienen varias ventajas sobre las vacuolas aisladas: 1) muestran altos índices de transporte debido a la gran relación superficie/volumen, 2) están esencialmente desprovistas de solutos endógenos, 3) se equilibran rápidamente con el medio y pueden entonces ser cargadas con el contenido deseado y 4) pueden ser despojadas de proteínas unidas débilmente que podrían interferir con las mediciones.

Estudios a partir de vesículas de membrana se han hecho mediante la técnica de espectrofotometría de *stopped flow*, la cual permite una medición más exacta de la permeabilidad al agua (Verkman, 1995). El cambio de volumen que sufren las vesículas luego de aplicarles un gradiente osmótico provoca cambios en la luz dispersada (*light scattering*) que son registrados a lo largo del tiempo. Así mediante los cambios de dispersión de luz puede estimarse el cambio de volumen. Esta técnica permite medir los cambios volumen a tiempos muy cortos: una vez aplicado el *shock* osmótico el cambio de luz dispersada se mide en el orden de milisegundos.

Niemietz y Tyerman caracterizaron canales de agua de raíces de trigo utilizando por un lado vesículas de membrana plasmática y por otro una fracción de endomembranas conteniendo principalmente tonoplasto (Niemietz y Tyerman, 1997). En esta última obtuvieron altos valores de P_f , inhibición por mercurio y baja energía de activación. En la fracción de membrana plasmática en cambio, si bien obtuvieron una alta relación P_f/P_d , lo que indicaría la presencia de canales para agua, no detectaron inhibición por mercurio y midieron una alta energía de activación. Los autores atribuyen estos resultados a las condiciones utilizadas durante el aislamiento de las vesículas.

Por otro lado, mediante la misma técnica, Maurel y colaboradores caracterizaron canales de agua utilizando vesículas de membrana plasmática y de tonoplasto de células de tabaco (Maurel *et al.*, 1997). Encontraron que la permeabilidad del tonoplasto es diez veces mayor que la de la membrana plasmática.

Más recientemente, Ohshima y colaboradores utilizaron vesículas de membrana para caracterizar funcionalmente el transporte de agua en *Graptopetalum paraguayense*, una planta CAM (Ohshima *et al.*, 2001).

Para profundizar el estudio de la permeabilidad al agua del tonoplasto de *Beta vulgaris* decidimos aislar vesículas de esta membrana. Utilizando este sistema podemos manipular el medio intra y extravesicular independizándonos del contenido vacuolar. El empleo de la técnica de espectrofotometría de *stopped flow* nos permitió obtener valores no subestimados de P_f , poder estudiar la funcionalidad de las acuaporinas presentes empleando parámetros más biofísicos, identificar por *Western Blot* la presencia de TIPs y finalmente estudiar el efecto de pH .

3.2 Materiales y Métodos

3.2.1 Aislamiento de vesículas de tonoplasto

Las vesículas de tonoplasto fueron aisladas utilizando un protocolo modificado a partir de la técnica de Poole (Poole *et al.*, 1984). Todo el procedimiento se realizó a 4°C, de acuerdo al esquema de la Figura 20. Se partió de 400 g (peso fresco) de raíces de remolachas previamente lavadas y peladas. Estas fueron cortadas en pequeños trozos, separadas en dos fracciones de 200 g y procesadas por separado en una licuadora comercial empleando en cada caso 200 ml de medio de homogeneización (250 mM sacarosa, 5 mM EDTA, 0.1% p/v BSA, 1% p/v PVP-40, 25 mM β -Mercaptoetanol y 70 mM Tris, pH 8). El homogenato se filtró a través de cuatro capas de gasa. Se repitió el proceso con los otros 200 g de raíces y ambos filtrados fueron centrifugados a 13000 g durante 10 minutos. El sobrenadante se filtró empleando en este caso un filtro comercial *Miracloth* (Calbiochem, La Jolla, USA) y se centrifugó a 80000 g durante 30 minutos. Para obtener la fracción microsomal (de la cual se guardó una alícuota para ensayos enzimáticos y *Western Blot*) se descartó el sobrenadante y se resuspendió el *pellet* en 8 ml de medio de resuspensión (124 mM sacarosa, 5 mM DTT, 15 mM MES, pH 6.8 con Bis-Tris Propano) utilizando un homogeneizador. Se prepararon gradientes que consistieron en 4 ml de 23% y 10% p/v sacarosa (con el agregado de 1 mM DTT, 15 mM MES, pH 6.8) sobre los cuales se apoyaron 4 ml de la fracción microsomal. Se centrifugaron a 80000 g durante 2 h. Las vesículas de tonoplasto fueron recuperadas de la banda formada en la interfase 23% y 10%. Se llevaron a volumen con la solución de resuspensión final (250 mM sacarosa, 1 mM EGTA, 1mM MgCl₂, 2 mM DTT, 20 mM Tris 20, pH 7.5) y se centrifugaron a 80000 g durante 30 minutos. Luego de

descartar el sobrenadante, el *pellet* conteniendo a las vesículas se resuspendió en 500 μ l de la misma solución. Alícuotas de 50 μ l fueron congeladas en nitrógeno líquido y almacenadas a -80°C hasta la realización de los experimentos. Las vesículas utilizadas fueron descongeladas solamente una vez.

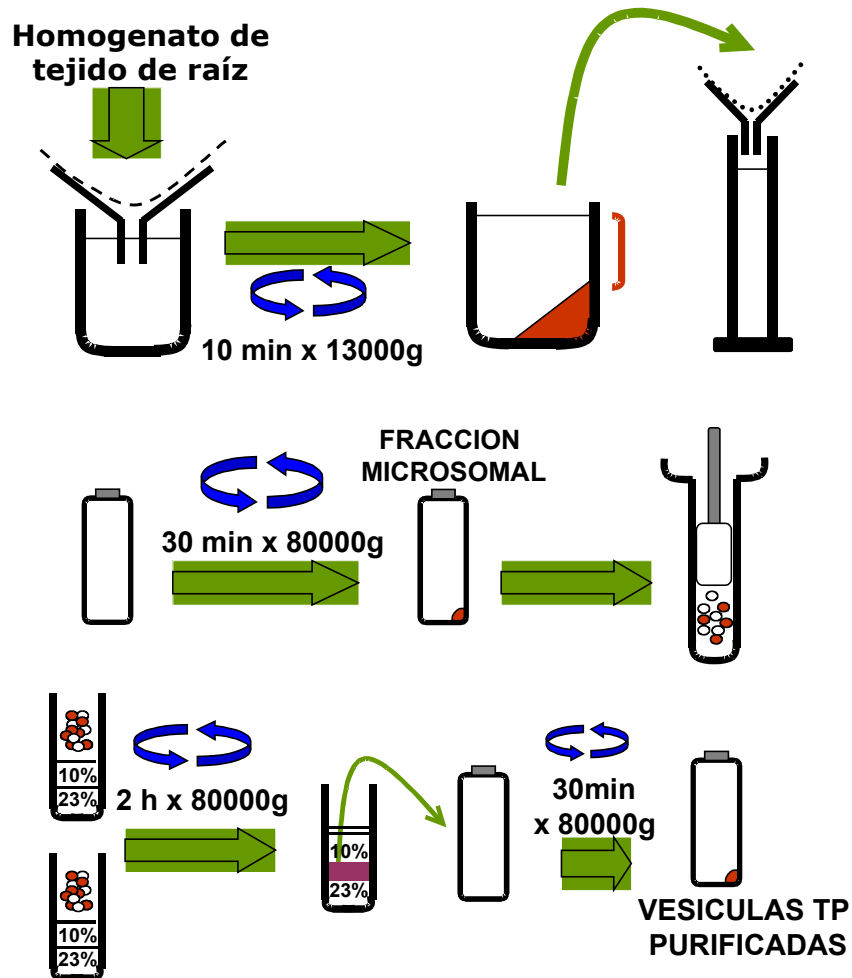


Figura 20: Esquema de aislamiento de vesículas purificadas de tonoplasto de *Beta vulgaris*

Se realiza un homogenato con trozos de tejido fresco que luego es centrifugado y filtrado para obtener la fracción microsomal. Esta es colocada en un gradiente de sacarosa para purificar la fracción final conteniendo las vesículas de tonoplasto de la interfase del gradiente. Finalmente, luego de centrifugar a alta velocidad se obtiene un *pellet* que es resuspendido en el *buffer* final.

3.2.2 Caracterización de vesículas de tonoplasto

Medición de proteínas

La concentración de proteínas presente en la fracción de vesículas se midió utilizando la técnica de Bradford (Bradford, 1976). Para esto se prepararon diferentes diluciones de la muestra (1/10, 1/20 y 1/100) y 10 μ l de cada una se mezclaron en la placa de reacción con 10 μ l de 1 M NaOH y 250 μ l de una dilución 1/5 de reactivo de Bradford (Bio-Rad). Se realizó en simultáneo una curva de calibración utilizando diferentes concentraciones de BSA (0, 0.5, 0.75, 1, 1.5 y 2 μ g BSA en 10 μ l). La absorbancia de cada muestra fue medida a 578 nm en un espectrofotómetro.

Ensayos de marcadores de membrana

Para verificar la pureza de la fracción enriquecida de tonoplasto se midió la actividad específica de enzimas marcadoras empleando como control a la fracción microsomal (Briskin *et al.*, 1987).

a) ATPasas

La H⁺-ATPasa del tonoplasto transporta protones hacia el interior de la vacuola hidrolizando ATP. Esta enzima es estimulada por Cl⁻, Br⁻ e I⁻, su actividad es óptima a pH 8 y es inhibible por NO₃⁻. La H⁺-ATPasa de membrana plasmática, en cambio es inhibible por vanadato. Esto hace que la utilización de estas dos enzimas marcadoras nos permita identificar la presencia de membrana plasmática y tonoplasto. Para ambas fracciones, microsomal y tonoplasto, se midió por lo tanto la actividad específica de estas dos enzimas en presencia y ausencia del inhibidor y en presencia y ausencia de 3 mM ATP.

En ambos casos se agregaron 45 μl de medio de reacción (ver más adelante), 10 μl de 0.02% v/v Brij, 10 μl de ATP o agua y 10 μl de muestra en una concentración 2-5 μg de proteína. Se incubó a 37°C durante 25 min y se evaluó la producción de fosfato inorgánico (Pi) mediante la reacción de Fiske y Subbarrow (Fiske y Subbarrow, 1925). Para esto se agregaron 175 μl de reactivo de Fiske, se incubó a 37°C durante 20 min y se midió la absorbancia a 620 nm.

Medio de reacción para H^+ ATPasa (vanadato sensible): 160 mM sacarosa, 0.1 mM $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_2$ (molibdato de Na), 5 mM MgSO_4 , 1 mM NaN_3 , 25 mM K_2SO_4 , 50 mM MES, 1 mM DTT, pH 6,5, con o sin el agregado 0.6 mM o-vanadato.

Medio de reacción para H^+ ATPasa (nitrato sensible): 160 mM sacarosa, 0.1 mM $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_2$, 5 mM MgSO_4 , 1 mM NaN_3 , 50 mM KCl, 50 mM MES, 1 mM DTT, pH 8, con o sin el agregado 25 mM KNO_3 .

B) IDPasa

Como enzima marcadora del aparato de Golgi se utilizó el ensayo de latencia de IDPasa (inosina 5' difosfatasa). La actividad específica de esta enzima se midió evaluando la producción de Pi en presencia o ausencia de 9 mM IDP. En ambos casos se agregaron 45 μl de medio de reacción (ver más adelante), 10 μl de 0.02% v/v Brij, 10 μl de IDP o agua y 10 μl de muestra en una concentración 2-5 μg de proteína. Se incubó a 37°C durante 25 min y se evaluó la producción de fosfato inorgánico (Pi) mediante la reacción de Fiske y Subbarrow (Fiske y Subbarrow, 1925). El ensayo se repitió para las mismas muestras 7 días después de la primera medición.

Medio de reacción para IDPasa: 160 mM sacarosa, 0.1 mM $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_2$, 5 mM MgSO_4 , 1 mM NaN_3 , 50 mM KCl, 50 mM MES, 1 mM DTT, pH 8 y presencia o no de 25 mM KNO_3 .

C) Citocromo C

Como enzimas marcadoras de mitocondria y retículo endoplasmático se midió la actividad específica de la citocromo C oxidasa y reductasa respectivamente. La citocromo C oxidasa se ensayó como la oxidación de 4 mM de citocromo C reducido. Para la reacción se agregaron 880 μl de medio de reacción (ver más adelante), 100 μl Brij, 10 μl 4 mM citocromo C reducido (en presencia de $\text{Na}_2\text{O}_4\text{S}_2$) y 10 μl de muestra en una concentración 5-10 μg de proteína. Para analizar la actividad enzimática se siguió cinéticamente la disminución de absorbancia a 550 nm.

La citocromo C oxidasa se probó utilizando citocromo C no reducido en presencia de 120 μM NADH. Para la reacción se agregaron 870 μl de medio de reacción (ver más adelante), 100 μl Brij, 10 μl 4 mM citocromo C, 10 μl NADH y 10 μl de muestra en una concentración 5-10 μg de proteína. Para analizar la actividad enzimática se siguieron cinéticamente los cambios en absorbancia a 550 nm.

Medio de reacción para citocromo C oxidasa: 20 mM K_2HPO_4 , 0.5 mM EDTA, pH 7.5.

Medio de reacción para citocromo C reductasa: 20 mM K_2HPO_4 , 0.5 mM EDTA, pH 7.5 más el agregado de 1.5 mM KCN en 100 ml *buffer* fosfato.

Microscopía electrónica

Se siguió un protocolo sugerido por la técnica Mariana López Ravasio del Instituto de Biología Celular y Neurociencias "Prof. Dr. Eduardo de Robertis" (LANAIS-MIE). La fracción purificada de vesículas que se obtuvo de la interfase del gradiente de densidad de sacarosa se completó hasta un volumen de 4 ml con *buffer* fosfato (0.1 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$, pH 7.2) y se centrifugó a 80000 g durante 20 min. Para la primera fijación el *pellet* se dejó durante 1 h 40 min en 2.5% v/v glutaraldehído en *buffer* fosfato a 4°C. Luego se lavó con 100 mM *buffer* fosfato en las mismas condiciones de centrifugación anterior. El *pellet* se resuspendió en 500 μl del mismo *buffer* y se mantuvo durante toda la noche a 4°C. La segunda fijación se realizó sobre hielo a temperatura ambiente con 1% p/v tetróxido de osmio durante 1h. Se lavó dos veces con agua destilada y se trató con el tercer fijador 5% p/v acetato de uranilo sobre hielo a temperatura ambiente durante 2 h. Nuevamente se hicieron dos lavados con agua destilada. Para la deshidratación de la muestra se utilizaron concentraciones crecientes de alcohol: 50% durante 15 min, 70% durante 15 min por duplicado, 96% durante 15 min realizado por duplicado, 100% durante 15 min. Se dejó durante 15 min en óxido de propileno. La inclusión se realizó en la resina Durcupam y se polimerizó durante 3 días en estufa a 60°C. Finalmente se talló con hoja de afeitar (Gillette, USA) y se cortó con un ultramicrotomo (Reichert-Jung) con navaja de vidrio.

Las vesículas fueron observadas al microscopio electrónico con un aumento de 20000x y se fotografiaron distintas secciones de la preparación con un aumento final de 40000x. Se utilizó un patrón de tamaño conocido para poder calcular el diámetro de las vesículas a partir de fotografías.

3.2.3 Experimentos de cambio de volumen mediante dispersión luminosa: espectrofotometría de *Stopped Flow*

El cambio de volumen de las vesículas de tonoplasto se siguió registrando los cambios en la intensidad de luz dispersada a 90° y 500 nm en un espectrofotómetro de *stopped-flow* (Applied Photophysics, UK). El equipo se encuentra en el IQUIFIB, laboratorio del Dr. Rolando Rossi, quien gentilmente nos facilitó su acceso y uso sin restricción.

Para los experimentos una alícuota de 10 µl de vesículas se mezcló con 1000 µl de la solución experimental (50 mM manitol, 25 mM NaCl, 10 mM Tris-MES, pH 8.3). El *shock* hiposmótico asociado con esta dilución indujo una apertura transiente de las vesículas las cuales se resellan equilibrando su interior con la solución extravesicular (Biber *et al.*, 1983). Las vesículas equilibradas en este nuevo medio se consideran en medio Iso y se cargaron en uno de los inyectores del equipo. En el otro, se cargó la solución experimental pero suplementada con 500 mM manitol (medio Hiper). En estas condiciones se genera un gradiente osmótico de aproximadamente 200 mOsm kg⁻¹ responsable de la salida de agua (Figura 21). En cada experimento el equipo mezcla volúmenes iguales de ambas soluciones (tiempo muerto menor a 3 ms) y se obtiene un registro (trazo) de cambio de intensidad de luz dispersada en función del tiempo. Partiendo de un volumen de cargado de 1 ml se obtienen en general de 8 a 12 trazos individuales que luego son promediados. Los trazos promediados de cada experimento se ajustaron a una función exponencial doble y se calculó la permeabilidad osmótica (P_f) según la siguiente ecuación:

$$P_f = k V_o / S V_a (C_{ext})$$

donde k es la constante exponencial, V_o es el volumen inicial promedio de la vesícula, S es la superficie promedio de la vesícula, V_a es el volumen molar parcial del agua y C_{ext} es la osmolaridad externa.

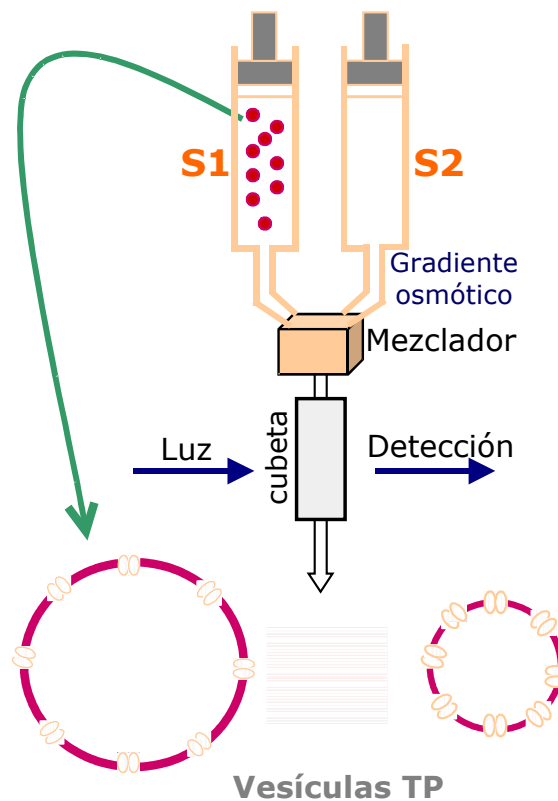


Figura 21: Esquema del equipo de espectrofotometría de *stopped flow*

Las jeringas controladas por pistones motorizados permiten mezclar eficientemente un pequeño volumen de solución hiperosmótica (S2) con un volumen igual de la suspensión de vesículas (S1). La mezcla resultante pasa a través de una cubeta donde se siguen los cambios de luz en función del tiempo.

Las osmolaridades de las soluciones fueron rutinariamente medidas en un osmómetro (Wescor, Logan, UT).

Todos los experimentos se realizaron a temperatura ambiente excepto los de energía de activación.

Efecto de diferentes gradientes sobre el cambio de volumen

Para estudiar la respuesta osmótica de las vesículas el transporte de agua se ensayó mezclando vesículas equilibradas con un volumen igual de la misma solución experimental pero suplementada con distintas concentraciones de manitol para generar diferentes gradientes (375, 267, 162, 940 mOsm kg⁻¹).

Efecto de la temperatura: energía de activación

Para los ensayos de energía de activación los experimentos se realizaron a diferentes temperaturas: 10, 15, 20, 25 y 30°C, empleando un baño termostático de circulación adosado al equipo de *stopped-flow*. La energía de activación (E_a) se calculó a partir de la relación de Arrhenius:

$$\ln k = E_a R^{-1} T^{-1}$$

donde $\ln k$ es el logaritmo natural de la constante exponencial, medida a diferentes temperaturas, R es la constante general de los gases (1.9872 cal mol⁻¹ °K⁻¹) y T es la temperatura absoluta (°K).

Inhibición por compuestos mercuriales

Para los estudios con HgCl₂ las soluciones de trabajo fueron suplementadas con 0.1 mM y 1 mM de HgCl₂. Este último fue preparado siempre el día del experimento a partir de una solución madre 10 mM. El tiempo de preincubación con el inhibidor fue el requerido para el montaje del experimento, que es de aproximadamente un minuto. Se verificó que el agregado de mercurio no

alterara la osmolaridad de las soluciones, midiendo en todos los casos las osmolaridades de los medios de incubación.

Efecto del pH

Las soluciones de trabajo empleadas en los experimentos control fueron realizadas a pH 8.3 utilizando 10 mM Tris-MES como *buffer*. Este es muy eficiente ya que no solamente reúne a dos solutos no permeables sino que además tiene un pKa de 8.1 (Tris) y 6.1 (MES) que permiten poder trabajar a diferentes concentraciones de protones respetando la concentración final de 10 mM. Para estudiar el efecto de la acidez del medio sobre el cambio de volumen en vesículas de tonoplasto se prepararon soluciones a pH 5.6, 6.3, 6.8, 7.3, 7.8, 8.3 y 9.5.

3.2.4 Estudios de *Western Blot*

Los estudios de *Western Blot* se realizaron a partir de la fracción de vesículas purificadas de tonoplasto empleando como control la fracción microsomal. Se sembraron 30 µg de proteína en geles de poliacrilamida 10% p/v para someterlos a un SDS-PAGE (Laemmli, 1970). Para ello los minigeles se prepararon en un equipo comercial (Mini-Protean II Cell, Bio-Rad) y la electroforesis se realizó a 100 V durante aproximadamente 2 h. Posteriormente los minigeles se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Towbin, 1979). La transferencia se realizó en otra cuba del mismo equipo (Mini Trans-Blot Transfer Cell, Bio-Rad, USA) a 100 V durante 2 h. Como marcador de peso molecular se utilizó el Rainbow-high molecular weight range (Amersham, USA). Una vez finalizada la transferencia, la membrana se tiñó con una solución de

Rojo Ponceau (SIGMA) para visualizar las proteínas y comprobar la eficiencia. La membrana de nitrocelulosa se lavó reiteradamente con agua destilada y se realizó el bloqueo en una solución de PBS (8 g NaCl, 0.2 g KCl, 1.44 g Na₂HPO₄ y 0.25 g KH₂PO₄, pH 7.5, en 1 l de agua destilada) conteniendo 3% p/v BSA y 0.1% v/v Tween 20 (PBST+BSA) con agitación durante 1 h a temperatura ambiente. Luego se incubaron con los anticuerpos específico anti α -TIP (dilución 1:1000) durante toda la noche y anti PIP1 y anti PIP2 (dilución 1:1000) 2 h. Se realizaron 3 lavados de 15 min cada uno en la solución PBST+BSA y 2 lavados más en PBS. La membrana se incubó con el anticuerpo secundario (anti IgG de conejo conjugado con la peroxidasa de rabanito, dilución 1:7500, SIGMA) durante 1 h a temperatura ambiente. Se realizaron nuevamente varios lavados en PBST+BSA y luego en PBS. La proteína inmovilizada fue entonces detectada por quimioluminiscencia (Bollag y Edelstein, 1983) utilizando un reactivo comercial (Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus NEL 103, PerkinElmer, Boston, USA). La membrana fue sumergida en este reactivo y seguidamente a la reacción de quimioluminiscencia las membranas se expusieron a placas radiográficas (Kodak XAR) para revelar las bandas positivas.

Los anticuerpos anti α -TIP (anticuerpo para *Phaseolus vulgaris*; Johnson *et al.*, 1989), anti PIP1 (específico para *Triticum aestivum*; Aroca *et al.*, 2005) y anti PIP2 (específico para *Arabidopsis thaliana*, Daniels *et al.*, 1994) fueron gentilmente cedidos por los Dres. Chrispeels y Aroca (UCSD, La Jolla California, USA). Se probó además TIP-MA27 (Marty-Mazars *et al.*, 1995) que nos fuera cedido por el Dr. Francis Marty (Université de Bourgogne, Dijon Cedex, France).

3.3 Resultados

3.3.1 Caracterización de vesículas de tonoplasto

Ensayos de marcadores de membrana

Partiendo en promedio de 400 g de tejido fresco de raíces de remolacha obtuvimos una fracción purificada de vesículas de tonoplasto con una concentración de proteínas de $3.85 \pm 0.55 \mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$ (n=7).

La Tabla II muestra las actividades específicas de las diferentes enzimas marcadoras ensayadas que nos permitió comprobar la pureza de las fracciones obtenidas.

La fracción final se enriqueció en vesículas de tonoplasto con respecto a la fracción microsomal en un factor de 1.56 dato que se infiere a partir de la actividad específica de la H⁺-ATPasa sensible a nitrato.

La posible contaminación con vesículas de membrana plasmática se estudió midiendo la actividad de la H⁺-ATPasa sensible a vanadato. Esta mostró un valor de $5.38 \mu\text{moles Pi h}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína en la fracción microsomal y $1.98 \mu\text{moles}$ en la enriquecida con tonoplasto (n=4). La actividad medida fue por lo tanto 2.7 veces menor en la fracción de vesículas con respecto a los microsomas totales.

Los valores encontrados para la enzima marcadora de retículo endoplasmático (citocromo C reductasa) revelan que hay una disminución del valor de la actividad enzimática de la fracción vesicular de tonoplasto con respecto a la microsomal.

La citocromo C oxidasa, enzima utilizada como marcadora de mitocondria, no pudo ser determinada en ninguna de las dos fracciones. Esto era esperable ya que con el protocolo utilizado las mitocondrias son removidas de la preparación en la centrifugación previa a la obtención de la fracción microsomal. Podemos entonces concluir que la fracción final que posee las vesículas de tonoplasto no posee contaminación con mitocondrias.

Para detectar la posible contaminación con vesículas de membrana de Golgi se realizó el ensayo de latencia de la inosina 5' difosfatasa (IDPasa). La actividad de esta enzima es latente y aumenta a lo largo del tiempo, entonces se determinó en membranas recién aisladas y siete días después de almacenarlas a 4°C. La latencia de esta enzima representa la diferencia observada en actividad luego del almacenamiento en frío. En nuestra preparación el aumento de la actividad de la enzima no es significativo con lo que podemos concluir que la fracción final de vesículas de tonoplasto no se enriqueció con vesículas de membrana de Golgi con respecto a la fracción microsomal.

	ATPasa sensible a Nitrato ($\mu\text{mol h}^{-1} \text{mg prot}^{-1}$) (TP)	ATPasa sensible a Vanadato ($\mu\text{mol h}^{-1} \text{mg prot}^{-1}$) (MP)	Citocromo C Reductasa ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg prot}^{-1}$) (RE)	Citocromo C oxidasa ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg prot}^{-1}$) (MIT)
Fracción Microsomal	11.58 ± 1.92 (n=4)	5.38 ± 0.37 (n=4)	3.16 ± 0.85 (n=5)	ND
Fracción Tonoplasto	18.09 ± 1.66 (n=4)	1.98 ± 0.82 (n=4)	1.23 ± 0.22 (n=5)	ND

Tabla II: Caracterización bioquímica de la fracción microsomal y purificada de tonoplasto

Valores de actividades de enzimas marcadoras para la fracción microsomal y de tonoplasto. Los valores de actividades específicas están expresados como micromoles de sustrato por miligramo de proteína (media ± SEM). Entre paréntesis se indica el número de preparaciones independientes utilizadas en cada caso. TP: tonoplasto, MP: membrana plasmática, RE: retículo endoplasmático, MIT: mitocondria, ND: indica valores no determinados.

Microscopía electrónica

El diámetro de las vesículas se midió a partir de diferentes fotografías tomadas con el microscopio electrónico (Figura 22). El diámetro promedio fue de 142 ± 5 nm (media \pm SEM, $n=340$). El histograma muestra la distribución de frecuencia de los diámetros medidos. Los resultados muestran que la preparación de vesículas representa una población homogénea.

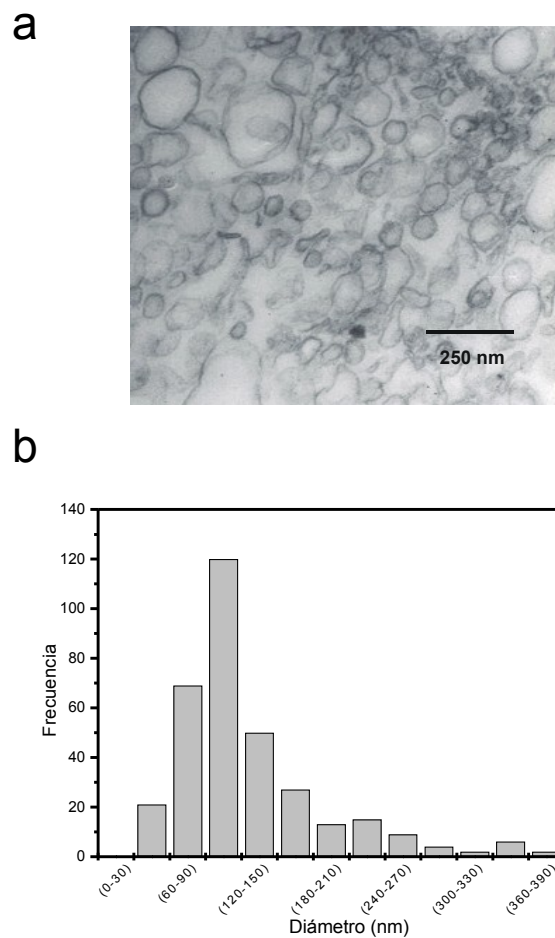


Figura 22: Caracterización de la fracción enriquecida de tonoplasto de *Beta vulgaris*

a) Fotografía de una muestra típica de vesículas de tonoplasto visualizada al microscopio electrónico. El diámetro de las vesículas fue determinado por medio de las imágenes obtenidas siendo su valor de 142 ± 5 nm (media \pm SEM, $n=340$). Aumento 40000x.

b) Distribución de frecuencias de los diámetros obtenidos para las vesículas de tonoplasto. La preparación contiene una población homogénea.

3.3.2 Medición de la permeabilidad osmótica en vesículas de tonoplasto

La Figura 23 muestra un experimento tipo donde se observa la variación de la intensidad de luz dispersada en función del tiempo en presencia de un gradiente hiperosmótico (200 mOsm kg^{-1}) en vesículas de tonoplasto.

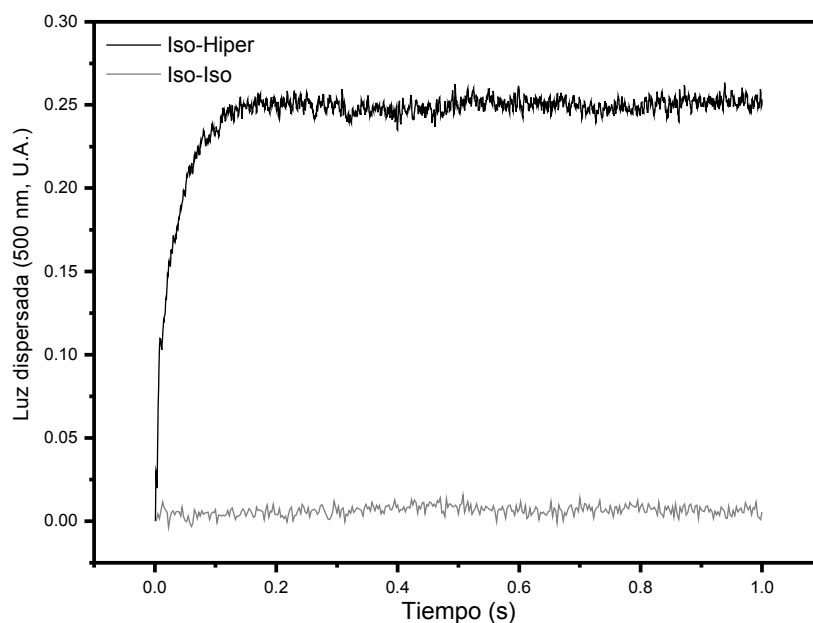


Figura 23: Mediciones de cambios de volumen en las vesículas de tonoplasto

Cambios de luz dispersada en función del tiempo en vesículas de tonoplasto debido a la variación en el volumen de la vesícula cuando se impone un gradiente osmótico (Iso-Hiper). La curva corresponde a un promedio de 12-14 trazos independientes. Como control las vesículas fueron mezcladas con una solución isosmótica (Iso-Iso). Los experimentos fueron repetidos para cinco preparaciones independientes.

Las vesículas de tonoplasto sometidas a un gradiente osmótico mostraron un cambio de volumen significativo (Iso-Hiper), mientras que no hubo cambio de volumen en ausencia de gradiente (Iso-Iso).

Para estudiar el comportamiento osmótico de las vesículas se realizaron experimentos en los cuales éstas fueron sometidas a diferentes gradientes. Se

encontró un aumento en la amplitud de cambio de la luz dispersada con el gradiente osmótico aplicado. Este incremento fue proporcional a la relación entre el gradiente intra y extravascular lo que también corresponde al volumen inicial y final de la vesícula (Figura 24). Estos resultados son consistentes con la teoría de que las vesículas presentan una relación inversa entre la intensidad de luz dispersada y el volumen y que el aumento en la intensidad de luz refleja el cambio de volumen que sufren las vesículas luego del gradiente osmótico (van Heeswijk y van Os, 1986).

Los experimentos fueron realizados a 26°C y el P_f calculado fue de $485 \pm 69 \mu\text{m s}^{-1}$ (media \pm SEM, $n=5$).

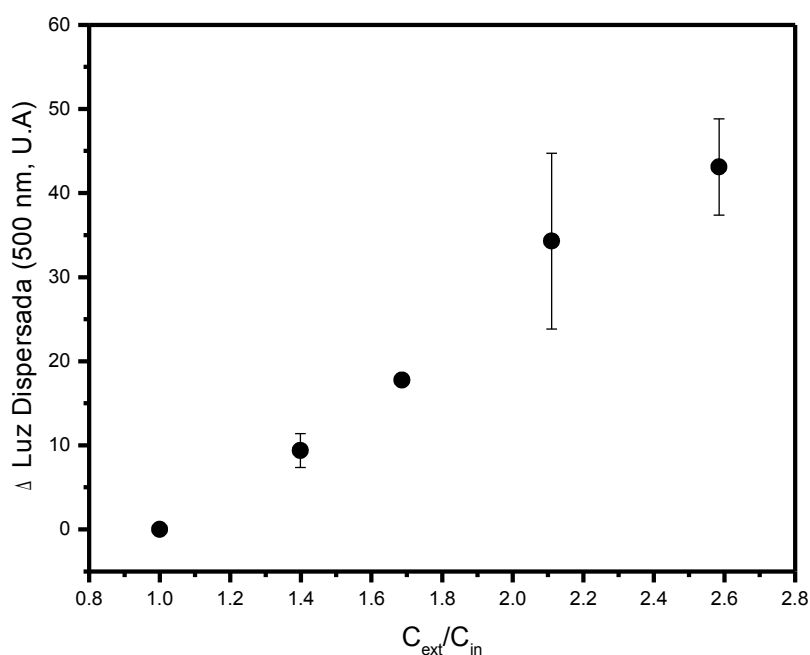


Figura 24: Dependencia de la permeabilidad al agua con el gradiente osmótico

El gráfico representa la relación lineal entre la amplitud máxima de cambio en la intensidad de luz dispersada y el gradiente osmótico impuesto expresado como C_{ext}/C_{in} .

Efecto de la temperatura: energía de activación

Para estudiar la dependencia del P_f con la temperatura las vesículas fueron expuestas a un gradiente osmótico a temperaturas que variaron entre 10°C y 30°C. Los resultados se muestran como un gráfico de Arrhenius en la Figura 25. El ajuste lineal de los datos indican una energía de activación aparente de 5.44 Kcal mol⁻¹ para el transporte de agua en las vesículas de tonoplasto. Esto sugiere que en esta membrana predomina una vía específica para el pasaje de agua (acuaporinas).

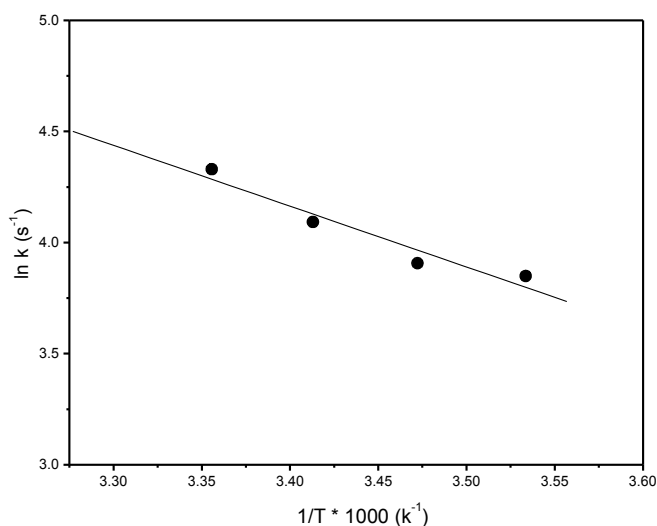


Figura 25: Dependencia de la permeabilidad al agua con la temperatura

Gráfico representativo de la dependencia del P_f de vesículas de tonoplasto con la temperatura. Esta se determinó entre 10°C y 30°C. La energía de activación calculada fue de 5.4 Kcal mol⁻¹.

Inhibición por compuestos mercuriales

Para investigar si el movimiento de agua se daba a través de acuaporinas las vesículas de tonoplasto fueron sometidas a un gradiente osmótico en presencia de diferentes concentraciones de HgCl₂.

La Figura 26 muestra el efecto de 0.1 mM o 1 mM de HgCl_2 sobre el transporte de agua expresado como porcentaje del control, en ausencia del inhibidor. El coeficiente de permeabilidad osmótica se redujo en un $76.4 \pm 0.3 \%$ y $84.4 \pm 2.2 \%$ (\pm SEM, $n=4$) respectivamente en relación al control.

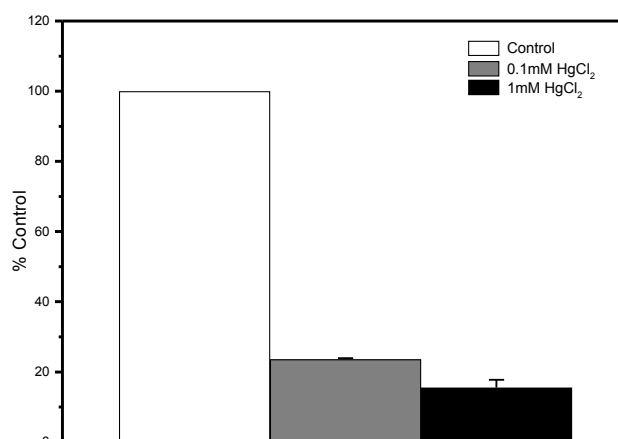


Figura 26: Efecto de compuestos mercuriales sobre la permeabilidad al agua

Se muestran valores de P_f como porcentaje del control (barra blanca, sin HgCl_2). Se probaron dos concentraciones de este inhibidor 0.1 mM (barra gris) y 1 mM (barra negra) que fueron mantenidas durante todo el experimento en ambas soluciones. Media \pm SEM, $n=4$.

Efecto del pH sobre el P_f

La Figura 27 muestra el efecto de la concentración de protones sobre el transporte de agua. Los valores son expresados como porcentaje del valor control, pH 8.3. Cuando las vesículas fueron incubadas durante 2 min en presencia de la solución experimental a pH 5.6 y se aplicó el gradiente osmótico, el P_f se redujo a $58 \pm 3 \%$ (media \pm SEM, $n=6$).

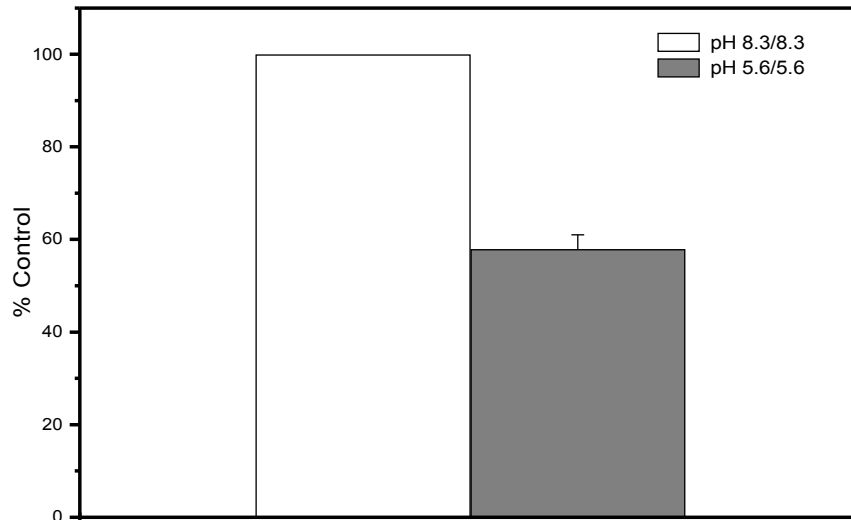


Figura 27: Efecto del pH sobre la permeabilidad al agua

Se muestra el valor de P_f obtenido a pH 5.6 (barra gris) como porcentaje del valor control a pH 8.3 (barra blanca). Media \pm SEM, n=6.

Para profundizar el estudio del efecto de pH se realizaron experimentos donde las vesículas fueron sometidas a un gradiente osmótico a diferentes concentraciones de protones. La Figura 28 muestra los valores obtenidos de P_f para los distintos valores de pH utilizados, el máximo valor de permeabilidad se encontró a pH 7.3 y para valores de pH mayores la diferencia no resultó significativa. Estos resultados sugieren que el P_f se inhibe significativamente a pHs ácidos.

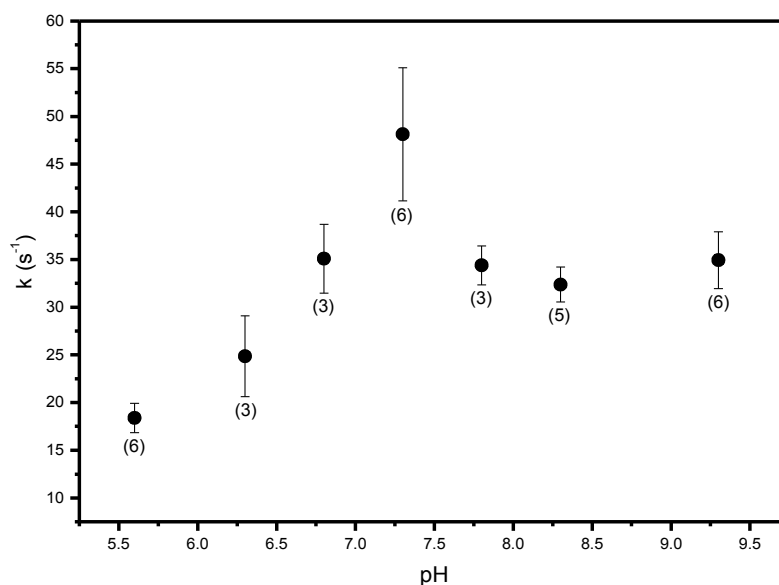


Figura 28: Mediciones de permeabilidad al agua a diferentes valores de pH

Las vesículas fueron equilibradas al pH indicado y luego se les aplicó un *shock* osmótico manteniendo la misma concentración de protones. Los valores son el promedio \pm SEM de n determinaciones independientes indicadas entre paréntesis.

3.3.3 Detección molecular de acuaporinas en vesículas de tonoplasto

Los estudios funcionales sugieren fuertemente que las membranas de tonoplasto poseen canales de agua. Para definir molecularmente la presencia de estas proteínas se realizaron ensayos de *Western Blot*.

Los mismos se llevaron a cabo a partir de fracciones microsomales y de tonoplasto para comprobar la presencia de la proteína utilizando un anticuerpo anti α -TIP. Este reconoció una banda de 25 kDa en la fracción microsomal mientras que en la fracción enriquecida en tonoplasto se detectó un doblete con bandas de 25 kDa y 27 kDa. En ambas fracciones pueden observarse bandas de mayor peso molecular (Figura 29).

Si bien la fracción vesicular fue caracterizada bioquímicamente, era necesario asegurar molecularmente que nuestra preparación no presentara contaminación con vesículas de membrana plasmática. Estas poseen un alto valor de permeabilidad osmótica y fuerte inhibición por pH (Alleva *et al.*, 2004) lo que podría alterar la interpretación de los resultados obtenidos con vesículas de tonoplasto. Fracciones microsomales, de tonoplasto y de membrana plasmática fueron corridas en paralelo y probadas utilizando anticuerpos anti PIP1 y anti PIP2. Puede observarse que ambos anticuerpos reconocen una banda de 25 kDa tanto en la fracción microsomal como en la fracción de membrana plasmática. La preparación de tonoplasto no es reconocida por ninguno de los dos anticuerpos confirmando que no existe contaminación por estas PIPs.

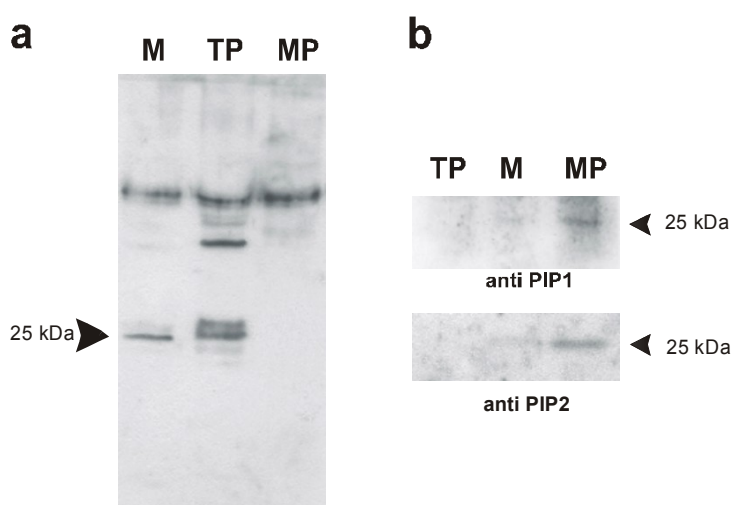


Figura 29: Análisis de Western Blot de extractos de raíces de remolacha (*Beta vulgaris*)

M: fracción microsomal total; TP: tonoplasto; PM: membrana plasmática, detectadas con diferentes anticuerpos

a) Membranas de M, TP y PM fueron ensayadas usando un anticuerpo para acuaporinas de tonoplasto (anti α -TIP de *Phaseolus vulgaris*).

b) Membranas de M, TP y PM fueron ensayadas usando anticuerpos para acuaporinas de membrana plasmática (anti PIP1 de *Triticum aestivum* y anti PIP2 de *Arabidopsis thaliana*) para descartar una posible contaminación en la preparación de tonoplasto.

El peso molecular de las bandas se indica a la derecha o izquierda.

También se realizaron experimentos con un anticuerpo que presentaría especificidad a TIP en *Beta vulgaris* (TIP-MA27) y que fuera descrito por Marty-Mazars (Marty-Mazars *et al.*, 1995). Sin embargo, otros autores, en forma posterior a esta publicación han hallado que este mismo anticuerpo reconoce predominantemente una proteína de mayor tamaño (45 kDa) que la esperada (27 kDa) (Hoh *et al.*, 1995; Jauh *et al.*, 1999). En nuestras preparaciones se detectó una banda de 22 kDa y otras de mayor peso molecular.

3.4 Discusión

Para profundizar los estudios de caracterización del P_f del tonoplasto de raíces de *Beta vulgaris* aislamos una fracción purificada de vesículas de tonoplasto y realizamos experimentos con la técnica de *stopped flow*. Esta permite el control y manipulación del contenido intra y extravesicular, esencial para estudiar mecanismos regulatorios involucrados directamente en la actividad del canal.

Las vesículas de tonoplasto muestran un alto valor de P_f , baja energía de activación y alta inhibición por compuestos mercuriales. Estos resultados junto con la detección de un doblete con bandas de aproximadamente 25 kDa y 27 kDa observadas utilizando el anticuerpo anti α -TIP son evidencias que confirman la existencia de un canal de agua activo en el tonoplasto en raíces de remolacha.

El valor de P_f calculado ($485 \pm 69 \mu\text{m s}^{-1}$, media \pm SEM, $n=5$) concuerda con el de otras preparaciones de tonoplasto en otros sistemas empleando la misma técnica (Maurel *et al.*, 1997; Niemietz y Tyerman, 1997) y junto con nuestras observaciones en vacuolas aisladas (capítulo II) y secciones de raíces

(Amodeo *et al.*, 1999) confirman que las acuaporinas están involucradas en el transporte de agua en el parénquima de raíz de *Beta vulgaris*.

Por muchos años, particularmente en células animales, se propuso que el pH del medio podía regular la permeabilidad al agua en un proceso *on-off* (Parisi *et al.*, 1983; Parisi y Bourguet, 1984; Parisi y Wietzerbin, 1984). Más recientemente se observó un efecto del pH en acuaporinas clonadas expresadas en ovocitos de *Xenopus laevis* (Zeuthen y Klaerke, 1999, Yasui *et al.*, 1999, Nemeth-Cahalan y Hall, 2000). En plantas muy pocos estudios fueron realizados buscando una posible regulación del transporte de agua por el pH. Gerbeau y colaboradores mostraron que la permeabilidad al agua de vesículas de membrana plasmática de *Arabidopsis* se reduce un 20% a pH ácido (Gerbeau *et al.*, 2002). Nuestros estudios muestran que la permeabilidad al agua de vacuolas aisladas de *Beta vulgaris* disminuye un 55% a pH 6.6 (Capítulo II) y vesículas de tonoplasto muestran una reducción parcial del P_f cuando son expuestas a bajo pH, indicando que la acidificación afecta el funcionamiento del canal. Un dato interesante de destacar es que mientras los canales de agua activos presentes en la preparación de tonoplasto de raíz son mayoritariamente inhibidos por $HgCl_2$ (inhibición del 84%) muestran un efecto parcial de inhibición por acidificación (inhibición del 42%).

El P_f de vesículas de tonoplasto tiene un valor máximo a pH 7.6 a diferencia de lo observado en preparaciones de membrana plasmática tanto de *Arabidopsis thaliana* como de *Beta vulgaris* (Gerbeau *et al.*, 2002; Alleva *et al.*, 2004).

Nuestra hipótesis es que solo una fracción de TIPs del tonoplasto de raíz de *Beta vulgaris* puede ser bloqueada por protones. Para probar esta hipótesis fue necesario descartar la presencia de una acuaporina de membrana plasmática en

nuestra preparación ya que estas muestran un alto valor de permeabilidad osmótica y son completamente inhibidas por la acidificación del medio (Alleva *et al.*, 2004). Una baja contaminación en la fracción de tonoplasto podría ser responsable de la inhibición parcial observada cuando las vesículas fueron expuestas a bajo pH. Para investigar esta posibilidad, se purificaron membranas plasmáticas del mismo material empleando un método de separación por partición en dos fases especial para obtener una fracción de membrana plasmática altamente purificada (Larsson *et al.*, 1994). Los análisis de *Western Blot* muestran claramente que mientras la fracción obtenida de membrana plasmática está enriquecida en PIP1 y PIP2, la fracción de tonoplasto no muestra contaminación con estas PIPs y está además enriquecida en TIPs (Figura 29).

Hasta el momento se han identificado cinco subclases de TIPs, pero sólo α -TIP y δ -TIP se han estudiado en profundidad (Maurel *et al.*, 1993; Johnson y Chrispeels, 1992; Maurel *et al.*, 1995; Jauh *et al.*, 1998). Los estudios de *Western Blot* muestran que un anticuerpo contra α -TIP se une a la fracción de tonoplasto. α -TIP es expresada en semilla y está presente en la membrana de vacuolas almacenadoras de proteínas durante el desarrollo temprano y estados tardíos de maduración de la semilla (Johnson *et al.*, 1989; Melroy y Herman, 1991). Es necesario destacar que los ortólogos de TIPs en diferentes especies pueden no ser reconocidos por el mismo anticuerpo y muestran diferentes patrones de expresión en los tejidos (Santoni *et al.*, 2000). Es por ello que en nuestra fracción de tonoplasto purificada podemos asegurar la presencia de una TIP pero no que sea específicamente la isoforma α -TIP ya que el anticuerpo empleado no es específico para *Beta vulgaris*. También está descrito en la literatura que anticuerpos contra el tonoplasto de células de parénquima de

almacenamiento de remolacha reconocen un polipéptido de 27 kDa relacionado con una TIP (Marty-Mazars *et al.*, 1995). Este sin embargo no pudo ser detectado en nuestra preparación. No obstante, esta información junto con los resultados presentados aquí nos permite especular que en nuestra preparación podría estar presente más de una isoforma.

En conclusión, el tonoplasto de raíz de *Beta vulgaris* expresa acuaporinas activas que son parcialmente inhibidas por la acidificación, probablemente porque sólo ciertas isoformas pueden ser bloqueadas por protones.

CAPITULO IV

Estudios de cambio de volumen en ovocitos expresando acuaporinas: mecanismo de regulación por pH

4.1 Introducción

Desde el descubrimiento de la primer acuaporina en plantas (Maurel *et al.*, 1993) se ha publicado una enorme cantidad de trabajos reportando la existencia en distintas especies de proteínas pertenecientes a la familia MIP. Esta inclusión de nuevas proteínas a dicha familia fue basada en la homología de secuencias entre la de la nueva proteína y la de la familia ya conocida. Además de la homología de secuencia, la idea de que estas proteínas transportaran agua estaba apoyada por evidencias experimentales que mostraban que su expresión se daba en determinadas condiciones o estados de la planta en los que el movimiento de agua resulta fundamental (procesos vinculados con desarrollo embrionario, elongación celular, respuesta al déficit de agua, Johnson y Chrispeels, 1989; Ludevid *et al.*, 1992; Guerrero *et al.*, 1990).

Sin embargo, es importante destacar, que el hecho de que haya una alta homología de secuencia entre dos proteínas no necesariamente implica que estas tengan igual función. Para poder realmente confirmar que la función de estas proteínas es transportar agua, es necesario medir dicho transporte. Una estrategia para medir la actividad de una proteína clonada consiste en sobreexpresarla en un sistema de expresión heterólogo. En el caso particular de las acuaporinas, el

sistema más usado desde hace tiempo, es la expresión de estas en ovocitos de *Xenopus laevis* (Gurdon *et al.*, 1971). Si bien la primer acuaporina en plantas fue caracterizada usando este sistema (Maurel *et al.*, 1993), en los años subsiguientes varias proteínas pertenecientes a la familia MIP se describieron solo por homología de secuencia. Recién en los últimos años se han comenzado a reportar una serie de trabajos donde efectivamente se prueba la funcionalidad de los supuestos canales de agua (Higuchi *et al.*, 1998; Li *et al.*, 2000; Dixit *et al.*, 2001; Moshelion *et al.*, 2002; Katsuhara *et al.*, 2002; Fetter *et al.*, 2004).

Respecto a la sobreexpresión de acuaporinas en ovocitos de *Xenopus laevis*, es importante destacar las ventajas que esta metodología presenta: los ovocitos son altamente eficientes para sintetizar y ensamblar proteínas luego de la inyección de ARN, son de fácil manipulación debido a su tamaño, aproximadamente 1 mm de diámetro, y fundamentalmente carecen de canales de agua endógenos. La ausencia de acuaporinas endógenas en estas células fue informada por Zhang y Verkman en 1991. Estos autores describieron que la permeabilidad al agua de la membrana del ovocito es muy baja ($8.6 \cdot 10^{-4} \text{ cm s}^{-1}$) y presenta una alta energía de activación ($10.2 \text{ Kcal mol}^{-1}$), datos que evidencian la ausencia de canales de agua propios de la membrana del ovocito.

Como vimos en el capítulo II uno de los mecanismos de regulación directa sobre las acuaporinas es la acidificación del medio. Se ha demostrado que la AQP3 de mamíferos se inhibe a valores de pH por debajo de 6.4 (Zeuthen y Klaerke, 1999) mientras que el P_f de ovocitos expresando la AQP0 aumenta significativamente a pH 6.5 (Németh-Cahalan y Hall, 2000). En este último trabajo

demonstraron que la histidina 40 tiene un rol clave en la modulación de la permeabilidad al agua. Otros datos disponibles en la literatura para diferentes canales regulados por pH indican que generalmente son las histidinas las responsables de la sensibilidad a la concentración de protones del medio (Tabla III). Sin embargo, se sabe que otros residuos capaces de sensar pH serían lisina, treonina, tirosina y metionina (Tabla III) y más recientemente se ha reportado que la leucina estaría involucrada en el *gating* por pH de canales de potasio de mamíferos (Sackin et al., 2005).

Proteína	Referencia	Respuesta	Sitio de mutación	Mutación
AQP0	Németh-Cahalan, 2000	Activación a pH ácido	His 40	A; D, K
Kir6.2 (K _{ATP})	Xu, JBC 2001 276:12898	Activación a pH ácido	His 175	A; K
	Xu, JBC 2001 276:38690	Activación a pH ácido	His 175	A; E; D; N; C; K; R
		Inactivación a pH ácido	His186 His193 His216 Otras 5 His	A N Q A
KST1 (canal de K en plantas)	Hoth, 1997	Activación a pH ácido	His160 His271	A; D; R A; D; R
Canal de urea	Weeks, 2000	Activación a pH ácido	His123	A; G
Kv1.5	Steidl, 1999	Inactivación a pH ácido	His452	Q
ROMK1	Fakler, 1996	Inactivación a pH ácido	Lis80	M
RMOK1	Chanchevalap, 2000	Inactivación a pH ácido	His23 His31 His225 His270 His274 His280 His342 His354	N; D; K
Kir2.3	Qu, 1999	Inactivación a pH ácido	Thr53 Tyr57 Met60	I W V

Tabla III: Datos informados para el sensado de pH en diferentes canales

Se muestra el efecto del pH sobre varias proteínas de acuerdo a las referencias indicadas. Se aclara el sitio responsable del sensado del pH y la mutación realizada.

Los resultados presentados en los capítulos anteriores indican que los cambios de volumen observados tanto en vacuolas aisladas como en vesículas de tonoplasto son debidos a rápidos movimientos de agua a través de acuaporinas, que además fueron detectadas molecularmente usando anticuerpos específicos. Finalmente en este capítulo, para demostrar que estas acuaporinas son realmente canales de agua, se llevo a cabo su sobreexpresión en ovocitos de *Xenopus*, se investigó el efecto del pH y mediante mutagénesis dirigida se identificó el aminoácido sensor de la concentración de protones en PIPs.

Este capítulo incluye experimentos que fueron realizados durante una pasantía en el Laboratorio del Dr. Christophe Maurel y bajo su supervisión (Biochimie et Physiologie Moléculaire des Plantes, ENSA-M/INRA/CNRS, Montpellier, Francia). La pasantía forma parte de un proyecto de colaboración entre ambos laboratorios (PICs Programme 618; ECOS 2003 #A03B03).

4.2 Materiales y Métodos

4.2.1 Obtención de los Clones

Los clones de *Beta vulgaris* fueron cedidos por Maria Karlsson del Departamento de Bioquímica de Plantas, Universidad de Lund, Lund, Suecia. Los mismos fueron obtenidos a partir de una *library* de hoja y raíz de remolacha (*Beta vulgaris*) utilizando como sonda So- δ TIP, ACC: AJ245953, ref. Maria Karlsson, Lund, Suecia y Nt-TIPa, ACC: AJ237751, ref. Christophe Maurel, Montpellier, Francia. Se extrajo el ADN plasmídico y los clones fueron cortados con enzimas de restricción

adecuadas para el clonado posicional en el vector Uni-ZAP XR. Se secuenciaron 16 clones, 4 de los cuales encontrados en raíz resultaron ser homólogos a TIPS. Estos fueron llamados pDCTIP3 (1237 pb, 254 aa), pDCTIP12 (946 pb, 247 aa), pDCTIP17 (986 pb, 247 aa) y pDCTIP51 (872 pb, 254 aa). pDCTIP12 y pDCTIP17 son dos genes diferentes pero que codifican para la misma proteína al igual que pDCTIP3 y pDCTIP51 (Maria Karlsson, comunicación personal).

Se trabajó además con acuaporinas clonadas de *Arabidopsis thaliana* (TIP1;1 PIP1;2, PIP2;1 y PIP2;2) obtenidas en el Laboratorio del Dr. Christophe Maurel.

4.2.2 Mutagénesis dirigida mediante el método de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Se sintetizaron oligonucleótidos (*primers*) complementarios a la secuencia a amplificar excepto en la base nucleotídica que se quiso mutar. Se generaron dos pares de *primers* (Figura 30), cada uno de los cuales consistió en un primer externo (1 o 2) y otro interno que llevaba la mutación (1" y 2"). Se realizaron dos PCRs llamadas primarias usando cada uno de los juegos de *primers* (1-1" y 2-2"). Se verificó el tamaño de las bandas obtenidas mediante un gel de agarosa y se purificaron a partir de este para ser utilizadas como molde en la reacción de PCR siguiente (secundaria).

Para la reacción secundaria se utilizaron ambos *primers* externos (1 y 2) lo que permitió amplificar el fragmento inicial total pero con la base mutada.

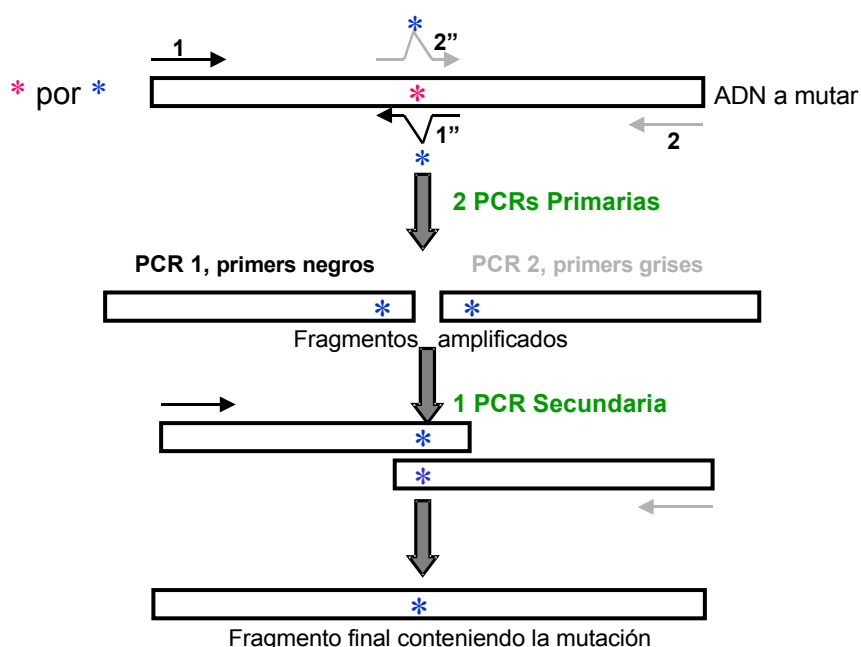


Figura 30: Esquema de mutagénesis dirigida mediante PCR

Los asteriscos indican el nucleótido que se desea mutar (rosa) o el que se usa para introducir la mutación (azul). Las flechas representan los dos pares de primers sintetizados (1-1'' y 2-2''). Se realizan dos PCRs primarias: PCR 1 (utilizando 1 y 1'') y PCR 2 (utilizando 2 y 2''). Los fragmentos obtenidos son utilizados como molde para la PCR secundaria, realizada con los primers 1 y 2 para obtener el fragmento original pero llevando la mutación.

PCR primaria

Se preparó la siguiente mezcla de reacción: $0.005 \mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$ del ADN molde, 0.2 mM de dNTPs, $1\times$ del *buffer* correspondiente a la enzima y $0.5 \text{ pmoles } \mu\text{l}^{-1}$ de oligonucleótidos (volumen final $100 \mu\text{l}$). Se incubó a 100°C durante 4 min y se agregaron 2.5 U de Pfu polimerasa. Las condiciones de la reacción fueron: 3 min a 94°C , 30 ciclos de 1 min a 94°C , 1 min a 55°C y 90 s a 72°C . Finalmente un ciclo a 72°C durante 5 min.

PCR secundaria

Mediante un *kit* comercial (GENECLEAN II, BIO 101) la banda de interés de ambas PCRs primarias fue purificada del gel y utilizada como molde en la PCR secundaria. La mezcla de reacción fue igual a la utilizada en la PCR primaria. Las condiciones de la reacción secundaria fueron: 3 min a 94°C, 3 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 50°C y 3 min a 72°C. Luego, 3 min a 94°C, 27 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 55°C y 3 min a 72°C. Finalmente un ciclo a 72°C durante 5 min. El tamaño de las bandas obtenidas se verificó mediante geles de agarosa.

Purificación del producto de PCR y clonado del nuevo fragmento

Una vez finalizada la PCR, se precipitó la fase acuosa con 3 M acetato de sodio (NaAc) y etanol absoluto, durante 1 h a -80°C. Se centrifugó a 15000 g durante 30 min, se lavó el precipitado con 70% y una vez seco se resuspendió en 20 μ l de 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH 8 (TE).

Para clonar el fragmento obtenido (conteniendo la mutación) en el vector de interés, se realizó una reacción de digestión cortando al inserto y al vector con las mismas enzimas y finalmente se realizó una reacción de ligación.

Digestión: se digirieron 3.7 μ g del vector de expresión (derivado de pSP64T, Maurel *et.al.*, 1993) y 10 μ l del fragmento purificado obtenido en la PCR secundaria (aproximadamente 2 μ g en 50 μ l finales de reacción) con 10-20 U 50 μ l⁻¹ de BglII y SpeI. Se incubó a 37°C durante 3-4 h. A partir de un gel de agarosa, que permitió además verificar la digestión, se extrajeron las bandas correspondientes al inserto y al vector para su purificación.

Ligación: se utilizaron 5-10 pmoles ml^{-1} de vector, una concentración de inserto 3-4 veces mayor y 1 U de T4 ADN ligasa en un volumen final de 15 μl . Se incubó a 16°C durante toda la noche.

Trasformación bacteriana

La transformación bacteriana se realizó mediante electroporación. Se agregaron 10 μl de una dilución 1/25 de la reacción de ligación a un tubo conteniendo 40 μl de bacterias electrocompetentes (E Coli, DH5 α) y se aplicó el pulso de corriente. Se agregó 1 ml de medio LB líquido (SIGMA) y se incubó a 37°C con agitación durante 1 h. Distintos volúmenes del cultivo fueron colocados en placas de Petri conteniendo LB agar e incubados a 37°C durante toda la noche.

Screening de la mutación

Para comprobar la presencia de la mutación introducida se realizó una PCR en placa a partir de las colonias obtenidas. Se prepararon 25 μl de la mezcla de reacción conteniendo 1.5 mM MgCl_2 , 0.2 mM dNTPs, 1x del *buffer* de la enzima, 10-20 pmoles $25 \mu\text{l}^{-1}$ de oligonucleótidos específicos y 1 U de Taq polimerasa Extra-polI. Se picaron al azar diferentes colonias aisladas que fueron identificadas y se incorporaron directamente a la placa conteniendo 25 μl de la mezcla de reacción. Las condiciones fueron las mismas que para la PCR primaria.

4.2.3 Aislamiento de plásmidos y transcripción *in vitro*

A partir de un *stock* de glicerol se obtuvieron colonias aisladas en una placa de Petri conteniendo LB agar más 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ ampicilina luego de incubarlas

durante toda la noche a 37°C. A partir de una única colonia aislada se realizó un precultivo en medio LB líquido con antibiótico incubándolo durante 6-8 h a 37°C con agitación. Se preparó una dilución 1:500 de este precultivo en medio LB líquido y se dejó crecer durante toda la noche con agitación a 37°C. Este se utilizó para aislar ADN plasmídico mediante la utilización de un *kit* comercial (Macherey-Nagel, Nucleobond aX).

Para la transcripción se linealizaron 5 µg de ADN plasmídico con la enzima de restricción apropiada (XhoI para pDCTIP3 y pDCTIP12 de *Beta vulgaris* y EcoRI para las PIP de *Arabidopsis thaliana*) durante la noche a 37°C. Se verificó la digestión en un gel 0.8% agarosa. Se realizaron dos extracciones con fenol-cloroformo y una con cloroformo. Para esto se incrementó el volumen de reacción a 100 µl agregando 80 µl de agua autoclavada y se agregaron 100 µl de fenol-cloroformo (preparado anteriormente en iguales proporciones), se centrifugó durante 2 min a 16000 g. Se repitió el mismo procedimiento con la fase acuosa en un tubo limpio. Para la precipitación del ADN la última fase acuosa se recuperó en un tubo limpio y se agregaron 1/10 volúmenes de 3 M NaAc pH 5.2 y 2 volúmenes de etanol absoluto. Se incubó a -20°C durante 1h. Se centrifugó durante 30 min a 15000 g a 4°C y luego de descartar el sobrenadante el precipitado se enjuagó con 500 µl de etanol 70% y se dejó secar durante unos minutos. El precipitado fue disuelto en agua tratada con DEPC y se agregaron los reactivos para la reacción de transcripción en la siguiente concentración final: 1 mM de ATP-CTP-UTP y 0.2 mM de GTP, 5 mM DTT, 0.6 mM análogo de Cap Ribo m⁷G, 100 U inhibidor de ARNasa, 1x *buffer* de reacción y 1 U µl⁻¹ de ARN polimerasa T3 o T7. Se incubó a 37°C

durante 90 min. Se agregaron $0.5 \text{ U } \mu\text{l}^{-1}$ de ARN polimerasa T3 o T7 y se incubó a 37°C durante 60 min. Se agregaron 100 U de inhibidor de ARNasa y 4 U de RQ1 ADNasa. Se incubó a 37°C durante 30 min. Se realizaron dos extracciones fenol-cloroformo y una con cloroformo y se precipitó el ARN durante 1h a -80°C . Se centrifugó durante 30 min a 15000 g a 4°C . El precipitado se resuspendió en 100 μl de agua tratada con DEPC y se precipitó nuevamente. Se centrifugó durante 30 min a 13000 g a 4°C y se dejó secar. Finalmente el precipitado se disolvió en 15 μl de agua DEPC y 40 U inhibidor de ARNasa. La concentración de ARN obtenido se midió mediante espectrofotometría y se comprobó su presencia en un gel. Se guardaron alícuotas a -80°C hasta la realización de los experimentos.

4.2.4 Obtención de ovocitos

El protocolo para la obtención de ovocitos se realizó según Cao (Cao *et al.*, 1992). Se utilizaron hembras de *Xenopus laevis* adquiridas comercialmente y mantenidas en recipientes de plástico individuales con agua, en una habitación acondicionada con ciclo luz oscuridad de 12 horas. Los animales son alimentados 2 veces por semana. El agua del recipiente que los contiene se cambia luego de ser alimentados y regularmente 3 veces por semana. Se emplea agua filtrada que se deja en recipientes aireados por 7 días antes de ser utilizada.

El animal se anestesió colocándolo en hielo durante 30-45 min previos a la operación. Se realizó un corte en la parte baja del abdomen, se extrajeron directamente con una pinza los lóbulos conteniendo ovocitos y se colocaron en solución OR2 (8.25 mM NaCl; 0.2 mM KCl; 0.5 mM HEPES; 0.1 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ajustada a pH 7.5 con 1 M NaOH). Se enjuagaron con la misma solución y luego se

separaron en pequeños grupos de entre 15 y 20. Finalmente se incubaron en una solución 1 U ml^{-1} colagenasa en OR2 (SIGMA) durante 1 h con agitación suave a $18\text{-}20^{\circ}\text{C}$. Los ovocitos se enjuagaron con solución OR2 suplementada con $0.1 \text{ g } 100 \text{ ml}^{-1}$ BSA y se incubaron en tampón k ($100 \text{ mM K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ajustado a pH 6.5 con HCl, más el agregado de 1 g l^{-1} BSA) durante 1 h con agitación suave a $18\text{-}20^{\circ}\text{C}$. Los ovocitos se lavaron con solución Barth's (8.8 mM NaCl ; 0.1 mM KCl ; 0.24 mM NaHCO_3 ; 1 mM HEPES ; $0.033 \text{ mM Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; $0.041 \text{ mM CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y $0.082 \text{ mM MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, ajustada a pH 7.4 con 1 M NaOH) suplementada con $0.1 \text{ g } 100 \text{ ml}^{-1}$ BSA. Finalmente se mantuvieron en solución Barth's con el agregado de $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ de gentamicina y se conservaron a $18\text{-}20^{\circ}\text{C}$ durante una noche antes de ser inyectados.

4.2.5 Inyección de ARNc en ovocitos de Xenopus

La inyección se realizó con un inyector comercial (Drumond Nanoject, USA) que permite inocular volúmenes fijos de 50 nl. En el pistón se coloca una pipeta de vidrio de punta muy fina que es llenada con aceite mineral coloreada, agua y finalmente el ARN a inyectar. Las pipetas se preparan a partir de pequeños capilares (3.5" Drumond #3-000-203-G/X, Drumond Scientific Company, USA) utilizando un estirador de pipetas calibrado para obtener puntas delgadas. Estas se esterilizan en estufa a 240°C durante 2 h.

Luego de verificar el estado de los ovocitos, estos fueron inyectados con 50 nl de $1 \mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$ ARNc del lado citoplasmático y colocados en una placa de 24 wells conteniendo 1x Barth's para tenerlos aislados. Se mantuvieron a $18\text{-}20^{\circ}\text{C}$ durante 48 o 72 h hasta el momento de los experimentos.

Se comparó el valor de P_f obtenido entre ovocitos no inyectados e inyectados con agua. No se encontraron diferencias significativas entre ambos valores (Figura 31) por lo que en adelante se utilizaron como control ovocitos no inyectados.

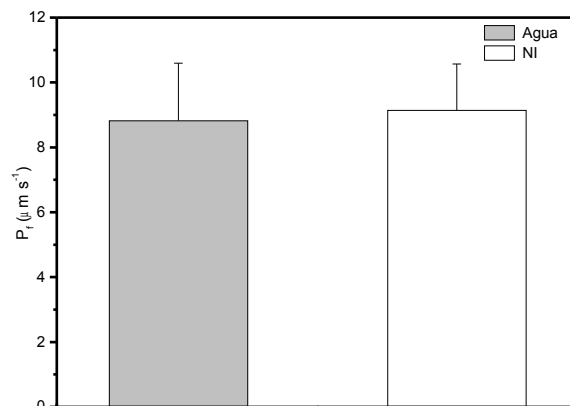


Figura 31: Valores de P_f para ovocitos control

Ovocitos inyectados con agua (barra gris) o no inyectados (barra blanca) fueron sometidos a un gradiente osmótico con una dilución 1/5 de la misma solución. Media \pm SEM, $n=6$.

4.2.6 Estudios de cambio de volumen

Para analizar el cambio de volumen, los ovocitos sumergidos en solución Barth's 1x ($200 \text{ mosmol Kg}^{-1}$) fueron transferidos a una pequeña cámara de observación ubicada en una lupa (Olympus SZ40). Se retiró el exceso de solución e inmediatamente se agregaron $750 \mu\text{l}$ de la misma solución diluida 5 veces (osmolaridad final 40 mOsm Kg^{-1}). A partir de ese momento se tomaron imágenes cada 20 s durante 2 min. Los cambios del volumen del ovocito son registrados mediante una cámara de video acoplada a la lupa que permite digitalizar las imágenes mediante una interfase analógica digital y almacenarlas en la computadora. Las imágenes almacenadas se analizan utilizando el programa Image Tool para obtener los valores de área que permiten calcular el volumen. La

pendiente del gráfico de volumen relativo en función del tiempo es utilizada para calcular el valor de permeabilidad osmótica mediante la siguiente ecuación:

$$P_f = k V_o / S V_a (\Delta Osm)$$

donde k es la pendiente, V_o es el volumen inicial del ovocito, S es la superficie medida del ovocito, V_a es el volumen molar parcial del agua y ΔOsm es la diferencia de osmolaridad entre el interior y el exterior del ovocito.

Efecto del pH

Para estudiar el efecto de pH sobre la permeabilidad al agua se utilizaron diferentes soluciones conteniendo 50 mM NaCl y 20 mM MES o 20 mM HEPES al pH indicado. Para controlar el pH intracelular del ovocito el NaCl fue reemplazado por acetato de sodio. La acidificación intracelular producida por la solución de NaAc se debe a que el ácido acético, en equilibrio con el acetato, es capaz de atravesar la membrana. Para verificar la concentración intracelular de protones alcanzada en cada caso se utilizó un electrodo especial con el que se midió el pH dentro del ovocito luego de 10 min de perfusión con las distintas soluciones experimentales, NaCl o NaAc a pH 6 o 7.5. La Figura 32 muestra el pH citoplasmático para cada una de las soluciones de perfusión. La acidificación intracelular se observó únicamente en presencia de NaAc pH6.

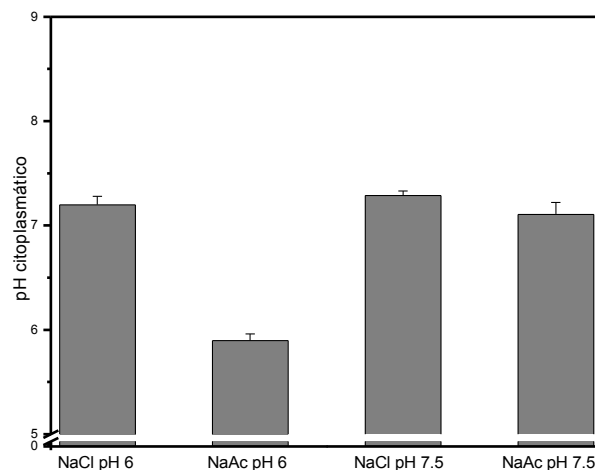


Figura 32: Efecto de la concentración externa de protones sobre el pH interno del ovocito

Ovocitos nativos fueron preincubados durante 10 minutos en soluciones conteniendo 50mM NaCl o NaAc a pH 6 o 7.5 y se midió el pH citosólico usando un electrodo sensible a pH, (n=7-8).

En el protocolo experimental los ovocitos fueron incubados durante 10 min en la solución de pH correspondiente en condiciones isosmóticas y luego se generó el *shock* hiposmótico con una dilución 1/5 de la misma solución.

4.3 Resultados

4.3.1 Expresión de TIPs de *Beta vulgaris* y estudio del efecto del pH

Los ovocitos inyectados con el ARNc de pDCTIP3 y pDCTIP12 fueron estudiados a las 48 y 72 horas después de la inyección. Para ello se los sometió a un gradiente osmótico y se analizó el cambio de volumen que sufrió cada ovocito comparado con los ovocitos control. A las 72 horas se dio la máxima expresión por lo que los experimentos siguientes se realizaron a este tiempo. Los ovocitos inyectados con ARNc de pDCTIP3 y pDCTIP12 tienen un valor de P_f de 87.7 ± 11.6

$\mu\text{m s}^{-1}$ y $45 \pm 5 \mu\text{m s}^{-1}$, respectivamente, ambos significativamente mayores que los no inyectados ($16.3 \pm 3.3 \mu\text{m s}^{-1}$), demostrando que los ovocitos expresan correctamente la proteína.

Basándonos en nuestros resultados de inhibición del transporte de agua por la acidificación en vacuolas aisladas y vesículas de tonoplasto estudiamos si el pH afectaba el cambio de volumen de los ovocitos inyectados. Realizamos primero experimentos para evaluar el efecto del pH citoplasmático sobre los movimientos de agua. Al pH control, los ovocitos inyectados con el ARNc de pDCTIP3 y de pDCTIP12, mostraron un P_f de $81.6 \pm 17.1 \mu\text{m s}^{-1}$ y $33.4 \pm 11.3 \mu\text{m s}^{-1}$ respectivamente, mientras que el valor de P_f calculado a pH 6 fue $91.3 \pm 6.05 \mu\text{m s}^{-1}$ y $39.1 \pm 13.2 \mu\text{m s}^{-1}$ respectivamente. A partir de estos datos podemos inferir que el transporte de agua no se ve afectado por la acidificación del medio interno del ovocito (Figura 33).

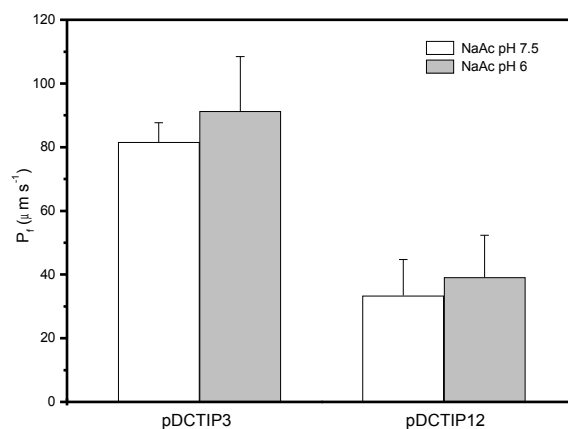


Figura 33: Efecto del pH citoplasmático sobre TIPs de *Beta vulgaris* expresadas en ovocitos de *Xenopus*

Ovocitos inyectados con ARNc de pDCTIP3 y pDCTIP12 fueron incubados durante 10 minutos en soluciones conteniendo 50mM NaAc a pH 6 (barra gris) o 7.5 (barra blanca). Se midió el cambio de volumen luego de someterlos a un gradiente osmótico con una dilución 1/5 de la misma solución. Media \pm SEM, n=3-8.

Posteriormente, probamos cual era la respuesta de los ovocitos cuando la acidificación era extracitoplasmática. La Figura 34 muestra que no existen diferencias significativas respecto al control (pH 7.5) en el valor de P_f a pH 6 para ninguno de los dos clones, indicando que la acidificación del pH extracitoplasmático tampoco afecta la permeabilidad osmótica del ovocito inyectado.

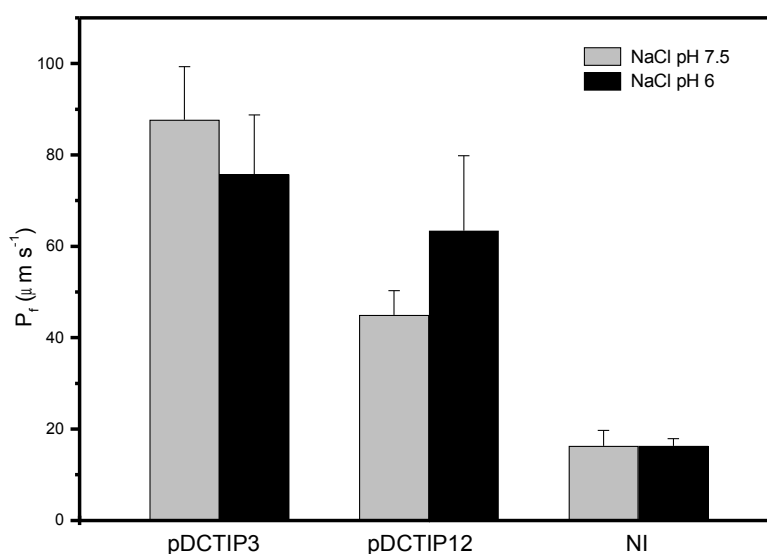


Figura 34: Efecto del pH extracitoplasmático sobre TIPs de *Beta vulgaris* expresadas en ovocitos de *Xenopus*

Ovocitos control no inyectados o inyectados con ARNc de pDCTIP3 y pDCTIP12 fueron incubados durante 10 minutos en una solución conteniendo 50mM NaCl a pH 6 (barra negra) o 7.5 (barra gris). Se midió el cambio de volumen luego de someterlos a un gradiente osmótico con una dilución 1/5 de la misma solución. Media \pm SEM, n=5-6.

Estos resultados sugieren que los clones pDCTIP3 y pDCTIP12 corresponderían a isoformas de TIPs que no son reguladas directamente por cambios en el pH intra o extracitoplasmático. Decidimos entonces evaluar la

respuesta ante la acidificación de otra acuaporina de tonoplasto utilizando la TIP1;1 de *Arabidopsis thaliana* dado que esta es el modelo de estudio para plantas superiores. Para ello inoculamos ovocitos de *Xenopus* con el ARNc de TIP1;1 y estudiamos el efecto de pH intra o extracitoplasmático. La Figura 35 muestra el coeficiente de permeabilidad osmótica de ovocitos expresando esta proteína en distintas condiciones de pH. Como puede observarse no existen diferencias significativas en ninguno de los casos por lo que se deduce que esta acuaporina no presenta sensibilidad al pH.

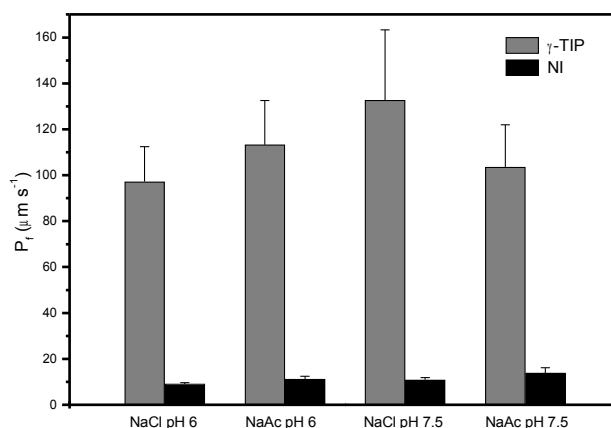


Figura 35: Efecto del pH sobre TIP1;1 de *Arabidopsis thaliana* expresada en ovocitos de *Xenopus*

Ovocitos control no inyectados (barras negras) o inyectados con ARNc de TIP1;1 (barras grises) fueron incubados durante 10 minutos en soluciones conteniendo 50mM NaCl o NaAc a pH 6 o 7.5. Se midió el cambio de volumen luego de someterlos a un gradiente osmótico con una dilución 1/5 de la misma solución. Media \pm SEM, n=22-24.

Dado que ciertos aminoácidos están involucrados en la sensibilidad al pH, alineamos las secuencias de los clones de acuaporinas de *Beta vulgaris* y de *Arabidopsis thaliana* con el objetivo de buscar patrones aminoacídicos que pudieran estar relacionados con características funcionales, Figura 36:

	N-terminal	DTM 1	loop A (vac)							
pDCTIP3	-MPISRISVG--TPDEAR	HPDTRLRSGLAEFISTLIFVFAGQGS	GMAFAKL-----TEGAA	52						
pDCTIP12	---MTKIALG--TSREAT	QPECIKALVVEFICTFLFVFAGVGS	SAMAADKA-----GA	47						
TIP1_1	-MPIRNIAIG--RPDEAT	RPDALKAAALAEFISTLIFVAVAGS	SGMAFNKL-----TENGA	52						
TIP1_2	-MPTRNIAIGG-VQEEVY	HPNALRAALAEFISTLIFVFAGS	SGSIAFNKI-----TDNGA	53						
TIP1_3	-MPINRIAIG--TPGEAS	RPDAIRAAFAEFISMVIFVFAGQGS	GMAFYGKL-----TGDGP	52						
TIP2_1	---MAGVAFG--SFDDSF	SLASLRAYLAEFISTLLFVFAGVGS	SAIAYAKL-----TSDAA	50						
TIP2_2	---MVKIEIG--SVGDSF	SVASLKAYLSEFIATLLFVFAGVGS	SALAFKAL-----TSDAA	50						
TIP2_3	---MVKIEVG--SVGDSF	SVSSLKAYLSEFIATLLFVFAGVGS	SAVAFKAL-----TSDGA	50						
TIP3_1	MATSARRAYGFRGRADEATH	HPDSIRATLAEFLSTFVVFVAAEGS	SILSLDKLYWEHAAHAGT	60						
TIP3_2	MATSARRAYGFRGRADEATH	HPDSIRATLAEFLSTFVVFVAAEGS	SILALDKLYWDTAHTGT	60						
TIP4_1	---MKKIELG--HHSEAA	KPCIKALIVEFITTFLLFVFAGVGS	SAMATDSL-----VG	47						
TIP5_1	MRRMIPTSFSS-KFQGVLS	MNALRCYVSEFISTFFVFLA	AVGVSVMSSRKL-----MAGDV	54						
	DTM 2	loop B (cit)	DTM 3							
pDCTIP3	NTPAGLVAASIAHAFALFVAV	AVGANISGGHVNPAVTFGAFVGG	NITLLNGIVYWIAQLL	112						
pDCTIP12	TTLVGLLFVGTTHAFVAVMIA	AGFNISGGHLNPAVTLGLAMGG	HITLIRSLLYWIIQCF	107						
TIP1_1	TPPSGLVAAVAHAFGLFVAVS	VGANISGGHVNPAVTFGAFIGG	NITLLRGILYWIAQLL	112						
TIP1_2	TPPSGLVAAALAHAFGLFVAVS	VGANISGGHVNPAVTFVLLGG	NITLLRGILYWIAQLL	113						
TIP1_3	ATPAGLVAASLSHAFALFVAVS	VGANVSGGHVNPAVTFGAFIGG	NITLLRILYWIAQLL	112						
TIP2_1	LDPAGLVAIAVCHGFALFVAVA	IGANISGGHVNPAVTFGLAVGG	QITVITGVFYWIAQLL	110						
TIP2_2	LDPAGLVAVAVAHAFALFVAVS	IAANISGGHLNPAVTLGLAVGG	NITVITGFFYWIAQCL	110						
TIP2_3	LDPAGLVAIAIAHAFALFVAVS	IAANISGGHLNPAVTLGLAIGG	NITLITGFFYWIAQCL	110						
TIP3_1	NTPGGILILVALAHAFALFAAVS	AAINVSGGHVNPAVTFGALVGG	RVTAIRAIYYWIAQLL	120						
TIP3_2	NTPGGILVVALAHALALFAAVS	AAINVSGGHVNPAVTFALIGR	ISVIRAIYYWIAQLL	120						
TIP4_1	NTLVGLFAVAVAHAFVAVMIS	AG-HISGGHLNPAVTLGLLGGH	ISVFRFLYWIDQLL	106						
TIP5_1	SGPFGVLI	PAIANALALSSSVYISWNVSGG	HVNPAVTFAMAVAGRISVPTAMFYWTSQMI	114						
	DTM 3	loop C (vac)	DTM 4	loop D (cit)						
pDCTIP3	GSVAACALLKFATGGLETA	AACATDVSAW	NALVMEIVMTFGLVYTVY	ATAIDPKKGNIG	172					
pDCTIP12	ASALACL	SLNVTGGLTTP	IHCLPKGVDP	LOGLVMEVILTFSLFTIY	TTIVDPKKGPIQ 167					
TIP1_1	GSVVA	CLILKFATGG	LAVPAFGLSAGVGV	LNAFVFEIVMTFGLVYTVY	ATAIDPKNGSLG 172					
TIP1_2	GSVAAC	FLLSFATGG	EPIPAFGLSAGVGS	LNALVFEIVMTFGLVYTVY	ATAVDPKNGSLG 173					
TIP1_3	GAVVAC	LLLVSTGG	METAASF	SYGVT	PNAVVF	EIVMTFGLVYTVY	ATAVDPKKGDI 172			
TIP2_1	GSTAAC	FLLKVTGGL	AVPTHSVAAGLGS	IEGVVMEIIITFALVYTVY	ATAADPKKGS 170					
TIP2_2	GSI	VACLLLVFVTNG	ESVPTHGVAAGLGA	IEGVVMEIVVTFALVYTVY	ATAADPKKGS 170					
TIP2_3	GSIVAC	LLLVFVTNGK	SVPTHGVSAGLGA	IEGVVMEIVVTFALVYTVY	ATAADPKKGS 170					
TIP3_1	GAILAC	LLRLT	TNGMRPVG	FRLASGVG	AVNGLVLEIILTFGLVYVY	STLIDPKRGS 180				
TIP3_2	GAILAC	LLRLAT	NGLRVP	GFHVASGVSE	LHGLLMEIILTFALVYVY	STADPKRGS 180				
TIP4_1	ASSAAC	FLLSYLTGG	MGT	VPHTLASGVSY	TQGIWEIILTFSLFTVY	ATIVDPKKGSLD 166				
TIP5_1	ASVMA	CLVLKVTVME	QHVPIYKI	AGEMTGF	GASVLEGLAFVLYTVY	FT-ASDPRRGLPL 173				
	DTM 5	loop E (vac)	DTM 6							
pDCTIP3	IIAPLAIGLIVGANILAG	GAFD	GASMNPA	V	SFGPAVMSWNW	TNHWIYVWG	PLIGAGIAGL	232		
pDCTIP12	TQGI	FLTGLVVG	ANIFAG	GLFSGASMN	PARSFG	PALISWN	WADHWIYVWG	PLIGGGLGGL 227		
TIP1_1	TIAP	IAIGFIVGANILAG	GAFSGASMN	PAVAFG	PAVVS	WTW	TNHWVYVWG	PLVGGGIAGL 232		
TIP1_2	TIAP	IAIGFIVGANILAG	GAFSGASMN	PAVAFG	PAVVS	WTW	TNHWVYVWG	PLIGGLAGI 233		
TIP1_3	IIAP	LAIGLIVGANILV	GAFD	GASMNPA	V	SFGPAV	VSWI	TNHWVYVWGP	FFIGAAIAAI 232	
TIP2_1	TIAP	LAIGLIVGANILAA	GF	FFSGSMN	PARSFG	PAVA	AGDFSG	HWVYVWG	PLIGGGLAGL 230	
TIP2_2	TIAP	IAIGFIVGANILAA	GF	FFSGSMN	PARSFG	PAVVS	GD	FSQIWIYVWG	PLVGGALAGL 230	
TIP2_3	TIAP	IAIGFIVGANILAA	GF	FFSGSMN	PARSFG	PAVVS	GD	LSQIWIYVWG	PLVGGALAGL 230	
TIP3_1	IIAP	LAIGLIVGANILV	G	FFSGASMN	PARAFG	PALV	WR	HDHWIYVWGP	FFIGSALAAL 240	
TIP3_2	IIAP	LAIGLIVGANILV	G	FFD	GASMN	PARAFG	PALV	WR	SNHWIYVWGP	FFIGGALAAL 240
TIP4_1	FG	PLLTGFVVG	ANILAG	GAFSGASMN	PARSFG	PALV	SN	W	TDHWIYVWG	PLIGGGLAGF 226
TIP5_1	AVG	PIFIGFVAGANV	LAA	GF	FFSGSMN	PACAFG	SAMVYGS	FKNQAVYVWG	PLLLGGATAAL 233	
	C-terminal									
pDCTIP3	IYEF	IFIG	-----	HQEPASADY	QRLSA	254				
pDCTIP12	ICDN	FFMFKS	-----	HVPLSR	DEDEF	247				
TIP1_1	IYEV	FFINT	-T-----	HEQLPT	TDY	251				
TIP1_2	IYDF	VFIDENA	-----	HEQLPT	TDY	253				
TIP1_3	VYDT	IFIGSNG	-----	HEPLPS	NDF	252				
TIP2_1	IYGN	VFMGSSE	-----	HVPLAS	ADF	250				
TIP2_2	IYGD	VFIGSYA	-----	PAPT	TESYP	250				
TIP2_3	IYGD	VFIGSYE	-----	AVET	REIRV	250				
TIP3_1	IYEM	VIP	-TEP	PTHHAH	GHQPLAPEDY	268				
TIP3_2	IYEM	IIPSVNE	PPHST--	HQPLAPEDY	267					
TIP4_1	IYEN	VLIDRP	-----	HVP	VADDEQ	PLLN- 249				
TIP5_1	YVDN	VVPVED	-----	DRGS	STGDAIGV--	256				

Figura 36: Alineamientos de secuencias de TIPs de *Beta vulgaris* y *Arabidopsis thaliana*

Alineamiento de las secuencias de pDCTIP3 y pDCTIP12 de *Beta vulgaris* y todos los disponibles de *Arabidopsis thaliana* mediante el programa CLUSTAL W. Se indican las secuencias correspondientes a los *loops*, los dominios transmembrana (DTM, en amarillo), las His (en rojo) y los NPA, en verde).

Encontramos que los clones pDCTIP3 y pDCTIP12 de *Beta vulgaris* no poseen residuos histidina expuestos en el *loop* D, mientras que si bien en el *loop* B, hay un residuo His conservado, se ubica extremadamente cercano al dominio NPA el cual esta inserto en la membrana involucrado en la formación del poro. Esta His además no podría ser la responsable de la sensibilidad a pH dado que está presente en los dos clones de *Beta vulgaris* ensayados y estos no muestran efecto de pH. Los *loops* B y D corresponden a la cara citoplasmática de la TIP cuando se encuentra en la vacuola y al lado extracelular cuando se la expresa en un ovocito. Por el contrario observando las secuencias aminoacídicas de las PIPs, proteínas muy relacionadas funcionalmente con las TIPs, se puede ver que estas poseen un patrón altamente conservado de histidinas (Figura 37).

a

	N-terminal	DTM 1
PIP1_2	MEGKEEDVRVGANKFPERQPIGTSAQSDKDYKEPPPAPLFEPGELA	SWSFWRAGIAEFIA
PIP2_2	-----MAKDVEGPEGFQTRDYEDPPPTPFDADELTKWSLYRAVIAEFVA	
hAQP1	-----MASEFKKLLFWRAVVAEFLA	
TIP1_1	-----MPIRNIAIGRPDEATRPDALKAAALAEFIS	
NIP1_2	-----MAEISGNNGGDARDGAVVVNLKEEDEQQQQQAIHKPLKQDSLISVPPFLQ	
GLPF	-----MSQTSTLKGQCIAEFLG	
SIP1_2	-----MSAVKSALGDMVITFLW	

	DTM 1	loop A	DTM 2	loop B
PIP1_2	TFLFLYITVLTVMGVK RSPN-----MCAS VGIQGI AWAFGGMIFALVYCTAGISGGHIN			
PIP2_2	TLLFLYITVLTVIGYKI QSDTKAGVDCCGGVILGIAWAFGGMIFILVYCTAGISGGHIN			
hAQP1	TTLFVFISIGSALGFKY PVGN-----QTAVQDNVKS LAFGLS IATLAQSVGHISGAHLN			
TIP1_1	TLIFVVAGSGSGMAFN KLTEG-----ATTP SGLVAA VAHAFGLFVAVSVGANISGGHVN			
NIP1_2	KLMAEVLGTYFLIFAG CAAVAVN-TQHDKAVTLP GIAI VWGLTVMVLVYSLGHISGAHLN			
GLPF	TGLLIFFGVGCVAALK VAGASFG-----QWEISVIWGLGVAMAIYLTAGVSGAHLN			
SIP1_2	VILSATFGIQTAAI VSAVGFHG-----ITWAPLVISTLVVFSISIFTVIGNVLGGASFN			

	loop B	DTM 3	loop C
PIP1_2	PAVTFGLFLARKLS--LTRA VYI VMQCLG AICGAG VVKGFQP-----		
PIP2_2	PAVTFGLFLARKVS--LIRA VLYMVA QCLG AICGV FRQSFQS-----		
hAQP1	PAVTLGLLLSQCIS--IFRALMY IIAQ CVGAI VATAI LSGITS-----		
TIP1_1	PAVTFGAFIGGNIT--LLRG ILY WIAQ LLGS VVACLILK FATG -----		
NIP1_2	PAVTIAFASCGRFP--LKQ V PAY ISQV IGSTLAAATLRL LFG -----		
GLPF	PAVTIALWLFACFD--KRV I PF IVS QVAGAFCAAAL VYGL YYNLFDFEQTHHIVRGSV		
SIP1_2	PCGNAAFYTAGVSSDSL FLAIR S PAQA IGAAGG AITIME MIP-----		

	loop C	DTM 4	loop D	DTM 5
PIP1_2	KQYQALGGGANTIAHGYTK GS GLG AEI IGTFVLVYTVFSATDAKRNARDS HVP ILAPLPI			
PIP2_2	SYYDRYGGGANSLADGYNT GT GL AAE IIGTFVLVYTVFSATDPKRNARDS HVP VLAPLPI			
hAQP1	SLTGNLSG--RNDLADGVNS GQ GLG IEI IGTLQLVLCV L ATDRRR-----RDLGG SAP LAI			
TIP1_1	GLAVPAFG----LSAGV VLNA FVFEIVMT FGLV YTVYATAIDPKN---GSLGT IAPI AI			
NIP1_2	LDQDVCSGKHDVFGTLP SG SNLQ SFV IEFIITFYLM F VISGVATDN--RAIGELAGLAV			
GLPF	ESVDLAGTFSTYPNPHIN FVQA F AVEM VITAILMGL L LALTDGNG---VPRG LAP LLI			
SIP1_2	EKYKTRIG--GKPSLQFGA HN GAISEV VLSF SVTF LVL LIIILRGR-----KL LAKT FL			

	DTM 5	loop E	DTM 6
PIP1_2	GFAVFLVHL ATIPITGTGINPARSLGAAIFNKD-----NAWDDH WV FVGP PF IG		
PIP2_2	GFAVFMVHL ATIPITGTGINPARSFGASVIYNKS-----KPWDDH W I F WVGP PF IG		
hAQP1	GLSVALGHL LAI DY TGCGINPARSFGSAVITHN-----FSNH W I F WVGP PF IG		
TIP1_1	GFIVGAN ILAGGAFSGASMNPAVAFGPAVVS WT -----WTNH W V Y WAG P LVG		
NIP1_2	GSTVLLN VI IAG PVSGASMN PGR SLG PAM VYSC-----YRGL W I Y IV S PI V G		
GLPF	GLLIAV IGASMG PLT GFAMN PAR DFGPKVF AW L AG WGN VAF TGG RDI PY FL V PL FG PI VG		
SIP1_2	ALATVSV FV VG SK FTR PFMN PAI AFG WAY IYKSHN-----TW DH F Y V Y W ISS YT G		

	DTM 6	C-terminal
PIP1_2	AALAALYH VI V IRAI PF KSR-----	
PIP2_2	AAIAAFYH Q F VL RAS GSKSLG SFR SAANV-----	
hAQP1	GALAVLI YDFILAP RS DL DR V KV W T SGQ VE EYDL DADD IN SR VE M K PK	
TIP1_1	GGIAG LI YEV FFINT THE QL P TT DY -----	
NIP1_2	AVSGAW VY NM VRY TD K PL RE IT KS G SL KT VR NG SS R -----	
GLPF	AIVGAF Y RK LIG RH LP CD IC V E E KE T TP S E Q K AS L-----	
SIP1_2	AILSAML F R I F P AP PL VQ KK Q K A -----	

b

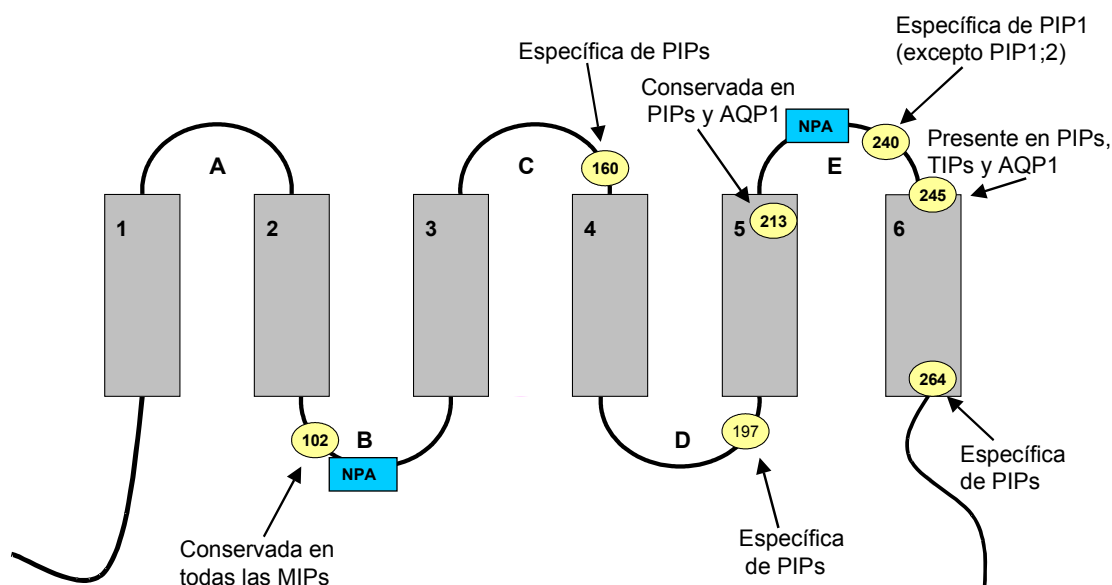


Figura 37: Patrón de conservación de histidinas

a) Alineamiento de las secuencias de PIP1;2 y PIP2;2 de *Arabidopsis thaliana* con diferentes miembros MIPs mediante el programa CLUSTAL W. En rojo se marcan las histidinas 197 y 264.

b) Esquema representativo de un monómero de AQP mostrando las diferentes His conservadas en las distintas MIPs.

4.3.2 Expresión de acuaporinas con residuos histidina altamente

conservados: efecto del pH

Decidimos entonces analizar si aquellas acuaporinas que poseen residuos histidina conservados muestran sensibilidad al pH ácido. Inyectamos entonces ovocitos con diferentes acuaporinas de membrana plasmática de *Arabidopsis* (PIP1;2, PIP2;1 y PIP2;2) y los sometimos a los experimentos de pH. La Figura 38 muestra cómo el P_f de los ovocitos expresando estas proteínas se redujo significativamente cuando se acidificó el interior celular.

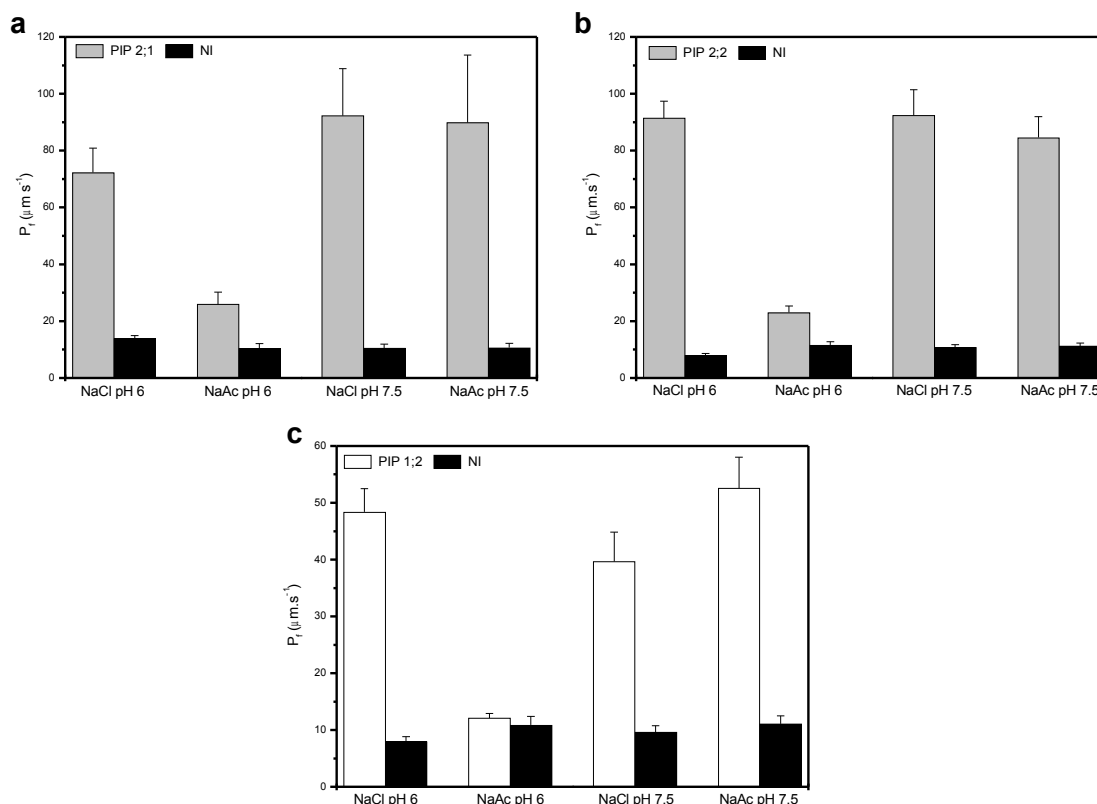


Figura 38: Efecto del pH sobre PIPs de *Arabidopsis thaliana* expresadas en ovocitos de *Xenopus*

Ovocitos control no inyectados (barras negras) o inyectados con ARNc de PIP2;1 (a), PIP2;2 (b) o PIP1;2 (c) fueron incubados durante 10 minutos en soluciones conteniendo 50mM NaCl o NaAc a pH 6 o 7.5. Se midió el cambio de volumen luego de someterlos a un gradiente osmótico con una dilución 1/5 de la misma solución. Media \pm SEM, n=22-24.

Nos interesamos entonces por evaluar en más detalle el mecanismo de regulación de la permeabilidad al agua por protones. Elegimos como modelo PIP2;2 dado que esta isoforma es la más abundante en la raíz de *Arabidopsis* (Javot *et al.*, 2003) y presenta valores de P_f muy superiores con respecto a PIP1 (Figura 38). Para ello realizamos experimentos donde los ovocitos expresando esta acuaporina fueron incubados en NaAc con valores de pH que variaron entre 6.0 y 7.5 lo que

mostró que el pK de la inhibición de PIP2;2 dependiente de protones se da alrededor de pH 6-6.9 (Figura 39).

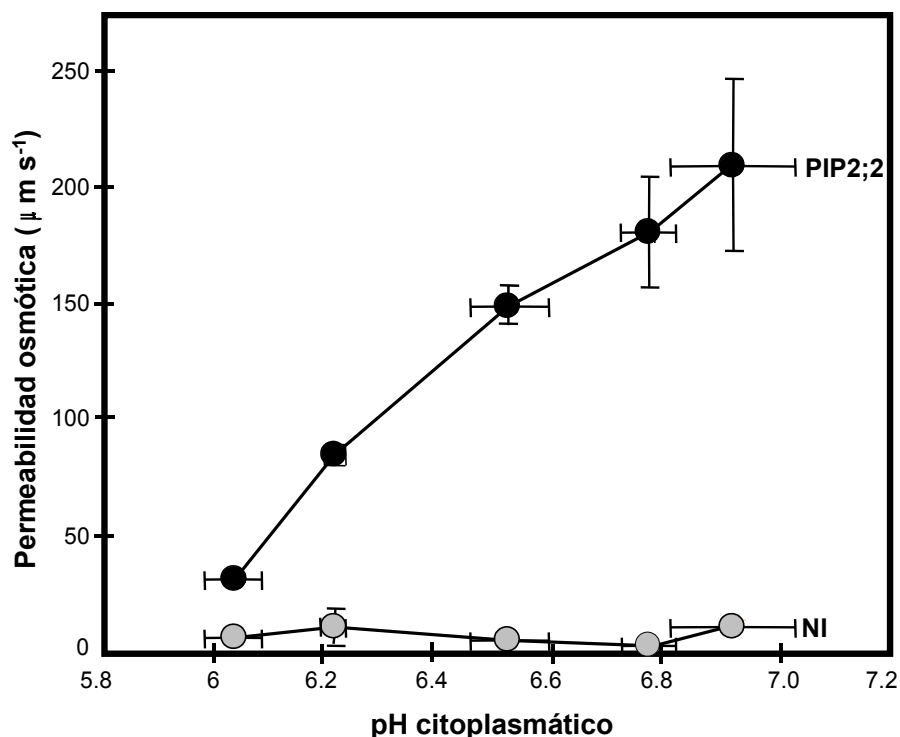


Figura 39: Sensibilidad de PIP2;2 a la acidificación citoplasmática

Ovocitos control no inyectados (círculos grises) o expresando la PIP2;2 (círculos negros) fueron preincubados durante 10 minutos en una solución conteniendo 50mM NaAc con pH entre 6 y 7.5. Se midieron los valores de P_f y se muestran como función del pH citosólico medido en ovocitos control en las mismas condiciones. Media \pm SEM, n=4-6.

4.3.3 Análisis de secuencias y expresión de acuaporinas mutantes

Con el objetivo de hallar la posible histidina involucrada en la sensibilidad al pH observada en PIP2;2, mutamos la His264 y la His197, ubicadas en el extremo carboxi-terminal y en el *loop* D respectivamente (Figura 37 b), dado que la inhibición del P_f fue intracelular (Figura 38).

Para la posición 264 la mutante realizada fue H264A. La Figura 40 muestra los valores de P_f para ovocitos expresando la proteína PIP2;2 o la mutante. No se encontraron diferencias significativas en los valores de P_f en ninguna de las condiciones de pH entre la proteína *wild type* y la mutante indicando que el residuo de la posición 264 no está involucrado en la sensibilidad al pH de PIP2;2.

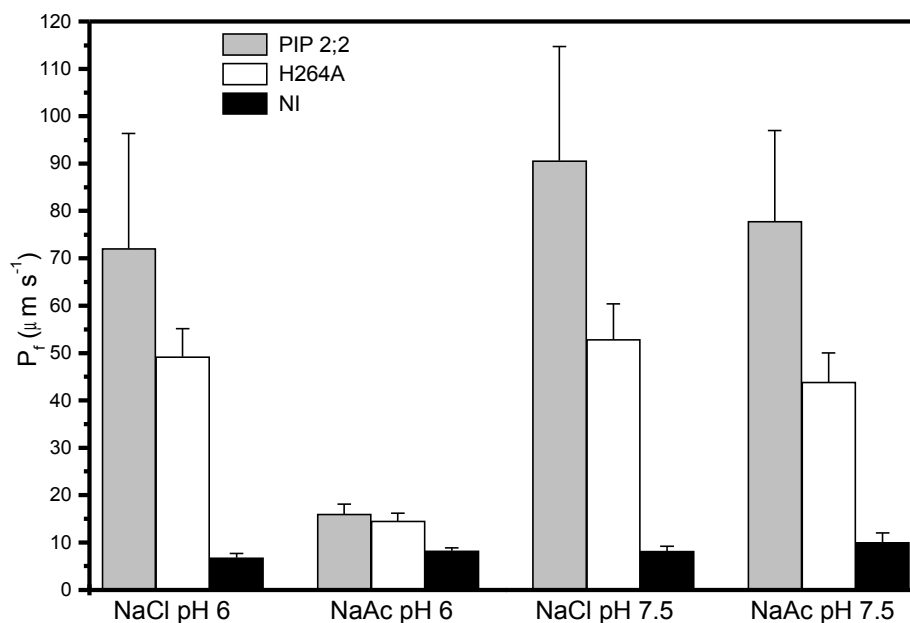


Figura 40: Efecto del pH sobre ovocitos expresando la mutante H264A

Valores de P_f para ovocitos no inyectados (barras negras), expresando PIP2;2 (barras grises) o la mutante H264A (barras blancas) luego del *shock* osmótico en soluciones conteniendo 50mM de NaCl o NaAc a pH 6 y 7.5. Media \pm SEM, n=5-14.

La Figura 41 muestra el comportamiento de diferentes mutantes de la posición 197 a distintos valores de pH. La mutante H197D pierde la sensibilidad a pH, pero mantiene un valor de permeabilidad relativamente alto. La mutante H197K, en cambio, pierde la sensibilidad a pH pero presenta un P_f bajo. Finalmente,

la mutante donde la histidina fue reemplazada por una alanina, muestra una inhibición de un 30%.

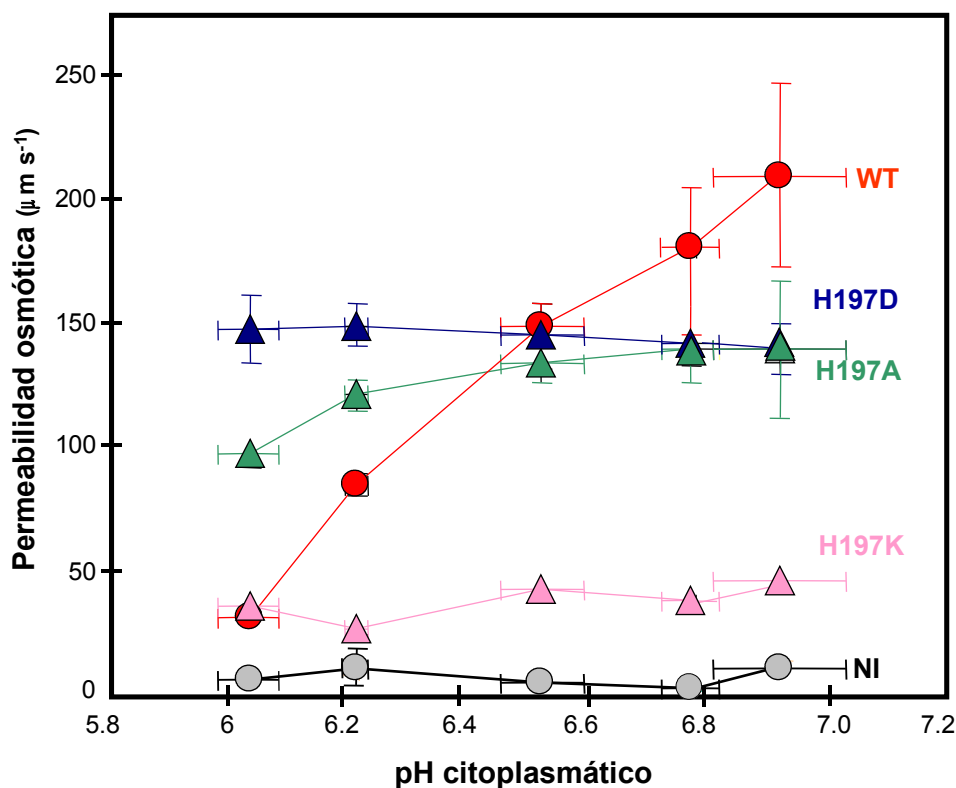


Figura 41: Sensibilidad de la *wild type* (WT) y las mutantes PIP2;2 a la acidificación citoplasmática

Ovocitos control no inyectados (círculos grises) u ovocitos expresando la PIP2;2 *wild type* (círculos rojos), las mutantes H197A (triángulos verdes), la H197D (triángulos azules), o la H197K (triángulos rosas) fueron preincubados durante 10 minutos en una solución conteniendo 50mM NaAc con pH entre 6 y 7.5. Se midieron los valores de P_f y se muestran como función del pH citosólico medido en ovocitos control en las mismas condiciones. Media \pm SEM, n=4-6.

Si bien estos resultados indicarían que la histidina 197 sería el sitio principal para sensor el pH citosólico, la sensibilidad residual que se observa en la mutante H197A podría deberse a la existencia de otros residuos cargados y cercanos a este. El *loop* D contiene una serie de aminoácidos que podrían posiblemente cooperar con

la función de la posición 197. Para analizar este punto se prepararon dobles mutantes, H197A/R194A y H197A/D195A. Ovocitos inyectados con cada una de estas mutantes pierden totalmente la sensibilidad a la acidificación citosólica a pH 6 (Figura 42). Las mutantes simples en las posiciones 194 o 195 también mostraron una inhibición por pH marcadamente reducida.

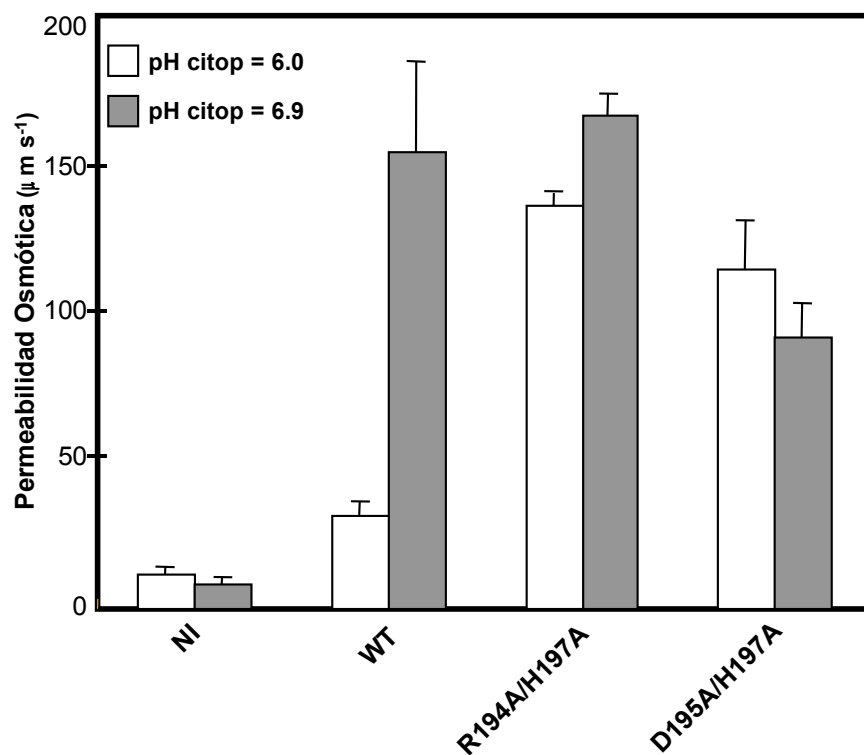


Figura 42: Sensibilidad de la *wild type* (WT) y los dobles mutantes PIP2;2 a la acidificación citoplasmática

Ovocitos control no inyectados u ovocitos expresando la PIP2;2 *wild type*, o las dobles mutantes R194A/H197A o HD195A/H197A fueron preincubados durante 10 minutos en una solución conteniendo 50mM NaAc pH 6 (barras grises) o 7.5 (barras blancas). Media \pm SEM, n=6-10.

Por lo tanto, la detección de los cambios de pH citosólicos en PIP2;2 es realizada por la histidina 197 con la participación de los residuos 194 y 195.

4.4 Discusión

Los ovocitos inyectados con ARNc de pDCTIP3 y pDCTIP12 de *Beta vulgaris* mostraron un valor de P_f significativamente más alto que los no inyectados, demostrando que la proteína para la cual codifican, fue correctamente traducida, expresada y activa en la membrana del ovocito. Sin embargo la acidificación intra o extracitoplasmática no tuvo efecto sobre la misma. Estos resultados difieren claramente con lo observado en vacuolas aisladas y vesículas de tonoplasto (capítulos II y III), donde la concentración de protones tuvo un efecto concreto sobre el coeficiente de permeabilidad osmótica.

Dos explicaciones alternativas, podrían dar cuenta de estos resultados que a primera vista parecen ser contradictorios:

- 1- Sobre la base de la hipótesis planteada en el capítulo III, es posible que existan al menos dos isoformas de TIPs, una regulada por pH y otra insensible a pH. Los clones pDCTIP3 y pDCTIP12 pertenecerían entonces al grupo de las acuaporinas no inhibidas por pH. Podría ocurrir que la isoforma sensible a la acidificación esté expresada en muy baja proporción en la raíz de *Beta vulgaris* lo que explicaría el hecho de que no haya sido posible clonarla con la estrategia utilizada (Materiales y métodos, sección 4.2.1). La sensibilidad podría darse por la presencia de un residuo His o de otro aminoácido capaz de sensor la concentración de protones (Tabla III).
- 2- El efecto del pH podría no ocurrir directamente sobre la acuaporina sino de modo indirecto. Es posible que el sensado de los cambios de pH que llevan a la inhibición del transporte de agua tanto en la vacuola aislada como en las vesículas

de tonoplasto, este dado por *otra* proteína de membrana, diferente de la acuaporina, pero que regule su actividad, con lo cual el cierre del canal de agua sería mediado y no directo. Si este fuera el caso, al realizar los experimentos en ovocitos solo se estarían expresando las TIP estudiadas y faltaría el entorno proteico "natural" para que la actividad de las TIPs pueda ser regulada. Por ejemplo está descrito que la α -TIP de *Phaseolus Vulgaris* es fosforilada por una CDPK unida al tonoplasto (Johnson y Chrispeels, 1992).

En el caso de las PIPs, se muestra una regulación por pH que no es mediada sino directa sobre el canal. La actividad de los homólogos PIP2 estudiados y PIP1;2 fue selectiva y significativamente inhibida con NaAc pH 6, que equivale al pH citoplasmático. Nuestros resultados sugieren que la mayoría de las PIPs de *Arabidopsis thaliana* son específicamente bloqueadas por la acidificación intracelular. Esto implica que las acuaporinas de membrana plasmática en esta especie tienen una estructura básica conservada para el sensado del pH citosólico. El pK obtenido en la curva de P_f en función del pH y el hecho de que la inhibición se produjera del lado intracelular sugirieron que la protonación de una histidina expuesta citosólicamente estaría involucrada. Las PIPs poseen tres histidinas orientadas hacia el citosol de las cuales solo dos son específicas, la histidina 197 y la 264 (Figura 37 b). Decidimos entonces mutar estas posiciones cambiando la histidina por diferentes aminoácidos que pudieran simular las distintas condiciones de pH. Una mutación en la posición 264 no tuvo efecto significativo en la actividad ni sensibilidad al pH de PIP2;2 confirmando que la histidina de esta posición no es

la responsable de sensar el pH citosólico y no está involucrada en este efecto. La acuaporina mutante con la sustitución de la His197 por una alanina mostró un bloqueo mucho menos pronunciado por la acidificación citoplasmática. La mutante H197D, la cual lleva una carga negativa en la misma posición, exhibió una actividad insensible al pH constitutivamente alta. Más aún la sustitución de la histidina 197 por un residuo de lisina (H197K) confirió una baja actividad totalmente insensible al pH asumiendo que la introducción de una carga positiva podría imitar el estado protonado de la histidina 197 a pH 6. El efecto de las mutaciones puntuales y/o sustitución de cargas establecen a la His197 de PIP₂ como el principal sitio de sensado del pH citosólico con participación de otros residuos cercanos , R194 y D195.

Con todo lo expuesto hasta aquí, se puede decir que la regulación por pH de la permeabilidad al agua es un fenómeno complejo y no homologable a todas las acuaporinas. Nuestros resultados sugieren que en PIP, un residuo histidina específico en el *loop* D citosólico en conjunto con residuos polares cercanos determinan la apertura y cierre de los canales de agua ante la acidificación del pH citosólico. En las TIPs en cambio, no está tan claro como sería el sensado de los cambios de pH que llevan al cierre del canal. O bien existe un mecanismo de regulación indirecto, o existen dos poblaciones de TIPs, de las cuales aun las sensibles a pH no han sido clonadas.

CAPITULO V

Conclusiones y perspectivas futuras

5.1 Conclusiones generales

Cuando comenzó la ejecución del plan de trabajo de la presente tesis doctoral, el panorama internacional marcaba un fuerte debate en el que se cuestionaba si el descubrimiento de las acuaporinas replanteaba o no el papel de la vía celular en el movimiento de agua en las plantas. Las observaciones indicaban que los patrones de expresión de las acuaporinas eran altos y su presencia era relevante en las dos membranas más importantes, la plasmática y la del tonoplasto. Sin embargo para ese entonces eran muy pocos los estudios de funcionalidad y menos aun se sabía cuáles eran los mecanismos de regulación de estas proteínas. Los fisiólogos más tradicionales se apoyaban en la transpiración y la menor resistencia de la vía apoplástica para minimizar los argumentos a favor de un posible papel más fuerte de las membranas biológicas.

El presente trabajo de tesis aporta evidencias que permiten fundamentalmente a) replantear el papel de la vía celular en el transporte de agua, y b) entender cómo el pH está involucrado en la regulación de las acuaporinas, modificando su actividad.

Nuestros resultados muestran la presencia de acuaporinas funcionales con alta permeabilidad en la membrana del tonoplasto del parénquima de reserva de la raíz de remolacha (*Beta vulgaris*) lo que implica una baja resistencia al movimiento de agua por la vía célula a célula. Asimismo, también se describe por primera vez que la acidificación citoplasmática es un importante mecanismo regulatorio que opera aumentando la resistencia al pasaje de agua, afectando el movimiento de agua en la vía celular.

En particular pudimos realizar las siguientes observaciones:

- ✓ *Vacuolas aisladas del parénquima de remolacha muestran una respuesta de cambio de volumen dependiente de las condiciones en que se somete al gradiente hiposmótico.* Empleando dos técnicas complementarias (mediciones a tiempos largos y cortos) pudimos estudiar el cambio de volumen en vacuolas individualizadas a través de videomicroscopía. Para el mismo *shock* osmótico el volumen final alcanzado es diferente de acuerdo a la velocidad con la cual se expone el gradiente, siendo menor en el caso de perfusión continua. Estos resultados indican que la forma de aplicar el gradiente influye sobre la respuesta de las vacuolas ante el gradiente hiposmótico, lo que podría ser una respuesta adaptativa para prevenir un aumento de volumen excesivo durante el *shock* osmótico.

- ✓ *La acidificación del medio disminuye el movimiento de agua y solutos en vacuolas aisladas.* Las vacuolas aisladas mostraron una respuesta osmótica que fue reversiblemente inhibida por compuestos mercuriales, lo que en principio nos sugirió que los movimientos de agua observados

se daban mayoritariamente a través de acuaporinas. La inhibición total del cambio de volumen por efecto del mercurio o del pH, que sufren las vacuolas a largo plazo (estado estacionario) da cuenta de que además de la participación de proteínas específicas para el paso de agua podría existir algún otro mecanismo compensatorio del volumen. Probablemente vinculado a la síntesis o degradación de osmolitos o redistribución de determinados iones.

- ✓ *La obtención de una fracción enriquecida de vesículas de tonoplasto permitió realizar estudios a nivel subcelular.* El trabajar con vesículas de tonoplasto permitió investigar cómo se comporta la membrana independientemente de factores citoplasmáticos solubles que puedan ser necesarios en determinados procesos metabólicos o mecanismos de regulación. Utilizando técnicas de mezclado más rápido pudimos hacer una caracterización biofísica del transporte de agua e identificar en la preparación isoformas TIPs.

- ✓ *En el tonoplasto del parénquima de remolacha hay acuaporinas funcionales.* Tanto con vacuolas aisladas (medición a corto plazo) como con vesículas de membrana pudimos calcular el coeficiente de permeabilidad osmótica (P_f). En ambos casos obtuvimos porcentajes similares de inhibición por mercurio, reversibilidad de este efecto por β -mercaptoetanol, que junto con el bajo valor de energía de activación confirman funcionalmente la presencia de acuaporinas activas.

- ✓ *La acidificación del medio inhibe el transporte de agua en vesículas de tonoplasto.* Describimos una importante inhibición del P_f por la acidificación externa, la cual se corresponde con el lado citoplasmático, que al igual que en vacuolas aisladas fue aproximadamente de 45%-55%. Esto podría deberse a que existe una cierta proporción de acuaporinas que no responden al pH y que habría más de una isoforma, una de las cuales podría ser sensible a pH.

- ✓ *Isoformas de TIP de Beta vulgaris no mostraron sensibilidad al pH.* Cuando expresamos los clones pDCTIP3 y pDCTIP12 de *Beta vulgaris* en ovocitos de *Xenopus*, no observamos efecto del pH interno ni externo. Probablemente esto se deba a que estos clones no son regulados directamente por la acidificación del medio. La diferencia encontrada en cuanto al efecto de pH entre vacuolas, vesículas y ovocitos podrían deberse a dos posibilidades: 1) que los clones de remolacha ensayados en ovocitos correspondan a la isoforma insensible, y que la inhibición observada en vacuola o vesículas se deba a la presencia de otra isoforma sensible a pH y que entonces la acidificación produzca un efecto directo sobre la proteína o 2) que el efecto del pH sea indirecto y sea necesaria alguna otra proteína que actúe sobre el canal de agua presente únicamente en la membrana vegetal.

- ✓ *Las PIP de Arabidopsis thaliana sensan el pH citosólico en forma directa.* En las PIPs de *Arabidopsis thaliana*, se observó una fuerte inhibición al pH citoplasmático e insensibilidad al pH externo, lo que permitió postular que estas acuaporinas sensan solo los cambios de pH citoplasmático.

Este bloqueo por pH es mucho más conservado que en el caso de las TIPs ya que todas los clones probados mostraron inhibición al producirse acidificación del medio intracelular. Se describió por primera vez el sensor involucrado en la regulación por pH citoplasmático de una acuaporina. Estudios de mutagénesis puntual permitieron establecer que un residuo histidina en el *loop* D citosólico en conjunto con residuos polares cercanos determinan la apertura y cierre de los canales de agua ante la acidificación del pH citosólico.

Estas observaciones abren una nueva perspectiva en la regulación de la permeabilidad al agua a nivel del tonoplasto y de la membrana plasmática. Dado que las vacuolas ocupan la mayoría del volumen celular (Marty, 1999) el citoplasma queda reducido a una fracción mínima por lo cual puede ser sometido a cambios importantes y rápidos de volumen que pueden ir en detrimento del metabolismo celular. Varios experimentos *in vitro* han sugerido que la permeabilidad al agua del tonoplasto es mayor que la de la membrana plasmática (Maurel et al., 1997; Niemietz and Tyerman, 1997). Se propuso entonces que la alta permeabilidad del tonoplasto podría ayudar a minimizar las fluctuaciones del volumen del citoplasma a corto plazo evitando daños estructurales o metabólicos (Tyerman *et al.*, 1999). Por lo tanto, la regulación de las acuaporinas puede ser uno de los mecanismos para un óptimo balance de agua. En particular, la inhibición coordinada de las acuaporinas de membrana plasmática por acidosis citoplasmática provee un mecanismo que resulta en la inhibición del transporte de agua de la raíz como se observó en mediciones de conductividad hidráulica (Birner y Steudle, 1993).

Ahora bien, si todas las PIPs se inhibieran en caso de acidificación citoplasmática, ¿deberían las TIPs permanecer abiertas (es decir, ser insensibles al pH)? En estas condiciones, con las TIPs activas, la vacuola tendría una gran capacidad de amortiguar los cambios de volumen citoplasmático. Sin embargo, nosotros postulamos que esta eficiencia sería aun mayor para la redistribución simplástica del agua si una fracción de TIPs *fuera* sensible al pH. En este modelo (Figura 43) esta sintonía entre ambas acuaporinas permitiría un balance de agua y redistribución dentro y entre las células a través de los plasmodesmos (vía simplástica).

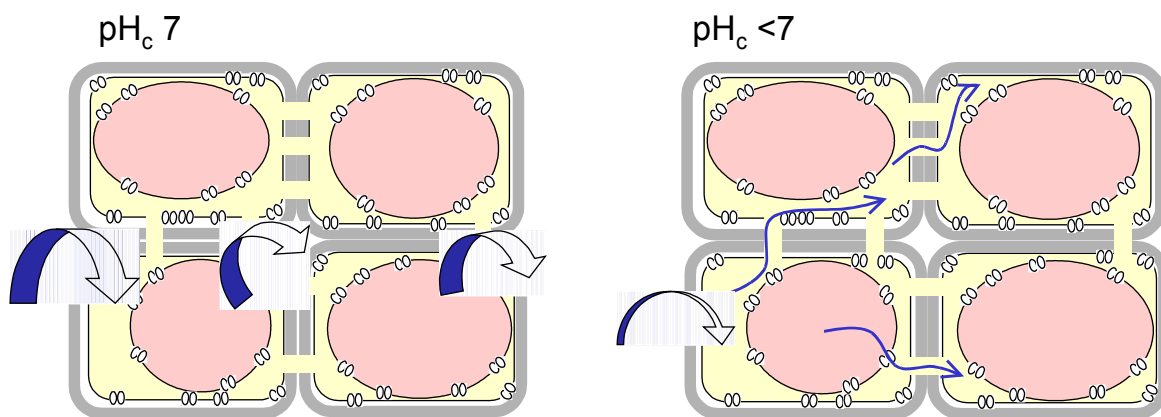


Figura 43: Modelo de redistribución simplástica del agua frente a la acidificación citoplasmática

En condiciones en las que el pH citoplasmático se encuentra dentro del rango fisiológico, las acuaporinas (tanto PIPs como TIPs) facilitan el pasaje de agua a través de la membrana (representado por flechas grandes). En condiciones de acidificación citoplasmática, la mayoría de las PIPs se bloquean (representada por una flecha delgada, indicando más resistencia al pasaje de agua) y entonces prevalece la situación de redistribución de agua en el interior de las células. De esta reorganización dependerá la relación entre la vacuola, el citoplasma y los plasmodesmos y cuánta resistencia ofrezca cada una de estas barreras al pasaje de agua. El hecho de que las TIPs se bloqueen parcialmente por la acidificación favorece la redistribución de agua vía plasmodesmos.

5.2 Perspectivas futuras

No es sino con la comprensión del movimiento de agua en las células y los mecanismos encargados de su regulación que se podrán plantear estrategias a futuro para introducir el mejoramiento vegetal en las condiciones en las que el agua resulta factor limitante. Las preguntas que surgen son ¿es esto posible? ¿Cuan lejos estamos? A manera de ejemplo, podemos citar que recientemente Aharon y colaboradores (2003) lograron plantas de tabaco con mayor crecimiento vegetativo, mayor tasa de transpiración, densidad estomática y eficiencia fotosintética con la sobreexpresión de la PIP2;1. Por otra parte, utilizando la técnica interferencia de ARN, Ma y colaboradores (2004) observaron que al reducir la presencia de TIP1;1 en plantas de *Arabidopsis thaliana* no se afecta la viabilidad (de acuerdo al grado de reducción de esta acuaporina) sino que la falta de esta acuaporina podría perturbar seriamente los mecanismos de metabolismo del carbono. Estos hallazgos incluso replantean, junto a otros trabajos (Hill *et al.*, 2004) que las acuaporinas pueden cumplir funciones que van mucho más allá del papel asignado de canal de agua.

Hasta hace poco se pensaba que era imposible alcanzar objetivos de esta clase manipulando un único gen, dada la complejidad del mecanismo. Estas nuevas evidencias y los estudios a futuro que se encaren para establecer el papel de las TIPs y las PIPs permitirá acercarse a la comprensión de los procesos directamente asociados con la capacidad de una planta al manejo de los recursos hídricos.

BIBLIOGRAFIA

Agre P, Sasaki S, Chrispeels MJ. 1993 Aquaporins: a family of water channel proteins. *Am. J. Physiol.* 265(3 Pt 2):F461

Aharon R, Shahak Y, Winer S, Bendov R, Kapulnik Y, Galili G. (2003) Overexpression of a plasma membrane aquaporin in transgenic tobacco improves plant vigor under favorable growth conditions but not under drought or salt stress. *Plant Cell* 15(2):439-447

Alleva K, Niemietz CM, Sutka M, Dorr R, Maurel C, Parisi M, Tyerman SD, Amodeo G. (2004). Plasma membrane vesicles of *Beta vulgaris* storage root show very high water permeability that is shut down by pH and calcium. 13th International Workshop on Plant Membrane Biology, Place Pierre Viala, Montpellier, France, July 06 – 10.

Amodeo G, Dorr R, Vallejo A, Sutka M, Parisi M. (1999) Radial and axial water transport in sugar beet storage root. *J. Exp. Bot.* 50(333):509-516

Arabidopsis genome Initiative. (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408:796-815

Aroca R, Amodeo G, Fernandez-Illescas S, Herman EM, Chaumont F, Chrispeels MJ. (2005) The role of aquaporins and membrane damage in chilling and hydrogen peroxide induced changes in the hydraulic conductance of maize roots. *Plant Physiol.* 137(1):341-353

Azaizeh H, Gunse B, Steudle E. (1992) Effects of NaCl and CaCl₂ on water transport across root cells of maize (*Zea mays* L.) seedlings. *Plant Physiol.* 99:886-894

Bacon JSD, MacDonald IR, Knight AH. (1965) The development of invertase activity in slices of root of *Beta vulgaris* L. Washed under aseptic conditions. *Biochem. J.* 94:175

Baiges I, Schaffner AR, Affenzeller MJ, Mas A. (2002) Plant aquaporins. *Physiol. Plant.* 115(2):175-182

Barkla BJ, Vera-Estrella R, Pantoja O, Kirch HH, Bonhert HJ. (1999) Aquaporin localization—how valid are the TIP and PIP labels? *Trends Plant Sci.* 4(3):86-88

Biber J, Malmstrom K, Scalera V, Murer H. (1983) Phosphorylation of rat kidney proximal tubular brush border membranes. Role of c-AMP dependent protein phosphorylation in the regulation of phosphate transport. *Pflugers Arch.* 398(3):221-226

- Biela A, Grote K, Otto B, Hoth S, Hedrich R, Kaldenhoff R.** (1999) The *Nicotiana tabacum* plasma membrane aquaporin NtAQP1 is mercury-insensitive and permeable for glycerol. *Plant J* 18(5):565-570
- Birner TP, Steudle E.** (1993) Effects of anaerobic conditions on water and solute relations, and on active transport in roots of maize (*Zea mays* L.) *Planta* 190:474-483
- Blatt MR.** (1991) Ion channel gating in plants: physiological implications and integration for stomatal function. *J. Membr. Biol.* 124(2):95-112
- Blumwald E.** (2000) Sodium transport and salt tolerance in plants. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12(4):431-4
- Blumwald E, Poole RJ.** (1985) Na⁺/H⁺ antiport in isolated tonoplast vesicles from storage tissue of *Beta vulgaris*. *Plant Physiol* 78:163-167
- Bohnert HJ, Nelson DE, Jensen RG.** (1995) Adaptations to environmental stresses. *Plant Cell* 7:1099-1111
- Boyer JS.** (1985) Water transport. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 36:473-516
- Bradford M.** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254
- Briskin DP, Leonard RT, Hodges TK.** (1987) Isolation of the plasma membrane: membrane markers and general principles. *Methods Enzymol.* 148:543-568
- Calamita G, Bishai WR, Preston GM, Guggino WB, Agre P.** (1995) Molecular cloning and characterization of AqpZ, a water channel from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 270(49):29063-29066
- Cao Y, Anderova M, Crawford NM, Schroeder JI.** (1992) Expression of an outward-rectifying potassium channel from maize mRNA and complementary RNA in *Xenopus* oocytes. *Plant Cell* 4(8):961-969
- Capurro C, Amodeo G, Dorr R, Parisi M.** (2004) Las acuaporinas y los movimientos de agua en los seres vivos. *Ciencia Hoy* 14(83):40-47
- Carvajal M, Cerdá A, Martínez V.** (2000) Does calcium ameliorate the negative effect of NaCl on melon root water transport by regulating aquaporin activity?. *New Phytol.* 145:439-447

Carvajal M, Cooke DT, Clarkson DT. (1996) Responses of wheat plants to nutrient deprivation may involve the regulation of water-channels function. *Planta* 199:372-381

Cass A, Finkelstein A. (1967) Water permeability of thin lipid membranes. *J. Gen. Physiol.* 50:1765-1784

Chanchevalap S, Yang Z, Cui N, Qu Z, Zhu G, Liu C, Giwa LR, Abdulkadir L, Jiang C. (2000) Involvement of histidine residues in proton sensing of ROMK1 channel. *J. Biol. Chem.* 275(11):7811-7817

Chaumont F, Barrieu F, Jung R, Chrispeels MJ. (2000) Plasma membrane intrinsic proteins from maize cluster in two sequence subgroups with differential aquaporin activity. *Plant Physiol.* 122(4):1025-1034

Chrispeels MJ. (1991) Sorting of protein in the secretory system. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42:21-53

Clarkson DT, Carvajal M, Henzler T, Waterhouse RN, Smyth AJ, Cooke DT and Steudle E. (2000) Root hydraulic conductance: diurnal aquaporin expression and the effects of nutrient stress *Journal Experimental Botany* 51(342): 61-70

Conkling MA, Cheng C, Yamamoto YT, Goodman HM. (1990) Isolation of transcriptionally regulated root-specific genes from tobacco. *Plant Physiol.* 93:1203-1211

Cutler SR, Ehrhardt DW, Griffitts JS, Somerville CR. (2000) Random GFP::cDNA fusions enable visualization of subcellular structures in cells of *Arabidopsis* at a high frequency. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97(7):3718-3723

Czempinski K, Gaedeke N, Zimmermann S, Müller-Röber B. (1999) Molecular mechanism and regulation of plant ion channel. *J. Exp. Bot.* 50:955-966

Dainty J. (1963) Water relations of plant cells *Adv. Bot. Res.* 1:279-326

Daniels MJ, Chaumont F, Mirkov TE, Chrispeels MJ. (1996) Characterization of a new vacuolar membrane aquaporin sensitive to mercury at a unique site. *Plant Cell* 8:587-599

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

Deepesh N De, (2000) *Plant Cell Vacuoles An introduction.* CSIRO PUBLISHING pp:163-248

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

Dorr R, Kierbel A, Vera J, Parisi M. (1997) A new data-acquisition system for the measurement of the net water flux across epithelia. *Comput. Meth. Prog. Bio.* 53:9-14

Ersek T, Kiraly Z. (1986) Phytoalexins: warding off compounds in plants? *Physiol. Plant.* 68:343-351

Fakler B, Schultz JH, Yang J, Schulte U, Brandle U, Zenner HP, Jan LY, Ruppertsberg JP. (1996) Identification of a titratable lysine residue that determines sensitivity of kidney potassium channels (ROMK) to intracellular pH. *EMBO J.* 15(16):4093-4099

Felle HH. (2001) pH: signal and messenger in plant cells. *Plant Biol.* 3:577-591

Fetter K, Van Wilder V, Moshelion M, Chaumont F. (2004) Interactions between plasma membrane aquaporins modulate their water channel activity. *Plant Cell* 16(1):215-228

Finkelstein A. (1987) Distinguished Lecture Series of the Society of General Physiologists, Vol 4, A Wiley-Interscience Publication, New York, pp.32-41

Fiske CH, Subbarow Y. (1925) Colorimetric determination of phosphorous. *J. Biol. Chem.* 66:375-400

Ford, P, Merot J, Jawerbaum A, Gimeno MAF, Capurro C, Parisi M. (2000) Water permeability in rat oocytes at different maturity stages: aquaporin-9 expression. *J Membr. Biol.* 176:151-158

Fortin MG, Morrison NA, Verma DP. (1987) Nodulin-26, a peribacteroid membrane nodulin is expressed independently of the development of the peribacteroid compartment. *Nucleic Acids Res.* 15(2):813-24.

Fotiadis D, Suda K, Tittmann P, Jenö P, Philippsen A, Müller DJ, Gross H, Engel A. (2001) Identification and structure of a putative Ca²⁺-binding domain at the C terminus of AQP1. *J. Mol. Biol.* 318(5):1381-1394

Fray RG, Wallace A, Grierson D, Lycett W. (1994) Nucleotide sequence and expression of a ripening and water stress-related cDNA from tomato with homology to the MIP class of membrane channel protein. *Plant Mol. Biol.* 24:539-543

Gerbeau P, Guclu J, Ripoche P, Maurel C. (1999) Aquaporin Nt-TIPa can account for the high permeability of tobacco cell vacuolar membrane to small neutral solutes. *Plant J.* 18(6): 577-587

Gerbeau P, Amodeo G, Henzler T, Santoni V, Ripoche P, Maurel C. (2002) The water permeability of Arabidopsis plasma membrane is regulated by divalent cations and pH. *Plant J.* 30(1):71-81

Gerendás J, Zhu Z, Sattelmacher B. (1998) influence of N and Ni supply on urease activity in rice. *J. Exp. Bot.* 49:1545-1554

Giannini JL, Holt JS, Briskin DP. (1990) The effect of gyceollin on proton leakage in *Phytophthora megasperma* f.sp. *glycinea* plasma membrane and red beet tonoplast vesicles. *Plant Sci.* 68:39-45

Guerrero FD, Jones JT, Mullet JE. (1990) Turgor-responsive gene transcription and RNA levels increase rapidly when pea shoots are wilted. Sequence and expression of three inducible genes. *Plant Mol. Biol.* 15(1):11-26

Gurdon JB, Lane CD, Woodland HR, Marbaix G. (1971) Use of frog eggs and oocytes for the study of messenger RNA and its translation in living cells. *Nature* 233:177-182

Gustafson CE, Levine S, Katsura T, McLaughlin M, Aleixo MD, Tamarappoo BK, Verkman AS, Brown D. (1998) Vasopressin regulated trafficking of a green fluorescent protein-aquaporin 2 chimera in LLC-PK1 cells. *Histochem. Cell Biol.* 110(4):377-386

Hine JC, Sprent JI. (1988) Growth of *Phaseolus vulgaris* on various nitrogen sources: the importance of urease. *J. Exp. Bot.* 39:1505-1512

Henzler T, Waterhouse RN, Smyth AJ, Carvajal M, Cooke DT, Schäffner AR, Steudle E, Clarkson DT. (1999) Diurnal variations in hydraulic conductivity and root pressure can be correlated with the expression of putative aquaporins in the roots *Lotus japonicus*. *Planta* 210:50-60

Heymann JB, Engel A. (1999) Aquaporins: Phylogeny, Structure, and Physiology of Water Channels. *News Physiol. Sci.* 14:187-193

Higuchi T, Suga S, Tsuchiya T, Hisada H, Morishima S, Okada Y, Maeshima M. (1998) Molecular cloning, water channel activity and tissue specific expression of two isoforms of radish vacuolar aquaporin. *Plant Cell Physiol.* 39(9):905-913

Hill AE, Shachar-Hill B, Shachar-Hill Y. (2004) What are aquaporins for? *J. Membr. Biol.* 197(1):1-32

Hoh B, Hinz G, Jeong BK, Robinson DG. (1995) Protein storage vacuoles form de novo during pea cotyledon development. *J. Cell Sci.* 108(Pt 1):299-310

Hoth S, Dreyer I, Dietrich P, Becker D, Muller-Rober B, Hedrich R. (1997) Molecular basis of plant-specific acid activation of K⁺ uptake channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94(9):4806-4810

Ishibashi K, Kuwahara M, Gu Y, Tanaka Y, Marumo F, Sasaki S. (1998) Cloning and functional expression of a new aquaporin (AQP9) abundantly expressed in the peripheral leukocytes permeable to water and urea, but not to glycerol. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 244(1):268-274

Ishibashi K, Sasaki S, Fushimi K, Uchida S, Kuwahara M, Saito H, Furukawa T, Nakajima K, Yamaguchi Y, Gojobori T. (1994) Molecular cloning and expression of a member of the aquaporin family with permeability to glycerol and urea in addition to water expressed at the basolateral membrane of kidney collecting duct cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91(14):6269-6273

Jang JY, Kim DG, Kim YO, Kim JS, Kang H. (2004) An expression analysis of a gene family encoding plasma membrane aquaporins in response to abiotic stresses in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* 54(5):713-725

Jauh GY, Fischer AM, Grimes HD, Ryan CA Jr, Rogers JC. (1998) delta-Tonoplast intrinsic protein defines unique plant vacuole functions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95(22):12995-12999

Jauh GY, Phillips TE, Rogers JC. (1999) Tonoplast intrinsic protein isoforms as markers for vacuolar functions. *Plant Cell* 11(10):1867-1882

Javot H, Lauvergeat V, Santoni V, Martin-Laurent F, Guclu J, Vinh J, Heyes J, Franck KI, Schaffner AR, Bouchez D, Maurel C. (2003) Role of a single aquaporin isoform in root water uptake. *Plant Cell* 15(2):509-522

Javot H, Maurel C. (2002) The role of aquaporins in root water uptake. *Ann. Bot. (Lond)* 90(3):301-313

Jensen WA, Salisbury FB. (1988) *Botánica. Segunda Edición, McGRAW-HILL, México*, pp. 196 , 211

Johanson U, Karlsson M, Johansson I, Gustavsson S, Sjovald S, Fraysse L, Weig AR, Kjellbom P. (2001) 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.* 126(4):1358-1369

Johansson I, Karlsson M, Shukla VK, Chrispeels MJ, Larsson C, Kjellbom P. (1998) Water transport activity of the plasma membrane aquaporin PM28A is regulated by phosphorylation. *Plant Cell* 10:451-459

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

Johnson KD, Herman EM, Chrispeels MJ. (1989) An abundant, highly conserved tonoplast protein in seeds *Plant Physiol.* 91:1006-1013

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

Jung JS, Preston GM, Smith BL, Guggino WB, Agre P. (1994) Molecular structure of the water channel through aquaporin CHIP. The hourglass model. *J. Biol. Chem.* 269(20):14648-14654

Kaldenhoff R, Kolling A, Richter G. (1993) A novel blue light- and abscisic acid-inducible gene of *Arabidopsis thaliana* encoding an intrinsic membrane protein. *Plant Mol. Biol.* 23(6):1187-98

Karlsson M, Johansson I, Bush M, McCann MC, Maurel C, Larsson C, Kjellbom P. (2000) An abundant spinach TIP expressed in mature, highly vacuolated cells. *Plant J.* 21(1): 83-90

Katsuhara M, Akiyama Y, Koshio K, Shibasaka M, Kasamo K. (2002) Functional analysis of water channels in barley roots. *Plant Cell Physiol.* 43(8):885-893

Katsuhara M, Kutchitsu K, Takeshige K, Tazawa M. (1989) Salt stressed induced cytoplasmic acidification and vacuolar alkalization in *Nitellopsis obtusa* cells. *Plant Physiol.* 90:1102-1107

Kirch HH, Vera-Estrella R, Gollmack D, Quigley F, Michalowski CB, Barkla BJ, Bohnert HJ. (2000) Expression of water channel protein in *Mesembryanthemum crystallinum*. *Plant Physiol.* 126:111-124

Klebl F, Wolf M, Sauer N. (2003) A defect in the yeast plasma membrane urea transporter Dur3p is complemented by CpNIP1, a Nod26-like protein from zucchini (*Cucurbita pepo* L.), and by *Arabidopsis thaliana* delta-TIP or gamma-TIP. *FEBS Lett.* 547(1-3):69-74

Koefoed-Johnsen V, Ussing HH. (1953) The contributions of diffusion and flow to the passage of D_2O through living membranes. Effect of neurohypophyseal hormone on isolated anuran skin. *Acta Physiol. Scand.* 28:60-76

- Krajinski F, Biela A, Schubert D, Gianinazzi-Pearson V, Kaldenhoff R, Franken P.** (2000) Arbuscular mycorrhiza development regulates the mRNA abundance of Mtaqp1 encoding a mercury-insensitive aquaporin of *Medicago truncatula*. *Planta* 211(1):85-90
- Laemmlí UK.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. *Nature* 227(259):680-685
- Laize V, Gobin R, Rousselet G, Badier C, Hohmann S, Ripoche P, Tacnet F.** (1999) Molecular and functional study of AQY1 from *Saccharomyces cerevisiae*: role of the C-terminal domain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 257(1):139-144
- Larsson C, Sommarin M, Widell S.** (1994) Isolation of highly purified plant plasma membranes and separation of inside-out and right-side-out vesicles. *Methods Enzymol.* 228:451-469
- Le Caherec F, Bron P, Verbavatz JM, Garret A, Morel G, Cavalier A, Bonnac G, Thomas D, Gouranton J, Hubert JF.** (1996) Incorporation of proteins into (*Xenopus*) oocytes by proteoliposome microinjection: functional characterization of a novel aquaporin. *J. Cell Sci.* 109 (Pt 6):1285-1295
- Leigh RA, Branton D.** (1976) Isolation of vacuoles from root storage tissue of *Beta vulgaris* L. *Plant Physiol.* 58:656-662
- Leigh RA, Rees T, Fuller WA, Banfield J.** (1979) The location of acid invertase activity and sucrose in the vacuoles of storage roots of beetroot (*Beta vulgaris*). *Biochem. J.* 178(3):539-547
- Leigh RA, Walker RR.** (1980) ATPase and acid phosphatase activities associated with vacuoles from storage root of red beet (*Beta vulgaris* L.). *Planta* 150:222-229
- Li L, Li S, Tao Y, Kitagawa Y.** (2000) Molecular cloning of a novel water channel from rice: its products expression in *Xenopus* oocytes and involvement in chilling tolerance. *Plant Sci.* 154(1):43-51
- Liu LH, Ludewig U, Frommer WB, von Wieren N.** (2003) AtDUR3 encodes a new type of high-affinity urea/H⁺ symporter in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 15(3):790-800
- Ludevid D, Hofte H, Himmelblau E, Chrispeels M.** (1992) The expression pattern of the tonoplast intrinsic protein γ -TIP in *Arabidopsis thaliana* is correlated with cell enlargement. *Plant Physiol.* 100:1633-1639
- Luu DT, Maurel C.** (2005) Aquaporins in a challenging environment: molecular gears for adjusting plant water status. *Plant Cell Environ.* 28:85-96

- Ma S, Quist TM, Ulanov A, Joly R, Bohnert HJ.** (2004) Loss of TIP1;1 in Arabidopsis leads to cell and plant death. *Plant J.* 40:845-859
- Macey RI.** (1984) Transport of water and urea in red blood cells. *Am. J. Physiol.* 246(3 Pt 1):C195-203
- Maggio A, Joly RJ.** (1995) Effects of Mercuric Chloride on the Hydraulic Conductivity of Tomato Root Systems (Evidence for a Channel-Mediated Water Pathway). *Plant Physiol.* 109(1):331-335
- Marschner H.** (1995) Mineral nutrition of higher plants. London: Academic press. Pp,889
- Marty F.** (1999) Plant vacuoles. *Plant Cell* 11(4):587-600
- Marty-Mazars D, Clémencet MC, Dozolme P, Marty F.** (1995) Antibodies to the tonoplast from storage parenchyma cells of beetroot recognize a major intrinsic protein related to TIPs. *Eur. J. Cell Biol.* 66:106-118
- Maurel C, Kado RT, Guern J, Chrispeels MJ.** (1995) Phosphorylation regulates the water channel activity of the seed-specific aquaporin α -TIP. *EMBO J.* 14(13):3028-3035
- Maurel C, Reizer J, Schroeder JI, Chrispeels MJ.** (1993) The vacuolar membrane protein γ -TIP creates water specific channels in Xenopus oocytes. *EMBO J.* 12(6):2241-2247
- Maurel C, Tacnet F, Guclu J, Guern J, Ripoche P.** (1997) Purified vesicles of tobacco cell vacuolar and plasma membranes exhibit dramatically different water permeability and water channel activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94(13):7103-7108
- Merloy DL, Herman EM.** (1991) TIP, an integral membrane protein of the protein-storage vacuoles of the soybean cotyledon undergoes developmentally regulated membrane accumulation and removal. *Planta* 184:113-122
- Miao GH, Hong Z, Verma DP.** (1992) Topology and phosphorylation of soybean nodulin-26, an intrinsic protein of the peribacteroid membrane. *J. Cell Biol.* 118(2):481-490
- Morillon R, Lassalles JP.** (1999) Osmotic water permeability of isolated vacuoles. *Planta* 210:80-84
- Moriyasu Y, Hattori M, Jauh GY, Rogers JC.** (2003) Alpha tonoplast intrinsic protein is specifically associated with vacuole membrane involved in an autophagic process. *Plant Cell Physiol.* 44(8):795-802

Moshelion M, Becker D, Biela A, Uehlein N, Hedrich R, Otto B, Levi H, Moran N, Kaldenhoff R. (2002) Plasma membrane aquaporins in the motor cells of *Samanea saman*: diurnal and circadian regulation. *Plant Cell* 14(3):727-739

Murata K, Mitsuoka K, Hirai T, Walz T, Agre P, Heymann JB, Engel A, Fujiyoshi Y. (2000) Structural determinants of water permeation through aquaporin-1. *Nature* 407(6804):599-605

Németh-Cahalan K, Hall JE. (2000) pH and calcium regulates the water permeability of aquaporin 0. *J. Biol. Chem.* 275(10):6777-6782

Niemietz CM, Tyerman SD. (1997) Characterization of water channels in wheat root membrane vesicles. *Plant Physiol.* 115:561-567

Niemietz CM, Tyerman SD. (2002) New potent inhibitors of aquaporins: silver and gold compounds inhibit aquaporins of plant and human origin. *FEBS Lett.* 531(3):443-447

Ohshima Y, Iwasaki I, Suga S, Murakami M, Inoue K, Maeshima M. (2001) Low aquaporin content and low osmotic water permeability of the plasma and vacuolar membranes of a CAM plant *Graptopetalum paraguayense*: comparison with radish. *Plant Cell Physiol.* 42(10):1119-1129

Park JH, Saier MH. (1996) Phylogenetic characterization of the MIP family of transmembrane channel proteins. *J. Membr. Biol.* 153(3):171-180

Paris N, Stanley CM, Jones RL, Rogers JC. (1996) Plant cells contain two functionally distinct vacuolar compartments. *Cell* 85:563-572

Parisi M, Bourguet J. (1985) Water channels in animal cells: a widespread structure?. *Biol. Cell* 55:155-158

Parisi M, Piccinni ZF. (1973) The penetration of water into the epithelium of toad urinary bladder and its modification by oxytocin. *J. Membr. Biol.* 12:227-246

Parisi M, Wietzerbin J, Bourguet J. (1983) Intracellular pH, transepithelial pH gradients and ADH-induced water channels. *Am. J. Physiol.* 244: F712-718

Parisi M, Bourguet J. (1984) Effects of cellular acidification on ADH-induced intramembrane particle aggregates. *Am. J. Physiol.* 246:C157-159

Parisi M, Wietzerbin J. (1984) Cellular pH and the ADH-induced hydrosmotic response in different ADH target epithelia. *Pflügers Arch.* 402:211-215

Polacco JC, Holland MA. (1993) Roles of urease in plant cells. *Int. Rev. Cytol.* 145:63-103

Poole RJ, Brinskin DP Krátký Z, Johnstone RM. (1984) Density gradient localization of plasma membrane and tonoplast from storage tissue of growing and dormant red beet. *Plant Physiol.* 74:549-556

Preston GM, Carroll TP, Guggino WB, Agre P. (1992) Appearance of water channels in *Xenopus* oocytes expressing red cell CHIP28 protein. *Science* 256:385-387

Preston GM, Jung JS, Guggino WB, Agre P (1993) The mercury-sensitive residue at cysteine 189 in the CHIP28 water channel. *J Biol. Chem.* 268:17-20

Qu Z, Zhu G, Yang Z, Cui N, Li Y, Chanchevalap S, Sulaiman S, Haynie H, Jiang C. (1999) Identification of a critical motif responsible for gating of Kir2.3 channel by intracellular protons. *J. Biol. Chem.* 274(20):13783-13789

Rausch T. (1991) The hexose transporters at the plasma membrane and tonoplast of higher plants. *Physiol. Plant.* 82:134-142

Raven OH, Evert RF, Eichhorn SE. (2000) *Biology of the plants*, 6 edicion, by freeman and Co Worth Publishers cap 31 PP 750-771

Ray PM. (1960) On the theory of osmotic water movements. *Plant Physiol.* 35:783-795 del maurel 97 review

Reizer J, Reizer A, Saier MH Jr. (1993) 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.* 28(3):235-257

Robinson DG, Sieber H, Kammerloher W, Schöffner AR. (1996) PIP1 aquaporins are concentrated in plasmalemmasomes of *Arabidopsis thaliana* mesophyll. *Plant Physiol.* 111:645-649

Roussel H, Bruns S, Gianinazzi-Pearson V, Hahbrock K, Franken P. (1997) Induction of a membrane intrinsic protein-encoding mRNA in arbuscular mycorrhiza and elicitor stimulated cell suspension cultures of parsley. *Plant Sci.* 126:203-210

Sackin H, Nanazashvili M, Palmer LG, Krambis M, Walters DE. (2005) Structural locus of the pH gate in the Kir1.1 inward rectifier channel. *Biophys J.* 2005 Jan 14; [Epub ahead of print]

Santoni V, Gerbeau P, Javot H, Maurel C. (2000) The high diversity of aquaporins reveals novel facets of plant membrane functions. *Curr. Opin. Plant Biol.* 3:476-481

- Sarda X, Tousch D, Ferrare K, Legrand E, Dupuis JM, Casse-Delbart F, Lamaze T.** (1997) Two TIP-like genes encoding aquaporins are expressed in sunflower guard cells. *Plant J.* 12(5):1103-1111
- Sasaki S, Ishibashi K, Marumo F.** (1998) Aquaporin-2 and -3: representatives of two subgroups of the aquaporin family colocalized in the kidney collecting duct. *Annu. Rev. Physiol.* 60:199-220
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K.** (1997) Gene expression and signal transduction in water-stress response. *Plant Physiol.* 115:327-334
- Smart CM.** (1994) Gene expression during leaf senescence. *New Phytol.* 126:419-448
- Suga S, Komatsu S, Maeshima M.** (2002) Aquaporin isoforms responsive to salt and water stresses and phytohormones in radish seedlings. *Plant Cell Physiol.* 43(10):1229-1237
- Steidl JV, Yool AJ.** (1999) Differential sensitivity of voltage-gated potassium channels Kv1.5 and Kv1.2 to acidic pH and molecular identification of pH sensor. *Mol. Pharmacol.* 55(5):812-820
- Steudle E.** (1994) Water transport across roots. *Plant Soil* 167:79-90
- Steudle E.** (1997) Water transport across plant tissue: role of water channel. *Biol. Cell* 89:259-273
- Steudle E.** (2000) Water uptake by roots: effects of water deficit. *J. Exp. Bot.* 51(350):1531-1542
- Steudle E.** (2000) Water uptake by plant roots: an integration of views. *Plant Soil* 226:145-56
- Steudle E, Peterson CA.** (1998) How does water get through roots? *J. Exp. Bot.* 49:775-788
- Sze H.** (1980) Nigericin-stimulated ATP activity in microsomal vesicles of tobacco callus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77:5904-5908
- Taiz L.** (1992) The plant vacuole. *J. Exp. Biol.* 172:113-122
- Taiz L, Zeiger E.** (1998) *Plant Physiology.* Second Edition. Sinauer Associates, Inc., Publishers pp. 11-33
- Takata K, Matsuzaki T, Tajika Y.** (2004) Aquaporins: water channel proteins of the cell membrane. *Prog. Histochem. Cytochem.* 39(1):1-83
- Ting IP.** (1985) Crassulacean acid metabolism. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 36:595-622

- Towbin H, Staehelin T, Gordon J.** (1979) Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 76(9):4350-4354
- Tyerman SD, Bohnert HJ, Maurel C, Steudle E, Smith JAC.** (1999) Plant aquaporins: their molecular biology, biophysics and significance for plant water relations. J. Exp. Bot. 50:1055-1071
- Url WG.** (1971) The site of penetration resistance to water in plant protoplast. Protoplasma 72:427-447
- van Heeswijk MP, van Os CH.** (1986) Osmotic water permeabilities of brush border and basolateral membrane vesicles from rat renal cortex and small intestine. J. Membr. Biol. 92(2):183-193
- van Os CH, Deen PM, Dempster JA.** (1994) Aquaporins: water selective channels in biological membranes. Molecular structure and tissue distribution. Biochem. Biophys. Acta 1197(3):291-309
- Vera-Estrella R, Barkla BJ, Bohnert HJ, Pantoja O.** (2004) Novel regulation of aquaporins during osmotic stress. Plant Physiol. 135(4):2318-2329
- Verkman AS.** (1995) Optical methods to measure membrane transport processes. J. Membr. Biol. 148:99-110
- Vogeli-Lange R, Wagner GJ.** (1990) Subcellular localization of cadmium and cadmium binding peptides in tobacco leaves. Plant physiol. 92:1086-1093
- Wagner GJ, Siegelman HW.** (1975) Large-scale isolation of intact vacuoles and isolation of chloroplast from mature plant tissues. Science 190:1298-1299
- Wan X, Steudle E, Hartung W.** (2004) Gating of water channels (aquaporins) in cortical cells of young corn roots by mechanical stimuli (pressure pulses): effects of ABA and of HgCl₂. J. Exp Bot. 55(396):411-422
- Weaver CD, Roberts DM.** (1992) Determination of the site of phosphorylation of nodulin 26 by the calcium-dependent protein kinase from soybean nodules. Biochemistry 31(37):8954-8959
- Weeks DL, Eskandari S, Scott DR, Sachs G.** (2000) A H⁺-gated urea channel: the link between *Helicobacter pylori* urease and gastric colonization. Science 287(5452):482-485
- Wink M.** (1993) The plant vacuole: a multifunctional compartment. J. Exp. Bot. 44:231-246

Xu H, Cui N, Yang Z, Wu J, Giwa LR, Abdulkadir L, Sharma P, Jiang C. (2001) Direct activation of cloned K(atp) channels by intracellular acidosis. *J. Biol. Chem.* 276(16):12898-12902

Xu H, Wu J, Cui N, Abdulkadir L, Wang R, Mao J, Giwa LR, Chanchevalap S, Jiang C. (2001) Distinct histidine residues control the acid-induced activation and inhibition of the cloned K(ATP) channel. *J. Biol. Chem.* 276(42):38690-38696

Yasui M, Hazama A, Kwon TH, Nielsen S, Guggino WB, Agre P. (1999) Rapid gating and anion permeability of an intracellular aquaporin. *Nature* 402:184-186

Ye RG, Verkman AS. (1989) Simultaneous optical measurement of osmotic and diffusional water permeability in cells and liposomes. *Biochemistry* 28(2):824-829

Zadunaisky JA, Parisi M, Montoreano R. (1963) Effect of antidiuretic hormone on permeability of single muscle fibres. *Nature* 200(4904):365:366

Zeuthen T, Klaerke DA. (1999) Transport of water and glycerol in aquaporin 3 is gated by H⁺. *J. Biol. Chem.* 274(31):21631-21636

Zhang RB, Verkman AS. (1991) Water and urea permeability properties of *Xenopus* oocytes: expression of mRNA from toad urinary bladder. *Am. J. Physiol.* 260(1 Pt 1):C26-34

Zhang R, van Hoek AN, Biwersi J, Verkman AS. (1993) A point mutation at cystein-189 blocks the water permeability of rat kidney water channel CHIP28k. *Biochemistry* 32:2938-2941