

Tesis Doctoral

# Aislamiento y caracterización del ligando del pistilo que interactúa con el sistema de receptores quinasa LePRK1 y LePRK2 de polen de *Solanum lycopersicon* (tomate)

Wengier, Diego Leonardo

2008

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

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

Cita tipo APA:

Wengier, Diego Leonardo. (2008). Aislamiento y caracterización del ligando del pistilo que interactúa con el sistema de receptores quinasa LePRK1 y LePRK2 de polen de *Solanum lycopersicon* (tomate). Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Wengier, Diego Leonardo. "Aislamiento y caracterización del ligando del pistilo que interactúa con el sistema de receptores quinasa LePRK1 y LePRK2 de polen de *Solanum lycopersicon* (tomate)". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2008.

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Fisiología, Biología Molecular y Celular

**Aislamiento y caracterización del ligando del pistilo que interactúa con el sistema de receptores quinasa LePRK1 y LePRK2 de polen de *Solanum lycopersicon* (tomate).**

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

**Autor: Lic. Diego Leonardo Wengier**

Director de tesis: Dr. Jorge P. Muschietti

Consejero de Estudios: Dr. Jorge P. Muschietti

Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular  
**INGEBI - CONICET**

Buenos Aires, 2008

El trabajo expuesto en esta tesis ha sido parte de los siguientes trabajos y manuscritos próximos a publicarse:

Wengier D, Valsecchi I, Cabanas ML, Tang WH, McCormick S, Muschiatti J.

**The receptor kinases LePRK1 and LePRK2 associate in pollen and when expressed in yeast, but dissociate in the presence of style extract.**

Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 May 27;100(11):6860-5.

Kaothien P, Ok SH, Shuai B, Wengier D, Cotter R, Kelley D, Kiriakopolos S, Muschiatti J, McCormick S.

**Kinase partner protein interacts with the LePRK1 and LePRK2 receptor kinases and plays a role in polarized pollen tube growth.**

Plant J. 2005 May;42(4):492-503.

Wengier D, Mazzella M, McCormick S, Muschiatti J.

**Pollen growth stimulation by MrX, a pistil ligand for LePRK complex in tomato pollen tubes**

Manuscrito en preparación.

Zhang D, Wengier D, Shuai B, Gui C, Muschiatti J, McCormick S, Tang W.

**The Pollen Receptor Kinase LePRK2 Regulates Pollen Germination and Tube Growth**

Manuscrito en preparación.

Resumen.....	5
Abstract.....	6
<b>1. Introducción .....</b>	<b>8</b>
<b>1.1. Producción de las gametas .....</b>	<b>10</b>
1.1.1. Megasporogénesis y megagametogénesis.....	10
1.1.2. Microsporogénesis y microgametogénesis .....	13
<b>1.2. Crecimiento del tubo polínico .....</b>	<b>16</b>
1.2.1. El tubo polínico .....	16
1.2.2. Crecimiento apical .....	17
1.2.3. El citoesqueleto de actina y sus proteínas asociadas.....	18
1.2.4. La concentración intracelular de Ca <sup>2+</sup> , el pH intracelular y otros iones (K <sup>+</sup> , Cl <sup>-</sup> ) .....	19
1.2.5. Fosfoinosítidos y lípidos.....	21
1.2.6. Proteínas pequeñas que unen GTP .....	23
<b>1.3. Transducción de señales en plantas mediada por receptores quinasa.....</b>	<b>26</b>
<b>1.4. LePRK1 y LePRK2.....</b>	<b>28</b>
<b>2. Objetivos .....</b>	<b>32</b>
<b>3. Capítulo 1: Respuestas bioquímicas del complejo de LePRKs a un compuesto proveniente del pistilo.....</b>	<b>34</b>
<b>3.1. Introducción .....</b>	<b>35</b>
<b>3.2. Materiales y Métodos.....</b>	<b>38</b>
3.2.1. Material vegetal utilizado.....	38
3.2.2. Fraccionamiento y purificación de microsomas de polen maduro de tomate .....	39
3.2.3. Ensayo de fosforilación.....	40
3.2.4. Electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) .....	41
3.2.5. Cepa de levaduras, condiciones de crecimiento e inducción de expresión de proteínas heterólogas.....	41
3.2.6. Fraccionamiento y purificación de microsomas de levaduras.....	44
3.2.7. Preparación de extractos y exudados de estigma-estilo.....	45
3.2.8. Ensayos de coimmunoprecipitación y <i>western blot</i> de microsomas de levaduras.....	46
<b>3.3. Resultados.....</b>	<b>48</b>
3.3.1. Disociación de la interacción LePRK1-LePRK2 en levaduras mediada por extractos de estigma-estilo.....	48
3.3.2. Desfosforilación de LePRK2 mediada por extractos y exudados de estigma-estilo .....	50
3.3.3. Breve caracterización de MrX, el componente activo del estigma-estilo .....	51
<b>3.4. Conclusiones .....</b>	<b>53</b>
<b>4. Capítulo 2: Purificación y Caracterización de MrX.....</b>	<b>57</b>
<b>4.1. Introducción .....</b>	<b>58</b>
<b>4.2. Materiales y Métodos.....</b>	<b>62</b>
4.2.1. Purificación de MrX .....	62

4.2.2.	<b>Caracterización de MrX</b> .....	69
4.3.	<b>Resultados</b> .....	74
4.3.1.	<b>Extracción de MrX con solvente orgánico y precipitaciones</b> .....	74
4.3.2.	<b>Separaciones cromatográficas exploratorias</b> .....	75
4.3.3.	<b>Protocolo de purificación</b> .....	80
4.3.4.	<b>Análisis estructural de MrX por UV-MALDI-TOF MS/MS y FT-ICR MS</b> .....	84
4.3.5.	<b>Análisis de aminoácidos</b> .....	88
4.3.6.	<b>Efectos de algunas proteasas en MrX</b> .....	89
4.3.7.	<b>Efectos de la hidrólisis ácida y básica sobre MrX</b> .....	93
4.3.8.	<b>Efectos del tratamiento reductor sobre MrX</b> .....	96
4.4.	<b>Conclusiones</b> .....	97
5.	<b>Capítulo 3: Efectos fisiológicos de MrX</b> .....	102
5.1.	<b>Introducción</b> .....	103
5.2.	<b>Materiales y métodos</b> .....	107
5.2.1.	<b>Material vegetal utilizado</b> .....	107
5.2.2.	<b>Ensayo de germinación de polen de tomate</b> .....	107
5.2.3.	<b>Preparación de las muestras y microscopía</b> .....	110
5.2.4.	<b>Análisis estadístico de los datos</b> .....	110
5.3.	<b>Resultados</b> .....	112
5.3.1.	<b>Efectos de MrX sobre el crecimiento del tubo polínico <i>in vitro</i> de plantas salvajes de tomate</b> .....	112
5.3.2.	<b>Efectos de MrX sobre el crecimiento del tubo polínico de plantas transgénicas eGFP, K2AS y K1OX</b> .....	117
5.4.	<b>Conclusiones</b> .....	122
6.	<b>Conclusiones finales y perspectivas</b> .....	126
7.	<b>Referencias</b> .....	137

## **Aislamiento y caracterización del ligando del pistilo que interactúa con el sistema de receptores quinasa LePRK1 y LePRK2 de polen de *Solanum lycopersicon* (tomate)**

### **Resumen**

Los LePRKs son receptores quinasa que se localizan en la membrana plasmática de polen, posiblemente mediando interacciones polen-pistilo. Previamente, hemos demostrado que LePRK2 se encuentra fosforilada en polen maduro y germinado, y se desfosforila cuando microsomas de polen son incubados con extractos de estigma-estilo. Esto sugiere que por lo menos LePRK2 podría estar transduciendo una señal del pistilo a través de la actividad de LePRK2. En esta tesis, mostramos que la desfosforilación de LePRK2 está mediada por una molécula proveniente del pistilo resistente al tratamiento térmico, alcalino y proteasas. Basándonos en la desfosforilación de LePRK2, desarrollamos un protocolo de purificación con el cual obtuvimos un pico aislado de ~3550 Da (determinado por UV-MALDI-TOF MS) correspondiente a esta molécula peptídica que nombramos MrX. Con el fin de evaluar los efectos de MrX en tubos polínicos en crecimiento, realizamos ensayos de germinación *in vitro* en presencia de MrX parcialmente purificado y determinamos la longitud del tubo polínico como marcador del estado fisiológico. La adición de MrX al medio de germinación resultó en un aumento del largo del tubo polínico en una forma dependiente de la dosis, mientras que las fracciones control no tuvieron efecto alguno. Nuestra hipótesis plantea que las interacciones polen-pistilo a través del complejo de LePRKs involucran la percepción de MrX por LePRK2, seguido de una desfosforilación de ésta y un incremento de la tasa de crecimiento del tubo polínico.

### **Palabras clave**

Interacción polen-pistilo – transducción de señales – purificación de ligando – receptor-ligando – fosforilación

**Isolation and Characterization of the pistil-produced ligand that interacts with pollen receptor kinases LePRK1 and LePRK2 from *Solanum lycopersicon* (tomato)**

**Abstract**

LePRK1 and LePRK2 are pollen specific receptor kinases that belong to a plasma membrane high molecular weight complex possibly involved in pollen-pistil interactions. Previously, we have shown that LePRK2 is phosphorylated in mature and germinated pollen grains, but is dephosphorylated when pollen microsomes are incubated with stigma-style extracts. This suggests that LePRK complex might be transducing a signal from pistils through LePRK2 activity. In this thesis, we show that LePRK2 dephosphorylation is mediated by a heat-, base- and protease-resistant molecule from pistils. Based on LePRK2 phosphorylation, we developed a purification protocol and obtained an isolated peak of ~3550 Da peptidic compound (as determined by UV-MALDI-TOF MS) that we named MrX. In order to assess the effects of MrX on growing pollen tubes, we did *in vitro* germination assays in the presence of partially purified fraction of MrX and determined pollen tube length as a marker of the physiological state. MrX addition to germination medium resulted in pollen tube length increase in a dose-dependent manner, but not when pollen grains were incubated with control fractions. We hypothesize that pollen-pistil interactions through LePRK complex involve MrX perception by LePRK2, followed by LePRK2 dephosphorylation and an increase in pollen tube growth rate.

**Key words**

Pollen-pistil interactions – signal transduction – ligand purification – ligand-receptor – phosphorylation

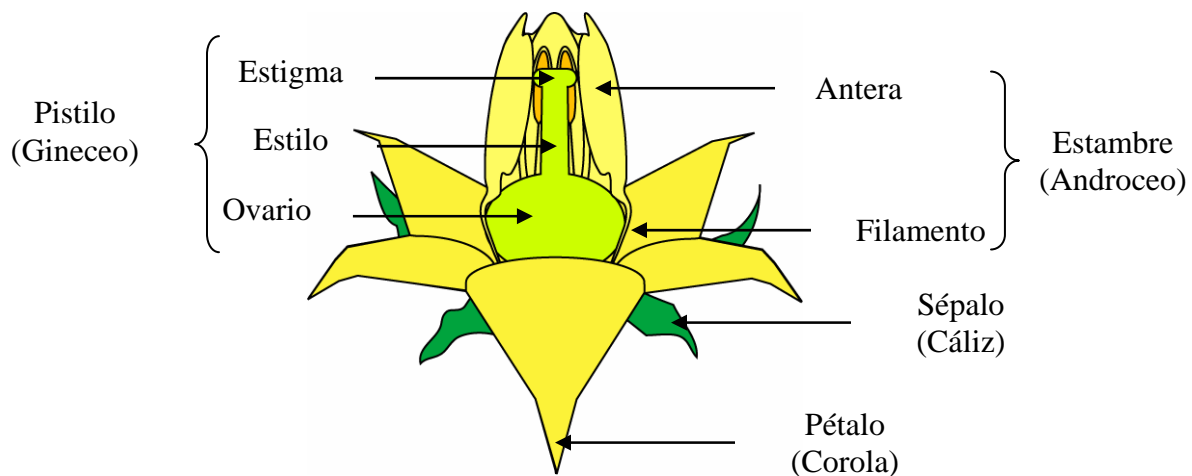




# **1. Introducción**

## 1. Introducción

Las Angiospermas (del griego: *angios*, ánfora o vaso; *sperma*, semilla) corresponden al grupo de plantas con flor dominantes en la actualidad. Aparecieron hace 140 millones de años durante el Jurásico tardío y sufrieron una rápida diversificación durante el Cretácico. Existen más de 250.000 especies agrupadas en 12.500 géneros y cerca de 300 familias, y en términos ecológicos y nutricionales, sobrepasan a todos los otros grupos de plantas. Numerosos factores contribuyeron a su dominancia, incluyendo su habilidad por alcanzar la madurez reproductiva rápidamente y la adaptación a la polinización y dispersión de las semillas mediada por animales. El ciclo de vida de las plantas superiores incluye la germinación de la semilla, el crecimiento vegetativo, la floración, fertilización, desarrollo del embrión y maduración de la semilla. La inducción de la floración se dispara por estímulos ambientales como la luz, la temperatura y la disponibilidad de nutrientes, en combinación con señales endógenas (es el caso de hormonas como la giberelina y los osciladores circadianos), para las cuales se han descrito numerosos genes de tiempo de floración [1]. La integración de las señales induce la expresión de genes que determinan la identidad del meristema apical del vástago, transformándolo en el meristema floral [2]. Finalmente, se activan los genes de identidad floral en las diferentes regiones de la flor, produciendo cuatro tipos de órganos pertenecientes a dos ciclos estériles y dos ciclos fértiles (Figura 1.1). Los primeros están



**Figura 1.1: Representación esquemática de una flor de tomate [*Solanum lycopersicon* L. (Miller)].**

asociados a la protección, a la atracción de polinizadores, dispersión del polen, etc. Estos dos ciclos corresponden al perianto compuesto por los sépalos, generalmente verdes y similares a una hoja típica; y los pétalos, que pueden presentar adaptaciones morfológicas como colores vistosos, estructuras especializadas, etc. Los ciclos fértiles están compuestos por el androceo y el gineceo o pistilo. En el androceo se encuentran los estambres, compuestos por un filamento largo y la antera conteniendo los sacos polínicos donde se produce el polen (gametofito masculino). El gineceo es generalmente claviforme presentando en su parte superior un estigma, donde se depositan los granos de polen; un estilo largo, y el ovario, que contiene a los óvulos, dentro de los cuales se encuentra el saco embrionario (gametofito femenino).

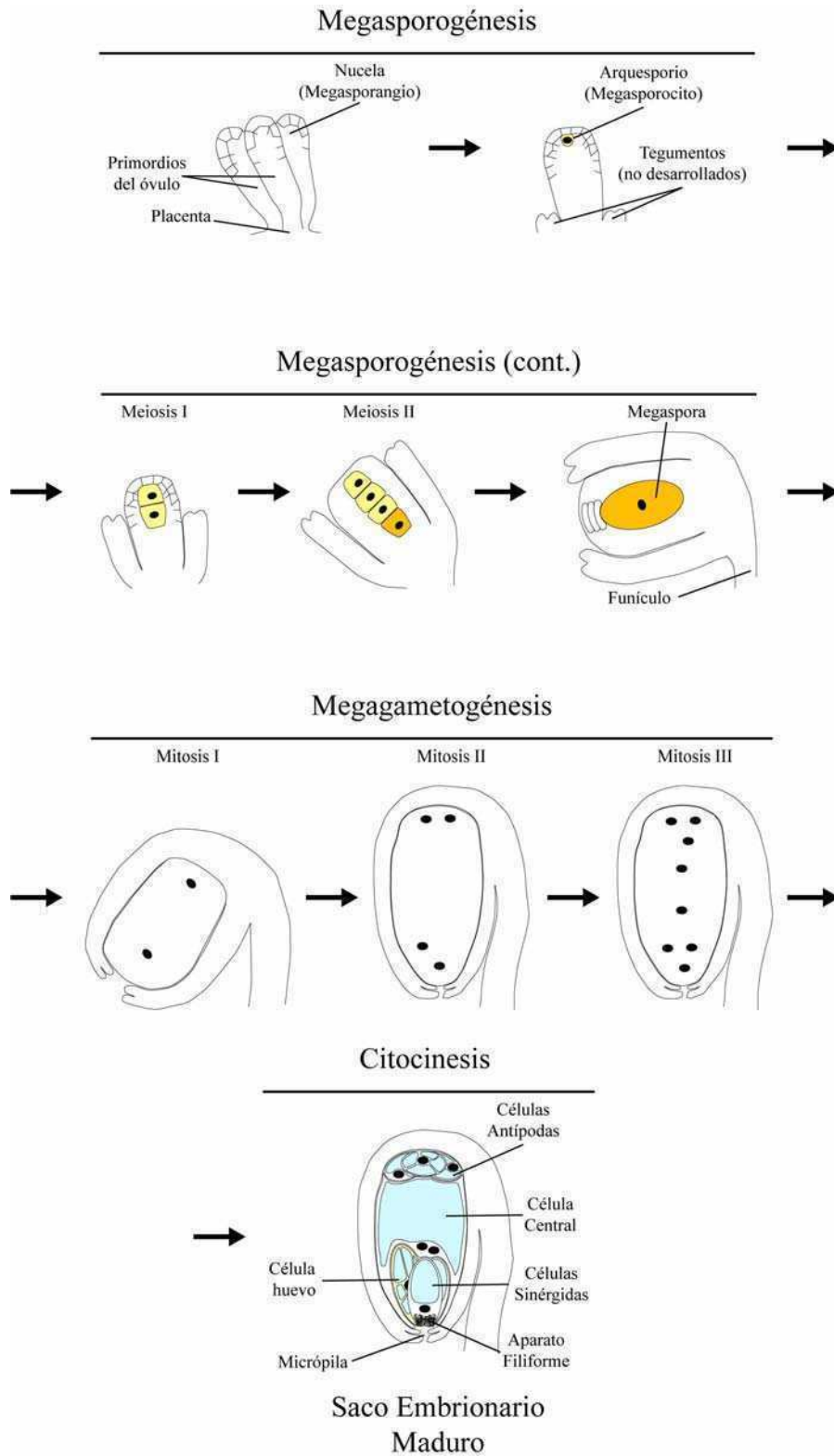
### **1.1. Producción de las gametas**

De la misma forma que ocurre en otros organismos, la reproducción sexual de las plantas requiere el encuentro de las gametas femeninas y masculinas. Sin embargo, las plantas desarrollan los tejidos fértiles como respuesta a los estímulos endógenos y a aquellos provenientes del medio ambiente, a diferencia de lo que ocurre en mamíferos, donde la línea germinal se diferencia durante la embriogénesis [2, 3]. Tal como ocurre en otros organismos con alternancia de generaciones haploides y diploides, en el esporofito se produce la megasporogénesis y microsporogénesis, generando esporas con la mitad del contenido cromosómico que serán las responsables de generar las gametas. Los procesos por los cuales a partir de las megasporas y microsporas se producen las gametas femeninas y masculinas se llaman megagametogénesis y microgametogénesis, respectivamente.

#### **1.1.1. Megasporogénesis y megagametogénesis**

Los óvulos se inician desde la placenta como un grupo denso de células meristemáticas que se expanden y forman pequeñas protuberancias. Cada óvulo consiste

básicamente de la nucela, donde se formará el gametofito femenino, uno o dos integumentos y el funículo que se encuentra unido a la placenta (Figura 1.2). Durante la megasporogénesis, la parte apical del primordio del óvulo forma la nucela, dentro de la cual se desarrolla el arquesporio, que alojará la megaspora. El arquesporio deriva de la hipodermis y contiene, generalmente, sólo un megasporocito que seguirá el programa de megasporogénesis. Existen diferentes tipos de patrones de formación de los sacos embrionarios, siendo el más común el tipo de desarrollo de *Polygonum* sp, que también se observa en *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*), *Petunia hybrida* y tomate. En estas especies, los dos ciclos de divisiones meióticas resultan en cuatro megasporas alineadas, de las cuales sólo sobrevive la que está más cerca de la calaza. Durante este proceso, las células en cada díada y tétrada se encuentran rodeadas por una pared de calosa que desaparece primero en el extremo donde se encontrará la megaspora funcional. Esta pared aísla a las células del tejido que las rodea, probablemente reduciendo el flujo de nutrientes necesarios para el desarrollo de la megaspora. En el desarrollo del saco embrionario tipo *Polygonum*, la célula que sobrevive inicia el proceso de megagametogénesis. Luego de tres mitosis sucesivas, el saco embrionario comienza a celularizarse para formar la estructura final formada por siete células. Los 2 núcleos polares migran a la posición central, donde en algunas especies se fusionan para formar el núcleo del endosperma secundario, y en otras se fusionan momentos antes de la fertilización. Durante la diferenciación celular, la polarización del eje calaza-micrópila establecido al principio del desarrollo del gametofito femenino va a determinar que los núcleos posicionados en el extremo micropilar se diferencien en la célula huevo y las células sinérgidas, mientras que los núcleos en el extremo calazal formen las células antípodas. En el extremo calazal de la célula huevo y las sinérgidas la pared celular está ausente, permitiendo el contacto directo de las membranas plasmáticas. La polaridad del gametofito femenino se cree está definido por la asimetría de las capas que rodean al óvulo, por lo tanto se encontraría bajo el control esporofítico, pero aún no se han identificado los factores responsables [2, 4, 5].



**Figura 1.2: Esquema de Megasporogénesis y Megagametogénesis del tipo *Polygonum sp.***

### 1.1.2. Microsporogénesis y microgametogénesis

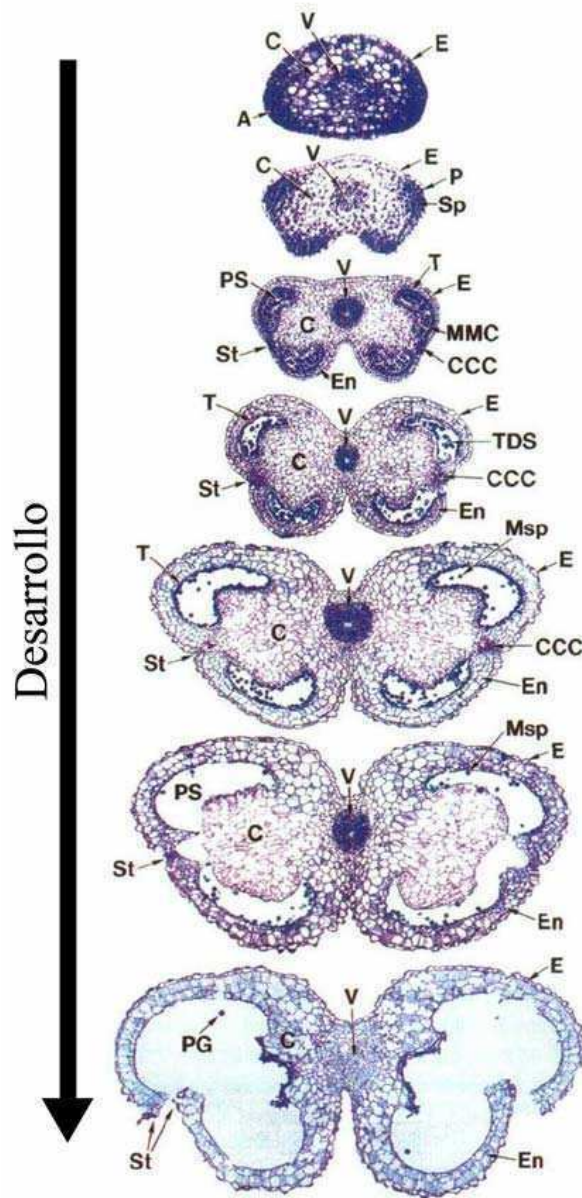
Los estambres están compuestos por un filamento largo que contiene un haz vascular que conduce agua y nutrientes desde la flor hacia la antera en la parte superior. En la antera, se encuentran los tejidos responsables de llevar a cabo funciones reproductivas (formación de las microsporas y el polen) y no reproductivas (estructurales y dispersión), permitiendo que se produzca la polinización y fertilización. En su interior, las anteras poseen un grupo de células arquesporales diploides que darán origen al endotecio, involucrado en la dehiscencia de la antera; el tapete y los microsporangios (sacos polínicos) [6]. El desarrollo del polen viable es dependiente de la presencia del tapete, cuyas funciones son la nutrición de las microsporas y la formación de la pared externa (Figura 1.3, tomada de [6]).

El programa de microsporogénesis comienza cuando las células madre de las microsporas se rodean de calosa aislándose de las células esporofíticas, para luego entrar concertadamente en una división meiótica. En este punto, los niveles citoplasmáticos de ARN mensajero y ribosomal disminuyen drásticamente, y los plástidos se desdiferencian y replican [2]. La tétrada de microsporas haploides resultantes se rodean de una pared de calosa propia, a la vez que comienzan a sintetizar la pared del grano de polen. La pared del polen de las angiospermas consiste de numerosas capas de materiales químicamente diferentes: una capa externa de esporopolenina (la exina), que consiste de dos subcapas: la sexina y la nexina; y una capa pectocelulósica más interna, la intina. Al momento de la citocinesis de la tétrada de microsporas, se determinan las zonas donde posteriormente se van a ubicar los poros de germinación del tubo polínico. La composición química de la exina es desconocida, principalmente por la gran estabilidad de la esporopolenina, lo que imposibilita degradarla en componentes más sencillos y facilitar así su estudio. Análisis bioquímicos diversos revelaron una mezcla de biopolímeros lipídicos, ácidos grasos de cadena larga, fenilpropanoides, compuestos fenólicos y carotenoides. Además de la protección mecánica que brinda la exina, una capa rica en lípidos, llamada trifina, *pollen coat* o *pollenkit*, llena los espacios entre las báculas de la superficie de la exina y provee numerosas e importantes funciones, como la adherencia a los polinizadores, interacciones polen-estigma, protección contra la deshidratación excesiva, la radiación UV y el ataque

de patógenos. Análisis químicos han demostrado la presencia de ésteres no polares de ácidos grasos de cadena media y larga, ácidos de cadena muy larga, proteínas pequeñas y glicoproteínas. Los ésteres no polares incluyendo ésteres de fenol o triterpenos mantendrían la fluidez de la capa de trifina con el fin de conservar proteínas y otras sustancias presentes en ella. En plantas de estigmas secos, los ácidos grasos de cadena larga presentes en la pared del grano de polen son importantes durante el contacto inicial de la superficie estigmática, actuando como moléculas señalizadoras o solubilizando/estabilizando otros componentes señalizadores en la capa de trifina o la pared celular. En maíz se ha identificado que las proteínas predominantes en la capa de trifina son endoxilanasas y otras glucanasas que se expresan en el tapete y se cree ayudarían en la penetración del tubo polínico dentro de las paredes celulares de las células estigmáticas [2].

Finalizada la meiosis, el tapete comienza a producir calasa, enzima que libera a las microsporas al degradar la pared que envuelve a cada tétrada y a cada microspora. Luego de la liberación, el citoplasma de las microsporas se reorganiza adoptando una distribución polar, donde las vacuolas pequeñas se fusionan formando una vacuola mayor central que restringe hacia un lado la mayor parte del citoplasma y los plástidos, y el núcleo hacia el otro. Esta polarización desencadena la división asimétrica llamada mitosis del polen I que determina el destino de las células hijas: se diferencian una célula vegetativa grande, que será responsable del desarrollo del tubo polínico; y una célula generativa pequeña, que posteriormente originará las células espermáticas. La célula generativa se redondea y es encapsulada por la célula vegetativa, ubicándose en el centro del grano de polen. Posteriormente, la célula generativa adquiere una forma ahusada o alongada, estabilizada por un complejo de microtúbulos alineados a lo largo de ella. Aunque no posea una verdadera pared celular, la célula generativa madura posee una matriz extracelular polisacáridica. En muchas especies, la célula generativa se divide antes que el polen se libere, formando dos células espermáticas aparentemente idénticas (polen tricelular; *Arabidopsis* y maíz, por ejemplo), mientras que en otras, la división ocurre durante la germinación del tubo polínico (polen bicelular; tomate, por ejemplo). Los pasos finales de la maduración del polen coinciden con la antesis y la dehiscencia de

las anteras, finalizando con la liberación de los granos de polen deshidratados (15-30% de contenido de agua) [2, 7, 8].



**Figura 1.3: Fotografías en campo claro del desarrollo de la antera de tabaco.** Secciones transversales de 10  $\mu$ m teñidas con azul de toluidina. Fotografía tomada de Goldberg *et al.* (1993). A, célula arqueosporial; C, conectivo; CCC, grupo de células circulares; E, epidermis; En, endotecio; MMC, células madre de las microsporas; Msp, microsporas; P, células parietales; PG, grano de polen; PS, saco polínico; Sp, células esporógenas; St, estomio; T, tapete; TDS, tetradas; V, haz vascular.



## **1.2. Crecimiento del tubo polínico**

El polen es transportado por agentes bióticos o abióticos y llega al estigma, donde se deposita. La fertilización va a ocurrir cuando el núcleo de una de las gametas presentes en el polen se fusione con el de la ovocélula, mientras que el núcleo de la otra gameta se fusiona con los dos núcleos de la célula central. Como producto de esta doble fecundación, se genera el cigoto (2n) y el endosperma (3n), respectivamente. Sin embargo, la fecundación no sucede inmediatamente a la polinización: el estigma está separado de los óvulos por el estilo y otros tejidos de origen esporofítico como la placenta, lugar donde los óvulos se insertan por medio del funículo. Las plantas han desarrollado una estrategia que les permite alcanzar los óvulos. Una vez hidratado, el grano de polen va a desarrollar por uno de sus poros un tubo polínico, una estructura tubular de crecimiento apical que tiene la capacidad de abrirse camino sobre o a través de las paredes de las células papilares del estigma, el tracto transmisor del estilo, la placenta, el funículo y los tegumentos, hasta llegar a la micrópila. Dentro de una de las células sinérgidas, el ápice del tubo polínico se rompe liberando las gametas, permitiendo que posteriormente ocurra la doble fecundación.

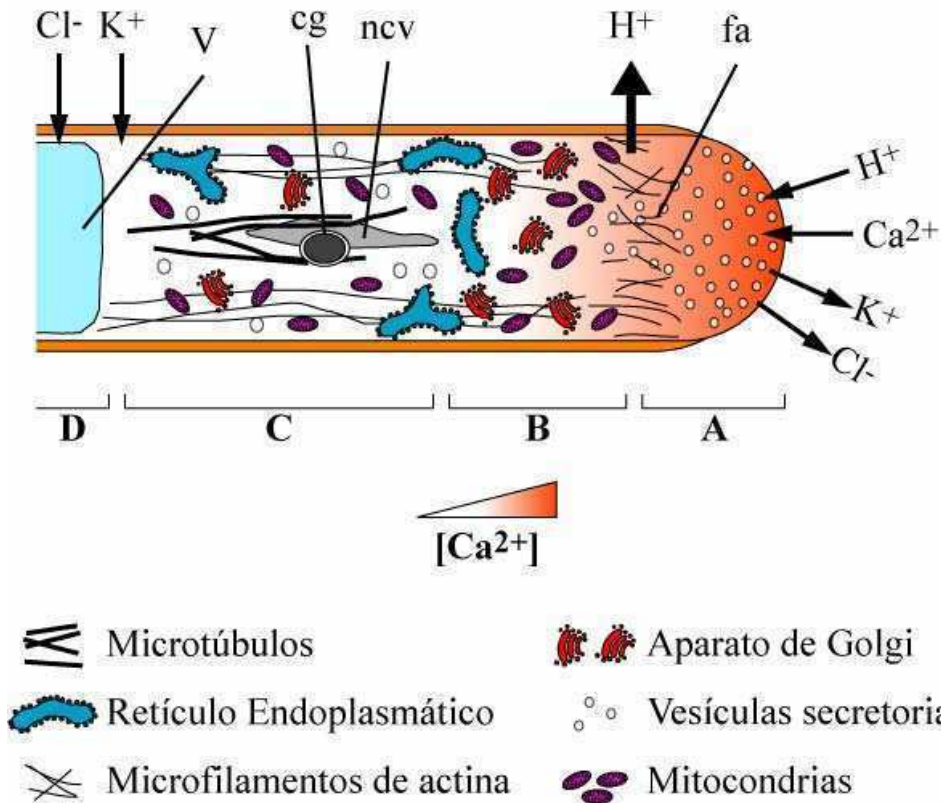
### **1.2.1. El tubo polínico**

Al depositarse sobre un estigma húmedo como el de tomate, el grano de polen se hidrata y las vacuolas se fusionan formando una gran vacuola central. En este momento, se puede observar microscópicamente el inicio de una conspicua reorganización del citoplasma. La intina frente a uno de los poros se comienza a expandir, quizás en respuesta a la entrada masiva de agua durante la hidratación, iniciando la formación del tubo polínico [3]. Establecido el incipiente tubo, éste se diferencia mostrando una polarización celular interna que se va a mantener hasta que se descarguen las gametas (Figura 1.4) [9]. En el ápice del tubo polínico, se encuentra la zona clara, definida de este modo por su aspecto al microscopio óptico dada la ausencia de amiloplastos y la vacuola de gran tamaño. Esta zona está caracterizada por la presencia de numerosas vesículas

secretorias que contienen precursores de la pared celular, son generadas en el aparato de Golgi y se disponen en forma de embudo invertido [10-12]. Por detrás, se encuentra la zona subapical altamente poblada de organelas metabólicamente activas como las mitocondrias, retículo endoplásmico y aparato de Golgi. Estas organelas nunca penetran la parte más apical de la zona clara, aún cuando no existe ninguna estructura celular evidente que lo impida [9, 13]. Por detrás de la zona clara, está la zona nuclear, donde se encuentra el núcleo de la célula vegetativa y las células espermáticas, junto con las organelas de mayor tamaño. La zona vacuolar se dispone por detrás de la zona nuclear y posee una vacuola tubular de gran tamaño que crece a medida que el tubo polínico lo hace. Ésta restringe el citoplasma a la parte apical del tubo. Regularmente, por detrás de la vacuola, se generan tapones de calosa que separan las zonas más viejas del tubo del ápice en activo crecimiento. En la zona más distal dentro de la zona clara y en la zona nuclear, se observa una característica corriente citoplasmática en forma de “fuente invertida”, que lleva corticalmente vesículas y organelas desde el tubo hacia la parte subapical, donde esta corriente revierte el sentido y retorna por la parte central del tubo polínico [14]. El citoesqueleto de actina y las proteínas asociadas a ella son las responsables de este movimiento. Apicalmente, la actina se encuentra formando filamentos cortos, por lo que el movimiento de las vesículas sería sólo *browniano*, poniéndose en contacto con la membrana plasmática y fusionándose, aportando material de pared y membrana celular. El exceso de membrana plasmática se recupera por invaginación de vesículas [9, 15-20].

### **1.2.2. Crecimiento apical**

Existen numerosos factores que actúan concertadamente permitiendo el mecanismo de crecimiento apical: el citoesqueleto de actina y sus proteínas asociadas [18, 21], la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) [9, 12, 22], el pH intracelular [12, 22] y otros iones ( $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ) [12, 22], fosfoinosítidos y lípidos [23]; y las proteínas pequeñas que unen GTP [23], entre otros. Todos estos componentes no actúan de forma aislada, sino que tienen sus efectos sobre los otros, formando una red compleja finamente



**Figura 1.4: Esquema de Tubo Polínico en crecimiento.** A, zona clara apical; B, zona subapical; C, zona nuclear; D, zona vacuolar; *cg*, célula generativa; *fa*, franja de actina; *ncv*, núcleo de la célula vegetativa; V, vacuola.

regulada. Por este motivo, la perturbación de cualquiera de los componentes de la red resulta en los mismos fenotipos aberrantes para todos ellos, como ser el arresto del crecimiento, la formación de un ápice globoso, etc [9, 18, 23-25].

### 1.2.3. El citoesqueleto de actina y sus proteínas asociadas

El citoesqueleto de actina es fundamental para el crecimiento apical en el polen, ya que dirige las vesículas al ápice del tubo a la vez que funciona de andamiaje para el transporte de las organelas [9, 12, 18]. El citoesqueleto de actina forma cables longitudinales corticales, más o menos paralelos entre sí que se extienden hasta la zona subapical. Allí, estos cables son reemplazados por filamentos cortos de actina formando

una estructura anular subapical altamente sensible a las perturbaciones extra e intracelulares. Esta estructura llamada “franja de actina” (o *apical actin fringe*), marcaría el lugar donde las corrientes citoplasmáticas revierten su sentido [13-16, 26, 27]. Luego de esta estructura, el ápice del tubo polínico carece de filamentos de actina. Se han observado numerosos fenotipos anormales asociados a la presencia de filamentos de actina en el ápice del tubo: la extensión de los cables del tubo dentro del ápice resultan en un arresto del crecimiento [25, 27]; mientras que la formación de una red de filamentos cortos o bandas transversales de actina se han visto asociadas al crecimiento isodiamétrico del tubo, resultando en un tubo con ápice globoso [27]. Las actividades de proteínas que unen actina tales como profilina, cofilina/factor despolimerizante de actina (ADF, *actin depolymerizing factor*), villina, gelsolina/fragmina y formina asegurarían la distribución específica de los microfilamentos en respuesta a cambios iónicos citoplasmáticos y en respuesta a proteínas transductoras de señales y segundos mensajeros (cAMP, cGMP, NO, fosfoinosítidos, etc.) [Ver Tabla 1.1].

#### **1.2.4. La concentración intracelular de $\text{Ca}^{2+}$ , el pH intracelular y otros iones ( $\text{K}^+$ , $\text{Cl}^-$ )**

Los tubos polínicos en crecimiento mantienen un gradiente decreciente de concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{H}^+$  desde el ápice hacia la base del tubo. En *Lilium longiflorum*, la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en el ápice alcanza valores de 10  $\mu\text{M}$ , disminuyendo a 0,2  $\mu\text{M}$  en una corta distancia por detrás del mismo. Los tubos polínicos también mantienen el extremo apical ligeramente ácido. Por detrás, en la misma zona donde se localiza la “franja de actina”, se detecta una región llamada “banda alcalina”, donde el pH citoplasmático puede ser alrededor de 1 unidad mayor que en el extremo apical. Esta zonación es indispensable para el crecimiento, ya que la disipación de la misma resulta en el arresto del desarrollo del tubo polínico [9, 21, 24].

<b>Proteína</b>	<b>Interactúa con</b>	<b>Función</b>	<b>Regulada por</b>
ADF/Cofilina	G- y F-actina	Promueve la liberación de monómeros de extremos “-” de F-actina y la fragmentación. Se localiza en la franja de actina (pH básico).	Unión a F-actina inhibida por fosforilación y unión a PtdIns <sub>2</sub> . Otras proteínas ( <i>Actin Interacting Protein 1</i> y Rac/Rop GTPasa).
Forminas	F-actina	Participa en la formación de haces no ramificados y en la señalización involucrada en la polaridad celular y citocinesis. Nuclea filamentos de actina en los extremos “+”, también fragmenta filamentos.	-
Gelsolina y Severina	F-actina	Estimula la fragmentación mediada por profilina, cubre extremos “+” y actúa de núcleo de nuevas polimerizaciones de forma dependiente de [Ca <sup>2+</sup> ]	PtdIns (?).
Profilina	G-actina	Impide la polimerización cuando los extremos “+” están bloqueados (dependiente de [Ca <sup>2+</sup> ]) y permite la polimerización cuando éstos están libres.	Fosforilación. PtdIns (?). Otras proteínas.
Vilina	F-actina	Promueve la formación de haces de actina. Con altas [Ca <sup>2+</sup> ] cubre los extremos positivos y fragmenta los haces.	-

**Tabla 1.1: Algunas proteínas que unen actina y sus funciones [18]**

*Extremos “+”*, corresponde a aquellos por donde la polimerización es más activa que la despolimerización; *extremos “-”*, corresponde a los extremos por donde la despolimerización es más activa que la polimerización.

La entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  se produce principalmente a través de canales ubicados apicalmente en la membrana plasmática y serían necesarios para la generación del gradiente [28-30]. Por otro lado, también se ha detectado la salida subapical de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el tubo a través de bombas en la membrana plasmática. Mutantes de Arabidopsis en un gen que codifica para una  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa que se localiza en la membrana plasmática, muestran esterilidad masculina [31]. La liberación regulada desde depósitos internos podría contribuir en la dinámica de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, especialmente cuando se considera la gran cantidad de retículo endoplasmático en la zona subapical [9]. Con respecto al pH intracelular, se ha detectado una corriente que ingresa  $\text{H}^+$  en el ápice del tubo y otra que libera  $\text{H}^+$  en la base de la zona clara, y posiblemente justifican el gradiente intracelular [32].

Algunas de las funciones del  $\text{Ca}^{2+}$  estarían relacionadas a la regulación del citoesqueleto, la endo y exocitosis [33, 34], etc. El aumento de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  está asociado a la fusión de las vesículas a la membrana plasmática [34], proceso en el cual estarían involucrados calmodulina y cAMP: la disminución localizada de los niveles de cualquiera de los dos, resulta en una inhibición de la actividad secretoria, seguida de una reorientación del crecimiento del tubo polínico [35].

Las funciones del  $\text{K}^+$  y el  $\text{Cl}^-$  en el crecimiento apical son menos conocidas que los iones mencionados antes. Se sabe que el  $\text{K}^+$  es necesario para el crecimiento de los tubos polínicos, dado que mutantes de Arabidopsis en un canal de  $\text{K}^+$  tipo *inward-rectifying* (SPIK), perteneciente a la familia de canales  $\text{Kv}$ , imposibilita el crecimiento, resultando en una disminución de la competitividad reproductiva [36]. Por otro lado, el  $\text{Cl}^-$  está completamente ausente en el ápice del tubo polínico, pero ingresa subapicalmente. La inhibición de la entrada del  $\text{Cl}^-$  resulta en un bloqueo del crecimiento y en el aumento del volumen del tubo polínico [37].

### **1.2.5. Fosfoinosítidos y lípidos**

El fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato ( $\text{PtdInsP}_2$ ) y sus derivados participan en numerosos procesos celulares, incluyendo la regulación del citoesqueleto, el tráfico

vesicular, la homeostasis de  $\text{Ca}^{2+}$  y otros, todos importantes en el proceso de crecimiento apical [24, 33, 38]. Dependiendo de la fosfolipasa que procese el  $\text{PtdInsP}_2$ , los productos que se obtienen son inositol 1,4,5-trifosfato ( $\text{IP}_3$ ) y diacilglicerol (DAG) cuando la fosfolipasa es la C (PLC); o, a partir de  $\text{PtdInsP}_2$  se obtiene directamente ácido fosfatídico (PA) por acción de la fosfolipasa D (PLD). Alternativamente, el DAG producido por la PLC puede ser convertido por acción de la DAG quinasa en ácido fosfatídico [23].

En polen, se ha demostrado que la función principal del  $\text{IP}_3$  sería la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde reservorios internos. Tanto el  $\text{IP}_3$  como el  $\text{PtdInsP}_2$  participan en el mantenimiento del el gradiente  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  y la secreción de vesículas en el extremo apical del tubo, y por ende en el crecimiento del tubo. Cuando se regulan las concentraciones de  $\text{IP}_3$  o  $\text{PtdInsP}_2$  intracelulares en *Agapanthus umbellatus*, se modula  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , se reduce la tasa de crecimiento y se reorienta el eje de crecimiento. El aumento de  $\text{PtdInsP}_2$  inhibe la secreción de vesículas y reduce, pero no arresta, el crecimiento. Sin embargo, el aumento de  $\text{IP}_3$ , aún cuando produce un pico de liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  similar a  $\text{PtdInsP}_2$ , estimula la secreción de vesículas y arresta el crecimiento [33]. Estos resultados podrían ser producto de diferentes respuestas celulares para  $\text{IP}_3$  o  $\text{PtdInsP}_2$ ; o bien, que el catabolismo de  $\text{PtdInsP}_2$  además de producir  $\text{IP}_3$  genera PA, sumando efectos adicionales. Una de las propiedades del PA es la traslocación de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de la membrana plasmática, haciéndolo importante para el crecimiento del tubo polínico. La reducción de PA por acción de antagonistas de su acumulación o inhibidores de la PLD, arrestan reversiblemente el crecimiento polarizado. La disminución de la concentración de PA resulta en la disipación del gradiente de  $\text{Ca}^{2+}$  e inhibe el reciclado de la membrana apical [33].

En *Petunia inflata*, se ha descrito una PLC que se localiza predominantemente en las anteras y los granos de polen, y específicamente en la membrana plasmática del ápice del tubo polínico. La expresión de mutantes de PLC dominantes negativas resulta en la ausencia del gradiente apical de  $\text{Ca}^{2+}$ , la disrupción del citoesqueleto de actina, arresto en el crecimiento e hinchazón del ápice del tubo polínico. En *Lillium davidii*, existen evidencias que la actividad de una PLC necesaria para el mantenimiento del gradiente de

Ca<sup>2+</sup>, estaría regulada por la actividad de una proteína G trimérica, además de ser estimulada por la presencia de CaM extracelular [39].

IP<sub>3</sub> también regula la concentración intracelular de otro segundo mensajero, el cAMP. En el polen, se ha demostrado que el cAMP participa en la orientación del tubo polínico. La aplicación extracelular *in vitro* de compuestos que elevan los niveles de cAMP (forskolina o dibutilil cAMP) en la proximidad del extremo apical, dirigen el crecimiento del tubo hacia el agonista; mientras que el efecto de compuestos que reducen los niveles intracelulares de cAMP (teofilina o Rp-8-Br-cAMPS) tienen el efecto contrario en la dirección del tubo polínico [40].

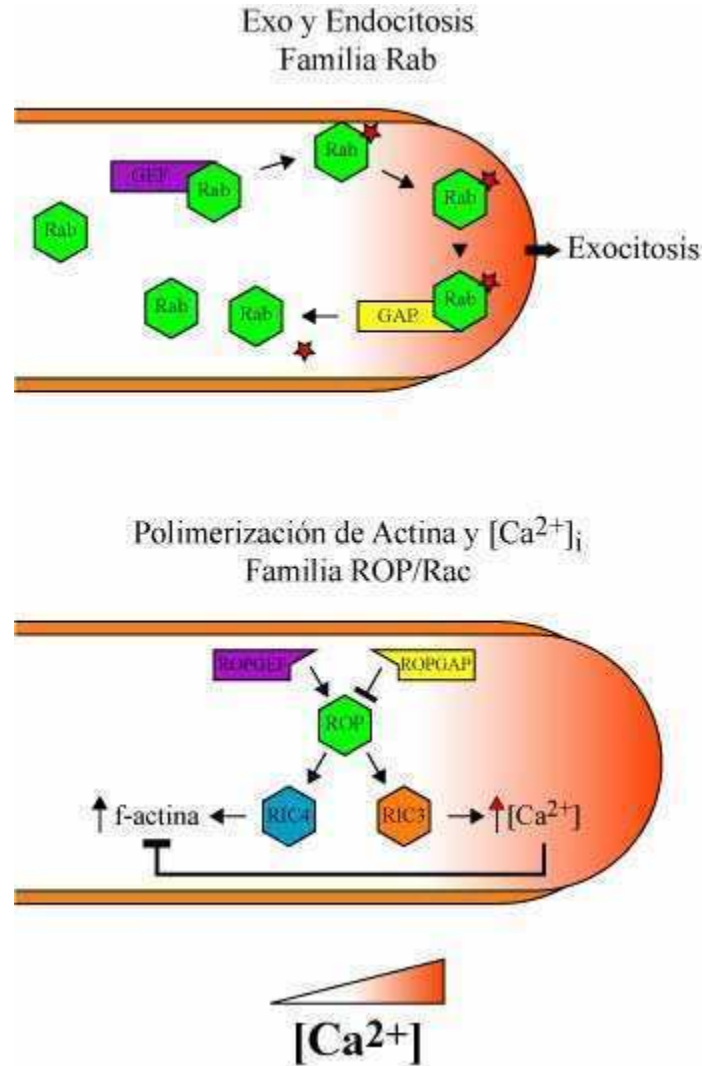
### **1.2.6. Proteínas pequeñas que unen GTP**

En mamíferos y levaduras, las proteínas pequeñas que unen GTP (proteínas G pequeñas) poseen un bajo peso molecular y están involucradas en la señalización. Pertenecen a la superfamilia de proteínas Ras, que incluye 5 familias: Ras, Rab, Arf, Ran y Rho [24, 41]. La actividad regulatoria depende de su unión a GDP o GTP: unidas a GTP, activan a sus efectores río abajo hasta que su propia actividad GTPasa las convierte en su forma inactiva unida a GDP. En estas proteínas, las velocidades de reacción de intercambio GDP-GTP y de hidrólisis del GTP suelen ser lentas, y las interacciones con sus efectores pueden ser moduladas por factores de intercambio de nucleótidos de guanina (*guanine exchange factor*, GEF) y proteínas activadoras de la GTPasa (*GTPase activating protein*, GAP). Las proteínas G pequeñas regulan una gran cantidad de procesos celulares, desde fusiones de membranas hasta importación nuclear. En tubos polínicos, están implicados en al menos dos procesos vitales: regulación del tráfico de vesículas y de los microfilamentos de actina (Figura 1.5) [23, 41].

El crecimiento rápido y polarizado requiere un sistema secretor activo que provea la gran cantidad de material requerido para la elongación del tubo polínico. Por ende, la exocitosis es el mayor contribuyente al crecimiento polarizado, abasteciendo de membrana plasmática, materiales de pared, enzimas y receptores que perciban las señales del tejido femenino, etc [42]. También se ha observado endocitosis activa en el ápice



utilizando compuestos fluorescentes impermeables (FM4-64, entre otros) [19, 20, 34]. Se cree que mediante la endocitosis se recupera parte de la membrana celular proveniente de las vesículas fusionadas previamente a la membrana plasmática. Manteniendo un balance



**Figura 1.5: Proteínas G pequeñas involucradas en el crecimiento del tubo polínico.** La familia Rab está involucrada en la exo y endocitosis. Rab se encuentra en el citoplasma en su estado inactivo unido a GDP en la zona subapical. Por acción de GEF, Rab une GTP y se activa, acercándose a la membrana plasmática e iniciando el tráfico vesicular hasta el ápice del tubo. GAP estimula la actividad GTPasa de Rab, inactivándola. Rab-GDP se localiza nuevamente en el citoplasma. La familia ROP/Rac está relacionada al citoesqueleto y  $[Ca^{2+}]_i$ . Por acción de ROPGEF, ROP se activa, promoviendo la entrada de  $Ca^{2+}$  apical mediante la acción de RIC3. Por otro lado, RIC4 promueve la polimerización de actina en las zonas de baja  $[Ca^{2+}]_i$ . La hidrólisis del GTP asociado a ROP/Rac estimulada por ROPGAP, resultaría en una disminución de la actividad de los efectores RIC3 y RIC4.

entre el tráfico anterógrado y retrógrado, se logra tanto el crecimiento como el reciclado de membranas, convirtiendo estos dos procesos en la fuerza motora en la región de expansión de la membrana celular del tubo polínico [23].

La exo y endocitosis ocurre por el funcionamiento de una maquinaria de fusión celular similar en los organismos eucariotas. Por ejemplo, *Arabidopsis* codifica para proteínas homólogas del complejo SNARE, involucrado en la fusión entre vesículas y las membranas de destino [23]. Aunque aún no se han encontrado en plantas verdaderas GTPasas del tipo Ras, si se encuentran homólogos de Rab e Ypt de mamíferos y levaduras, respectivamente. Ambas pertenecen a la familia de proteínas G pequeñas relacionadas a Ras que regulan el transporte retrógrado y anterógrado entre endomembranas y la membrana plasmática. Rab es la familia más grande de proteínas G pequeñas y controla el acoplamiento de las vesículas al citoesqueleto, el transporte y anclaje de vesículas. En tabaco, se ha descrito la presencia de al menos dos proteínas pertenecientes a esta familia. Una de ellas, NtRab11b, se localiza en la zona clara, dando evidencia de su posible asociación a vesículas secretorias. Esta localización se dispersa por la acción de agentes despolimerizantes de actina, lo que sugeriría que NtRab11b está asociada a vesículas que se desplazan sobre microfilamentos de actina. Por otra parte, NtRab11b estaría involucrada en la endocitosis, ya que la inhibición funcional de ésta impide la acumulación apical de compuestos fluorescentes impermeables. La regulación de la localización de NtRab11b dependería de la actividad de las GAPs y GEFs, ya que una dominante negativa de NtRab11b unida a GDP bloquea la acumulación apical de ésta, mientras que una versión constitutivamente activa unida a GTP, resulta en una acumulación uniforme de la mutante en el ápice. La expresión de cualquiera de estas versiones en plantas resultó en una menor fertilidad masculina. Por lo tanto, una correcta relación entre la forma activa e inactiva de Rab debe ser mantenida para lograr un eficiente transporte de vesículas en el ápice del tubo polínico [43].

En numerosos organismos eucariotas, la GTPasa Rho regula la organización del citoesqueleto de actina y el desarrollo de la polaridad, controla la expresión génica, la síntesis de pared, la producción de peróxido de hidrógeno, endocitosis, exocitosis, citocinesis, progresión del ciclo celular y la diferenciación celular [24, 44]. En plantas, estas GTPasas se llaman ROP (*Rho-related GTPase from plants*) y se ha encontrado que

tienen una importante función en la elongación del tubo polínico en Arabidopsis [45, 46], arveja [47] y tabaco [48], entre otros. Las ROPs se acumulan en el ápice del tubo polínico, donde llevarían a cabo sus funciones. La expresión de una mutante constitutivamente activada unida a GTP resulta en el crecimiento isodiamétrico del ápice del tubo, dando un aspecto globoso; mientras que la expresión de una mutante dominante negativa unida a GDP resulta en un arresto del crecimiento. Estos experimentos demuestran la posición central en la regulación del crecimiento del tubo polínico de las ROPs. En el ápice, ROP activa la quinasa de fosfatidilinositol, llevando a la formación de PtdInsP<sub>2</sub>, que participa en la liberación de Ca<sup>2+</sup>. La expresión de las mutantes unidas a GTP o GDP en tubos polínicos resultaron en la formación de microfilamentos de actina largos o cortos, respectivamente, indicando que esta proteína está involucrada en la dinámica del citoesqueleto [46]. La actividad de ROP ocurre por la activación de sus efectores llamados RICs (*ROP-interactive CRIB-containing proteins*) [49]. Se ha demostrado que dos integrantes de esta familia de proteínas, RIC3 y RIC4, interactúan con ROP en caminos que se contrarrestan mutuamente. RIC4 promueve la polimerización de F-actina, mientras que RIC3 promueve el aumento de [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, induciendo la despolimerización de los microfilamentos [50]. Por otra parte, también se han identificado algunos de los correspondientes RopGEFs [51, 52], RopGAPs [27, 53, 54] y RopGDI (por *ROP guanine nucleotide dissociation inhibitor*, transloca a ROP desde la membrana plasmática hacia el citoplasma u otras zonas de la membrana plasmática) [27, 55], modulando el crecimiento del tubo polínico mediante la regulación de la actividad de ROP. Por último, ROP también estaría involucrada en la regulación de la endo y exocitosis, ya que la germinación de granos de polen en presencia de análogos no hidrolizables de GTP interfieren con estos procesos. El uso de GDPβS disminuye la tasa de crecimiento, mientras que GTPγS tiene el efecto contrario además de promover la exocitosis [34].

### **1.3. Transducción de señales en plantas mediada por receptores quinasa**

Los receptores anclados en la membrana juegan un papel fundamental en todos los organismos al reconocer señales del ambiente y de otras células y activando las

cascadas de señalización río abajo. Las proteínas receptoras quinasas (*Receptor-like kinases, RLKs*) se encuentran en metazoos y plantas, contienen un dominio extracelular que está unido al dominio quinasa por una región transmembrana. El análisis de los datos obtenidos de los proyectos genoma de plantas completados hasta el momento, han permitido identificar cerca de 600 RLKs en *Arabidopsis* y más de 1100 en arroz [56]. Utilizando la genética directa o reversa, se han descrito numerosos RLKs que estarían involucrados en un amplio rango de procesos fisiológicos, como la interacción planta-patógeno y la defensa, percepción de hormonas, desarrollo, morfogénesis, diferenciación, etc. Sin embargo, sólo algunos representantes de esta gran familia, como el sistema CLAVATA y el receptor de brasinosteroides (*BRI1*), han sido caracterizados bioquímicamente demostrando alguna de las relaciones directas con otras proteínas involucradas en el camino de transducción de señales.

El sistema de transducción de señales de CLAVATA (*CLV1*, *CLV2* y *CLV3*) actúa en el meristema apical del vástago, restringiendo la expresión del factor de transcripción WUSCHEL (WUS), regulando así el tamaño y la diferenciación del meristema [56]. *CLV1* codifica para un receptor quinasa con motivos ricos en leucina (*leucine rich repeats, LRR*) [57], *CLV2* codifica para un receptor con motivos LRR sin dominio quinasa [58] y *CLV3* es un pequeño polipéptido secretado [59]. El fenotipo observado por la inactivación del sistema CLV es similar al que se obtiene por la expresión de WUS en mutantes *clv*. Sólo se conocen dos componentes citoplasmáticos del sistema: la proteína ROP y un posible regulador del sistema, la proteína fosfatasa asociada a proteínas quinasa (*kinase-associated protein phosphatase, KAPP*). KAPP se une a numerosos efectores, entre los cuales se encuentra *CLV1* [60, 61]. La sobreexpresión y cosupresión de la expresión de KAPP sugieren que esta proteína está involucrada en la represión de la actividad de *CLV1*. Sin embargo, no existen estudios que muestren el mecanismo por el cual KAPP actúa sobre el sistema de CLV.

Los brasinosteroides (BRs) son hormonas esteroideas esenciales para eventos de señalización durante el crecimiento, desarrollo y respuestas al medio ambiente [56, 62]. El receptor de brasinosteroides, *BRI1*, fue encontrado en un *screening* para mutantes insensibles a BR en *Arabidopsis* [63]. Las mutantes *bri1* muestran enanismo, esterilidad masculina y desetiología en la oscuridad, además de otros fenotipos [64]. *BRI1* es un

receptor quinasa transmembrana con un extremo extracelular con motivos LRR que une BR [65]. Otros RLKs relacionados a la señalización de BR han sido identificados por *screenings* genéticos y similitud de secuencias. BAK1 (también conocido como AtSERK3), es un LRR-RLK que interactúa con BRI1 [66, 67]. Se cree que luego de unir BR, BRI1 formaría homodímeros y luego fosforilaría a BAK1 [68]. Recientemente, se ha identificado que en tomate, una proteína homóloga a BRI1 es también receptora de sistemina, un péptido de señalización de 18-22 aminoácidos involucrado en la respuesta al daño y a los mecanismos de defensa en Solanáceas [69-71]. Río abajo del receptor de BR, se encuentra una proteína quinasa que regula negativamente la cascada de señales llamada BIN2 (*BR-insensitive 2*). BIN2 interactúa con dos factores de transcripción BZR1 (*Brassinazole resistant 1*) [72] y BES1 (*bri1 EMS suppressor*) [73], probablemente fosforilándolos, resultando en la degradación de los mismos. Ambas proteínas se localizan débilmente en el núcleo. La presencia de BR induce una fuerte localización nuclear de ambos factores de transcripción, regulando la expresión génica. BSU1 (*Bri1 suppressor 1*) es una fosfatasa de serina/treonina que antagoniza los efectos de BIN2 e incrementa los niveles de BES1 [62]. Existen otros ejemplos de proteínas asociadas a la transducción de señales mediada por BR y diferentes modelos que intentan explicar el modo de acción, sin embargo aún se desconocen los mecanismos moleculares por los cuales la planta responde a esta hormona [62, 74-76].

#### **1.4. LePRK1 y LePRK2**

Con el fin de identificar componentes del grano de polen involucrados en la interacción polen-pistilo, en el laboratorio se aislaron dos genes que codifican para proteínas receptoras quinasa (LePRK1 y LePRK2) específicas de grano de polen de *Solanum esculentum* VF 36 (tomate cultivado). Las secuencias aminoacídicas, deducidas de las nucleotídicas, presentan todas las características de los receptores quinasa: extremo extracelular, en estos casos con motivos LRR involucradas en interacción proteína-proteína; tracto transmembrana y porción citoplasmática con los dominios característicos de proteínas quinasa. En estudios posteriores se demostró que ambas

proteínas son específicas del grano de polen (no se expresan en otros tejidos), su expresión ocurre en los estadios más tardíos del desarrollo, aumentando la expresión de LePRK2 notablemente durante la germinación; y su localización en la membrana plasmática del tubo polínico indicaría que estarían involucradas en la interacción con los tejidos del pistilo. Además, se demostró *in vitro* que los dominios citoplasmáticos de ambas proteínas presentaban actividad quinasa cuando son expresadas heterológicamente, aunque sólo LePRK2 presenta actividad quinasa en microsomas de polen [77]. La incorporación de extractos de pistilo de tomate y no de hoja, a dicha reacción de fosforilación provocó una desfosforilación de LePRK2 que resultó ser específica, mientras que el patrón general de fosforilación de las demás proteínas de polen permanecía inalterado. Esto sugirió que al menos la fosforilación/desfosforilación de LePRK2 podría mediar alguna etapa en la interacción con los tejidos de pistilo [77].

También se ha demostrado, utilizando las técnicas de FPLC y coimmunoprecipitación, que ambas LePRKs se encuentran en la membrana del grano de polen y del tubo polínico formando un complejo de alto peso molecular (~ 400 kDa). Sin embargo, al germinar los granos de polen en presencia de extractos de pistilo de tomate, el complejo de alto peso molecular desaparece, dando lugar a la aparición de cada LePRK en su forma monomérica (~70 kDa). Esto último sugiere que uno o más componentes del pistilo serían los responsables de interactuar con los dominios extracelulares de ambas LePRKs, produciendo la desfosforilación específica de LePRK2 y la disociación del complejo de LePRKs [78].

En busca de ligandos extracelulares de las LePRKs, se rastrearon bibliotecas de ADNc de polen y pistilo de tomate mediante la técnica de dos híbridos en levaduras, utilizando como cebos los dominios extracelulares de las LePRKs (ECDs, *extracellular domains*). En el primer rastreo, se encontró a LAT52, entre otros candidatos. LAT52 se une al dominio extracelular de LePRK2 antes, pero no después de la germinación, por lo que actuaría en una forma autócrina y se cree que su interacción activaría una cascada de señales necesaria para la iniciación del crecimiento del tubo polínico [79]. Esta proteína ha sido profundamente caracterizada: LAT52 es requerida para la germinación *in vitro* y para lograr la fertilización *in vivo* [80]. La germinación *in vitro* de polen que expresa el gen antisentido para LAT52, resultó en un fenotipo más severo que cuando este polen se

utilizaba para polinizar estigmas salvajes [80]. Esta observación sugiere que la interacción de LAT52 con LePRK2 *in vivo* sería desplazada por algún otro ligando cuando el polen se deposita sobre el estigma, permitiendo la germinación.

Realizando nuevos rastreos de bibliotecas de cDNA de pistilo y polen de tomate, se encontraron al menos dos ligandos más para LePRKs [81]. Ambos se unen a los dominios extracelulares de LePRK1 y LePRK2, y serían extracelulares. Se nombraron LeSHY (número de acceso en GenBank: AY376852) y LeSTIG1 (número de acceso en GenBank: AY376851) de acuerdo a su similitud de secuencia con otras proteínas descritas anteriormente en petunia [82] y tabaco [83]. LeSHY es una proteína con alta expresión en polen maduro y germinado que posee un péptido señal N-terminal seguido de 10 LRR. La secuencia aminoacídica posee una identidad de secuencia del 69% con una proteína anteriormente llamada PGPS/D4 o SHY [82]. En petunia, la expresión de SHY aumenta en los primeros momentos del crecimiento del tubo polínico y es inducida por flavonoides, que son necesarios para la germinación del polen. Por otro lado, LeSTIG1 posee un péptido señal N-terminal y carece de secuencias de retención, es una proteína rica en cisteínas, y se expresa específicamente en la zona secretoria del estigma.

LeSTIG1 y LeSHY se unen ambas a ECD2 y ECD1. Fracciones enriquecidas en LAT52 desplazan la unión entre LeSHY y LePRK2, pero no la unión con LeSTIG1. Esto indicaría que LAT52, o algún otro compuesto presente en la muestra, tiene la capacidad de competir la interacción con LeSHY, pero no con LeSTIG1. Por otro lado, la interacción entre LAT52 y LePRK2 es competida eficazmente por LeSTIG1. En conclusión, LeSTIG1 tendría una afinidad mayor que LAT52 y LeSHY. Dado que LeSTIG1 es una proteína secretada, se analizó el efecto de un exudado de tomate sobre la interacción LePRK2-LAT52 y se observó que una fracción >3 kDa aún conservaba la capacidad de desplazar la interacción. La germinación de granos de polen en presencia de LeSTIG1, pero no LeSHY o LAT52, resultó en una estimulación del crecimiento con respecto al control en ausencia de agregados [81]. LeSTIG1 no modifica la orientación del crecimiento del tubo polínico, sino que lo estimula.

Con la misma técnica de doble híbrido en levaduras, se realizaron rastreos de bibliotecas de ADNc de polen, utilizando como cebo los dominios citoplasmáticos de LePRK1 y LePRK2. En estos experimentos, una de las proteínas aisladas correspondió a

KPP (*Kinase partner protein*). Se demostró que esta proteína interactúa *in vitro* con ambas quinasas, mientras que *in vivo* sólo lo hace con LePRK2. También se observó que estaría asociada a la membrana plasmática, aún cuando no presenta dominios transmembrana; y presentaría diferentes isoformas fosforiladas. La sobreexpresión de KPP en plantas, resultó en tubos polínicos de ápice globoso, muy similares a los que se observan por sobreexpresión de versiones constitutivamente activadas de ROP [46, 49, 52]. Trabajos posteriores indicaron que esta proteína corresponde a un nuevo grupo de ROPGEFs exclusivas de plantas [84].

Sin embargo, a pesar de encontrar al menos tres ligandos extracelulares para el complejo de LePRKs, aún se desconoce el componente presente en el extracto de pistilo que induce la desfosforilación específica de LePRK2, ya que las versiones recombinantes de LAT52 y LeSTIG1 no tuvieron efecto alguno sobre el estado de fosforilación de LePRK2 (experimentos realizados por el autor de esta tesis, no mostrados). En este trabajo, se exponen los resultados de la purificación y caracterización del compuesto responsable de la desfosforilación específica de LePRK2, y los efectos fisiológicos que este compuesto tiene sobre el crecimiento del tubo polínico. Los resultados obtenidos indicarían que este compuesto no sería ninguno de los encontrados anteriormente, sugiriendo que se trataría de un nuevo ligando del complejo de LePRKs que tiene efectos a nivel bioquímico y fisiológico.



## **2. Objetivos**

## **2. Objetivos**

Los objetivos de esta tesis fueron los siguientes:

1. Purificar y caracterizar el componente proveniente del pistilo capaz de promover la desfosforilación específica de LePRK2;
2. Determinar la naturaleza química y la estructura molecular del compuesto;
3. Determinar los efectos fisiológicos que provoca este compuesto sobre la germinación del grano de polen o el crecimiento del tubo polínico.

### **3. Capítulo 1: Respuestas bioquímicas del complejo de LePRKs a un compuesto proveniente del pistilo**

### 3.1. Introducción

Entre los más de 600 receptores quinasa identificados por homología de secuencia en el genoma de *Arabidopsis*, el grupo más grande está compuesto por aquellos que cuentan en sus dominios extracelulares de motivos LRR [85]. Es a través de los LRR que estos receptores unen los ligandos extracelulares e inician una cascada de transducción de señales río abajo, tal como se ha demostrado en el caso de FLS2 [86], el receptor del elicitor bacteriano flagelina; BRI1 y la unión de BR [65], y el receptor de fitosulfoquina [56, 87], etc. De forma general, la unión del ligando recluta al receptor otras proteínas de la membrana plasmática y del citoplasma, estimula la autofosforilación o la transfosforilación de las proteínas reclutadas, activando el sistema e iniciando la cascada de señales, tal como ocurre en sistemas animales como el de los receptores del TGF- $\beta$  (*transforming growth factor*) o EGF (*epidermal growth factor*) [60]. En la mayoría de los sistemas descritos hasta ahora, la activación del receptor desencadena la fosforilación de componentes citoplasmáticos río abajo.

En sistemas animales, a pesar de existir pocos miembros en cada familia de receptores quinasa, la capacidad de respuesta a distintas señales extracelulares se ve aumentada por la formación de diferentes heterooligómeros, que a su vez activan componentes intracelulares particulares de cada cascada [60, 88]. En plantas, se ha observado la formación de heterooligómeros en el caso de receptores como CLV1 [61, 89], *Arabidopsis* CRINKLY4 (ACR4), involucrado en el desarrollo embrionario [90]; y BRI1. En el caso de BRI1, se ha demostrado su heterooligomerización con BAK1 *in vivo* [66] y cuando se expresaron en protoplastos de arveja [91] o en levaduras [67]. Aunque recientemente se ha demostrado que del mismo modo que ocurre en los sistemas animales, BRI1 forma *in vivo* homodímeros en ausencia del ligando, y sólo interactúa con BAK1 luego de unir BR [68, 92]. La posibilidad que los receptores de plantas actúen como los de animales, formando diferentes complejos dependiendo del ligando que unan y transduciendo señales distintas está siendo investigada. El principal obstáculo es el desconocimiento de los ligandos para la mayoría de los receptores que ya han sido caracterizados. Hasta el momento, se han descrito al menos dos ejemplos de receptores

con promiscuidad de ligandos: BRI1 y el complejo de LePRKs. Se ha demostrado que tBRI1 (*tomato* BRI1) no solo une BR, sino que además es uno de los receptores de sistemina [69, 70, 93]. Recientemente se describió la interacción de BAK1 con los receptores FLS2 y EFR (factor de elongación Tu), involucrados en la defensa contra patógenos, en un camino independiente de la percepción de BR [94, 95]. En ambos casos, la unión al ligando parecería no depender de la presencia de BAK1, pero sí la transducción de la señal. Por otro lado, tal como se explicó anteriormente, LAT52, LeSTIG y LeSHY han sido identificados como proteínas que interactúan con los dominios extracelulares de las LePRKs y se encontró que los dos primeros participan en el control del crecimiento del tubo polínico [79, 81].

El complejo de LePRKs parecería actuar de un modo distinto a los sistemas de transducción de señales mencionados al menos en tres aspectos. En primer lugar, LePRK1 y LePRK2 forman heterooligómeros en la membrana plasmática del grano de polen maduro antes de percibir cualquier señal proveniente del pistilo [78]. En segundo lugar, LePRK2 se encuentra fosforilada en ausencia de ligandos del tejido femenino [77]. Por último, en presencia de un ligando proveniente del pistilo, LePRK2 se desfosforila específicamente y el complejo de LePRKs se separa en sus monómeros, probablemente iniciando la cascada de transducción de señales [77, 78]. En plantas, el único ejemplo de un sistema de transducción que en ausencia de ligando se encuentra formando un complejo proteico de alto peso molecular, corresponde al sistema de autoincompatibilidad (*SI, self incompatibility*) de las Brasicáceas [96]. Inmediatamente antes de la antésis, se expresan dos proteínas que corresponden a los determinantes femeninos de la SI: una proteína glicosilada extracelular SLG (*S-locus glycoprotein*) y una proteína quinasa SRK (*S-locus receptor kinase*), anclada a membrana plasmática y con su porción extracelular similar a SLG. Ambas muestran diversidad de secuencia alélica dentro de cada haplotipo S. El complemento masculino de la SI corresponde a SP11/SCR (*S-locus protein 11/S-locus cystein rich*), un péptido de secuencia altamente variable, secretado, de peso molecular menor a 10 kDa, básico y rico en cisteínas. En la membrana plasmática de las células estigmáticas, SRK y SLG forman un complejo de alto peso molecular permitiendo la unión de SCR. Al unir un SCR del mismo haplotipo, se induce la autofosforilación de SRK y se inicia la cascada de señales implicada en el

rechazo del polen propio. Pero esto contrasta con lo que ocurre en polen de tomate con el complejo de LePRKs, donde la cascada de señales comenzaría con la desfosforilación de LePRK2 receptor acompañado por una disociación del complejo de LePRKs.

En este capítulo, mostramos que LePRK1 y LePRK2 interactúan aún cuando son expresados heterológamente en levaduras, y que además se disocian en presencia de extractos o exudados de estigma-estilo de tomate como lo hacen en polen. Por otra parte, los resultados de una breve caracterización bioquímica del extracto de estigma-estilo, sugieren que el o los compuestos presentes en el pistilo causantes de la desfosforilación específica de LePRK2 y la disociación de la interacción LePRK1-LePRK2 serían diferentes a los ligandos previamente caracterizados (LAT52, LeSTIG, LeSHY). De acuerdo a esta caracterización, este compuesto sería resistente a altas temperaturas, tendría un peso molecular comprendido entre 3-10 kDa y estaría presente en el apoplasto tanto de tomate como de *Nicotiana tabacum* (tabaco) [78].

## 3.2. Materiales y Métodos

### 3.2.1. Material vegetal utilizado

El polen maduro de tomate se obtuvo por vibración de las anteras de *Solanum lycopersicon* L. cv. VF36 (*Lycopersicon esculentum*, Miller; tomate cultivado) crecido a 28°C y con 16 horas de luz. La mayor cantidad de polen maduro se obtuvo de aquellas flores de tomate que se encontraban abiertas y con los pétalos curvados hacia la base del pedicelo, y que además presentaban el estigma ligeramente por debajo de la apertura del tubo conformado por las anteras fusionadas (ver flecha blanca en la Figura 3.1). Las



**Figura 3.1: Flores de *Solanum lycopersicon* L. (Miller).**

[www.funet.fi/pub/sci/bio/life/plants/magnoliophyta/magnoliophytina/magnoliopsida/solanaceae/lycopersicon/esculentum-1a.jpg](http://www.funet.fi/pub/sci/bio/life/plants/magnoliophyta/magnoliophytina/magnoliopsida/solanaceae/lycopersicon/esculentum-1a.jpg)

flores seleccionadas fueron manualmente colectadas de las plantas y almacenadas en bolsas de papel hasta el momento de vibrar las anteras. Para recoger el polen, el cáliz y la corola se retrajeron sobre el pedicelo y la apertura del tubo conformado por las anteras se

dispuso sobre la boca de un microtubo de 1,5 ml. Cuidadosamente, se hicieron vibrar las anteras tocando con el *vortex* de mano encendido la base de las mismas. Se colectaron 200  $\mu$ l de polen por microtubo proveniente de un *pool* de flores y cada tubo fue inmediatamente congelado en nitrógeno líquido y almacenado a  $-80^{\circ}\text{C}$ . De las flores ya utilizadas se diseccionó la parte superior del pistilo (estigma y estilo), que también fue conservada a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Los pistilos de tabaco se obtuvieron de *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi D8 crecidas a  $28^{\circ}\text{C}$  y con 16 horas de luz. Se colectaron estigma-estilo de aquellas flores de tabaco en preantesis, cuando la flor había alcanzado el tamaño máximo; y en antesis, siempre que el tejido no estuviese oxidado. El tejido se almacenó a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### **3.2.2. Fraccionamiento y purificación de microsomas de polen maduro de tomate**

En un homogenizador vidrio-vidrio tipo Tenbroeck (7 ml, Kontes) se resuspendieron a  $4^{\circ}\text{C}$   $\sim 50$   $\mu$ l de polen maduro en 500  $\mu$ l de *buffer* de Lisis para polen (BLP). Para romper los granos de polen, se realizaron cinco ciclos de 1 minuto de homogenización. Entre cada ciclo, se mantuvo el homogenizador en un baño agua-hielo por al menos 2 minutos con el fin de minimizar el recalentamiento de la muestra por la fricción. Luego de la ruptura, el homogenato se transfirió a un microtubo de 1,5 ml. El homogenizador se enjuagó con 500  $\mu$ l de BLP y este sobrenadante también se transfirió al microtubo. El homogenato completo se centrifugó a 10.000 xg por 15 min a  $4^{\circ}\text{C}$ . El sobrenadante conteniendo principalmente microsomas, ribosomas y proteínas citoplasmáticas fue transferido a un tubo para ultracentrífuga. La muestra se centrifugó a 100.000 xg por 90 min a  $4^{\circ}\text{C}$ . El sobrenadante ( $S_{100}$ ) se reservó aparte y el *pellet* conteniendo la fracción microsomal se transfirió a un microtubo de 1,5 ml y se agregó BLP suplementado con 0,5% de NP-40 (concentración final, BLP+NP-40). Utilizando microbarras magnéticas (10 mm x 3 mm), se agitó la muestra en un baño agua-hielo por 60 min hasta resuspender completamente. Luego, se centrifugó a 10.000 xg por 10 min a  $4^{\circ}\text{C}$ , y se conservó el sobrenadante. En todos los casos, se agregó BLP+NP-40 para lograr una concentración igual o menor que 15 mg/ml, con el fin de evitar la formación



de agregados. El  $S_{100}$  y el *pellet* resuspendido ( $P_{100}$ ) de ultracentrifugación se fraccionaron, congelaron y conservaron en ultracongeladora ( $-80^{\circ}\text{C}$ ). La determinación de proteínas se realizó por el método de BCA de acuerdo a las especificaciones del fabricante (Pierce) o Bradford ambos modificados para microplacas [97].

Buffer de Lisis para polen (BLP):

50 mM Tris-HCl pH 7,5.

50 mM NaCl.

1 mM EDTA pH 8,0.

1X *Cocktail* de Antiproteasas (Complete EDTA-free: PMSF, Pefabloc SC, Pefabloc SC Plus, Aprotinina, Leupeptina,  $\alpha_2$ -macroglobulina y E-64; Roche).

### 3.2.3. Ensayo de fosforilación

Primero, se preparó un *stock* conteniendo *buffer* de fosforilación 1X y 15  $\mu\text{g}$  de proteínas de  $P_{100}$ /reacción. Cada muestra de extracto/exudado (tratado o no) se llevo a un mismo volumen con el *buffer* que correspondiera según el caso y/o agua. Luego, se les incorporó *buffer* de fosforilación para lograr una concentración final de 1X. El ensayo comenzó con el agregado de 0,125  $\mu\text{Ci}$  de  $^{32}\text{P}\gamma\text{ATP}$ /reacción al *stock*, mezclando inmediatamente y administrándolo a cada muestra (6  $\mu\text{l}$ ). Las reacciones se incubaron por 10 min a temperatura ambiente ( $25\text{-}30^{\circ}\text{C}$ ) y el ensayo se detuvo con el agregado de *Cracking buffer* 5X. Las muestras se calentaron 3-5 min a  $100^{\circ}\text{C}$ , se centrifugaron por 3 min a 10.000 xg y las proteínas en los sobrenadantes se separaron por electroforesis desnaturante en geles de poliacrilamida con SDS en geles de 8% (sección 3.2.4).

Buffer de fosforilación 5X:

250 mM HEPES.

10 mM  $\text{MnCl}_2$ .

10 mM  $\text{MgCl}_2$ .

5 mM  $\text{CaCl}_2$ .

5 mM Ditioneína (DTT).

Cracking Buffer 5X:

10% SDS.

50% Glicerol.

25%  $\beta$ -mercaptoetanol.

125 mM Tris-HCl pH 7,4.

0,004% Azul de bromofenol.

### **3.2.4. Electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE)**

Los SDS-PAGE que se realizaron en esta tesis respetaron el siguiente protocolo. Las separaciones electroforéticas se llevaron a cabo a 15 mA por gel hasta que las muestras atravesaran el gel concentrador, y luego se elevó la corriente hasta 30-35 mA por gel, dejando escapar el frente de corrida hasta el marcador de proteínas de 32,5 kDa. Los geles se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Hybond® ECL®, GE Healthcare) por el método de transferencia semiseca. Para obtener la señal radiactiva, se utilizó el sistema de autorradiografías sin film Storm® 820 PhosphorImager (GE Healthcare).

### **3.2.5. Cepa de levaduras, condiciones de crecimiento e inducción de expresión de proteínas heterólogas**

Para la expresión heteróloga de LePRK1 y LePRK2 en *Saccharomyces cerevisiae*, se utilizaron dos cepas existentes en el laboratorio: ScK1K2 y ScWT. Ambas corresponden a la cepa BJ2168 (MATa *prc1-407 prb1-1122 pep4-3 leu2 trp1 ura3-52 gal2*) conteniendo o no los genes de LePRK1 y LePRK2, respectivamente. La cepa ScK1K2 lleva los vectores de expresión en levaduras YCpIF3(LEU2)-LePRK1-c-myc,

YCpIF6(URA3)-LePRK2-glu-glu e YCpIF12(TRP1) [reservado para la expresión de una tercera proteína adicional en caso de ser necesario]. Estos vectores poseen elementos necesarios para su propagación en bacterias (origen de replicación y gen de selección) y levaduras (secuencia ARS1 de replicación, centrómero y gen marcador de selección). Además, estos vectores tienen un sitio de multiclonado río abajo del promotor GAL1, inducible por galactosa [98]. Los genes fueron fusionados a las señales c-myc (LePRK1) o glu-glu (LePRK2) para su detección con anticuerpos comerciales desarrollados contra estos epítopes. Las levaduras ScWT llevan la misma serie de vectores pero vacíos.

Los cultivos de levaduras se iniciaron inoculando 50 ml de medio líquido sintético definido suplementado con aminoácidos (sin Leucina ni Triptofano), bases nitrogenadas (sin Uracilo), y glucosa 2% (SD+DO-LUW+Glucosa) con levaduras crecidas en el mismo medio sólido. Las levaduras se crecieron en *erlenmeyers* de 250 ml por 3 días a 30°C y 200 rpm de agitación. El medio de cultivo se renovó al final del segundo día. Al tercer día, el medio se reemplazó por SD+DO-LUW suplementado con galactosa (2%), en vez de glucosa. La inducción se realizó por 16 horas a 30°C y 200 rpm de agitación. En todos los casos que se reemplazó el medio o cuando terminó la inducción, los cultivos se centrifugaron a 3.000 xg por 8 min a temperatura ambiente en tubos de 50 ml. Los *pellets* celulares inducidos se usaron inmediatamente o se conservaron a -20°C hasta su utilización.

#### Medio Sintético Definido líquido (SD):

1,7 g base nitrogenada para levaduras, sin aminoácidos ni sulfato de amonio (Difco).

5 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

H<sub>2</sub>O desionizada en csp 820 ml.

El medio se ajusta a pH 5,8 y se autoclava.

Para el medio SD sólido, se agrega agar hasta una concentración final de 1,5% p/v.

#### Solución Dropout 10X (DO 10X):

La composición del DO 10X que se utilizó corresponde al de la tabla 3.1, omitiendo los componentes resaltados en gris (Leucina, Uracilo y Triptofano). Para 1 litro de DO 10X, se pesan todos los aminoácidos necesarios de acuerdo a la Tabla 3.1 y se disuelven en

920 ml de agua. Se omiten el L-ácido Aspártico y la L-Treonina. La solución se autoclava. Cuando la solución autoclavada está fría, se agregan en esterilidad 64 ml de una solución de L-Treonina 3,125% y 16 ml de la solución de L-ácido Aspártico 6,25%, ambas esterilizadas por filtración. La solución se mezcla y fracciona en tubos estériles de 50 ml y se conserva a 4-8 °C.

COMPONENTE	mg/litro
L-Isoleucina	300
L-Valina	1500
L-Adenina	200
L-Arginina HCl	200
L-Histidina HCl monohidrato	200
L-Leucina	1000
L-Lisina HCl	300
L-Metionina	200
L-Fenilalanina	500
L-Treonina*	2000
L-Triptofano	200
L-Tirosina	300
L-Uracilo	200
L-Acido Glutámico	1000
L-Acido Aspártico*	1000
L-Serina	4000

(\*) Aminoácidos no autoclavables

**Tabla 3.1. Composición de la solución Dropout 10X.**

Glucosa 25%:

25 g Dextrosa anhidra.

H<sub>2</sub>O desionizada csp 100 ml.

La solución se autoclava.

La solución puede prepararse más concentrada (hasta 50%). En tal caso, se debe corregir el medio SD para el volumen de glucosa que se va a utilizar. La solución se conserva a 4-8°C.

#### Galactosa 25%:

25 g Galactosa.

H<sub>2</sub>O desionizada csp 100 ml. La solución se termina de disolver calentando al microondas o en un agitador magnético con calor.

La solución se autoclava.

Soluciones de concentraciones mayores a 25% son difíciles de obtener dado que la galactosa no se disuelve. La solución se conserva a 4-8°C.

### **3.2.6. Fraccionamiento y purificación de microsomas de levaduras**

Cada *pellet* de levaduras se resuspendió en 2 volúmenes de *buffer* de Ruptura de levaduras (BRL) frío y se agregaron 4 volúmenes de bolitas de vidrio de 0,5 mm de diámetro frías (Sigma). Para romper las levaduras, se realizaron 5 ciclos de agitación de 1 min con *vortex* a máxima velocidad. Entre cada ciclo, se mantuvo el tubo de 50 ml en un baño agua-hielo por al menos 2 min con el fin de minimizar el recalentamiento de la muestra. Luego de la ruptura, el homogenato se transfirió a un tubo de vidrio para centrífuga con micropipeta automática, para evitar el pasaje de las bolitas. Las bolitas de vidrio se enjuagaron con 7 volúmenes de BRL, invirtiendo el tubo 10 veces y dejando reposar en agua-hielo hasta que éstas decanten. El lavado se transfirió al mismo tubo de centrífuga. El homogenato se centrifugó a 10.000 xg por 15 min a 4°C. El sobrenadante conteniendo principalmente microsomas, ribosomas y proteínas citoplasmáticas se transfirió a un tubo para ultracentrífuga. La muestra se centrifugó a 100.000 xg por 90 min a 4°C. El *pellet* conteniendo los microsomas se transfirió a un vial de vidrio de fondo plano de 4 ml de capacidad y se resuspendió en *buffer* RIPA modificado utilizando microbarras magnéticas (10 mm x 3 mm). Se agitó la muestra en un baño agua-hielo por 1 hora hasta resuspensión completa. Al igual que en la sección 3.2.2, las concentraciones

de proteínas se mantuvieron a una concentración igual o menor que 15 mg/ml. El *pellet* resuspendido (P<sub>100</sub>) de ultracentrifugación se fraccionó, congeló y conservó a -80°C. La determinación de proteínas se realizó por el método de BCA modificado para microplacas de acuerdo a las indicaciones del fabricante (Pierce).

Buffer de Ruptura de levaduras (BRL):

20 mM Tris-HCl pH 8,0.

10 mM MgCl.

1 mM EDTA pH 8,0.

5% Glicerol.

1 mM DTT.

300 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

1X *Cocktail* de Antiproteasas.

Buffer RIPA modificado

50 mM Tris-HCl pH 7,4.

150 mM NaCl.

1% NP-40.

0,1% SDS.

### **3.2.7. Preparación de extractos y exudados de estigma-estilo**

El extracto de estigma-estilo se preparó homogenizando 30 estigmas-estilos de tomate o 4 estigma-estilos de tabaco en 500 µl de Tris-HCl 50 mM (pH 7,4) con homogenizador de vidrio-vidrio tipo Micro Duall (3 ml, Kontes). El homogenato se centrifugó a 10.000 xg por 10 min a 4°C y el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo.

El exudado de estigma-estilo se preparó cortando transversalmente 8 estigma-estilos de tabaco en secciones de 5 mm de largo e incubando las secciones en 1 ml de Tris-HCl 50 mM (pH 7,4) por 24 horas en agitación a 4°C. El sobrenadante se centrifugó

a 12.000 xg durante 5 minutos. El sobrenadante clarificado correspondiente al exudado final, se transfirió a un tubo nuevo.

Para ambos casos, con el fin de normalizar la cantidad de extracto a utilizar se cuantificó la concentración de proteínas por el método de BCA (Pierce) modificado para microplacas de acuerdo a las indicaciones del fabricante.

El tratamiento de calentamiento del extracto de estigma-estilo consistió en incubar la muestra por 15 min a 95°C, seguido de una centrifugación por 10 min a 10.000 xg para retirar los precipitados. El sobrenadante se utilizó en los ensayos.

Para las separaciones por ultrafiltración, se utilizaron los filtros Microcon® YM-3 e YM-10 (Millipore), cuyos límites de exclusión son 3 kDa y 10 kDa respectivamente. Se siguieron las indicaciones del fabricante para su utilización.

### **3.2.8. Ensayos de coimmunoprecipitación y *western blot* de microsomas de levaduras**

En cada tubo de reacción de coimmunoprecipitación se colocaron 750 µg de proteínas del extracto de microsomas de levaduras ScWT o ScK1K2, y se completó con *buffer* RIPA modificado hasta un volumen final de 400 µl. A cada tubo se agregaron 1-2 µl de Anticuerpo *anti-glu-glu* (Covance) que reconoce el epítipo fusionado a LePRK2; las reacciones se incubaron a 4°C durante 2 horas con agitación suave. Los tubos se centrifugaron a 1.000 xg por 5 min y el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo. Posteriormente, se agregaron 100 µl de una suspensión al 10% v/v de Proteína A-Sefarosa (Sigma) prehidratada en *buffer* RIPA modificado y se incubó por 1 hora con agitación suave. Las bolitas de sefarosa unidas al inmunocomplejo se separaron por centrifugación a 800 xg durante 1 min. El sobrenadante se descartó y el *immunopellet* se lavó con 1 ml de *buffer* RIPA modificado frío y se incubó con agitación suave por 10 min a 4°C. Este proceso se repitió 3 veces. El *immunopellet* final (ya lavado) se resuspendió en 2X *Cracking buffer*, se agitó vigorosamente con *vortex* por 1 min, se calentó por 5 min a 100°C y se agitó nuevamente con *vortex* por 1 min. Las muestras se centrifugaron por 5

min a 10.000 xg y las proteínas de los sobrenadantes se separaron electroforéticamente por SDS-PAGE en geles de 8% (condiciones de electroforesis en sección 3.2.4).

En los casos que se evaluó el efecto del extracto de estigma-estilo, exudado o extracto de estigma-estilo tratado, se preincubaron los microsomas de levaduras con las muestras de pistilo a ensayar por 30 min a 4°C con agitación suave. Luego, se agregó el anticuerpo y se prosiguió el protocolo como se menciona más arriba.



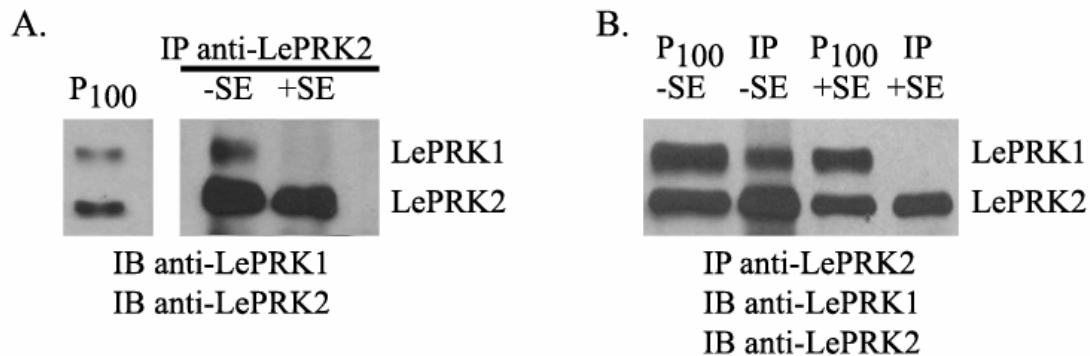
### 3.3. Resultados

#### 3.3.1. Disociación de la interacción LePRK1-LePRK2 en levaduras mediada por extractos de estigma-estilo

Como se detalla en la Introducción, en el laboratorio hemos demostrado la interacción de LePRK1 y LePRK2 mediante coimmunoprecipitación en fracciones microsomales de polen maduro y levaduras ScK1K2. Esto último sugiere que otras proteínas de polen no serían necesarias para la interacción. También demostramos que la presencia de extractos de estigma-estilo en el medio de germinación de polen de tomate indujo la disociación del complejo de alto peso molecular donde se encuentran LePRK1 y LePRK2 [78]. Sin embargo, no sabíamos si esta disociación de la interacción entre LePRK1 con LePRK2 en polen era consecuencia de la percepción del compuesto presente en el extracto de estigma-estilo por parte de algunos de los dos receptores quinasa, o una consecuencia indirecta de la percepción de la señal por parte de alguna otra proteína que podría formar parte del complejo de polen. Para responder esta pregunta, utilizamos las levaduras ScK1K2 y analizamos la estabilidad de la interacción entre LePRK1 y LePRK2 en presencia del extracto de estigma-estilo y en ausencia de cualquier otra proteína de polen.

En principio, decidimos analizar la respuesta de esferoplastos o levaduras enteras ScK1K2 inducidas con galactosa frente a la presencia de extractos de estigma-estilo de tomate. Para ello, se incubaron levaduras ScK1K2 ya inducidas con galactosa con extractos de estigma-estilo de tomate o con el mismo volumen de Tris-HCl 50 mM (pH 7,4) por 10 min a 30°C. Luego de la incubación, purificamos microsomas y realizamos un ensayo de coimmunoprecipitación utilizando anticuerpos *anti-glu-glu* dirigidos contra el epítipo fusionado a LePRK2. En algunos de los experimentos, pudimos observar un efecto negativo del extracto de estigma-estilo sobre la estabilidad de la interacción entre LePRK1 y LePRK2. Es decir, cuando las levaduras ScK1K2 inducidas con galactosa se incubaban con extractos de estigma-estilo, LePRK1 no estaba en el *inmunopellet* (resultados no mostrados). Para confirmar este resultado, reformulamos el experimento.

Decidimos realizar un experimento donde analizamos el efecto de un extracto de estigma-estilo en fracciones microsomales de levaduras ScK1K2 inducidas con galactosa. Se incubó la misma cantidad de proteínas microsomales de levaduras ScK1K2 en ausencia o presencia de un extracto de estigma-estilo de tomate por 30 min a 4°C, para luego proseguir con el protocolo de coimmunoprecipitación utilizando el anticuerpo *anti-glu-glu*. En estas condiciones, pudimos observar que la señal correspondiente a LePRK1 en el inmunopellet desapareció cuando los microsomas eran preincubados con extracto (figura 3.2.A). Este mismo resultado se obtuvo al utilizar extracto de estigma-estilo de tabaco en lugar de tomate (figura 3.2.B). Este resultado indica que la estabilidad de la interacción entre LePRK1 y LePRK2 disminuye en presencia del extracto, sugiriendo que éste presenta algún compuesto que tiene acción directa sobre la interacción LePRK1-LePRK2. De acuerdo a las observaciones en esferoplastos de levaduras ScK1K2 inducidas con galactosa, este efecto ocurriría a través de los dominios extracelulares de las LePRKs. Además, no serían necesarias otras proteínas provenientes del polen para percibir la señal e inducir la disociación de la interacción, ya que la expresión de solamente LePRK1 y LePRK2 es suficiente para disociarse en presencia del extracto. Por otro lado, dado que el extracto de estigma-estilo de tabaco también indujo la disociación



**Figura 3.2: A. Disociación de la interacción LePRK1-LePRK2 mediada por extracto de estigma-estilo de tomate en microsomas de levaduras ScK1K2. B. Disociación de la interacción LePRK1-LePRK2 mediada por extractos de estigma-estilo de tabaco en microsomas de levaduras ScK1K2.**

*IB anti-LePRK1*, western blot con anticuerpos específicos contra LePRK1; *IB anti-LePRK2*, western blot con anticuerpos específicos contra LePRK2; *IP*, inmunoprecipitación; *IP anti-LePRK2*, IP con anticuerpos dirigidos contra el epítipo *glu-glu* de LePRK2; *SE*, extracto de estigma-estilo; *P<sub>100</sub>*, microsomas de levaduras ScK1K2.

de la interacción, se podría sugerir que otras Solanáceas además del tomate podrían poseer el mismo compuesto en sus estigmas-estilos.

Con el fin de determinar si el compuesto presente en tabaco conserva las mismas funciones que el de tomate, decidimos comprobar si el extracto de estigma-estilo y el exudado de tabaco eran capaces de desfosforilar LePRK2.

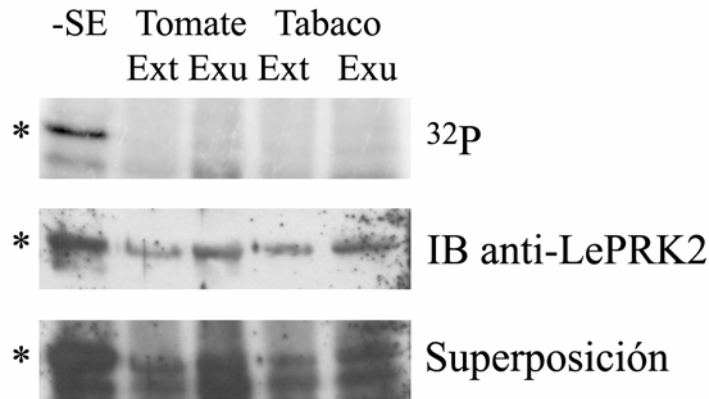
### **3.3.2. Desfosforilación de LePRK2 mediada por extractos y exudados de estigma-estilo**

Realizamos el ensayo de fosforilación de LePRK2 en presencia de extractos de estigma-estilo de tomate o tabaco con el fin de analizar la respuesta de los microsomas de polen a dos extractos de diferentes Solanáceas. En la Figura 3.3, podemos observar que tanto el extracto de tomate como el de tabaco tienen la capacidad de desfosforilar específicamente a LePRK2 en las mismas condiciones de reacción.

Posteriormente, quisimos determinar si la actividad de desfosforilación de LePRK2 se encontraba presente en exudados de estigma-estilo. En el caso que así fuera, entonces estaríamos en presencia de un compuesto apoplástico posiblemente en el tracto transmisor del estigma y estilo en estrecho contacto con el tubo polínico en crecimiento. Para realizar este experimento, repetimos los ensayos de fosforilación, utilizando exudados de estigma-estilo de tabaco. En la figura 3.3, se observa que el exudado conserva la capacidad de inducir la desfosforilación de LePRK2. Por lo tanto, podemos concluir que el compuesto responsable tiene localización apoplástica y que podría ser obtenido libre de contaminaciones intracelulares.

Concluyendo, los extractos de tomate y tabaco utilizados presentaban ambos la capacidad de inducir la disociación de la interacción entre LePRK1 y LePRK2 en levaduras, y desfosforilación de LePRK2. Entonces, decidimos iniciar una caracterización y purificación del compuesto responsable de estas actividades. En adelante, decidimos trabajar con los estigmas-estilos de tabaco dado que esta planta presenta ventajas operativas frente a la planta de tomate: el estigma-estilo de tabaco es unas 20 veces más grande que el de tomate, se pueden cultivar más plantas de tabaco por

unidad de área, son de más fácil mantenimiento y se pueden obtener más flores de tabaco en un menor tiempo.



**Figura 3.3: Desfosforilación de LePRK2 mediada por extractos (*Ext*) o exudados (*Exu*) de Tomate o Tabaco.**  $^{32}P$ , autorradiografía; IB anti-LePRK2, western blot utilizando un anticuerpo específico contra el dominio extracelular de LePRK2. El asterisco (\*) indica la señal correspondiente a LePRK2.

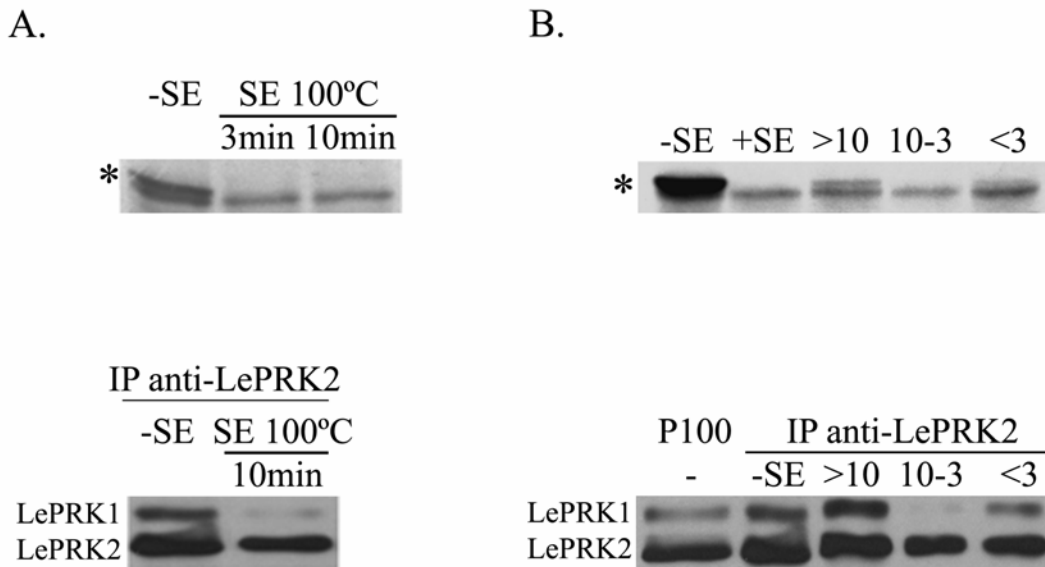
### 3.3.3. Breve caracterización de MrX, el componente activo del estigma-estilo

La disociación de la interacción entre LePRK1 y LePRK2, y la desfosforilación de LePRK2 podrían producirse en respuesta a más de un compuesto distinto. Con el fin de simplificar el modelo de trabajo y hasta encontrar evidencias que demostraran lo contrario, decidimos nombrar como **MrX** al compuesto responsable de ambas actividades presente en estigmas-estilo de tomate y tabaco.

Como primer paso de caracterización, estudiamos la capacidad de MrX de resistir tratamientos térmicos (100°C). En principio, calentamos el extracto de estigma-estilo a 100°C a diferentes tiempos y lo utilizamos en el ensayo de fosforilación de LePRK2. En la Figura 3.4.A (panel superior), podemos observar que para dos tiempos diferentes, el extracto tratado aún fue capaz de desfosforilar LePRK2. En otros ensayos no mostrados, también pudimos determinar que MrX resiste tratamientos a 100°C por más de 24 horas. El extracto calentado también fue ensayado en la disociación de la interacción entre LePRK1 y LePRK2. En la Figura 3.4.A (panel inferior), observamos que luego del

tratamiento de calentamiento, MrX aún está activo. De acuerdo a estos dos resultados, podemos afirmar que MrX resiste tratamientos térmicos a alta temperatura.

Un segundo paso de caracterización consistió en realizar una separación por peso molecular aparente del extracto mediante la técnica de ultrafiltración. Utilizamos dos unidades de ultrafiltración con límites de exclusión de 10 y 3 kDa. Obtuvimos 3 fracciones: compuestos mayores a 10 kDa, de 3 a 10 kDa y menores a 3 kDa. Estas fracciones fueron ensayadas en su capacidad de desfosforilar a LePRK2 y disociar la interacción de LePRK1 y LePRK2. En la Figura 3.4.B (paneles superior e inferior) se observa que la misma fracción es responsable de ambas actividades. Por lo tanto, MrX tendría un peso molecular aparente comprendido entre 3 y 10 kDa.



**Figura 3.4: Desfosforilación de LePRK2 en microsomas de polen y disociación de la interacción LePRK1-LePRK2 expresadas en levaduras, mediada por MrX sometido a 100°C (A) o ultrafiltración (B).** Los paneles superiores muestran los resultados del ensayo de fosforilación, mientras que los inferiores corresponden a los resultados de las coimmunoprecipitaciones. *SE*, extracto de estigma-estilo de tabaco. *IP anti-LePRK2*, inmunoprecipitación con anticuerpos *anti-glu-glu*; *>10*, peso molecular mayor a 10 kDa; *10-3*, peso molecular entre 10 y 3 kDa; *<3*, peso molecular menor a 3 kDa. *P100*, fracción microsomal de levaduras *ScK1K2*. El asterisco (\*) indica la señal correspondiente a LePRK2.

### 3.4. Conclusiones

Los granos de polen tienen la capacidad de hidratarse, germinar y producir un tubo polínico en un medio de cultivo definido *in vitro*. En estas condiciones, hemos demostrado que en granos de polen de tomate en crecimiento, LePRK1 y LePRK2 tienen la capacidad de formar un complejo de alto peso molecular que responde bioquímicamente a la presencia de algún compuesto proveniente del pistilo. Cuando los granos de polen son germinados en presencia de extractos de estigma-estilo de tomate, el complejo de alto peso molecular se disocia liberando sus componentes monoméricos. Por otra parte, LePRK2, que se encuentra fosforilada en microsomas de polen, responde a la presencia de SE mediante una desfosforilación específica [78].

En este capítulo, hemos descrito el sistema heterólogo en levaduras que nos permitió reproducir la interacción entre LePRK1 y LePRK2 como ocurre en el grano de polen. Previamente, hemos utilizado este sistema para demostrar que la interacción entre LePRK1 y LePRK2 requiere sólo de estas dos proteínas para ser establecida. Aquí, hemos demostrado que en presencia de sólo estos dos receptores quinasa, el extracto de estigma-estilo induce la disociación de dicha interacción. Esto indicaría que la percepción de la señal proveniente del exudado ocurriría sólo a través de LePRK1 y/o LePRK2. Sin embargo, no se puede descartar que alguna proteína de la levadura pueda participar en el establecimiento o la estabilización de la interacción entre ambas proteínas heterólogas, o que participen en la disociación de esta interacción mediada por el extracto de estigma-estilo.

Lamentablemente, el sistema de levaduras no nos ha permitido reproducir la fosforilación de LePRK2. Probablemente, esto se deba a la ausencia de alguna proteína de polen o a la presencia de un entorno diferente al requerido para que esta modificación ocurra. Por lo tanto, este ensayo de actividad debió continuar realizándose en microsomas de polen.

Utilizando los dos ensayos mencionados, se ha podido caracterizar brevemente a MrX. Este compuesto posee un peso molecular aparente de entre 3 y 10 kDa; y, además es resistente a tratamientos térmicos a 100°C. MrX puede ser aislado de exudados de la

porción superior del pistilo (estigma y estilo), implicando que sería un molécula soluble del apoplasto. El tracto transmisor del estilo es un tejido secretor que brindaría todos los requerimientos nutricionales y las señales apropiadas para estimular y orientar el crecimiento del tubo polínico hasta alcanzar el ovario [99]. Una vez allí, señales generadas en los óvulos estarían implicadas en la atracción de los tubos polínicos a los sacos embrionarios [100]. Esto sugiere que el tubo polínico en crecimiento por el tracto transmisor del estigma y el estilo, se encontraría con MrX, un posible ligando del complejo de LePRKs. Este encuentro desembocaría en cambios bioquímicos en el tubo polínico, en la transducción de una señal intracelular y la modificación de algún proceso relacionado al crecimiento o la orientación del tubo. El hecho que existe un complejo proteico que percibe a MrX y responde a él fisiológica y bioquímicamente, sugeriría que este compuesto no sería un sustrato nutricional para el tubo polínico (ver capítulo 3).

Cabe mencionar que las actividades descritas para MrX (la desfosforilación de LePRK2 y la disociación de la interacción para MrX), han sido encontradas tanto en estigma-estilos de tomate como de tabaco. No es sorprendente que esto sea así, ya que tomate y tabaco pertenecen a la misma familia taxonómica (Solanáceas). Además, se ha reportado la presencia de proteínas homólogas a LePRK1 y LePRK2 en tabaco, además de otras especies (Figura 3.5.A y B) [101]. En tomate, hemos desarrollado exitosamente anticuerpos específicos dirigidos contra los dominios extracelulares de LePRK1 y LePRK2 que no muestran reactividad cruzada, aún cuando estos dominios poseen un ~54% de identidad y un ~70% de similitud. Utilizando estos anticuerpos, hemos tratado infructuosamente de detectar las proteínas homólogas en microsomas de polen maduro de tabaco, que presentarían una alta identidad con los receptores de tomate (en base a las secuencias parciales disponibles, ver figura 3.5.B). Existen diferentes motivos que puedan explicar por qué sólo se han obtenidos resultados negativos en estos experimentos. En principio, la falta de reacción con los anticuerpos puede deberse sencillamente a la altísima especificidad de los mismos con sus respectivos antígenos de tomate. Por otro lado, podría existir una diferencia temporal en la expresión de las proteínas homólogas a LePRK1 y LePRK2 en tabaco, no estando presente en polen maduro pero sí en polen germinado. También el título de cada una de ellas en polen maduro podría ser menor que en tomate, y esto en conjunto con la alta especificidad del anticuerpo podría ser suficiente

para no detectarlas. En las muestras de polen maduro, tampoco se han podido identificar proteínas que se desfosforilen diferencialmente en presencia de extracto de estigma-estilo de tabaco (resultados no mostrados).

## A

```

LePRK1      MSVAYRYSNHNRRHHHHHLLILFVLLLQVIVPIKSDNNEAEILLRFKSLQKNDATAN-W 59
NtPRK1      -----
LePRK2      -----MSSQKNYKKNKHVLFVLMIMCSLAFVTEANLSEPEVLLKFRESLKYDGDPPFTW 53
NtPRK2      -----

LePRK1      NTKVSPCDKKTDRPNWDNVICENGFVFLQLENKGLSGTIDVDALKDLPNFRITISVMNNN 119
NtPRK1      -----
LePRK2      DANVPPCVKDNKPKWNNLFCESGKVYGLNLENLGLSGTIDLKELPNLRTISVFKNK 113
NtPRK2      -----

LePRK1      FEGPIPNLSKLAGLKTAYFTNNKFSGQIDNSFFEGMHWLKKLHLGNNQISGKIPSVFGQL 179
NtPRK1      -----QIDNTLFEGMHWLKKLHLANNQLSGKIPSVLQQL 34
LePRK2      FEGPLPIILNKPLTLKSAYFSNNKFSGPIDQNI FEGMNSLKKLHLANNEFTGPLPPIFGDM 173
NtPRK2      -----PIDQKIFEGMNSKKLHLSNNEFTGPLPPIFGDM 34
                **.:*****: *****.***:::* :*.:*:::

LePRK1      PKLTELRLENNKFEGQIPDFNQERLIDMNFANNSLQGPIPHGLASLKPSAFEGNNLCDGP 239
NtPRK1      PKLTELRVENNKFEGQIPDFVQERLMDMNFANNSLEGPIPHGLTSLKPSAFEGNDLCDGP 94
LePRK2      PNLRELNIQNNKFEGPIPPSYSHLYLPAYDGDGLCGPP-----LAKSCNKEDEKKK-E 226
NtPRK2      PNLRELNIHNNKFEGPIPPSYSHLYFPAYDGDGPGCPP-----LAKSCIKEDELKK-E 87
                *: * * . : . ***** * * . . : . . : . * * * * . : : .

LePRK1      FSKCTSEPKVALWT 253
NtPRK1      LSKCTSEPKVALWT 108
LePRK2      ESSSSSS---SGWK 237
NtPRK2      ESSSSSSSASSGWK 101
                *.:*. : *

```

## B

	NtPRK1	NtPRK2
<b>LePRK1</b>	88%	56%
	94%	70%
<b>LePRK2</b>	42%	91%
	55%	93%
<b>NtPRK1</b>		37%
		52%

**Figura 3.5:** A. Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de los dominios extracelulares de LePRK1 y LePRK2, y las secuencias parciales de los dominios extracelulares de sus homólogos NtPRK1 y NtPRK2. B. Porcentajes de identidad (arriba) y similitud (abajo) entre las secuencias de los distintos receptores quinasa.



La identificación del o los procesos regulados por la actividad del complejo de LePRKs requiere obtener MrX en su estado puro. El agregado de MrX puro a granos de polen en medio de germinación *in vitro* podría resultar en cambios morfológicos o fisiológicos que, junto a las modificaciones bioquímicas ya mencionadas, serían muy importantes para la identificación del proceso biológico en el cual LePRK1 y LePRK2 se encuentran involucradas.

## **4. Capítulo 2: Purificación y Caracterización de MrX**

#### 4.1. Introducción

En plantas superiores, la interacción célula-célula está mediada principalmente por pequeños compuestos lipofílicos (fitohormonas) como las auxinas, citocininas, giberelinas, ácido abscísico, etileno, brasinosteroides y jasmonatos [102]. En *Arabidopsis*, se ha comprobado que algunos productos del metabolismo secundario como los derivados de las alcaloides y N-aciletanolamidas estarían involucrados en procesos de división celular y diferenciación [103], y por otro lado, también existiría una señal derivada de carotenoides implicada en la dominancia apical [104]. Recientemente, se han descrito señales peptídicas secretadas y no secretadas involucradas en varios aspectos de la regulación del crecimiento incluyendo respuestas de defensa, crecimiento de callos, organización meristemática, autoincompatibilidad, crecimiento radical, regulación de la forma de la hoja, formación de nódulos y abscisión de las hojas. Además, el análisis *in silico* del genoma ha revelado la presencia de un número de genes que codifican para pequeños marcos abiertos de lectura con secuencias homólogas a estos péptidos [102].

Numerosas evidencias indican que los péptidos son importantes para el desarrollo y el crecimiento en las plantas. Hasta el momento sólo cuatro hormonas peptídicas vegetales han sido caracterizadas detalladamente. Sistemina y fitosulfoquina fueron encontrados a partir de la purificación del compuesto responsable de un fenotipo particular, mientras que SCR/SP11 y CLE/CLV3 fueron descubiertas genéticamente por el aislamiento y caracterización de mutantes. Otros péptidos aún carecen de estudios exhaustivos o se desconocen los receptores (RALF, ENOD40, POLARIS, ROTUNDIFOLIA4/DEVIL1, IDA [102], EPF1 [105]).

La sistemina es el compuesto producido en Solanáceas por células dañadas que tiene la capacidad de modular la salida de protones de células intactas en cultivo *in vitro*. Fue purificada a partir de hojas de tomate mediante la extracción y posterior separación cromatográfica del extracto. El tratamiento con proteasas o hidrólisis ácida resultaba en la pérdida de actividad, y en el último caso, la liberación de aminoácidos [106]. La obtención de la secuencia permitió identificar a la prosistemina de 200 aminoácidos, de la cual se obtiene el péptido maduro por proteólisis del precursor [107]. El precursor se encuentra en el citoplasma de las células parenquimáticas del tejido vascular y carece de

péptido señal N-terminal como otros péptidos secretados [108]. Existen otros péptidos con actividades similares, pero la secuencia del precursor no está relacionada, además de poseer un péptido señal [109, 110]. Estos péptidos se localizarían en la matriz extracelular donde serían procesados por peptidasas [109]. Usando el mismo ensayo en tabaco, se encontró un péptido de 49 aminoácidos que produce la rápida alcalinización del medio de cultivo sin activar la respuesta de defensa [111]. Este péptido se llamó *Rapid Alkalinization Factor* (RALF) y también se encontró en alfalfa y tomate. Este compuesto también activa MAPK cuando es aplicado en concentraciones nanomolares. Sin embargo, el rol *in vivo* de los RALFs aún se desconoce. El precursor de RALF de tomate es un polipéptido de 115 aminoácidos que contiene un péptido señal N-terminal y el RALF se encuentra en la porción carboxilo terminal. No se sabe como ocurre el procesamiento, pero dos residuos río arriba del N-terminal del RALF maduro se encuentra el motivo aminoacídico dibásico (típico para el reconocimiento de enzimas procesadoras en levaduras y animales). Los genes tipo RALF se han identificado en numerosas plantas y se expresan en casi todos los tejidos, además de la raíz, indicando que puede tener otras funciones además del arresto del crecimiento de ésta [111, 112]. En *Arabidopsis*, se identificaron 34 genes que codifican para posibles péptidos tipo RALF [113]. Sin embargo, no hay mutantes con ganancia o pérdida de función. En tomate se encontró un receptor para estas proteínas en membrana plasmática [114].

La fitosulfoquina (PSK) fue purificada mediante separaciones cromatográficas del medio condicionado de células en cultivo de espárrago [115], y posteriormente se demostró que se encuentra en otras especies vegetales. Es un pentapéptido sulfatado altamente hidrofílico, neutro y relativamente estable al calor, pero no resiste tratamientos con pronasa E. En células en cultivo, es requerida para la exitosa formación de callos de explantos maduros, promoviendo la división celular. Además está involucrada en la embriogénesis somática, la formación de yemas y raíces adventicias y la germinación del polen. PSK se produce por el procesamiento enzimático de un precursor peptídico de ~80 aminoácidos que contiene una señal de secreción N-terminal. Los genes correspondientes al precursor de PSK están redundantemente distribuidos por el genoma de *Arabidopsis* (cinco genes), y se encuentran en una variedad de angiospermas y gimnospermas. Los

únicos aminoácidos conservados corresponden a los cinco aminoácidos del dominio de PSK y algunos más inmediatamente río arriba del dominio PSK.

El gen SCR se expresa en las células del tapete y en los granos de polen, y el marco abierto de lectura codifica para un producto de 74-81 aminoácidos dependiendo del haplotipo [116]. A diferencia de otros péptidos, SCR no requiere otra modificación postraduccional más que la remoción del extremo N-terminal y la correcta formación de puentes disulfuro [117]. *Arabidopsis* contiene 28 genes homólogos a SCR, cuyos productos tienen entre 4,4-9,5 kDa, son hidrofílicos y conservan las 8 cisteínas requeridas para los puentes disulfuro. Estos genes se expresan en numerosos tejidos, pero sus funciones no han sido determinadas [118].

CLV3 codifica para una proteína secretada de 96 aminoácidos que contiene un péptido señal y se proteoliza, generando un péptido de 12 aminoácidos correspondiente al extremo carboxilo terminal [119, 120]. Esta proteína pertenece a la familia de genes CLE/ESR (*Embryo-Surrounding Region*) cuyos productos también son secretados y sufren el mismo procesamiento [121]. Sin embargo, sólo algunos de ellos se unen específicamente al receptor CLV1, siendo CLV3 el más específico [122]. ESR se expresan en el endosperma en desarrollo y codifican para polipéptidos secretados. Las secuencias completas de CLV3 y ESR son diferentes, salvo por los 14 aminoácidos de la región carboxilo terminal. En *Arabidopsis*, se han encontrado 25 genes que codifican para péptidos secretados por homología de secuencia con esos 14 aminoácidos, los cuales fueron nombrados CLAVATA/ESR *related* (CLE) y son expresados en numerosos tejidos durante el desarrollo [59]. La mayoría de los péptidos CLE poseen un sitio dibásico potencial de procesamiento que podría ser reconocido por subtilasas [123, 124]. Algunos CLE fueron purificados de medios condicionados y actúan como factores de inhibición de la diferenciación traqueal en células de *Zinnia elegans* en cultivo y son parcialmente resistentes a proteasas. Se observó que la pronasa E elimina gran parte de la actividad, mientras que la proteinasa K no tiene efectos. Por otro lado, la tripsina disminuye la actividad mínimamente [121]. Experimentos de ultrafiltración demostraron que estos CLE tienen un peso menor a 5 kDa y resisten 100° C por 10 min.

También han sido descritos diferentes compuestos reguladores del crecimiento del polen de los cuales se desconoce el sitio de acción o la presencia de receptores. Del

estigma de *Lilium longiflorum* se purificaron la quimiocianina, una proteína básica de ~9 kDa, con una secuencia homóloga a fitocianinas, y otros péptidos llamados SCAs (*stylar cysteine-rich adhesin*), que juntos tienen la capacidad de orientar el crecimiento del tubo polínico y adherirlo a un sustrato *in vitro* [125-128]. Por homología de secuencia a quimiocianina, en *Arabidopsis* se encontró la plantacianina [129]. Por otra parte, en el tracto transmisor de *Lilium longiflorum*, se encontró una pectina involucrada en la orientación del crecimiento a través de la adhesión [130]. También se han descrito a las glicoproteínas TTS (*transmitting tract specific glycoprotein*) de tabaco y NaTTS de *Nicotiana glauca*, que participarían en la orientación del crecimiento del polen y serían utilizadas como fuente nutricional y de orientación [131, 132]. Luego de emerger del tracto transmisor, los tubos polínicos se dirigen a la micrópila guiados por señales moleculares que involucran al tubo, los tejidos diploides que rodean al óvulo (GABA, ácido  $\gamma$ -aminobutírico [133, 134]) y al gametofito femenino [135-137].

En este capítulo, iniciamos una caracterización más detallada de MrX, responsable de la desfosforilación de LePRK2, y analizamos su comportamiento en diversos pasos de extracción y separación cromatográfica. Basándonos en la bibliografía citada en esta introducción, probamos diferentes métodos de precipitación, separaciones en columnas con matrices de diferente naturaleza (intercambio iónico y fase reversa), utilizamos proteasas y glicosidasas, realizamos hidrólisis ácida y básica y reducción con DTT. En base a los resultados obtenidos en estos experimentos, diseñamos un protocolo de purificación del cual obtuvimos una fracción que analizamos por UV-MALDI-TOF donde el único compuesto presente corresponde a MrX, una molécula de ~3550 Da.

## **4.2. Materiales y Métodos**

### **4.2.1. Purificación de MrX**

#### **4.2.1.1. Extracción de MrX con solvente orgánico y precipitaciones**

##### **4.2.1.1.1. Extracción con metanol y cloroformo**

Se homogenizaron 8 estigmas-estilos de tabaco en 1 ml de bicarbonato de amonio y se lo centrifugó 5 min a 10.000 xg a temperatura ambiente, obteniéndose un extracto de estigma-estilo (sobrenadante). A este extracto se le agregó un volumen de metanol 100% y se mezcló por inversión. Luego, se agregó 1/2 volumen de cloroformo y se agitó vigorosamente con *vortex*. Se centrifugó 5 min a 6.000 xg a temperatura ambiente. Se obtuvieron tres fases: una acuosa (superior), una interfase y una orgánica (inferior). La fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo. A la interfase y fase orgánica, se le agregaron 4,5 volúmenes (con respecto al homogenato original) de metanol 100%, se mezcló y centrifugó 5 min a 6.000 xg. Se obtuvieron un *pellet* y un sobrenadante orgánico, correspondiendo a la interfase y fase orgánica original respectivamente. El sobrenadante orgánico se transfirió a un tubo nuevo. Las tres fracciones obtenidas correspondientes a fase acuosa, *pellet* y sobrenadante orgánico se secaron en *speedvac* (SAVANT) y resuspendieron en agua en el mismo volumen de partida. Para lograr resuspender por completo la interfase y el sobrenadante orgánico fue necesario agitarlas vigorosamente con *vortex*. El mismo volumen correspondiente a cada fase se analizó en el ensayo de fosforilación siguiendo el protocolo de la sección 3.2.3.

##### **4.2.1.1.2. Precipitación de MrX con ácido tricloroacético (TCA)**

A 300 µl de un extracto de estigma-estilo (preparado como en la sección anterior) se le agregó TCA hasta una concentración final de 6% a partir de una solución 30%. La muestra se incubó por 15 min a temperatura ambiente. Luego, se centrifugó por 5 min a 12.000 xg. El sobrenadante y el *pellet* se secaron en *speedvac* y se agregó Tris-HCl 0,1M pH 8 para facilitar la neutralización y la resuspensión. El mismo volumen de cada

fracción se analizó en el ensayo de fosforilación siguiendo el protocolo de la sección 3.2.3.

#### **4.2.1.1.3. Precipitación de MrX con acetona**

A un exudado de estigma-estilo, se le agregaron 6 volúmenes de acetona 100%, se mezcló por inversión y se centrifugó a 12.000 xg por 15 min. El sobrenadante se transfirió a un balón y, con el fin de eliminar la acetona, se secó en evaporador rotatorio de presión reducida (*rotavap*). Al *pellet* obtenido se le agregó agua hasta resuspender la muestra. Luego, se secó en *rotavap* o *speedvac*, para remover la acetona remanente, y se resuspendió nuevamente en agua. Por último, tanto sobrenadante como *pellet* resuspendido, se centrifugaron por 5 min a 12.000 xg y las muestras clarificadas se transfirieron a un tubo nuevo. El mismo volumen de cada fracción se analizó en el ensayo de fosforilación siguiendo el protocolo de la sección 3.2.3.

#### **4.2.1.2. Columnas de intercambio iónico**

##### **4.2.1.2.1. Cartuchos comerciales**

Se utilizaron cartuchos comerciales de 1 ml de lecho para estudiar el comportamiento de MrX frente a dos resinas diferentes: 1) QMA (intercambio aniónico), amina cuaternaria (Sep-Pak® Plus Accell Plus QMA cartridge 37-55µm, WAT020545, Waters); y 2) CM (intercambio catiónico), carboximetilcelulosa (Sep-Pak® Plus Accell Plus CM 37-55µm, WAT020550, Waters). Los cartuchos se prehidrataron con agua *milliQ*. La muestra que se cargó en las resinas correspondía al *pellet* de la precipitación con acetona de un exudado de estigma-estilo extraído al menos 3 veces con metanol-cloroformo (ver sección 4.2.1.1.1 y 4.2.1.1.3). Luego de cargar el cartucho, se lavó con 5 volúmenes de agua y se realizó un gradiente continuo de 0 a 500mM de acetato o bicarbonato de amonio. El cartucho se lavó con acetato o bicarbonato de amonio 500mM (2 volúmenes) y 1M (2 volúmenes). Se colectaron fracciones de 1 ml, se concentraron y la presencia de MrX se determinó mediante el ensayo de fosforilación (ver sección 3.2.3).



#### 4.2.1.2.2. DEAE-sephadex y MonoQ

Con el fin de seleccionar la resina adecuada, en primer lugar se utilizó DEAE-sephadex (A-50, 40-120  $\mu\text{m}$ , número de catálogo 17-0180-06, GE Healthcare). La resina se hidrató por 2 horas a  $100^\circ\text{C}$  con agua *milliQ*, siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez fría y enjuagada, la resina se cargó en una jeringa de 50 ml (40 ml de lecho, hidratada con agua). Por encima del lecho, se colocó un círculo de papel cromatográfico Whatman, para evitar la perturbación de la columna al cargar la muestra o la solución de corrida. La columna se lavó con 5 volúmenes de agua *MilliQ*, 5 volúmenes de bicarbonato de amonio 1M y nuevamente con agua. La separación cromatográfica se inició cargando una muestra similar de exudado de estigma-estilo a la utilizada en la sección anterior. La columna primero se lavó con 5 volúmenes de columna de agua *milliQ*. Se comenzó un gradiente continuo de 0 a 250mM de bicarbonato de amonio. Finalizado el gradiente, se realizaron lavados con bicarbonato de amonio 500mM (2 volúmenes) y 1M (2 volúmenes). Para evitar perturbaciones en la concentración salina de la solución durante la corrida por el encogimiento de la resina, se reguló el flujo del *buffer* evitando la acumulación de líquido por encima del lecho de la columna. Se colectaron fracciones de 3 ml, a las cuales se les determinó la absorbancia a 280 nm y la presencia de MrX en un ensayo de fosforilación.

En segundo lugar, se utilizó una columna comercial MonoQ (MonoQ HR 5/5, 1 ml de lecho, número de catálogo 17-0546-01, GE Healthcare) acoplada a un equipo de *Fast Protein Liquid Chromatography* (FPLC, GE Healthcare). La columna se lavó con 5 volúmenes de agua *milliQ*, 5 volúmenes de bicarbonato de amonio 1M y 5 volúmenes de agua *milliQ*. La separación se realizó a un flujo de 1 ml/min y se comenzó cargando una muestra de exudado similar a la utilizada anteriormente. La columna se lavó con 5 volúmenes de agua. Luego, se realizó un gradiente de 0 a 75mM en 5 min, seguido de 75mM a 150mM en 10 min utilizando bicarbonato de amonio. Finalizado los gradientes, se realizaron 2 lavados sucesivos de bicarbonato de amonio 500mM y 1M. Se colectaron fracciones de 1 ml, a las que posteriormente se les determinó la presencia de MrX por medio del ensayo de fosforilación.

#### 4.2.1.3. Columna de Fase Reversa

Se prehidrató el cartucho comercial de fase reversa (Sep-Pak® Plus C18 cartridge 55-105µm, WAT020515, Waters) con acetonitrilo 50%, se lo equilibró con 5 volúmenes de acetonitrilo 6%, y se cargó una muestra similar a la utilizada antes (previamente llevada a acetonitrilo 6%). El cartucho se lavó con 5 volúmenes de acetonitrilo 6%, y luego se realizó un gradiente de 6 a 50 % de acetonitrilo. Al finalizar, al cartucho se le realizaron dos lavados sucesivos de 3 volúmenes de acetonitrilo 50% y 100%, respectivamente. A las fracciones de 1 ml se les determinó la absorbancia a 280 nm, se secaron por completo en *speedvac* y se resuspendieron nuevamente en 1 ml de agua. Se determinó la presencia de MrX en cada fracción como se mencionó antes.

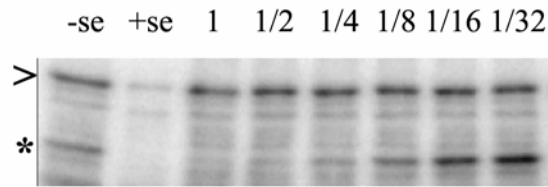
#### 4.2.1.4. Protocolo de purificación de MrX

Para realizar el exudado, se cortaron 100 estigmas-estilos de tabaco en secciones de 0,5 cm aproximadamente cada 25 ml de bicarbonato de amonio 50 mM. Se incubó a 4°C con agitación suave por 16 horas. Posteriormente, se separó el tejido del exudado filtrando con papel de filtro. A continuación, se realizaron al menos 3 extracciones sucesivas con metanol-cloroformo, hasta observar una interfase límpida. Para ello, al exudado se agregó un volumen de metanol 100% y medio volumen de cloroformo, se agitó vigorosamente y centrifugó por 5 minutos a 10.000 xg. La fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo y se le volvió a agregar el mismo volumen de cloroformo que antes. Finalizada la extracción, la fase acuosa se evaporó por completo en *rotavap*. El precipitado se resuspendió en agua *milliQ*, asegurándose la recuperación total de la muestra por lavados sucesivos del balón. El nuevo volumen final obtenido fue 1/10 del original (con respecto al exudado). Se agregaron 6 volúmenes de acetona 100%, se agitó vigorosamente y centrifugó por 10 min a 10.000 xg. El sobrenadante se descartó y el *pellet*, resuspendido con agua *milliQ*, se transfirió a un nuevo balón para remover la acetona residual. Al precipitado resuspendido en agua *milliQ* se le determinó la absorbancia a 280 nm. Esta muestra se separó primero en una columna MonoQ,

cargándola con 1 unidad de absorbancia a 280 nm por vez. La separación se realizó a un flujo de 1 ml/min con bicarbonato de amonio, utilizando un programa diseñado para tal caso: luego de cargar la muestra, se lavó la columna con 5 volúmenes de agua, seguido de un gradiente 0 a 75mM de bicarbonato de amonio en 5 min y 75 a 100mM en 10 min; finalmente, se lavó la columna con 1M por 5 min y agua por 5 min. Las fracciones de 1 ml se colectaron, se midió la absorbancia a 280 nm y se determinó la presencia de MrX en por medio del ensayo de fosforilación. Las fracciones activas (en la desfosforilación de LePRK2) se juntaron, se secaron en *rotavap*, y se les agregó acetonitrilo hasta una concentración final de 6%. En una columna casera de fase reversa (ICN Silica RP C18, 32 $\mu$ m, 62 Å, 05035, ICN Biomedicals GmbH), previamente tratada como se explicó en la sección 4.2.1.3, se sembró la muestra activa proveniente de la MonoQ. Se lavó la columna con acetonitrilo 6%, se colectaron fracciones de 1 ml y se les midió absorbancia a 280 nm. Cuando los valores de absorbancia bajaron a niveles basales, se realizaron 2 lavados de la columna con acetonitrilo 50% y 100%. Los lavados se colectaron en fracciones de 1 ml y se midió absorbancia. Las fracciones se secaron en *speedvac* y se ensayó la actividad. Las fracciones positivas se juntaron, se determinó absorbancia a 280 nm de la muestra y se sembró de a 1 unidad de absorbancia a 280 nm en la segunda columna MonoQ (equilibrada en agua *milliQ*) por vez, utilizando el mismo programa que antes. A cada fracción de 1 ml se le determinó la actividad.

#### 4.2.1.5. Tabla de Purificación

Se cuantificó a MrX por absorbancia a 280 nm y como indicador de actividad se utilizó el estado de fosforilación de LePRK2. Para calcular la actividad de MrX (que se define más adelante) en cada paso de la purificación, se determinó la absorbancia a 280 nm de las fracciones activas, se realizaron diluciones seriadas al medio y se realizó el ensayo de fosforilación de LePRK2 con cada dilución. En las imágenes digitalizadas de los geles, se cuantificó la intensidad de las bandas correspondientes a LePRK2 ( $I_{LePRK2}$ ) y a una banda control ( $I_{Control}$ ) que no muestra cambios en presencia de MrX utilizando el *software* ImageJ (figura 4.1). Para descartar defectos de carga o diferencias en las señales



**Figura 4.1: Ejemplo de gel para realizar la tabla de purificación.** El asterisco indica la posición de la banda de LePRK2, mientras que la punta de la flecha indica la banda control. *-se* y *+se*, sin y con extracto de estigma-estilo, respectivamente; *1* a *1/32*, diluciones seridas al medio, comenzando con una muestra sin diluir (*1*).

“ruido” entre calles de un mismo gel, se calcularon las “señales relativizadas” (*SR*) de la siguiente manera:

$$SR_{\sin SE} = I_{LePRK2 \sin SE} / I_{Control \sin SE}$$

$$SR_{\text{con SE}} = I_{LePRK2 \text{ con SE}} / I_{Control \text{ con SE}}$$

$$SR_{Dil} = I_{LePRK2 Dil} / I_{Control Dil}$$

donde se obtuvieron las *SR* en ausencia de MrX (*sin SE*), en presencia de MrX (*con SE*) o en presencia de una de las diluciones de un paso de purificación (*Dil*). Luego, para fijar una escala de actividad, donde 1 corresponde a un 100% de fosforilación de LePRK2 (en ausencia de MrX) y 0 corresponde a un 0% de fosforilación de LePRK2 (en presencia de MrX), se calculó la “Señal Normalizada” (*SN*):

$$SN_{Dil} = \frac{SR_{Dil} - SR_{\text{con SE}}}{SR_{\sin SE}}$$

donde “*SN Dil*” corresponde a la señal normalizada de una de las diluciones de un paso de purificación. Dado que la actividad de MrX es promover la desfosforilación de LePRK2 y los valores de la señal corresponden al remanente de LePRK2 fosforilado, definimos actividad de MrX como:

$$A(\text{MrX})_{Dil} = \text{actividad de MrX en una de la diluciones} = 1 - SN_{Dil}$$

Como estimador del estado de pureza de MrX, utilizamos los valores de  $A(\text{MrX})_{Dil}$  de las diluciones de cada paso de purificación y las absorbancias a 280 nm para determinar el valor de *Km*. Para calcularlo, se asumió una cinética del primer orden y se utilizó el diagrama de Lineweaver-Burk. Dado que el método de cuantificación es por absorbancia a 280 nm, *Km* corresponde a un valor de absorbancia que disminuye a medida que

aumenta la pureza de MrX. Se realizaron dos purificaciones en duplicado y se promediaron los valores de Km.

#### 4.2.1.6. UV-MALDI-TOF MS, UV-MALDI-TOF MS/MS y FT-ICR MS

La determinación del peso molecular de MrX se realizó por espectrometría de masa *Ultraviolet Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight* (UV-MALDI-TOF) en el servicio de Espectrometría de Masa de la Unidad de Bioquímica Analítica de la Universidad de la República Oriental del Uruguay. La muestra se disolvió en agua y las medidas de masa se realizaron en un espectrómetro de masa Voyager-DE™ PRO (Applied Biosystems), equipado con un láser de Nitrogeno (337 nm). Los espectros de masa se adquirieron en modo reflector usando como matriz ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinámico. La matriz se preparó como una solución saturada en 60% acetonitrilo, 0.1% ácido trifluoroacético. Para realizar una calibración externa se utilizó una mezcla de péptidos estándar (Applied Biosystems).

Para realizar el análisis por fragmentación, la muestra se envió al *Keck Biotechnology Resource Laboratory*, perteneciente a la Universidad de Yale (USA). Se utilizaron dos técnicas de espectrometría de masa UV-MALDI-TOF MS/MS con un equipo MDS SCIEX 4800 MALDI TOF/TOF *Analyzer* (Applied Biosystems) y FT-ICR (*Fourier-Transform Ion Cyclotron Resonance*) utilizando un equipo *9.4 Tesla Apex-Qe Hybrid Qe-Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance* (Bruker) con una fuente de ionización *Apollo II electrospray*. La determinación por UV-MALDI-TOF/TOF se realizó utilizando ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinámico como matriz disuelto en 50% de agua/50% acetonitrilo/0,1% ácido trifluoroacético. Se agregó bradiquinina a la matriz como calibrante interno (masa monoisotópica y protonada de 1060,5692 Da). La concentración final bradiquinina obtenida fue de 1.3 fmol/*spot* aproximadamente. Para la determinación, se mezcló 0,8  $\mu$ l de la muestra de MrX con 0,8  $\mu$ l de la matriz y se cargaron sobre la placa de MALDI.

Para la espectrometría de masa FT-ICR, la muestra se aplicó directamente al espectrómetro de masa mediante *nanoelectrospray* (nanoESI) con un capilar con punta de

sílica de 30  $\mu\text{m}$  de diámetro interno (New Objective, Inc.) a un flujo de 15  $\mu\text{l/hr}$ . Se hizo contacto a Tierra con la punta del nanoESI y se aplicó una diferencia de potencial de  $\sim 1600\text{V}$  al extremo del capilar. El equipo se programó para la detección exacta de las masas moleculares entre 450 y 2500  $m/z$  (masa/carga) en todo el espectro del ancho de banda. Subsiguientemente, el pico de interés se aisló utilizando un cuadrupolo y luego se fragmentó por CID (*Collision-induced dissociation*, disociación inducida por colisión) o disociación multifotónica infrarroja (*Infrared Multiphoton dissociation*, IRMPD). Las asignaciones se realizaron basándose en las mediciones de masa exacta y el ajuste de picos isotópicos a los patrones isotópicos (algoritmos SNAP2). A los datos colectados se aplicó la transformación de Fourier, se generaron los espectros de masa  $m/z$  y se realizó una deconvolución de los datos, determinándose las masas monoisotópicas.

#### **4.2.2. Caracterización de MrX**

##### **4.2.2.1. Tratamiento con proteasas**

Las muestras utilizadas en cada tratamiento correspondieron a MrX parcialmente purificado, como por ejemplo fracciones activas de una DEAE-sephadex (sección 4.2.1.2.2) o las obtenidas de un *pellet* de acetona pasado por fase reversa omitiendo el paso de intercambio iónico. Se siguieron los protocolos de digestión con proteasas de acuerdo a las especificaciones del *Current Protocols in Protein Science* [97].

Para las reacciones de digestión con proteasas, se tomaron dos veces la cantidad de MrX que indujera una desfosforilación de LePRK2 del 60% en una reacción estándar de fosforilación. Para estimar este valor, se realizaron ensayos de fosforilación de LePRK2 con diluciones seriadas de MrX y las muestras se trataron como en la sección 3.2.3. La imagen digitalizada se analizó utilizando el *software* ImageJ. Se graficó señal de LePRK2 versus unidades de absorbancia 280 nm de la dilución de MrX utilizada. Del gráfico obtenido, se obtuvo el valor de unidades de absorbancia (280 nm) de MrX capaces de desfosforilar a LePRK2 en un 60% (resultados no mostrados).

Para cada experimento, se analizó la actividad hidrolítica de la proteasa respectiva (tripsina, pepsina y carboxipeptidasa Y) utilizando una proteína estándar (albúmina sérica bovina, BSA; Sigma). En las reacciones control que se realizaron a la par del experimento con MrX, se utilizaron las mismas unidades de absorbancia (280 nm) de BSA que de MrX. La cantidad de cada enzima a utilizar se determinó empíricamente, verificando qué masa era necesaria para digerir BSA completamente en las condiciones del ensayo. Las muestras de BSA se separaron por SDS-PAGE y el gel se tiñó con *Coomassie Blue* de acuerdo a técnicas convencionales [97]. Los geles obtenidos se digitalizaron para su análisis.

El protocolo que se describe para tripsina, se realizó para pepsina y carboxipeptidasa Y, bajo las condiciones ideales para cada una de las enzimas como se detalla más adelante.

Se prepararon dos pares de tubos, el primer par conteniendo BSA (control) y el segundo par conteniendo una fracción positiva de DEAE correspondiente a MrX. Uno de los tubos de cada par fue utilizado como control de la reacción, omitiendo la enzima. Al otro tubo del par, se agregó 1/6 de la masa de BSA de tripsina (Sigma; *stock*: 10 mg/ml en bicarbonato de amonio 0,1M). La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 60 µl en bicarbonato de amonio 0,1M por 16 horas a 37°C. En el caso de los tubos conteniendo MrX (control y digestión), la reacción se terminó calentando las muestras por 15 min a 95°C. Luego, se agregaron 90 µl de agua (150 µl finales de solución acuosa), 150 µl de Metanol 100% y 75 µl de Cloroformo. La muestra se agitó vigorosamente con *vortex*, se centrifugó por 2 min a 6.000 xg y la fase acuosa (~300 µl) se transfirió a un tubo nuevo. La fase acuosa se secó por completo en *speedvac*. La muestra seca se resuspendió en 30 µl de agua. Se realizaron 3 diluciones seriadas al medio de 15 µl de la muestra (1/2, 1/4, 1/8) y una dilución al décimo (1/10). En el ensayo de fosforilación, se analizó el efecto de 10 µl de la digestión tal cual y de las diluciones 1/2, 1/4, 1/8 y 1/10. El ensayo de fosforilación se llevó a cabo como en la sección 3.2.3 (ver figura 4.9).

Para pepsina, se utilizaron 1/21 veces la masa de BSA de enzima y la digestión se llevó a cabo en HCl 10mM. En el caso de la carboxipeptidasa Y, se utilizaron 1/6 veces la masa de BSA y la digestión se llevó a cabo en acetato de sodio 5mM (pH 4,0).

#### 4.2.2.2. Hidrólisis ácida

Se realizaron dos tipos de hidrólisis, la primera incubando extractos de estigma-estilo en HCl 1N a 100°C en bloque termostatzado durante 4 ó 20 horas. Luego del tratamiento, las muestras se equilibraron con NaOH y se agregó Tris-HCl pH 8,0 hasta una concentración 0,1M. Una alícuota de cada tratamiento se utilizó en el ensayo de fosforilación para determinar la capacidad de desfosforilar LePRK2.

El segundo método de hidrólisis se realizó asistido por microondas de acuerdo al protocolo de Zhong *et al.* [138]. En microtubos herméticos de 1,5 ml, cuatro volúmenes de percolado de C18 con la capacidad de defosforilar totalmente a LePRK2, se llevaron a una concentración de HCl de 1,5N en un volumen final de 50 µl (**Hidrólisis**). Se prepararon tres controles para verificar el experimento: **control de dilución**, en el que se colocó la misma cantidad de percolado de C18 y luego se sometió a todas las diluciones que sufrieron las muestras ensayadas durante el tratamiento, omitiendo el calentamiento y el ácido; **control de sales**, en el que se colocó ácido, pero omitiendo el percolado de C18; y, **control del tratamiento térmico**, en el que se colocó el percolado de C18, se sometió al calentamiento, omitiendo ácido. Los tubos correspondientes a la hidrólisis, el control de sales y el control del tratamiento térmico se sellaron con Parafilm y se los colocó en el interior de un microondas. A su lado, se colocó un recipiente con tapa (no hermética) conteniendo 100 ml de agua, con el fin de absorber la energía sobrante. Las muestras se calentaron 10 minutos a máxima potencia (900 W). A diferencia del protocolo de Zhong *et al.*, los tubos se retiraron del microondas y las muestras correspondientes a la hidrólisis y el control de sales se equilibraron con NaOH y se agregó Tris-HCl pH 8,0 hasta una concentración de 0,1M. A los tubos correspondientes al control de tratamiento térmico y control de dilución, se les agregó NaCl hasta una concentración de 1,5M y, posteriormente, se agregó Tris-HCl pH 8,0 hasta una concentración de 0,1M. Todas las muestras se llevaron a 100 µl con agua. De cada una de estas cuatro muestras (tratamiento y tres controles), se tomaron 25 µl y se realizaron dos diluciones seriadas al medio. Luego, se ensayaron 25 µl de cada una de las muestras originales y sus diluciones en su capacidad de promover la desfosforilación de LePRK2. Para verificar el protocolo,



se realizó el mismo ensayo con BSA y se separaron las muestras en un SDS-PAGE 8%. Como en la sección 4.2.2.1, el gel se tiñó con *Coomassie Blue* y se tomaron fotografías digitales.

#### 4.2.2.3. Hidrólisis básica

Para realizar la hidrólisis, se tomaron 10 volúmenes de una fracción positiva de DEAE (DEAE+) correspondiente a MrX capaz de desfosforilar totalmente a LePRK2. La muestra se liofilizó, resuspendió en NaOH 1N y transfirió a microtubos de 0,2 ml, incubando durante 2 horas a 100°C en termociclador con tapa termostalizada (PTC-100® Programmable Thermal Controller, MJ Research, Inc). Se prepararon tres controles para verificar el experimento: **control de dilución**, en el que se colocó la misma cantidad de DEAE+ y se sometió a todas las diluciones que sufrieron las muestras ensayadas durante el tratamiento, omitiendo el calentamiento y base; **control de sales**, en el que se colocó la base, pero omitiendo DEAE+; y, **control del tratamiento térmico**, en el que se colocó DEAE+, se sometió al calentamiento, omitiendo la base. Luego del tratamiento, las muestras correspondientes a la hidrólisis y el control de sales se equilibraron con HCl y se agregó Tris-HCl pH 8,0 hasta una concentración de 0,1M. A los tubos correspondientes al control del tratamiento térmico y control de dilución, se les agregó NaCl y Tris-HCl pH 8,0 hasta una concentración 1M y 0,1M, respectivamente. Con estas cuatro muestras (tratamiento y tres controles), se realizó una dilución 1/10, y de ésta se tomó una alícuota para realizar dos diluciones seriadas al medio. Luego, se ensayaron una alícuota de la dilución 1/10 (correspondiente a 1 volumen de DEAE+ capaz de desfosforilar totalmente a LePRK2) y sus diluciones en su capacidad de promover la desfosforilación de LePRK2. De la misma forma que en la sección anterior, para verificar el protocolo, se lo repitió utilizando BSA. El resultado del tratamiento se analizó de la misma forma que antes.

#### 4.2.2.4. Tratamiento reductor

Una alícuota de DEAE+ se incubó por 15 min a 100°C con DTT 5 y 10 mM en tubos herméticamente cerrados. Se agregaron tres tubos como controles: el primero, conteniendo DEAE+ pero sin DTT (el cual se calentó 15 min a 100°C); y, el segundo y tercero, conteniendo 5 y 10mM de DTT pero sin DEAE+. Finalizado el tratamiento, los tubos se incubaron 10 min más a 100°C con la tapa abierta, para favorecer la evaporación del DTT. Las 5 muestras (5mM DTT sin DEAE+, 5mM DTT con DEAE+, 10mM DTT sin DEAE+, 10mM DEAE+ con DTT y DEAE+ calentado) más una muestra control sin ningún agregado ni tratamiento, se ensayaron en su capacidad de desfosforilar a LePRK2.

### 4.3. Resultados

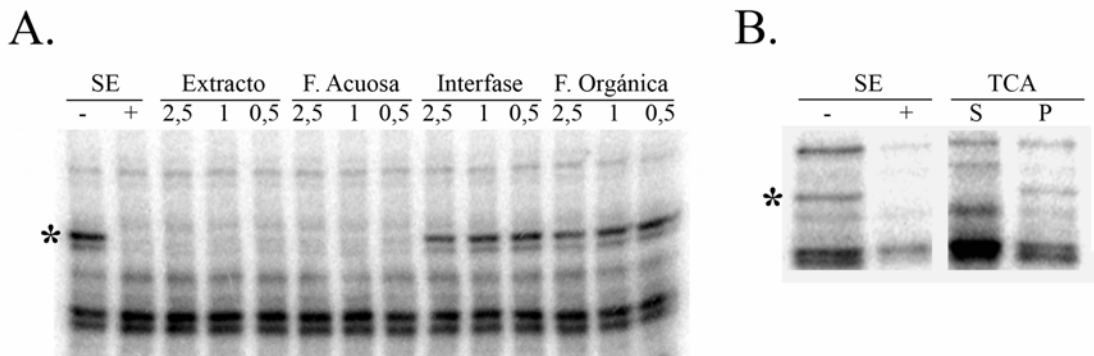
#### 4.3.1. Extracción de MrX con solvente orgánico y precipitaciones

A pesar de desconocer la naturaleza química de MrX *a priori*, decidimos realizar diferentes ensayos suponiendo que se trataba de un péptido (ver sección 4.4). La información obtenida de estos tratamientos, también podía ser utilizada para el diseño de un protocolo de purificación. En principio, analizamos el comportamiento de MrX en dos protocolos típicos para el estudio de proteínas: extracción con metanol-cloroformo y precipitación con TCA.

El primer experimento que realizamos fue la extracción con metanol-cloroformo. Típicamente, las proteínas se desnaturalizan y precipitan entre las fases orgánica y acuosa, exponiendo los residuos hidrofóbicos hacia la orgánica y los hidrofílicos hacia la acuosa. Luego de retirar la fase acuosa, la interfase conteniendo las proteínas se recupera por centrifugación y precipitación. Seguidamente, ensayamos cada una de las fracciones en una reacción de fosforilación. En la figura 4.2.A, observamos la desfosforilación específica de LePRK2 solamente en la calle donde se utilizó la fase acuosa. La interfase no produjo desfosforilación de LePRK2, mientras que observamos una pequeña disminución en la señal de LePRK2 para el ensayo de la fase orgánica. Una posible explicación para este resultado es la contaminación de la fase orgánica con restos de la fase acuosa, produciendo la desfosforilación de LePRK2. Si bien existía la posibilidad de perder la actividad de MrX debido a la desnaturalización en presencia de solventes orgánicos, este experimento nos demuestra que MrX es resistente a extracciones con solventes orgánicos donde gran parte de las proteínas pierden su estructura terciaria y cuaternaria.

En segundo lugar, llevamos a cabo una precipitación con TCA con el objetivo de contar con un paso concentrador en el protocolo de purificación [97]. Al igual que en el experimento anterior, existía la posibilidad que se pierda la actividad debido a la desnaturalización por el pH bajo. Sin embargo, MrX no precipitó en esas condiciones dado que la desfosforilación de LePRK2 se obtuvo con el sobrenadante y no con el *pellet*

(figura 4.2.B). Esto indicaría que MrX no responde como lo hacen otras proteínas a la precipitación con TCA.

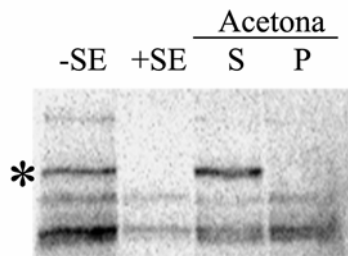


**Figura 4.2:** **A. Desfosforilación de LePRK2 mediada por diferentes fracciones de una extracción metanol-cloroforno de un extracto de estigma-estilo de tabaco.** Las reacciones se realizaron en presencia de 0,5, 1 y 2,5  $\mu$ l de cada fase. **B. Desfosforilación de LePRK2 mediada por el sobrenadante (S) o *pellet* (P) de una precipitación con ácido tricloroacético (TCA) de un extracto de estigma-estilo de tabaco.** Las reacciones se realizaron en presencia de 10  $\mu$ l de cada fracción. SE, exudado de estigma-estilo de tabaco. El asterisco (\*) indica la señal correspondiente a LePRK2.

### 4.3.2. Separaciones cromatográficas exploratorias

Decidimos analizar el comportamiento de MrX en distintos tipos de resinas de intercambio iónico, con el objetivo de poder utilizarlas posteriormente en el diseño de un protocolo de purificación. En principio, cargamos columnas MonoQ (aniónica) o MonoS (catiónica) con exudados de estigma-estilo preparados en Tris-HCl 50mM (pH 7,4). En ningún caso logramos retener a MrX en las columnas (datos no mostrados). Luego, intentamos realizar una separación cromatográfica del exudado de estigma-estilo en fase normal (sílica) que permite la adsorción de compuestos polares. La determinación de la mejor mezcla de solventes la realizamos primeramente en placa delgada. En estas condiciones, la mezcla acetona-agua (6:1) era la que mejor resolvía los componentes presentes en el exudado (datos no mostrados). Llevamos el exudado a esas condiciones, pero observamos la formación de un precipitado diminuto. Decidimos preparar una

“pastilla” con el exudado y sílica, y cargar la columna para realizar la separación. Luego de la separación, concentramos las fracciones obtenidas y las ensayamos en la reacción de fosforilación. En ninguna fracción obtuvimos actividad, por lo que consideramos que MrX no había eluido de la columna o en esa mezcla de solventes (acetona-agua, 6:1) perdía actividad. Dado que habíamos obtenido un precipitado al utilizar la mezcla de solventes, era posible que esta fracción sea la que contuviera a MrX y que al precipitar quedara retenida en la columna. Entonces, repetimos la resuspensión en acetona-agua, separamos el sobrenadante y el *pellet*, y los probamos en el ensayo de fosforilación. En la figura 4.3, observamos que la desfosforilación de LePRK2 se produce en presencia de la fracción que contiene al precipitado de acetona. Esto indicaría que durante la separación cromatográfica, MrX precipitó dentro de la columna de sílica y no eluyó de la misma. Por otra parte, este resultado demuestra que la precipitación con acetona no afecta la actividad de MrX.

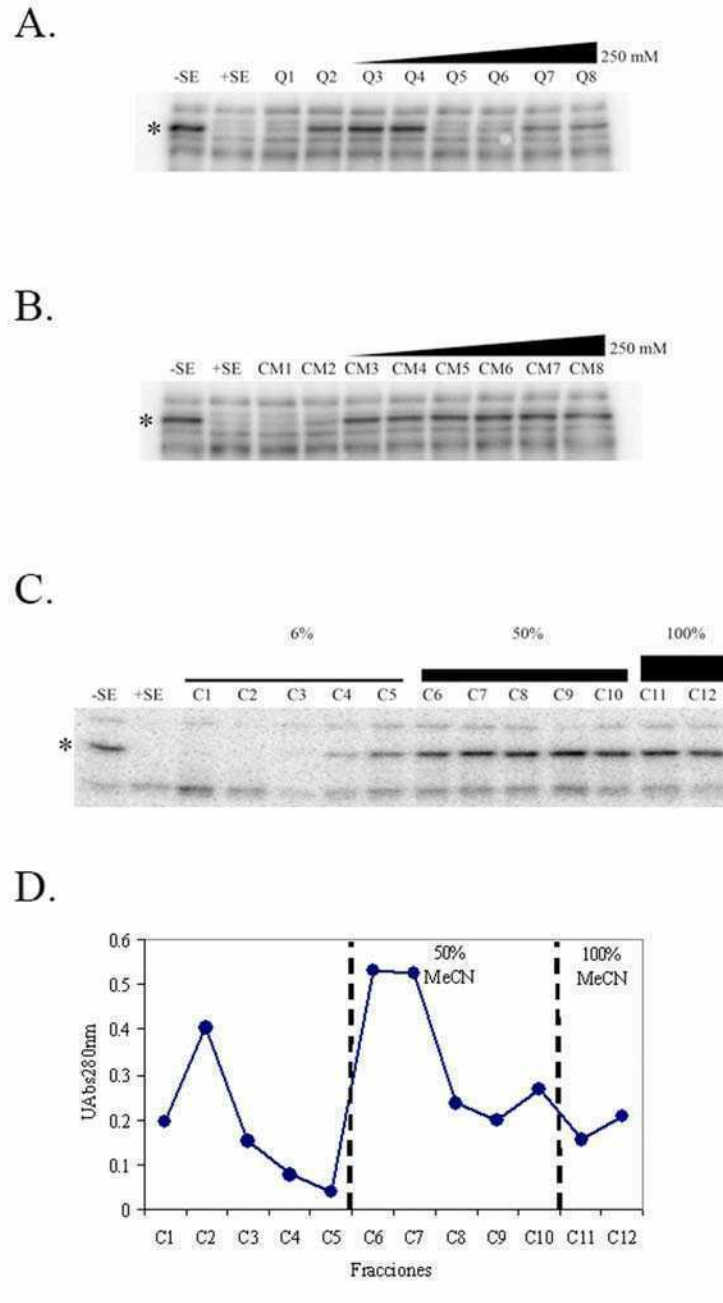


**Figura 4.3: Desfosforilación de LePRK2 en presencia del sobrenadante (S) o *pellet* (P) de una precipitación con acetona.** SE, exudado de estigma-estilo de tabaco. El asterisco (\*) indica la señal correspondiente a LePRK2.

Antes de eliminar las técnicas cromatográficas de separación utilizadas antes, preparamos nuevos exudados utilizando otras soluciones diferentes al Tris-HCl. Seleccionamos las soluciones salinas a utilizar en base a dos premisas: ser fácilmente eliminables, tal que se puedan realizar ensayos espectroscópicos para la determinación de estructura en ausencia de sales que pueden resultar un inconveniente; y, cuyos aniones sean lo suficientemente voluminosos como para evitar que estos sean más eficientes que MrX en el pegado a la resina. Seleccionamos dos soluciones diferentes, ambas sales de ácidos o bases débiles, que permitieran un mínimo de capacidad *buffer*: acetato de amonio y bicarbonato de amonio. En ambos casos, tanto la base como el ácido poseen

formas volátiles, facilitando la eliminación de las mismas por la aplicación de presiones negativas. Preparamos exudados con ambas soluciones, extrajimos con metanol-cloroformo y precipitamos con acetona. Observamos que el acetato de amonio era más difícil de eliminar que el bicarbonato de amonio, por lo que seleccionamos este último para realizar las purificaciones (datos no mostrados).

Repetimos las separaciones cromatográficas utilizando cartuchos comerciales de resinas de intercambio aniónico (QMA), catiónico (CM) y en resinas de fase reversa (C18). Esta última matriz es comúnmente utilizada en la purificación de péptidos, dado que se basa en la interacción de los residuos hidrofóbicos de los mismos con la resina. La mayor interacción se logra en aquellos péptidos que contienen pocos residuos polares o cargados [139]. Separamos los extractos en experimentos independientes en cada uno de los cartuchos de acuerdo a sus respectivos protocolos, y buscamos la presencia de MrX por la actividad de desfosforilación de LePRK2 en los percolados y eluidos. En la figura 4.4, observamos las imágenes digitalizadas del ensayo de fosforilación de LePRK2 en presencia de las fracciones de cada experimento. En las condiciones que se realizaron los fraccionamientos, MrX eluyó de la resina de intercambio aniónico luego de la aplicación de un gradiente salino, mientras que percoló de la resina de intercambio catiónico. Esto indicaría que al pH utilizado, MrX tendría carga negativa. Por otra parte, MrX también percoló de la resina de fase reversa, sugiriendo que este compuesto no es lo suficientemente hidrofóbico en las condiciones de carga por lo que no interactúa con la matriz. De acuerdo a estos resultados, podemos concluir que la decisión de utilizar bicarbonato de amonio en vez de Tris-HCl a un pH de 7,4 fue una decisión acertada. En las primeras separaciones cromatográficas en resinas de intercambio aniónico, el uso del *buffer* Tris resultó en la elución de MrX en el percolado (ver arriba). Es posible que este efecto sea resultado del fuerte pegado de los iones  $\text{Cl}^-$  a la resina de amina cuaternaria. El uso de bicarbonato de amonio resulta en un mayor pegado de MrX a la resina. Los iones bicarbonato son menos eficientes que el  $\text{Cl}^-$  para unirse a la matriz, permitiendo que MrX tenga la oportunidad de interactuar con ella.



**Figura 4.4: Desfosforilación de LePRK2 mediada por fracciones de separaciones cromatográficas en fase sólida de MrX.** *A.* Ensayo de fosforilación en presencia de fracciones del cartucho de QMA (Q1 a Q8). *B.* Ensayo de fosforilación en presencia de fracciones del cartucho de CM (CM1 a CM8). *C.* Ensayo de fosforilación en presencia de fracciones del cartucho de C18 (C1 a C8). *D.* Perfil de absorción a 280 nm de las fracciones de C18. Las líneas punteadas indican dónde se comenzó a eluir con acetonitrilo (MeCN) 50 y 100 %.

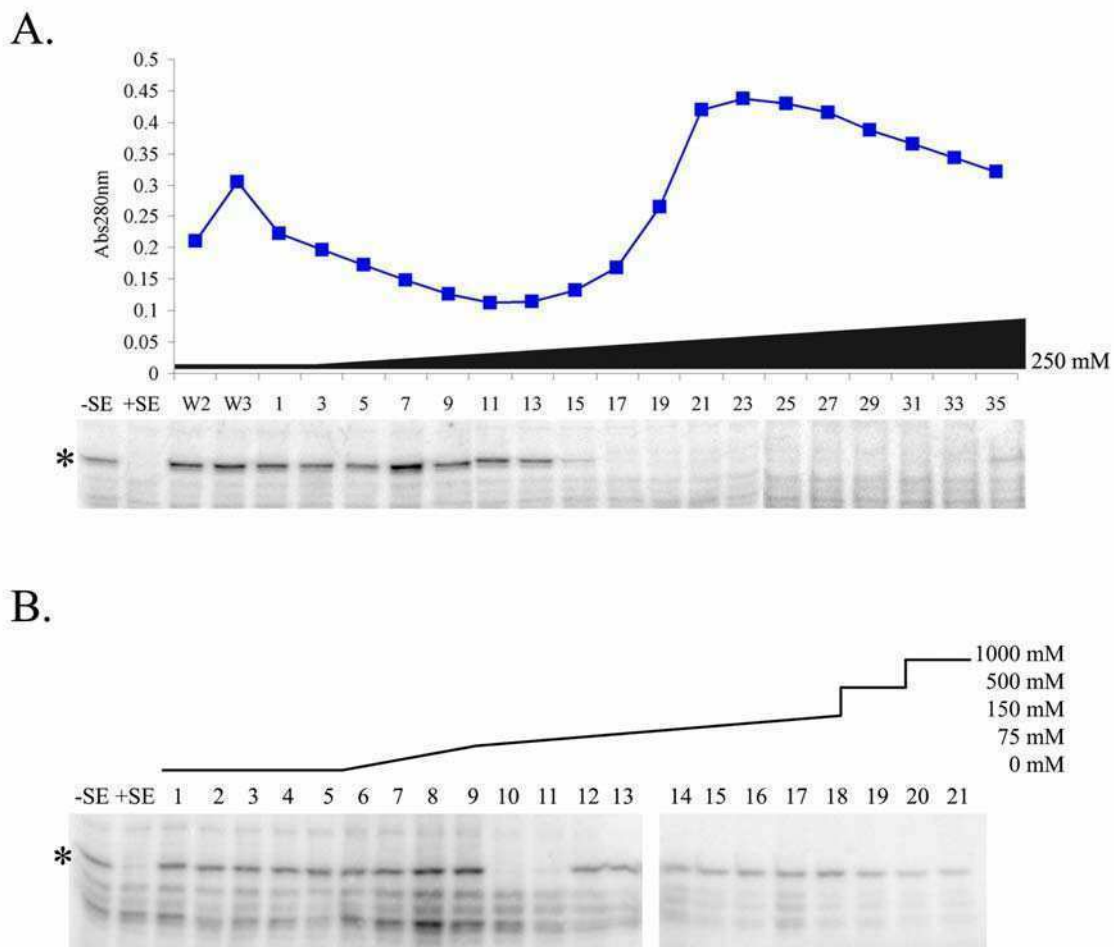
*SE*, exudado de estigma-estilo de tabaco. El asterisco (\*) indica la señal correspondiente a LePRK2. Ver detalles de los protocolos en la sección 4.2.1.2 y 3.

Resulta extraño el no haber podido retener a MrX en la resina de C18, dado que el protocolo que se utilizó se seleccionó en base a diferentes citas bibliográficas donde se realizaban purificaciones de péptidos, y éstos quedan retenidos en columnas de esta matriz [106, 111, 115, 140-147]. Podemos asegurar que el cartucho de C18 funcionó correctamente ya que al eluir con cantidades crecientes de acetonitrilo (ver sección 4.2.1.3), la absorbancia a 280 aumentaba (figura 4.4.D). Esta absorbancia no es producto del cambio de solventes, puesto que al medir las mezclas de acetonitrilo 50 y 100%, los valores obtenidos de absorbancia no justificaron los aumentos obtenidos durante la corrida. Esto indicaría que la resina retuvo diferentes compuestos -muy probablemente de naturaleza peptídica, de acuerdo a la bibliografía consultada- presentes en la mezcla, pero no a MrX.

Como mencionamos previamente, el cartucho de resina de intercambio aniónico (QMA) resultó efectivo para retener a MrX. Decidimos analizar el comportamiento cromatográfico de MrX en otras resinas de intercambio aniónico en un formato que nos permitiera la separación de mayor cantidad de muestra, compatible con un protocolo de purificación. Utilizamos DEAE-sephadex, en una columna hecha a mano; y, MonoQ, en una columna comercial. En ambos casos, logramos retener a MrX y eluirlo posteriormente (figura 4.5). Sin embargo, como era de esperar para una columna confeccionada manualmente, la resina DEAE-sephadex resultó en un pico de elución ancho, obteniéndose MrX en un volumen de elución muy grande, comprendido por las fracciones 16-34. En el caso de la MonoQ, obtuvimos un pico agudo típico de una corrida de FPLC, donde la actividad podía ser aislada prácticamente en 2 ml totales por corrida (fracciones 10 y 11). Por lo tanto, seleccionamos la MonoQ para el protocolo de purificación y bicarbonato de amonio como solución de corrida.

El siguiente paso fue combinar las diferentes técnicas de purificación descritas previamente dentro de un protocolo de purificación con el fin de obtener a MrX en su estado puro para llevar a cabo las determinaciones estructurales.





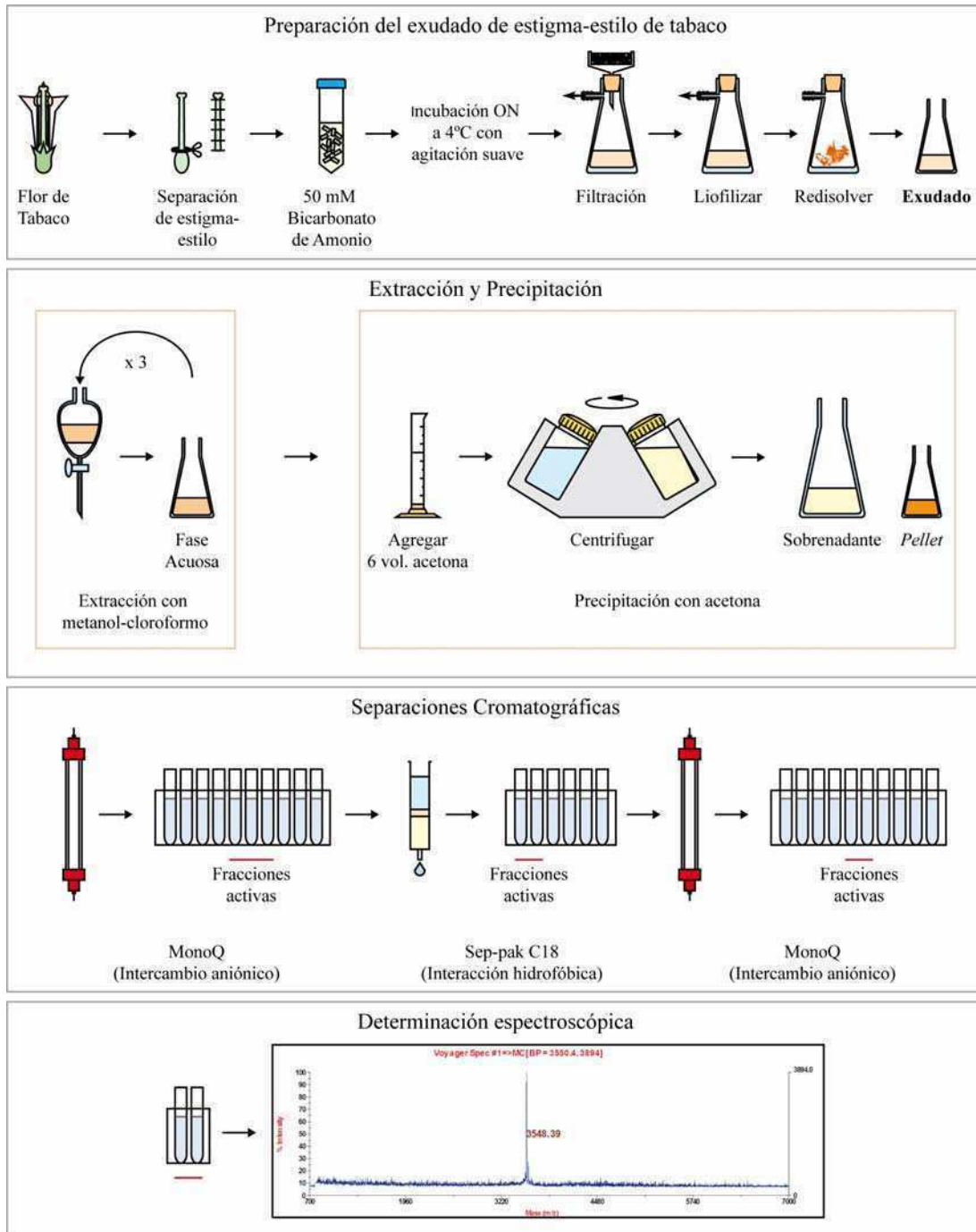
**Figura 4.5: Desfosforilación de LePRK2 en presencia de fracciones de dos columnas de intercambio aniónico.** Las columnas fueron eluidas con  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  hasta una concentración final de 250mM. **A.** Columna DEAE-sephadex manual. El gráfico muestra la absorbancia a 280 nm de las fracciones ensayadas en la reacción de fosforilación. **B.** Columna MonoQ comercial.

El asterisco (\*) muestra la posición de LePRK2. *SE*, exudado de estigma-estilo de tabaco.

### 4.3.3. Protocolo de purificación

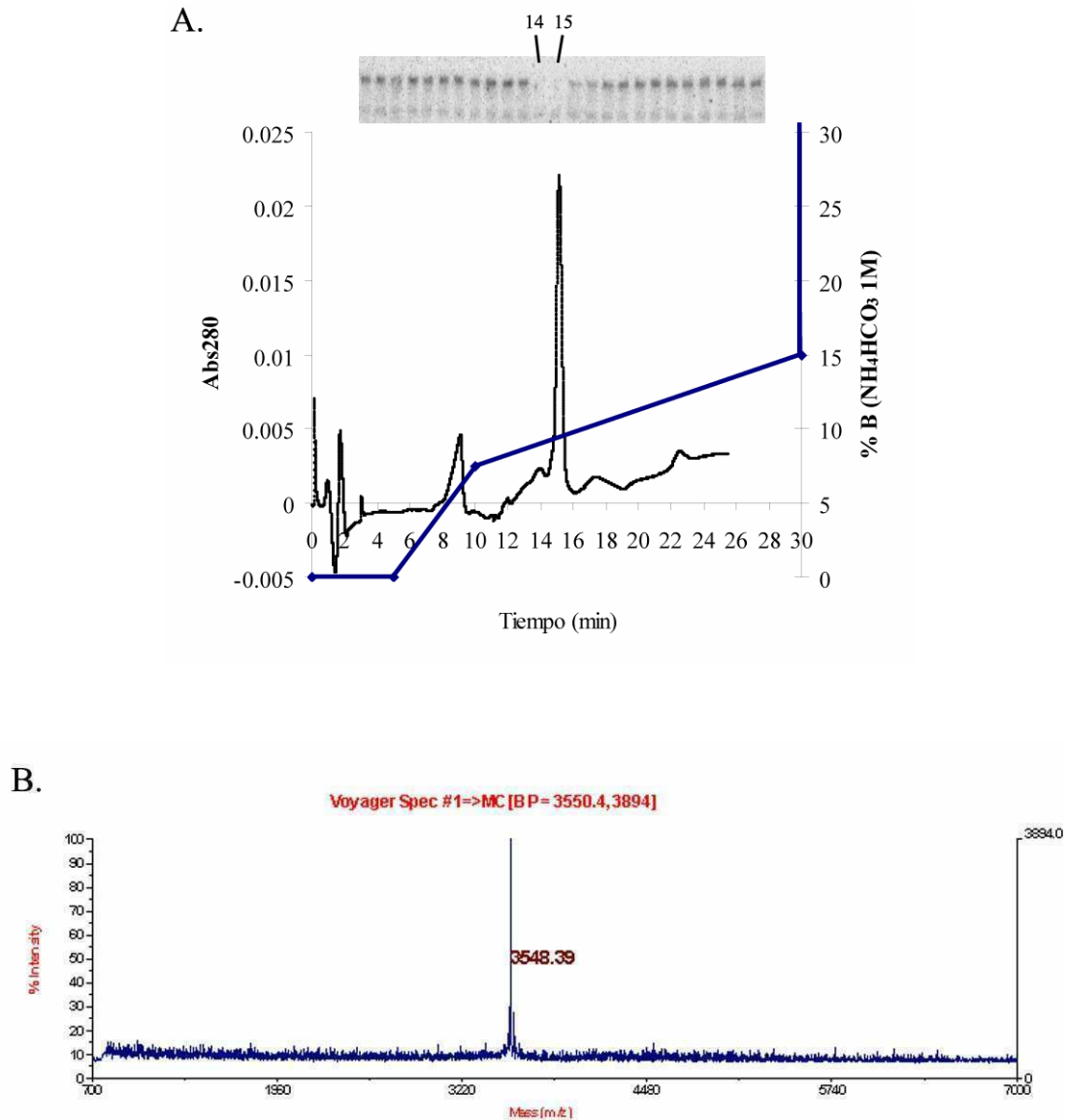
Como fue expuesto en la sección anterior, la extracción con solventes orgánicos y precipitación con acetona, y la cromatografía de intercambio aniónico fueron métodos bioquímicos apropiados para iniciar el protocolo de purificación. Decidimos utilizar

también la resina de fase reversa (C18), ya que a pesar de no retener a MrX, sirve para eliminar otros compuestos contaminantes (ver figura 4.4.D). La figura 4.6 muestra la estrategia de purificación que decidimos aplicar.



**Figura 4.6: Representación esquemática del protocolo de purificación.** Ver detalles del protocolo de purificación en la sección 4.2.1.4.

Primeramente, realizamos el protocolo de purificación de forma analítica, con el fin de analizar cuál era la eficiencia del protocolo propuesto. Decidimos utilizar la absorbancia a 280 nm como una correlación del estado de pureza, aun cuando en un mismo pico pueda eluir más de un compuesto (datos no mostrados). Como resultado del protocolo, en el último paso de purificación (MonoQ) obtuvimos un pico aislado que al



**Figura 4.7: A. Cromatograma del último paso de purificación (2da. MonoQ) y ensayo de actividad de las fracciones. En azul, se observa el gradiente de elución (eje y secundario). En el autorradiograma del panel superior, se señalan las dos fracciones con actividad (14 y 15). B. Espectrometría de masa UV-MALDI-TOF de MrX purificado de acuerdo al protocolo desarrollado.**

determinarle la actividad, era capaz de desfosforilar a LePRK2 (figura 4.7.A). Suponiendo que la desfosforilación de LePRK2 procede de forma similar que una actividad enzimática de primer orden, utilizamos el  $K_m$  como estimador del estado de pureza. Calculamos el valor de  $K_m$  para cada paso de purificación y obtuvimos la tabla de purificación (tabla 4.1). Podemos observar que mediante el protocolo diseñado, logramos purificar MrX cerca de  $\sim 160.000$  veces con respecto al exudado (no contamos con el error estándar, ya que sólo teníamos una réplica del último paso). De la tabla de purificación también deducimos que el paso de precipitación con acetona no resulta en la separación de MrX de otros compuestos contaminantes, ya que el valor de  $K_m$  obtenido es prácticamente similar al exudado original. Por otro lado, el valor de  $K_m$  obtenido para el paso de C18 indica que no logramos purificar con respecto al paso anterior e incluso que necesitamos más unidades de absorbancia a 280 nm para desfosforilar a LePRK2. Esto contradice las observaciones mostradas antes donde la elución con 50 y 100% acetonitrilo resultan en el despegado de compuestos que absorben a 280 nm. Es posible que la incubación con acetonitrilo resulte en la desnaturalización de MrX. De este modo, obtendríamos MrX inactivo que eluye junto con MrX activo. La mezcla de una versión activa e inactiva resultaría en la necesidad de utilizar mayor cantidad de MrX con respecto al paso de purificación anterior para lograr el mismo efecto. Sin embargo, una concentración de acetonitrilo 6% no debería causar un efecto tan drástico sobre MrX, cuando hemos demostrado que 50% metanol en presencia de cloroformo no tiene efectos sobre la actividad (primeros pasos de purificación). Por lo tanto, es probable que este resultado sea el compendio de errores experimentales (pipeteo, determinación de absorbancia a 280 nm, diferencias de “señales ruido” de diferentes geles, etc.). A pesar de estas observaciones y en vista que el resultado final determinado por espectrometría de masa fue satisfactorio, iniciamos una purificación preparativa con 431 estigmas-estilos de tabaco siguiendo el protocolo de purificación sin realizar ningún cambio.

Paso de Purificación	Km	Error st.	Error %	Purif. c/r Exudado
Exudado	16.38	0.06	0.4	1.0
Snte. Cloroformo	9.78	2.13	21.8	1.7
<i>Pellet</i> de Acetona	21.58	2.83	13.1	0.8
1era MonoQ	7.35E-04	1.69E-04	22.9	22276
C18	1.28E-03	2.39E-04	18.6	12769
2da MonoQ (desalada)	1.04E-04	----	----	156849

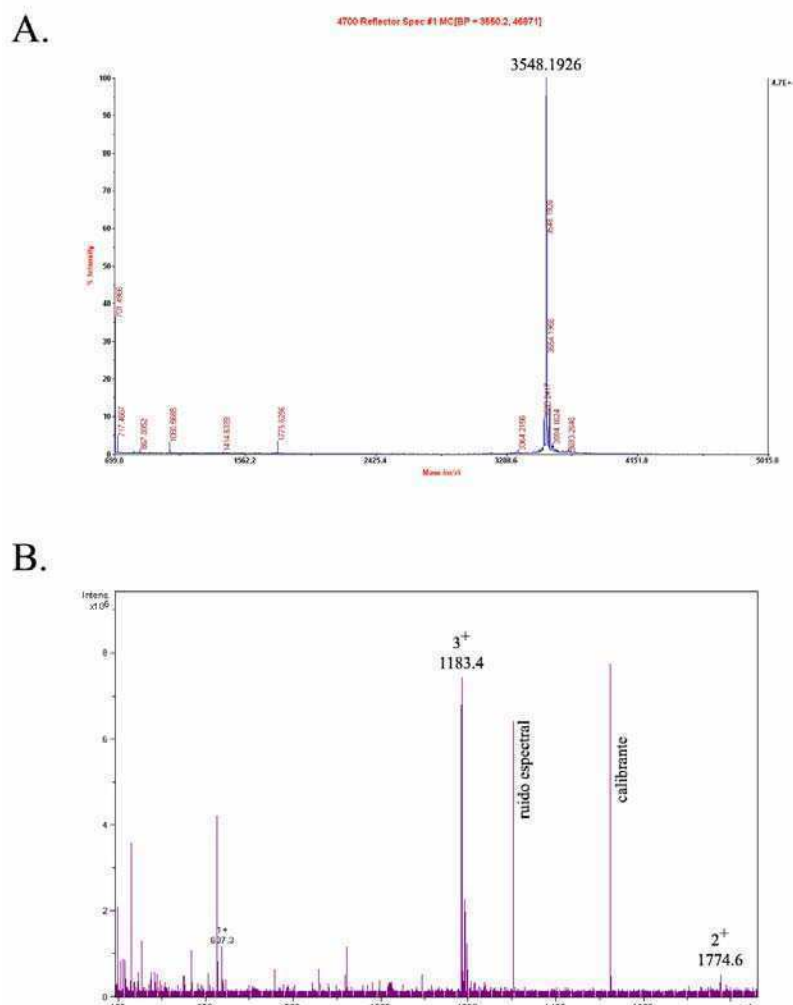
**Tabla 4.1: Tabla de Purificación de MrX.** *Error %*, error porcentual; *Error st.*, error estándar, *Purif. c/r Exudado*, purificación con respecto al exudado; *Snte.*, sobrenadante.

En la figura 4.7.B mostramos el espectro de masa UV-MALDI-TOF de las fracciones de MonoQ del último paso de purificación que desfosforilan LePRK2. De esta figura podemos concluir que el protocolo de purificación fue exitoso, ya que las fracciones positivas correspondieron a un pico aislado detectado por absorbancia a 280 nm, del que obtuvimos un pico único en UV-MALDI-TOF. De acuerdo a este resultado, podemos asegurar que purificamos MrX a homogeneidad y determinamos con precisión que su peso molecular es de  $3548,4 \pm 0,1$  Da. Sin embargo, el equipo utilizado para realizar la determinación del peso molecular de MrX no estaba capacitado para producir la fragmentación del mismo y así obtener la secuencia. Para ello, debimos repetir el protocolo de purificación para obtener más masa y realizar así determinaciones estructurales.

#### 4.3.4. Análisis estructural de MrX por UV-MALDI-TOF MS/MS y FT-ICR MS

En principio, verificamos el peso molecular de MrX por dos técnicas diferentes de espectrometría de masa: UV-MALDI-TOF (figura 4.8.A) y FT-ICR (figura 4.8.B). Los resultados de las nuevas determinaciones indicaron que la masa obtenida para el ión molecular coincide con la masa ya determinada (sección 4.3.3). En base a estos valores, el peso promedio (entre las diferentes técnicas) corresponde a  $3548.3 \pm 0.1$  Da.

Los análisis estructurales de MrX por fragmentación se realizaron utilizando las dos técnicas mencionadas arriba. En ambos casos, debido al gran tamaño del ión



**Figura 4.8:** **A. Espectrometría de masa UV-MALDI-TOF.** Se observa el ión molecular de MrX que corresponde a un peso de  $3548,20 \pm 0,01$  Da. **B. Espectrometría de masa FT-ICR.** Se observan los iones correspondientes a  $\text{MrX}^{2+}$  ( $1774,6$  Da) y  $\text{MrX}^{3+}$  ( $1183,4$  Da), resultando en un ión parental de  $3548,30 \pm 0,01$  Da.

molecular, no fue posible obtener un número suficiente de fragmentos detectables que nos permitieran realizar una secuenciación *de novo*. Tampoco fue posible generar fragmentos por tripsinización, debido a la resistencia de MrX a esta proteasa (ver más adelante). Sin embargo, las dos técnicas permitieron determinar la presencia de un residuo de arginina presente en la molécula (en la figura 4.9.A, se muestra el resultado para las determinaciones hechas por UV-MALDI-TOF/TOF).

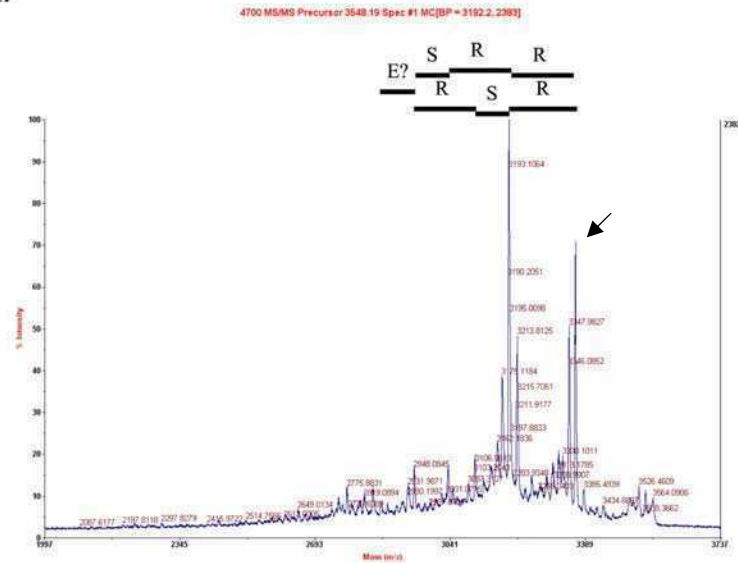
En el caso de la fragmentación producida utilizando espectrometría de masa UV-MALDI-TOF/TOF (figura 4.9), se pudieron identificar una serie de fragmentos que

podrían ser adjudicables a diversos residuos aminoacídicos, en todos los casos, con errores de determinación menores a 0,2 Da. Vale decir que, al desconocer la secuencia de MrX, no sabemos si los fragmentos obtenidos corresponden a la serie *y* o *b*. Por lo tanto, una secuencia de aminoácidos identificados puede estar en sentido amino terminal a carboxilo terminal del péptido, o la inversa (carboxilo terminal a amino terminal). En la figura 4.9.A, correspondiente a los fragmentos de alto peso molecular, se pueden observar dos series posibles de aminoácidos R-R-S (o S-R-R) o R-S-R, seguidos por un residuo de ácido glutámico (este último con un error de ~0,24 Da). La diferencia de ~202 Da entre el ión parental (~3548 Da) y el primer fragmento detectable (~3346 Da, que corresponde al primer pico que se observa entre los diferentes isótopos), puede ser adjudicable a numerosos dipéptidos (M-A, A-M, D-S, S-D, C-V, V-C o T-T). También es posible que el fragmento de ~3346 Da se haya producido por una desaminación (~17 Da) del fragmento de ~3362 Da (ver flecha en figura 4.9.A). De ser este el caso, la diferencia entre el ión parental y el fragmento de ~3362 Da podría ser adjudicable a un triptofano (~186 Da).

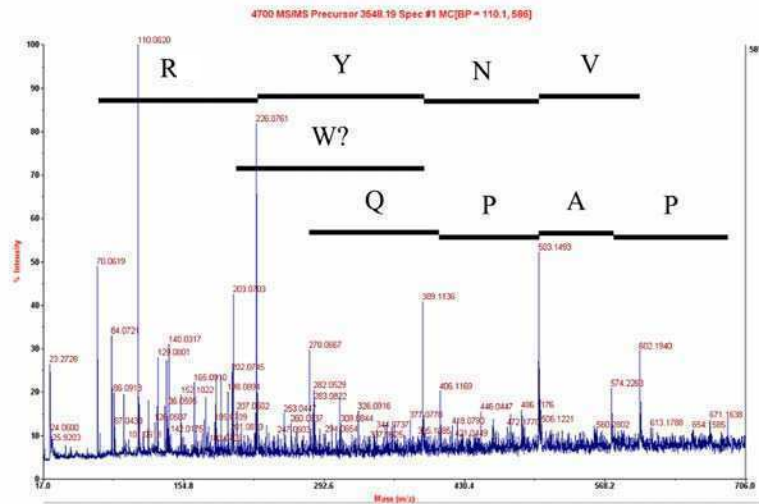
Por otra parte, en la figura 4.9.B se observan los fragmentos de bajo peso molecular. Obtuvimos una serie de picos cuyas diferencias podrían ser atribuirse a la secuencia V-N-Y-R (R-Y-N-V) con un error total menor a 0,1 Da. También observamos la presencia de dos picos (~389 Da y ~203 Da) cuya diferencia podría corresponder a un triptofano (error menor a 0,05 Da), y podría reemplazar a la tirosina de la secuencia anterior. De ser este el caso, también debería excluirse la arginina de esta secuencia. Observamos otros picos que podrían corresponder a la secuencia P-A-P-Q (Q-P-A-P), con un error menor a 0,2 Da. Las dos secuencias mencionadas, V-N-[Y-R]/W y P-A-P-Q, podrían ser mutuamente excluyentes dado que comparten el pico de ~503 Da.

De acuerdo a estos resultados, será necesario realizar nuevas determinaciones espectroscópicas con el fin de confirmar las secuencias obtenidas.

A.



B.



**Figura 4.9: Espectrometría de masa UV-MALDI-TOF-TOF.** El ión parental está filtrado para permitir la observación de los picos. Sobre los picos se señalan posibles asignaciones. **A. Región correspondiente a iones hijos de alto peso molecular.** La flecha señala el ión de ~3362 Da. **B. Región correspondiente a iones de bajo peso molecular.** La diferencia entre las masas de los residuos aminoacídicos monoisotópicos y las masas determinadas fueron menores a ~0,2 Da para A, y ~0,11 Da para B.



#### 4.3.5. Análisis de aminoácidos

Decidimos realizar un análisis de aminoácidos en una muestra purificada siguiendo el protocolo estándar. El análisis se realizó en el LANAIS-PRO dependiente de CONICET-UBA (Facultad de Medicina). Para realizar las determinaciones, MrX fue sometido a una hidrólisis ácida (HCl 6N a 110 °C, por 20 horas) y los productos se sembraron en el analizador. Como ensayo control, se analizó una muestra de MrX sin hidrólisis previa. De la comparación de ambas muestras, se obtuvieron sólo algunos aminoácidos provenientes de la hidrólisis (Tabla 4.2). La sumatoria de las cantidades detectadas para cada aminoácido resultó menor que el total de la muestra analizada, indicando que la hidrólisis no fue completa. Por otra parte, ninguno de los aminoácidos encontrados absorbe a 280 nm y no se identificaron aminoácidos ácidos que justifiquen el pegado a columnas de intercambio aniónico (incluso se encontraron dos aminoácidos básicos, lisina y arginina). Esto indicaría que no se encontraron todos los aminoácidos presentes en MrX. A pesar de ello, este resultado confirmaría la naturaleza proteica de MrX, a la vez que da indicios del contenido de aminoácidos presentes en la secuencia.

<u>Aminoácido</u>	<u>Cantidad detectada</u>
Serina	626 pmoles
Arginina	173 pmoles
Treonina	475 pmoles
Alanina	542 pmoles
Metionina	239 pmoles
Leucina	116 pmoles
Lisina	443 pmoles

**Tabla 4.2: Determinación de aminoácidos en una muestra pura de MrX**

#### 4.3.6. Efectos de algunas proteasas en MrX

De acuerdo a los resultados de la sección anterior, tenemos la certeza que MrX corresponde a un compuesto de naturaleza peptídica. Por ello, decidimos evaluar el efecto de diferentes proteasas sobre MrX, con el fin de determinar si este compuesto es un péptido susceptible a la hidrólisis enzimática y, de serlo, utilizar esta enzima para producir fragmentos que nos permitan secuenciarlo. Seleccionamos diferentes proteasas de acuerdo a sus propiedades hidrolíticas: Tripsina, Pepsina y Carboxipeptidasa Y. En la Tabla 4.3 observamos las especificaciones de cada una de estas proteasas.

<u>Proteasa</u>	<u>Actividad</u>	<u>Tipo</u>	<u>Sitio de clivaje</u>
Tripsina	Serinproteasa	endo	Arg o Lys
Pepsina	proteasa ácida	endo	Phe/Tyr>>Leu>>Trp>Ala u otro aa hidrofóbico
Carboxipeptidasa Y	serincarboxipeptidasa	exo	Amplio rango

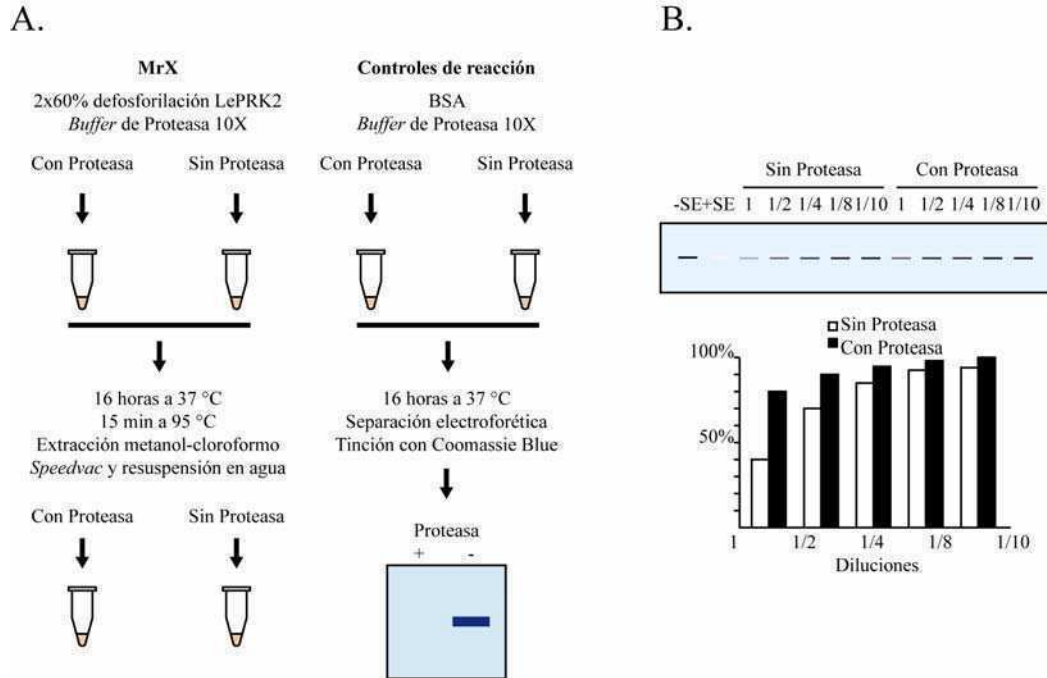
**Tabla 4.3: Características de las proteasas utilizadas en este trabajo [148].**

Decidimos utilizar una relación alta enzima-sustrato y 16 horas de incubación, con el fin de poder llegar a la hidrólisis total de MrX. Primero cuantificamos espectrofotométricamente a MrX por su absorbancia a 280 nm. Luego, calculamos la masa de BSA que corresponda a la misma absorbancia y, basándonos en este valor, determinamos empíricamente la masa de enzima a utilizar. En estos ensayos de proteólisis utilizamos una muestra de MrX parcialmente purificada (fracciones positivas de una columna de DEAE-sephadex, precedidas de una extracción con metanol-cloroformo y precipitación con acetona).

Diseñamos un experimento que nos permitiera ver cambios pequeños en la concentración de MrX activo posterior a la reacción de hidrólisis enzimática (figura 3.3.8). Dado que la respuesta que observamos por la presencia de MrX activo es la

desaparición de LePRK2, debimos seleccionar una cantidad de este ligando cuya diferencia de una dilución a la siguiente sea cuantificable. Utilizar una cantidad de MrX mayor o igual a la desfosforilación total de LePRK2 podría situarnos debajo del límite de detección para la banda fosforilada de LePRK2 en el gel, necesitando una alta actividad proteolítica de la enzima para detectar cambios. Por otro lado, utilizar cantidades reducidas de MrX que sólo produzcan una disminución del ~20% de la señal de LePRK2 como límite superior (por ejemplo), podría dificultarnos la determinación de diferencias entre las sucesivas diluciones, ya que todas tendrían valores muy similares de señal. Por lo tanto, decidimos realizar las reacciones utilizando como primera dilución de MrX aquella que induce una desfosforilación de LePRK2 tal que la señal remanente es de un 40% con respecto al control sin MrX. De acuerdo a nuestro protocolo, en el caso que la proteasa no tuviera efectos, deberíamos obtener una señal de fosforilación de LePRK2 con respecto al control (sin MrX) del 40% para la mayor cantidad de MrX, seguida por 70%, 85%, 92,5%, etcétera para las sucesivas diluciones. En el caso que la proteasa tuviera la capacidad de hidrolizar MrX, tal que ahora se obtenga una señal para LePRK2 del 80% con respecto al control (en vez de 40%) para la mayor cantidad, las señales obtenidas para las diluciones siguientes serían de 90%, 95%, 97,5%, hasta valores despreciables con respecto al control. De esta forma, las primeras diluciones de MrX tratado con enzima o sin tratar deberían ser los más informativos, indicando si las proteasas tienen la capacidad de hidrolizar a MrX. En el caso que la proteasa pudiera degradar completamente a MrX, la señal de LePRK2 para la mayor cantidad no debería tener diferencias apreciables con respecto al control sin MrX (Figura 4.10.B).

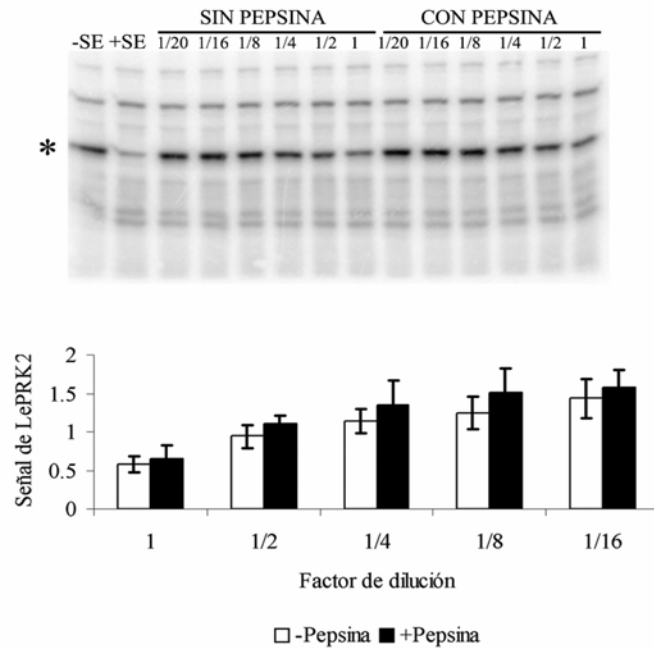
En cada reacción de hidrólisis utilizamos dos veces la cantidad de MrX capaz de reducir la señal de LePRK2 en un 60% con respecto al control sin MrX. Luego de la hidrólisis, realizamos diluciones seriadas al medio de cada una de las reacciones, obteniendo un rango de concentraciones decrecientes de MrX activo, comenzando con una señal de LePRK2 correspondiente al 40% con respecto al control, seguido de las diluciones seriadas (como se mencionó arriba). Cuantificamos densitométricamente las imágenes digitalizadas de los experimentos y graficamos estado de fosforilación de LePRK2 versus unidades de absorbancia a 280 nm de la fracción correspondiente a MrX.



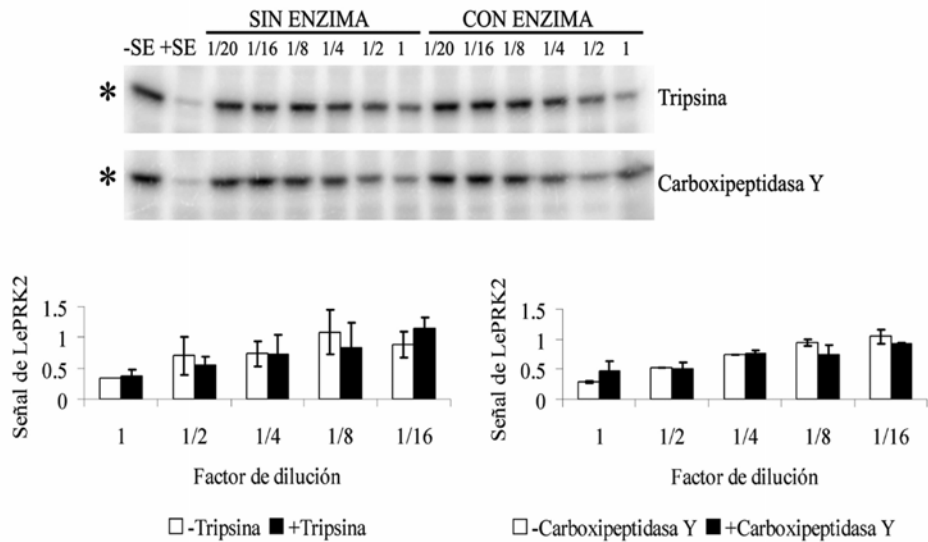
**Figura 4.10: Representación esquemática del protocolo de proteólisis de MrX.** A, Proteólisis de las muestras y de una proteína control (BSA). Ver detalles del protocolo en la sección 4.2.2.1. B, Resultado esperado: se realiza el ensayo de fosforilación de LePRK2 con diluciones seriadas al medio provenientes de la reacción (con y sin proteasa). La señal de LePRK2 fosforilada es cuantificada para cada calle y graficada en forma de barras.

En el panel A de la figura 4.11, observamos la imagen digitalizada del gel de fosforilación de LePRK2 en presencia de MrX tratado con pepsina. Podemos observar que para la misma dilución de MrX tratado y sin tratar, la intensidad de la banda de fosforilación de LePRK2 es similar. Esta imagen fue analizada con el *software* ImageJ, obteniéndose el gráfico de histogramas del panel inferior. Podemos observar que para el caso de la pepsina, no detectamos efectos de la proteasa sobre MrX, ya que no existen diferencias apreciables de señal de fosforilación de LePRK2 tratando o no con la proteasa. En la figura 4.11.B, observamos en gels representativos para tripsina y carboxipeptidasa Y, el mismo resultado que para pepsina.

A.

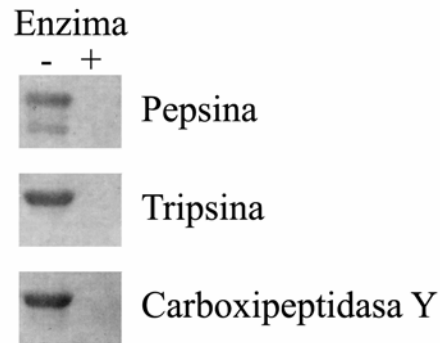


B.



**Figura 4.11: Ensayos de proteólisis de MrX.** A, Proteólisis con pepsina. Ensayo de fosforilación con diluciones seriadas. Ver detalles del protocolo en la sección 4.2.2.1. B, ensayo de fosforilación de LePRK2 con diluciones seriadas al medio provenientes de la proteólisis (con y sin proteasa). La señal de cada banda es cuantificada y graficada en forma de barras. El asterisco (\*) muestra la posición de LePRK2.

Todos los experimentos de proteólisis se repitieron al menos 3 veces. Los gráficos e imágenes digitalizadas de la figura son promedios de dos réplicas técnicas realizadas en el mismo momento, utilizando el mismo extracto. No pudimos graficar el valor promedio de la señal de LePRK2 para experimentos independientes, dado que el patrón de fosforilación de los microsomas es ligeramente variable de experimento en experimento, y de muestra de microsomas a la siguiente. Sin embargo, el resultado que obtuvimos fue siempre el mismo: para las proteasas utilizadas en este trabajo no obtuvimos una disminución de la actividad de MrX. En la figura 4.12, observamos la imagen digitalizada de un gel teñido con *Coomassie blue*, en el cual separamos electroforéticamente reacciones de proteólisis utilizando BSA como sustrato. En las condiciones de reacción utilizadas en este trabajo, todas las proteasas utilizadas fueron capaces de hidrolizar al sustrato, dado que la banda correspondiente a BSA desaparece en presencia de la enzima. Por lo tanto, podemos concluir que en las condiciones de reacción, MrX es resistente a las proteasas ensayadas.



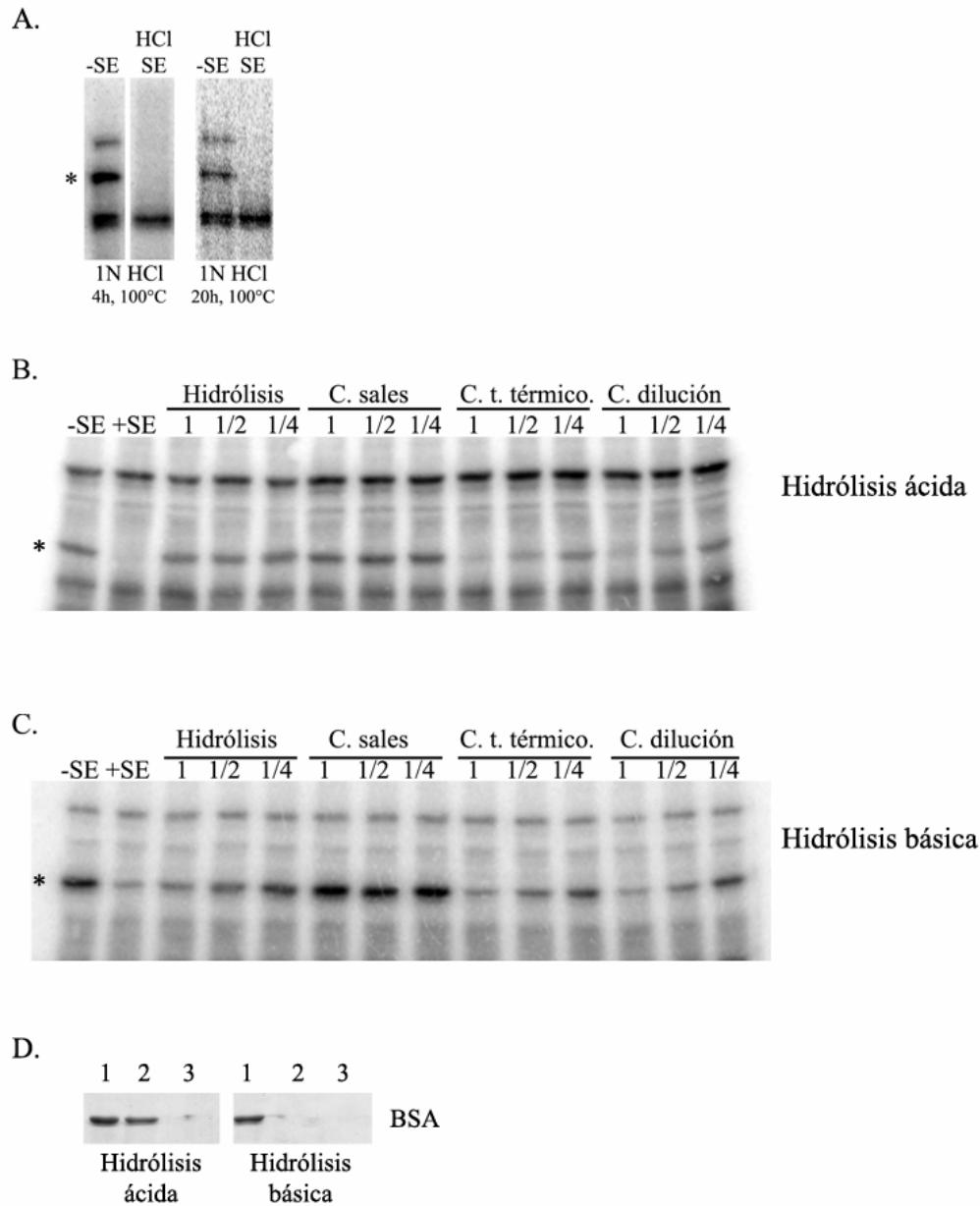
**Figura 4.12: Ensayo de proteólisis de una proteína control (BSA) en las condiciones ensayadas para MrX.** Cada panel corresponde a BSA sin tratar (-) o tratada (+) con la proteasa respectiva. Las muestras se separaron por SDS-PAGE y el gel se tiñó con *Coomassie blue*.

#### 4.3.7. Efectos de la hidrólisis ácida y básica sobre MrX

Numerosas biomoléculas son sensibles a los tratamientos con ácidos o bases concentradas a alta temperatura. En condiciones de alto pH, se hidrolizan las uniones

éster y amida, por lo que proteínas y ácidos nucleicos son hidrolizados. En condiciones de pH ácido, tanto las uniones amida de las proteínas como las uniones glicosídicas son hidrolizadas [149].

Probamos el efecto de la hidrólisis ácida y básica sobre MrX. En el primer caso, intentamos dos protocolos de acuerdo a la bibliografía [97, 138, 150], utilizando un bloque termostatzado a 100°C y variando el tiempo de incubación (4 horas y 20 horas) con una concentración de ácido clorhídrico de 1N, o utilizando un método de hidrólisis asistido por horno microondas en presencia de 1,5N del mismo ácido. En la figura 4.13.A y B, mostramos el efecto de la hidrólisis con los dos métodos. Podemos observar que las condiciones de reacción en el protocolo del bloque termostatzado, no tiene efectos sobre la actividad de MrX, aún luego de 20 horas de incubación (figura 4.13.A). Sin embargo, el protocolo del microondas tiene un marcado efecto en la reducción de la actividad desfosforilante de LePRK2 (figura 4.13.B), resultando en una señal radiactiva de LePRK2 comparable con la obtenida para el control de sales (ausencia de MrX). Por otro lado, la hidrólisis básica no tuvo efecto alguno sobre MrX (figura 4.13.C). A pesar de incubar una muestra de MrX en NaOH 1N por 2 horas a 100°C, la muestra neutralizada y diluida aun conservaba la capacidad de desfosforilar LePRK2, del mismo modo que lo hacía el control. En la figura 4.13.D, podemos observar el efecto de ambos tratamientos sobre BSA. En el caso de la hidrólisis ácida (asistida por microondas), obtuvimos una desaparición completa de la banda de BSA, mientras que el calentamiento por 10 min parece no tener efectos significativos sobre la presencia de la proteína. En el caso del tratamiento básico, observamos la desaparición de la banda de BSA cuando ésta es tratada con NaOH y en el control del tratamiento térmico. Este resultado puede deberse a la hidrólisis de la proteína en el tratamiento alcalino y a la precipitación por la incubación a altas temperaturas de la BSA en el control de tratamiento térmico, respectivamente.

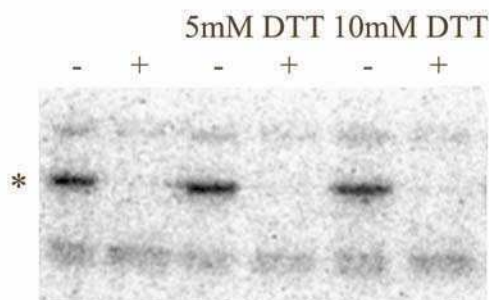


**Figura 4.13: A. Hidrólisis ácida de MrX en bloque termostatzado.** El tratamiento de cada extracto de estigma-estilo (SE) se indica al pie de cada panel. *HCl SE*, corresponde a la calle del extracto tratado con ácido clorhídrico. **B. Hidrólisis ácida de MrX asistida por microondas.** **C. Hidrólisis básica de MrX.** Para B y C: *Hidrólisis*, MrX sometido al tratamiento hidrolítico; *C. sales*, control de sales; *C. t. térmico.*, control del tratamiento térmico; *C. dilución*, control de dilución. 1, 1/2 y 1/4 representan la dilución de la alícuota utilizada en el ensayo, correspondiendo a una alícuota sin diluir (1), o dos diluciones seriadas al medio. **D. Seroalbúmina bovina (BSA) sometida a hidrólisis ácida asistida por microondas e hidrólisis básica.** El gel de SDS-PAGE fue teñido con *Coomassie blue*. 1, BSA sin tratar; 2, control del tratamiento térmico de BSA; 3, BSA sometida al tratamiento hidrolítico. El asterisco (\*) muestra la posición de LePRK2.



#### 4.3.8. Efectos del tratamiento reductor sobre MrX

Muchos compuestos peptídicos de diversos orígenes presentan características similares a las obtenidas hasta el momento en MrX: resistencia al tratamiento con proteasas, hidrólisis y termorresistencia (ver referencias en Tabla 6.1, sección 6). Algunos de estos péptidos, forman uniones disulfuro entre cisteínas de la secuencia primaria [151, 152]. Decidimos analizar el efecto de concentraciones crecientes de DTT sobre MrX, suponiendo que este compuesto posee este tipo de uniones intramoleculares como lo hacen otros péptidos [127]. En la figura 4.14, observamos que 5 mM y 10 mM de DTT no tuvieron efectos sobre un exudado de estigma-estilo de tabaco, como así tampoco 50 mM de DTT (datos no mostrados), ya que las muestras tratadas conservan la capacidad de desfosforilar a LePRK2.



**Figura 4.14: Tratamiento con DTT.** Fracción activa de DEAE (DEAE+) sin tratar o tratado con 5 mM ó 10 mM de DTT. -, reacción en ausencia de DEAE+; +, reacción con DEAE+. El asterisco (\*) muestra la posición de LePRK2.

#### 4.4. Conclusiones

En el capítulo anterior demostramos que la desfosforilación específica de LePRK2 y la disociación de su interacción con LePRK1 se produce por un compuesto presente en el apoplasto del estigma-estilo de tomate y tabaco (sección 3.3.1 y 3.3.2, [78]). Tratándose del ligando de un complejo proteico, de un peso molecular comparable al de otros ligandos peptídicos, y absorbancia a 280 nm, y en ausencia de datos espectroscópicos, supusimos que MrX era de naturaleza proteica. En este capítulo, describimos el diseño de un protocolo con el cual logramos purificar ~160.000 con respecto al exudado original a MrX, una molécula de ~3.550 Da responsable de la desfosforilación específica de LePRK2. La obtención de MrX puro nos permitirá investigar en qué procesos fisiológicos está involucrado el complejo LePRK de polen de tomate (ver capítulo siguiente). Además, realizamos una caracterización del mismo con el fin de confirmar que es de naturaleza peptídica.

El comportamiento de MrX en los diferentes pasos de purificación utilizados, nos permitió identificar algunas propiedades de este compuesto. MrX presentaría bajo número de grupos hidrofóbicos, ya que en presencia de cloroformo y metanol permanece en la fase acuosa. Además, su naturaleza hidrofílica se confirmaría por tres observaciones independientes: su falta de retención en resinas de fase reversa en las condiciones ensayadas; la retención y elución selectiva cuando se separa cromatográficamente en columnas o en placa delgada utilizando celulosa como fase sólida y alcoholes como fase móvil (resultados no mostrados); y, su interacción con columnas de intercambio aniónico, sugiriendo que MrX estaría cargado negativamente al pH de trabajo (~8,0).

Como resultado del análisis de aminoácidos, identificamos al menos 7 residuos que estarían presentes en MrX. En principio, notamos que 2 corresponden a aminoácidos básicos (arginina y lisina) y no encontramos ninguno ácido (ácido aspártico y glutámico), lo que resulta contradictorio con la retención de MrX en columnas de MonoQ. Por otra parte, no encontramos fenilalanina, tirosina o triptofano que justifiquen la absorbancia a 260-280 nm. Estos dos resultados contrastan con dos propiedades bien conocidas de MrX: la carga negativa (al pH que realizamos la purificación) y su absorbancia a 280 nm. Nuestra hipótesis para explicar esta observación es que la determinación de aminoácidos

no fue eficiente, quizás por alguna característica estructural de MrX que impide la hidrólisis total. A pesar de la diferencia de concentración de ácido en la determinación de aminoácidos (6N) y la hidrólisis que se muestra en la figura 4.13.A (1N), parecería que MrX es resistente al HCl a 100°C, ya que persiste la actividad desfosforilante. Los aminoácidos obtenidos en la determinación podrían pertenecer a una porción de MrX fácilmente hidrolizable, quizás en los residuos expuestos al medio, mientras que aquellos que absorben a 280 nm podrían encontrarse en una zona interna o protegida, como es normal en las proteínas. Sin embargo, de ser este el caso, también las cargas negativas que unen a MrX a las resinas de intercambio aniónico deberían estar en esta zona ya que no fueron identificados en el análisis, y ésto imposibilitaría su unión a las matrices. Cabe señalar, que también se identificaron serina y treonina en el análisis, y estos dos aminoácidos son blancos de *O*-glicosidaciones. Si los aminoácidos obtenidos en la determinación pertenecen a una zona expuesta de MrX y además están *O*-glicosidados, quizás los sustituyentes podrían estar cargados negativamente (sulfatados o por esterificación con grupos fosfato). Esta sería una característica esperable de un producto de secreción presente en la matriz extracelular. De esta forma se podría justificar: la interacción a las columnas de intercambio aniónico, alta hidrofiliidad superficial que imposibilitan la interacción a resinas de fase reversa, la interacción con celulosa en cromatografías en columna y placa delgada y la imposibilidad de las proteasas a acceder a los aminoácidos blanco (sección 4.3.6 y comentarios más adelante). Sin embargo, debemos mencionar que en la determinación de aminoácidos, se encontraron picos artefacto que eluían a los mismos tiempos que lo hacen el ácido glutámico y aspártico, por lo que también existe la posibilidad que existan aminoácidos ácidos en la molécula y no hayan podido ser identificados. De acuerdo a los resultados expuestos en la figura 4.13.B, será necesario repetir la determinación de aminoácidos en muestras de MrX sometidas a hidrólisis ácida asistida por microondas, donde comprobamos la pérdida prácticamente total de la actividad.

Con el fin de confirmar la naturaleza proteica de MrX, comenzamos con la utilización de una batería de proteasas con especificidad por algunos de los diferentes aminoácidos encontrados en MrX, esperando que éste sea degradado. Tratamos con tripsina dirigida contra dos aminoácidos presentes en MrX (arginina y lisina); pepsina,

contra fenilalanina y tirosina, los cuales serían los residuos que absorben a 280 nm; y con carboxipeptidasa Y, de amplio espectro. La pérdida de actividad luego del tratamiento con la proteasa indicaría que el compuesto es indiscutiblemente una proteína, y la obtención de fragmentos nos ayudaría a secuenciar MrX por espectrometría de masa. Sin embargo, en ningún caso observamos un aumento en el estado de fosforilación de LePRK2 correlacionado con una disminución en la actividad desfosforilante mediada por MrX. En principio este resultado fue desalentador, dado que esperábamos una disminución de la actividad de MrX por ser una molécula proteica. Otros investigadores han reportado la existencia de proteínas o péptidos que también presentan resistencia a proteasas (ver referencias en Tabla 6.1, sección 6). Algunas de estas proteínas presentan uniones intramoleculares a través de puentes disulfuro que estabilizan la estructura tridimensional de la misma. Esta estabilización resulta en una mayor tolerancia a altas temperaturas y a la digestión por proteasas [151-153]. Por lo tanto, podríamos suponer que MrX presenta uniones puente disulfuro intracatenarias que le permiten a la molécula resistir altas temperaturas sin desnaturalizarse a la vez que el plegamiento compacto, y la posible presencia de glicosidaciones, impide el ataque por proteasas (ver más adelante). En Violáceas y Rubiáceas (plantas), se ha descrito un grupo de moléculas llamadas ciclótidos que corresponden a moléculas de ~30 aminoácidos (2-4 kDa), donde no existen extremos amino o carboxilo terminal, ya que estos están unidos covalentemente, y además presentan 3 uniones disulfuro que estabilizan la molécula [154, 155]. Estos péptidos cíclicos poseen una estructura compacta y son completamente resistentes al tratamiento térmico y con proteasas. Sólo luego de la reducción de las uniones disulfuro estos compuestos son lábiles a la acción de las enzimas proteolíticas [151]. Sin embargo, la ruptura de las uniones S-S no implican una pérdida de la actividad de estos compuestos. Si MrX pertenece a este grupo de proteínas, entonces podría explicarse la imposibilidad de digerirlo enzimáticamente con las proteasas descritas en este trabajo, y con otras que ensayamos y no mencionamos aquí (proteínasa K y termolisina). Asimismo, el tratamiento con DTT tampoco sería suficiente para disminuir la actividad de MrX. Que MrX pertenezca a este grupo de compuestos, es una posibilidad que aún debe ser analizada. Para ello, será necesario tratar MrX primero con un agente reductor, seguido de una alquilación, para finalmente tratarlo con proteasas [151]. En el caso de tener una

estructura compacta similar a los péptidos cíclicos, también se entendería por qué MrX eluye en columnas de tamiz molecular Superdex Peptide (GE Healthcare) en fracciones correspondientes a un peso molecular menor que el determinado por espectrometría de masa (resultados no mostrados). Por otra parte, se ha observado que los ciclótidos absorben a 280 nm y emiten fluorescencia a ~330 nm por la presencia de aminoácidos aromáticos. Esta emisión aumenta con la reducción de los puentes disulfuro, al exponer los residuos responsables de la emisión [151]. La determinación del espectro de fluorescencia de MrX y su respuesta a la presencia de DTT sería de vital importancia para identificar la presencia de puentes disulfuro. A pesar de las similitudes entre las propiedades de los ciclótidos y MrX, existe una diferencia substancial en la purificación de ambos. Los ciclótidos son fácilmente purificables por su interacción con columnas de fase reversa, a diferencia de lo que ocurre con MrX. Como lo mencionamos antes, quizás la presencia de glicosidaciones responda a esta diferencia.

Para estudiar la presencia de glicosidaciones en MrX, en una serie de experimentos no mostrados en esta tesis analizamos el efecto de una celulasa [hidrólisis de 1,4-(1,3:1,4)- $\beta$ -D-glucano] y una pectoliasa [hidrólisis de poli  $\alpha$ -1,4-glicanos por actividad endopoligalacturonasa; hidrólisis de  $-\text{CH}_2\text{OH}$  de los C6 de hexosas por actividad endopectinliasa], dos enzimas utilizadas habitualmente en la producción de protoplastos vegetales. Estas dos enzimas tienen la capacidad de degradar las uniones típicas encontradas en las paredes celulares vegetales. Además se analizó el efecto de una liticasa, otra hidrolasa con una especificidad diferente a las mencionadas [poli- $\beta$ -(1-3)-glucano]. Ninguna de las enzimas ensayadas tuvo efectos sobre la actividad de MrX, indicando que éste no posee estas uniones o bien que la remoción de los residuos no afectaría la actividad. Este último resultado coincide con el observado luego de la hidrólisis ácida, que no solamente produce la ruptura de las uniones peptídicas, sino que además promueve la hidrólisis de la unión entre azúcares [156], donde aún se observa desfosforilación de LePRK2. También existe la posibilidad que MrX no esté glicosilado. Para estudiar esta posibilidad, deberíamos determinar la presencia de glicanos mediante la reacción de oxidación con periodato o por la reacción de ácido periódico-Schiff (PAS) [156]. Otra posibilidad sería metilar los oxhidrilos presentes en los azúcares y estudiar el comportamiento de met-MrX en columnas de fase reversa. Por lo mencionado arriba, en

caso de existir glicosidaciones, éstas no tendrían una función importante en la actividad de MrX.

Además de la hidrólisis con HCl, intentamos utilizar otra técnica para romper los enlaces peptídicos. Por ello, sometimos MrX a una hidrólisis alcalina, que habitualmente se usa en la industria para el tratamiento de estructuras proteicas recalcitrantes [157]. Luego del tratamiento alcalino, tampoco se produjo una disminución evidente de la actividad de MrX. Quizás el tiempo de reacción no haya sido lo suficientemente prolongado, aún así es sorprendente la imposibilidad de hidrolizar a MrX.

El conjunto de resultados obtenidos hasta ahora estarían describiendo un compuesto peptídico no mencionado antes en la bibliografía, con la capacidad de resistir tratamientos drásticos como altas concentraciones de ácido y base, la alta temperatura, el poder reductor y la actividad de proteasas e hidrolasas de diferente especificidad. Lamentablemente, como no pudimos obtener fragmentos de menor peso molecular, hasta el momento ha resultado imposible la determinación de la estructura molecular de MrX. La combinación de diversos tratamientos como la reducción, alquilación e hidrólisis enzimática o el tratamiento de MrX con CNBr que rompe la unión peptídica en los residuos de metionina (presente en MrX, Tabla 4.2) [97], quizás nos permitan obtener fragmentos que puedan ser estudiados por espectrometría de masa. El conocimiento de la estructura molecular nos va a permitir clonar el gen que codifica para MrX y producir una versión recombinante, o bien sintetizarlo *in vitro*. MrX marcado radiactivamente o con un fluoróforo sería la herramienta ideal para estudiar bioquímicamente y microscópicamente el comportamiento del complejo de LePRKs. A pesar de no contar con estas herramientas, el desarrollo del protocolo de purificación en el cual obtenemos MrX (descrito en esta tesis) nos va a permitir realizar ensayos fisiológicos *in vivo* (ver capítulo siguiente). Estos ensayos nos facilitarán identificar en qué procesos está involucrado el complejo de LePRKs y de qué forma se ve modulada la actividad del complejo por MrX.

## **5. Capítulo 3: Efectos fisiológicos de MrX**

## 5.1. Introducción

El gametofito femenino es una estructura reducida rodeada por los tejidos del pistilo. La fertilización exitosa requiere que el tubo polínico llegue a este pequeño blanco rodeado de células esporofíticas [100]. Existen dos instancias de intenso diálogo molecular previos a la fertilización. La primera implica la interacción entre el tubo polínico y el tejido esporofítico del pistilo. Durante esta etapa, el tubo percibe señales presentes en la matriz extracelular del tracto transmisor que le permitirían nutrirse, orientarse, adherirse, e indicar el camino hacia los óvulos. La segunda instancia se establece entre el tubo polínico y el gametofito femenino. El saco embrionario indica el camino hacia la micrópila y restringe la entrada de más de un tubo a la sinérgida. Existen observaciones que muestran que es necesario que el tubo polínico atraviese el estigma y el estilo (al menos una parte) para que pueda percibir las señales provenientes del saco embrionario [158, 159]. Este comportamiento sugeriría que existe una jerarquía de señales que el tubo polínico va percibiendo a lo largo del crecimiento, y el orden en el cual las percibe es fundamental para la fertilización [99]. En este diálogo complejo, el tubo polínico tiene que tener la capacidad de percibir e interpretar estas señales. Algunas de ellas actúan a través de receptores de membrana tipo LRR o con dominios S (glicoproteína S), y de otras se desconoce el modo de acción.

El estigma es el primer tejido que recibe al polen, y en plantas autocompatibles el polen de la misma flor puede adherirse, hidratarse, germinar y penetrar el estilo [99]. En plantas de estigma seco como en las Brasicáceas, la pared del grano de polen contiene numerosas proteínas involucradas en la interacción inicial con el estigma, como proteínas relacionadas a la hidratación [160], o el determinante masculino de autoincompatibilidad SCR [96] y proteínas de bajo peso molecular involucradas en la adhesión del grano de polen al estigma [147, 161]. También existen señales autócrinas producidas por el grano de polen que estimulan la germinación como la fitosulfoquina [162]. En plantas de estigma húmedo como tomate y tabaco, luego que ocurre la germinación, los tubos polínicos crecen sobre o a través de la matriz extracelular del estilo. Al hacerlo, siguen moléculas quimioattractantes que indican el camino hacia el ovario. En *Lilium longiflorum*, se han descrito dos proteínas involucradas en la interacción polen-pistilo:



SCA (asociada a pectina y a ubiquitina extracelular [126]), en la adhesión a sustratos artificiales [126, 130, 163] y a la matriz extracelular del pistilo [126, 128]; y, quimiocianina, que atrae a los tubos polínicos *in vitro* [125]. En *Arabidopsis*, la sobreexpresión de plantacianina, resulta en un crecimiento anormal del tubo polínico [129]. Otras proteínas involucradas en el crecimiento del tubo polínico son las pertenecientes a la familia de glicoproteínas ricas en arabinogalactanos (AGP), que actúan como sustrato nutricional o pegamento/lubricante guiando a los tubos polínicos hacia los óvulos [164]. Dentro de esta familia, en tabaco la glicoproteína TTS se encuentra en el estilo formando un gradiente de glicosilación y resulta quimiotrópicamente activa para el tubo polínico *in vitro* [131, 132]. TTS es desglicosilada *in vivo* e *in vitro*, y los azúcares son incorporados en la pared celular del tubo polínico. Existen otros ejemplos de proteínas altamente glicosiladas además de TTS que actuarían como fuente nutricional, como glicoproteínas del estilo ricas en galactosa (GaRSGP) o proteínas específicas de pistilo tipo extensina (PELP). Sin embargo, estas proteínas no tienen actividad quimiotrópica [164].

Al alcanzar el ovario, el tubo polínico es guiado por los tejidos placentarios hasta los óvulos, donde ocurre la última instancia de comunicación: la entrada al saco embrionario a través de la micrópila. Esta etapa está separada en una fase de atracción funicular, dependiente de los tejidos diploides del óvulo [100, 165]; y otra micropilar, dependiente del gametofito femenino [136, 137, 166]. Una de las señales funiculares descritas involucra al GABA en *Arabidopsis*, que se encuentra en concentraciones crecientes a lo largo del pistilo y estimula el crecimiento del tubo polínico [133]. Además del  $\text{Ca}^{2+}$  liberado por el gametofito femenino, existirían otras señales micropilares quimioattractantes, que serían difusibles, proteicas y se originarían en las células sinérgidas [135, 137, 167], como así también señales repelentes que impedirían la entrada de más de un tubo polínico a la micrópila [158].

Las señales emitidas por los diferentes tejidos del pistilo son transducidas por un sistema intracelular, redirigiendo la migración del tubo y redefiniendo el ápice. El tubo polínico se extiende depositando vesículas que contienen nueva membrana y componentes de la pared celular mediante un sistema de transporte de actina-miosina [23, 42, 168]. Se han identificado una larga lista de moléculas señalizadoras intracelulares

candidatas a ser las responsables de unir las señales extracelulares con las respuestas fisiológicas, incluyendo cAMP [40], ROP [168, 169] y la quinasa de fosfatidilinositol monofosfato [46]. Todos estos componentes intracelulares regulan en mayor o menor medida la  $[Ca^{2+}]_i$  y el citoesqueleto de actina, resultando en una reorientación del crecimiento, y su estimulación o arresto (en algunos casos acompañado de la formación de un ápice globoso) [23, 168]. Sin embargo, aún se desconocen los componentes que conectan las señales extracelulares con las moléculas intracelulares [170].

En este contexto, el complejo de LePRKs podría ser clave para la identificación del eslabón faltante en la cadena de transducción de señales entre los tejidos femeninos y el tubo polínico. Como se ha mencionado antes, se han identificado algunos ligandos extracelulares que interactúan con el complejo de forma autócrina como LAT52 [79], y otros provenientes del pistilo como LeSHY y LeSTIG1 [81]. Sin embargo, no existen evidencias de la respuesta del complejo de LePRKs a estos compuestos. Por otra parte, se ha descrito que este complejo responde bioquímicamente a la presencia de extractos de estigma-estilo de tomate o tabaco [77, 78], y se ha identificado a KPP [52], un componente intracelular con homología a GEFs de plantas [84], que sería el responsable de transducir la señal, probablemente modulando la actividad de ROP. El aislamiento de MrX, el compuesto responsable del “encendido” o “apagado” del complejo de LePRKs mediante la desfosforilación de LePRK2, abre las puertas para el estudio de las respuestas fisiológicas del tubo polínico ante señales del tejido femenino. En base a la interacción del complejo de LePRKs con KPP, estas respuestas estarían asociadas a la estimulación o inhibición del crecimiento, pudiendo afectar la morfología del tubo polínico.

En este capítulo, analizamos las respuestas del tubo polínico a la presencia de MrX. Decidimos analizar los efectos de concentraciones crecientes de este ligando sobre el crecimiento y la morfología del tubo. Además, con el fin de analizar qué efectos tiene la modulación de la expresión de ambos receptores sobre el crecimiento del tubo polínico y la percepción de MrX, utilizamos polen de plantas transgénicas antisentido para LePRK2 y sobreexpresantes de LePRK1. El análisis de los resultados obtenidos indica que MrX estimula el crecimiento del tubo polínico *in vitro*. Por otra parte, la utilización de las plantas transgénicas nos permitió determinar que el complejo de LePRKs modularía el crecimiento de forma dual, estimulándolo a través de la actividad de

LePRK2 y reprimiéndolo a través de LePRK1. La estimulación del crecimiento inducida por MrX, sería totalmente dependiente de LePRK2, quien sería el responsable de la percepción o transducción de dicha señal hacia el citoplasma.

## 5.2. Materiales y métodos

### 5.2.1. Material vegetal utilizado

El polen de tomate se obtuvo de la misma forma que se describe en la sección 3.2.1, pero se utilizó recién recolectado en todos los ensayos de germinación. Además de utilizar plantas salvajes, se colectó polen de tres variedades de plantas transgénicas. La primera variedad definida como “**K2AS**”, lleva la secuencia que corresponde al gen en antisentido de LePRK2 bajo el promotor específico de polen LAT52 (LAT52::K2AS). Además, lleva una segunda construcción del gen de la proteína verde fluorescente (GFP) de *Aequorea victoria* [171], también bajo el promotor de polen LAT52 [80, 172]. La segunda variedad definida como “**K1OX**”, corresponde al gen de LePRK1 bajo el promotor LAT52, y de la misma forma que K2AS, lleva la construcción LAT52::eGFP. La tercera variedad definida como “**eGFP**”, lleva solamente la secuencia del gen de eGFP bajo el promotor de LAT52. Las plantas transgénicas fueron oportunamente generadas por las doctoras Weihua Tang y Sheila McCormick, en el *Plant Gene Expression Center*, Universidad de California en Berkeley, Albany, CA (EE.UU.).

### 5.2.2. Ensayo de germinación de polen de tomate

Para analizar el efecto de MrX sobre el crecimiento del tubo polínico, se utilizó como fuente de MrX una fracción correspondiente al percolado de C18 (ver sección 4.3.2, figura 4.4.D y 4.7.A). Como control, se utilizó primero agua y después se ensayó una fracción correspondiente a los compuestos retenidos en la C18 y eluidos con acetonitrilo 50%. Estos compuestos no presentan actividad defosforilante de LePRK2 (Figura 4.4.C y D). En la germinación, se ensayaron fracciones correspondientes a MrX y fracciones control ambas provenientes de eventos de purificación independientes. Como método de normalización de la cantidad de muestra a ensayar, se utilizaron las mismas unidades de absorbancia a 280 nm. En todos los casos, se prepararon mezclas conteniendo medio de

germinación de polen (PGM) 1,25X, diferentes cantidades de las muestras a ensayar y agua de manera tal que la concentración final del PGM sea 1X.

Por otro lado, se preparó una suspensión de 2 mg de polen de tomate recién colectado por ml de PGM 1X sin sacarosa (para evitar la germinación), y se prehidrató por 30 min a temperatura ambiente, invirtiendo el tubo 2-3 veces cada 5 minutos. Finalizado el período de prehidratación, se centrifugó la suspensión a 2.000 xg por 5 min y se resuspendió el polen hidratado en PGM 1X (mismo volumen inicial, concentración 2 mg/ml).

Para comenzar el experimento, en cada pocillo de una microplaca de 24 pocillos, se colocaron 200 µl de PGM 1X+MrX o control y 200 µl de la suspensión de polen prehidratado. En cada experimento, se prepararon 3 microplacas independientes, contando cada una de ellas con 1 ó 2 réplicas para cada concentración de MrX (un total de 3 o 6 réplicas por tratamiento en cada experimento). El experimento se repitió un mínimo de 3 veces. Se analizó el efecto de MrX sobre el crecimiento del tubo polínico luego de 1 o 3 horas. Luego de la incubación, se transfirieron 270 µl de cada pocillo a un microtubo de 1,5 ml y se agregaron 30 µl de una solución de fijado, se agitó por 20 min a 4 °C. Las muestras se conservaron a 4 °C hasta el momento de fotografiar con el microscopio. La figura 5.2.1 representa esquemáticamente el diseño experimental.

Medio de germinación de polen de tomate 1X (PGM 1X):

24% PEG 3350

2% Sacarosa

20mM MES pH 6

0,02% p/v MgSO<sub>4</sub>

0,01% p/v KNO<sub>3</sub>

0,01% p/v H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>

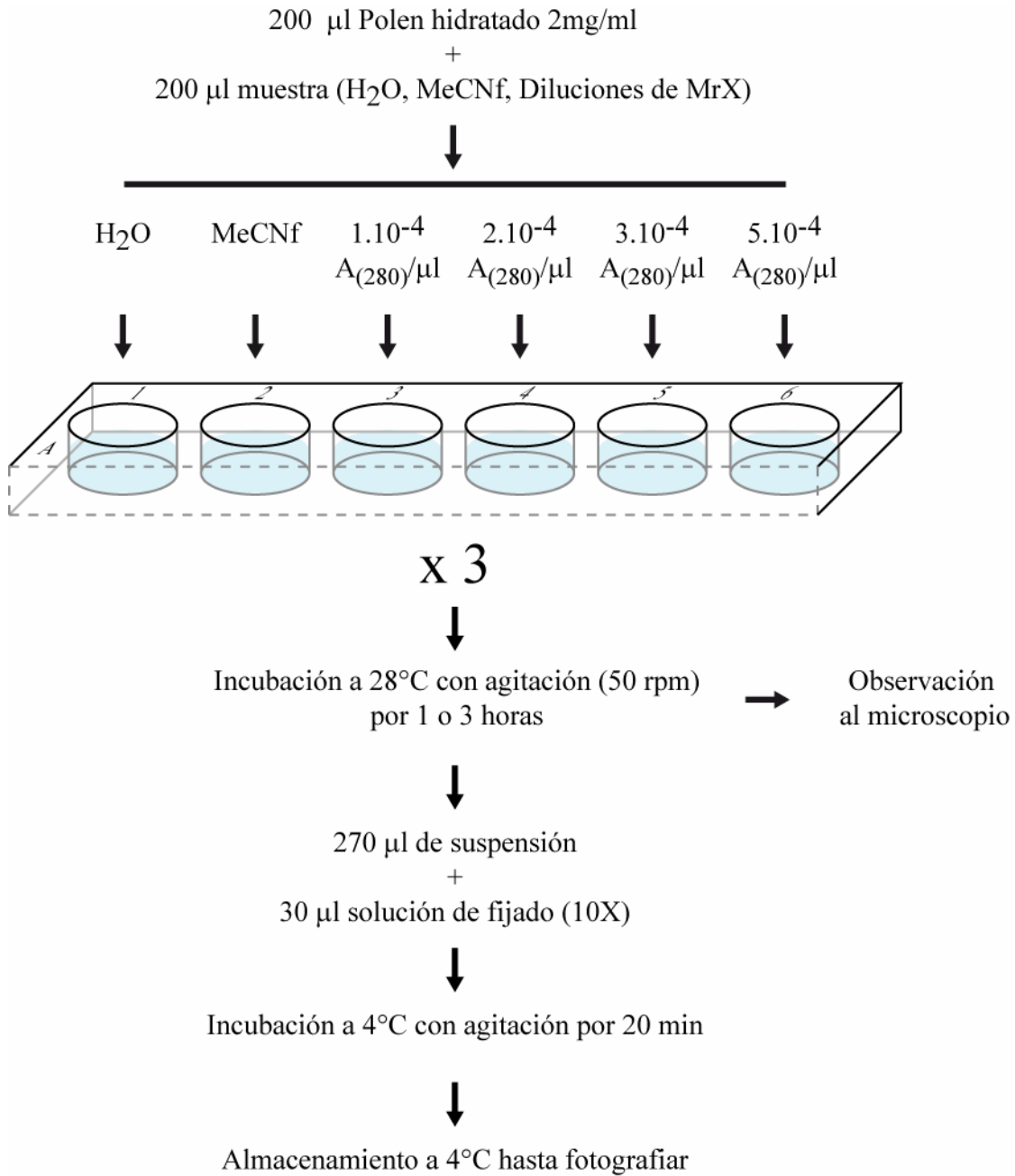
0,07% p/v Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>

Solución de Fijado 10X:

5,6% Formaldehído

0,5% Glutaraldehído

25% PEG 3350



**Figura 5.1: Protocolo esquemático del ensayo de germinación de polen de tomate en presencia de MrX.** Ver detalles del protocolo en la sección 5.2.2.

### 5.2.3. Preparación de las muestras y microscopía

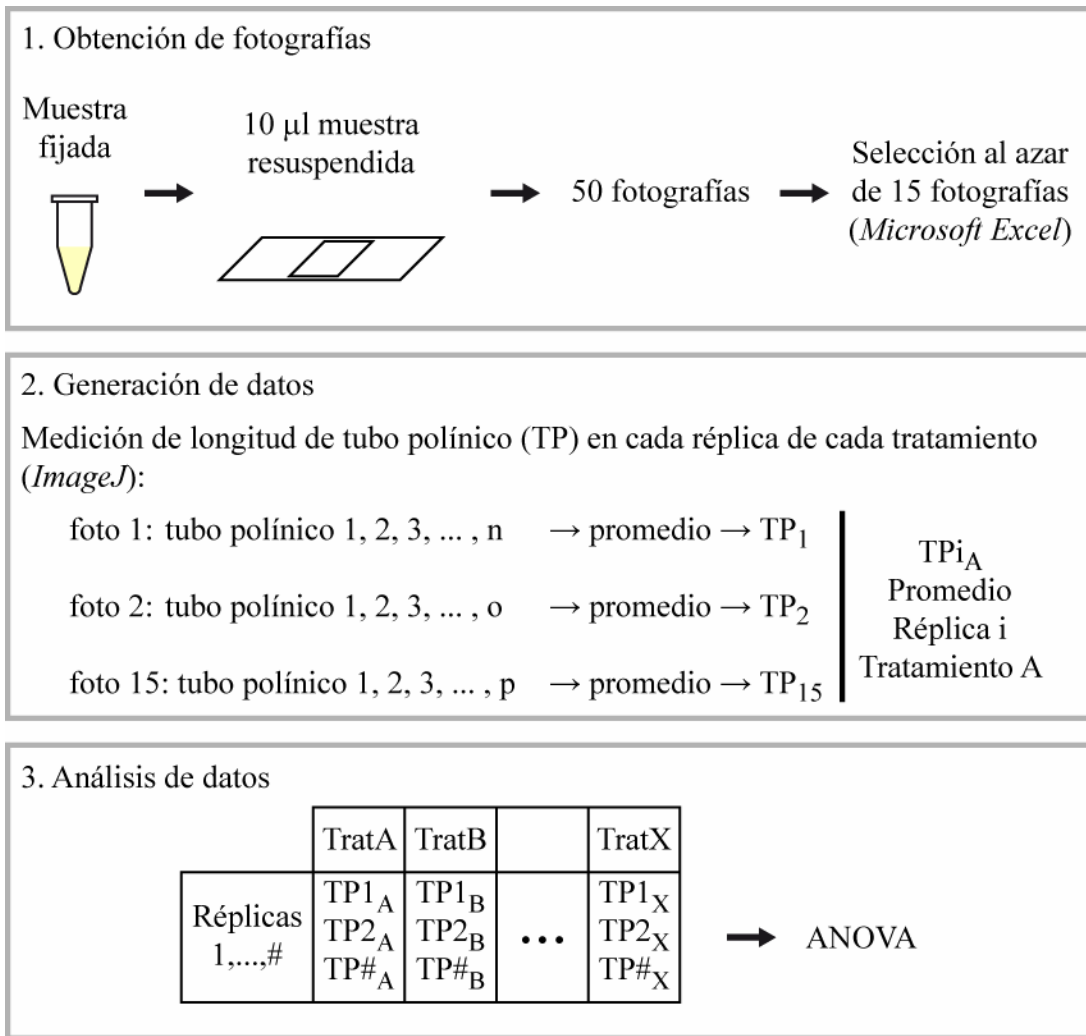
Sobre un portaobjetos se colocaron 10  $\mu\text{l}$  de cada muestra de polen germinado y fijado. Se cubrió con un cubreobjetos de 2 x 2 cm. Utilizando una cámara digital (Diagnostic Instruments, Sterling Heights, MI) acoplada a un microscopio invertido Axiophot (Zeiss, Jena, Germany), se tomaron 50 fotos digitales de cada muestra. Utilizando el *software* AxioVision (Zeiss), en una de las fotografías se incluyeron barras de medición que permitieron la transformación de las medidas a  $\mu\text{m}$ . Como regla para la toma de fotografías, se incluyeron todos los tubos polínicos que atravesaran el campo del microscopio durante el recorrido del mismo.

### 5.2.4. Análisis estadístico de los datos

El diagrama presente en la figura 5.2, esquematiza cómo se procedió con las muestras y los datos. Se seleccionaron al azar 15 fotografías de cada réplica utilizando el *software* Microsoft Excel. Luego, con el *software* ImageJ se midió el largo de todos de los tubos polínicos presentes en cada fotografía y se promediaron los valores obtenidos. El valor de longitud de tubo polínico para cada réplica se obtuvo del promedio de las 15 repeticiones.

Antes de evaluar el efecto de MrX sobre el crecimiento del tubo polínico, se analizó la dispersión de los datos para el tamaño de muestra tomada de polen. El experimento se realizó de acuerdo al diseño planteado en la figura 5.1, pero de sólo 2 réplicas de polen germinado en ausencia de MrX, de las cuales se tomaron 2 muestras. Se determinaron las longitudes de los tubos polínicos en cada muestra, obteniéndose 2 promedios para cada réplica. Los valores se compararon por medio de la prueba t de Student utilizando el *software* Prism 4.0 (GraphPad Software, San Diego, EE.UU.). Para muestras provenientes de la misma réplica, no existieron diferencias en la varianza (datos no mostrados). No se encontraron diferencias significativas entre diferentes muestras pertenecientes a la misma réplica ( $p > 0,05$ ).

Validado el diseño experimental, se realizó el experimento con cantidades diferentes de MrX. Una vez obtenida la longitud del tubo polínico para cada réplica, se realizó una ANOVA de 1 factor utilizando el *software* Prism 4.0. La normalidad de los datos se analizó mediante la prueba de Bartlett. Verificada la igualdad de las varianzas, se juntaron los valores de todos los experimentos realizados y se repitió el análisis estadístico.



**Figura 5.2: Obtención de datos y análisis estadístico del ensayo de germinación de polen de tomate en presencia de MrX.** Ver detalles del protocolo en la sección 5.2.2.



### 5.3. Resultados

#### 5.3.1. Efectos de MrX sobre el crecimiento del tubo polínico *in vitro* de plantas salvajes de tomate

Con el fin de estudiar cuál podía ser el efecto específico producido por MrX sobre el tubo polínico, decidimos realizar ensayos de germinación *in vitro* en presencia de MrX y analizar la aparición de posibles cambios fenotípicos. Dado que las funciones que debe llevar a cabo el tubo polínico durante su crecimiento son limitadas (crecer a través del tejido esporofítico respondiendo a señales de atracción/repulsión, estimulación/inhibición del crecimiento y descarga de las gametas), los fenotipos esperables podían ser de carácter fisiológico, como cambios en la tasa de germinación o crecimiento; y/o, morfológicos, como cambios en las dimensiones del tubo polínico, distribución de vacuolas, etc. Entonces, diseñamos un experimento donde analizamos al mismo tiempo la morfología del tubo polínico y el estado fisiológico. Analizamos microscópicamente tubos polínicos en crecimiento, y en paralelo, fijamos y determinamos sus longitudes, utilizando esta medida como marcador fisiológico (Figura 5.1 y 5.2).

Realizamos observaciones luego de 1 y 3 horas de germinación en presencia de cantidades crecientes de MrX. Estas condiciones nos permitieron analizar en qué momento podría estar produciéndose algún fenotipo característico del tratamiento con MrX. Con el objetivo de eliminar efectos falsos por posibles contaminantes presentes en una misma purificación, utilizamos MrX proveniente de una misma etapa de purificación (percolado de C18), pero de diferentes eventos de purificación (ver sección 5.2.2). En todos los casos normalizamos la cantidad de MrX de acuerdo a su absorbancia a 280 nm. No observamos la aparición de morfologías distintivas o aberrantes para ninguna cantidad de MrX tanto a 1 como a 3 horas, por lo cual nos concentramos en analizar si había alguna influencia sobre la longitud del tubo polínico. Para ello realizamos la medición de las longitudes de los tubos sobre las muestras fijadas. Repetimos el experimento un total de 3 veces para 1 hora y 6 veces para 3 horas. El análisis de los datos mostró que no existían diferencias en las varianzas para cada experimento dentro

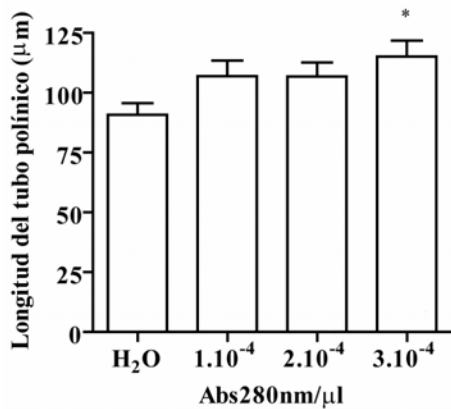
del conjunto de datos de 1 ó 3 horas, independientemente de cuándo fue hecho éste o del evento de purificación. Por esto último, decidimos unificar todos los resultados y hacer un análisis estadístico global. En total, analizamos un mínimo de 6 réplicas para cada concentración ensayada para ambos tiempos estudiados. En la figura 5.3, observamos los resultados de la determinación de la longitud del tubo polínico en función de la concentración de MrX. Para 1 hora de germinación (figura 5.3.A), la presencia de concentraciones crecientes de MrX resulta en un aumento de la longitud del tubo polínico, significativo para  $3 \times 10^{-4}$  Abs 280 nm de MrX /  $\mu\text{l}$  de PGM, que fue la mayor concentración usada para 1 hora de germinación. Para 3 horas de germinación, las diferencias significativas se empezaron a registrar a partir de  $2 \times 10^{-4}$  Abs 280 nm de MrX /  $\mu\text{l}$  PGM y responden de forma dosis dependiente (figura 5.3.B).

En todos los casos, utilizamos como control del experimento granos de polen germinados en presencia de agua en vez de MrX. Sin embargo, estos experimentos no nos permitían asegurar que los efectos observados sean un resultado específico de la presencia de MrX. Decidimos utilizar un control diferente al agua para analizar esta posibilidad. Como demostramos en la sección 4.3.3 (figura 4.4), si una muestra activa proveniente de la columna de intercambio aniónico la fraccionamos en un cartucho de C18, obtenemos dos fracciones: el percolado, donde encontramos a MrX; y, el retenido, comprendido por otros compuestos que eluyen en presencia de acetonitrilo 50% y absorben a 280 nm. Estos últimos posiblemente de naturaleza péptidica al igual que MrX, ya que se mantienen en las mismas fracciones que éste en la columna de intercambio iónico, pero poseen diferente afinidad por la resina hidrofóbica. Consideramos que la fracción eluida con acetonitrilo (muestra **MeCNf**) era ideal para utilizarlo como control y analizar si el efecto de promoción del crecimiento del tubo polínico era específico para MrX. Para ello, analizamos la longitud de los tubos polínicos en respuesta a la presencia de agua o MeCNf en un ensayo de germinación *in vitro* de polen luego de 1 o 3 horas de crecimiento. Para MeCNf, utilizamos una concentración de  $3 \times 10^{-4}$  Abs 280 nm /  $\mu\text{l}$  de PGM, ya que en los experimentos en presencia de MrX, esta concentración siempre produjo diferencias significativas con respecto al agua. La presencia de MeCNf no produjo ninguna diferencia significativa con respecto al agua en ninguno de los tiempos ensayados (1 hora,  $p > 0,80$ ; 3 horas,  $p > 0,14$ ; datos no mostrados). Por lo tanto,

podemos concluir que el efecto observado en la figura 5.3, corresponde a un efecto promotor del crecimiento del tubo polínico de tomate mediado específicamente por MrX. Por este motivo, en adelante continuamos utilizando agua como control del experimento.

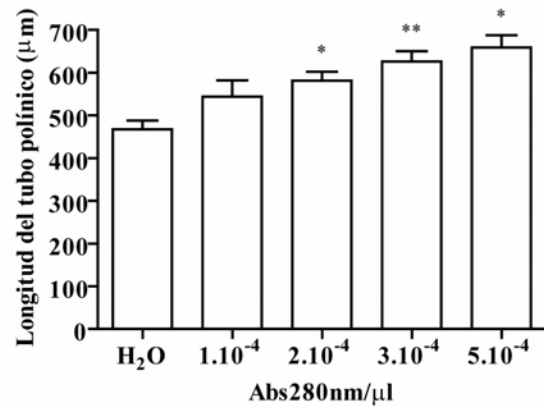
Los granos de polen podrían estar percibiendo la señal de MrX sólo luego que el tubo polínico ha germinado y se ha desarrollado por un período dado de tiempo, o bien

A.



Abs 280nm/µl	Promedio (µm)	Error estándar	n
0 (Agua)	90	5	11
1.10 <sup>-4</sup>	107	7	6
2.10 <sup>-4</sup>	107	6	12
3.10 <sup>-4</sup>	115	7	9

B.



Abs 280nm/µl	Promedio (µm)	Error estándar	n
0 (Agua)	468	20	28
1.10 <sup>-4</sup>	544	38	9
2.10 <sup>-4</sup>	582	21	25
3.10 <sup>-4</sup>	626	24	22
5.10 <sup>-4</sup>	659	28	6

**Figura 5.3: Efecto de MrX sobre la longitud del tubo polínico.** A. 1 hora de crecimiento. El asterisco indica diferencias significativas con respecto al H<sub>2</sub>O (\*, p < 0,05). B. 3 horas de crecimiento. Los asteriscos indican las diferencias significativas con respecto al H<sub>2</sub>O (\*, p < 0,01; \*\*, p < 0,001). n, número de réplicas.

Se realizaron un mínimo de 3 y 6 experimentos independientes para 1 y 3 horas de germinación, respectivamente.

podrían hacerlo desde el momento que comienza la germinación. Para intentar determinar en qué momento el grano de polen comienza a percibir a MrX e iniciar una respuesta, para cada concentración ensayada tomamos los pares de datos para 1 y 3 horas, y con

ellos calculamos la tasa de crecimiento y el incremento en longitud para cada uno de los tratamientos.

La tasa de crecimiento la calculamos como

$$\text{Tasa de crecimiento}_i = (\text{Longitud}_{3i} - \text{Longitud}_{1i}) / 2 \text{ horas}$$

donde:

- *Tasa de crecimiento<sub>i</sub>*, es la tasa calculada para el tratamiento *i*;
- *Longitud<sub>3i</sub>* representa la media obtenida para el tratamiento *i* a las 3 horas;
- *Longitud<sub>1i</sub>* es la media obtenida para el tratamiento *i* luego de 1 hora.

El incremento en longitud del tubo polínico lo calculamos como

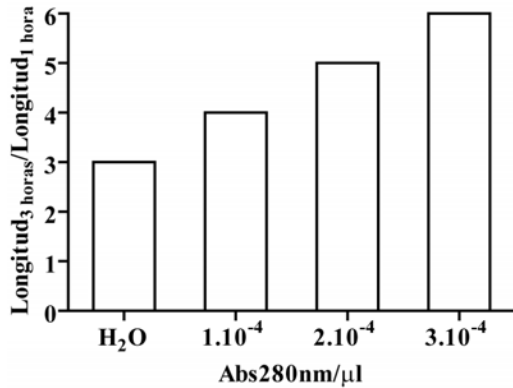
$$\text{Incremento en longitud}_i = \text{Longitud}_{3i} / \text{Longitud}_{1i}$$

donde:

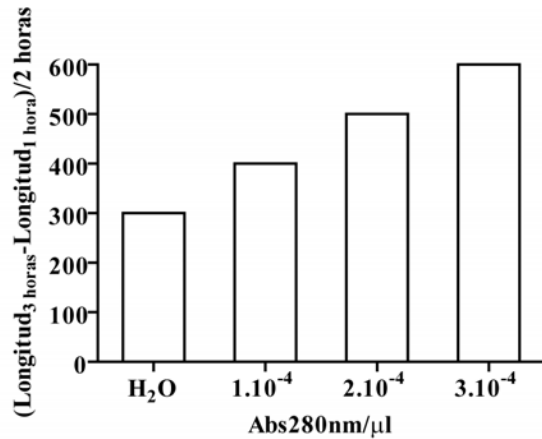
- *Incremento en longitud<sub>i</sub>* es el incremento para el tratamiento *i*;
- *Longitud<sub>3i</sub>* representa la media obtenida para el tratamiento *i* a las 3 horas;
- *Longitud<sub>1i</sub>* es la media obtenida para el tratamiento *i* luego de 1 hora.

Para discriminar entre las dos posibilidades mencionadas antes comparamos los valores de la tasa de crecimiento y el incremento en longitud para cada tratamiento. De ser cierta la primera hipótesis, donde el tubo polínico no percibe a MrX hasta 1 hora luego de iniciada la germinación, a medida que transcurre el tiempo se debería producir un aumento acelerado de la tasa de crecimiento con concentraciones crecientes de MrX (figura 5.4.B). Esto se vería reflejado en el incremento de longitud, que también debería aumentar con la concentración de MrX (figura 5.4.A). Si resulta cierta la segunda hipótesis donde el polen percibe a MrX desde el inicio de la germinación, la tasa de crecimiento debería ser mayor para concentraciones elevadas de MrX (figura 5.4.D). Esta tasa de crecimiento debería ser constante desde el principio, resultando en un incremento de longitud similar para todos los tratamientos (figura 5.4.C).

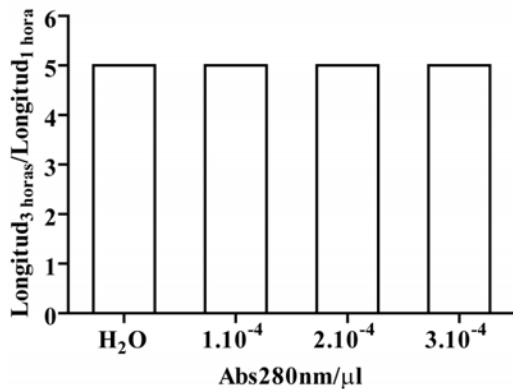
A.



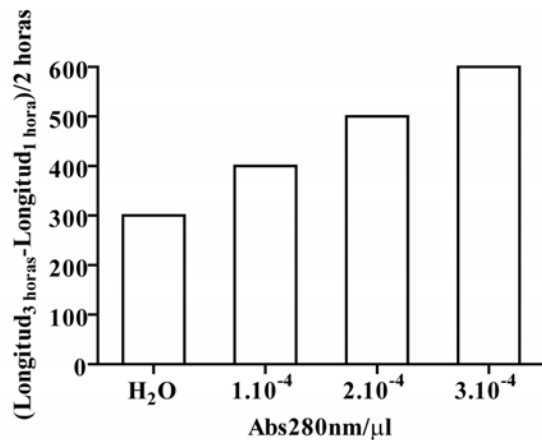
B.



C.



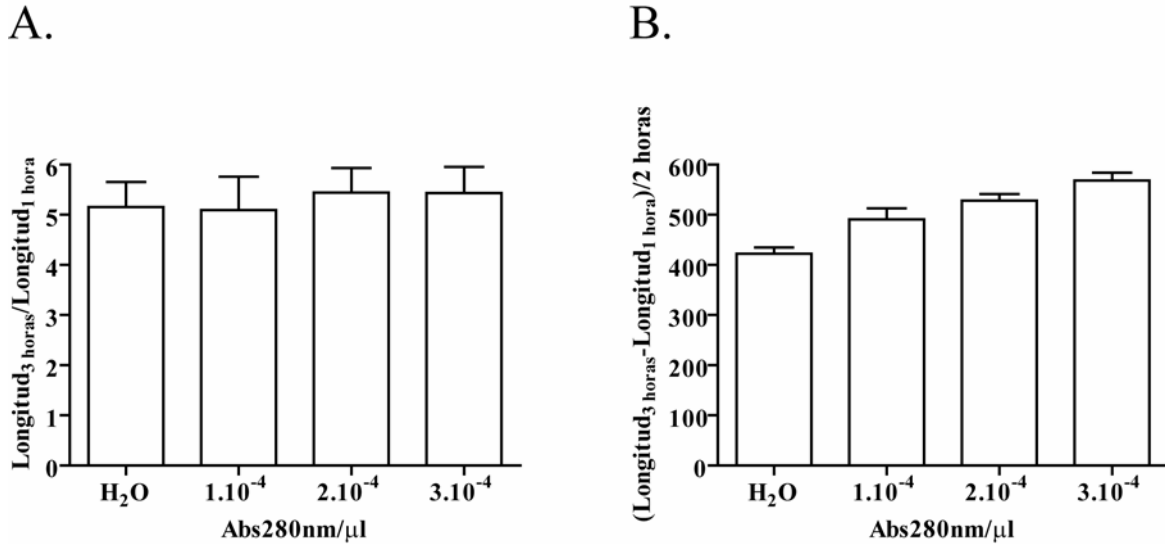
D.



**Figura 5.4: Dos hipótesis explicativas para la percepción de MrX: Incremento de la longitud del tubo polínico (A y C) y de la tasa de crecimiento (B y D) en función de la concentración de MrX.** En la primera hipótesis, la sensibilidad a MrX aumenta con el tiempo. A 1 hora de crecimiento, MrX aún no es percibido. A las 3 horas, los tubos polínicos alcanzaron su longitud final dependiendo de la cantidad de MrX que perciben (A) y establecen una tasa de crecimiento para cada concentración (B). En la segunda hipótesis, los tubos polínicos perciben a MrX desde el inicio del crecimiento. Por lo tanto, el incremento de longitud es constante para cada concentración (C). Para cada tratamiento, los tubos polínicos crecen a una tasa que depende de la concentración de MrX (D).

En la figura 5.5, observamos el resultado del procesamiento de los datos. La tasa de crecimiento aumentó con concentraciones crecientes de MrX como lo habíamos previsto. Sin embargo, los valores de incremento de longitud se mantienen constantes

para todos los tratamientos. Esto sugiere fuertemente que la segunda hipótesis es la correcta, sugiriendo que el tubo polínico es capaz de detectar a MrX desde el comienzo de la germinación, siendo la transducción de la señal lo que varía en función del tiempo.



**Figura 5.5: Incremento de la longitud del tubo polínico (A) y tasa de crecimiento (B) en función de la concentración de MrX.** Las barras de error corresponden a la propagación de los errores (estándar) para los promedios de longitud de tubos polínicos determinados en la figura 5.3, mediante el método de derivadas parciales.

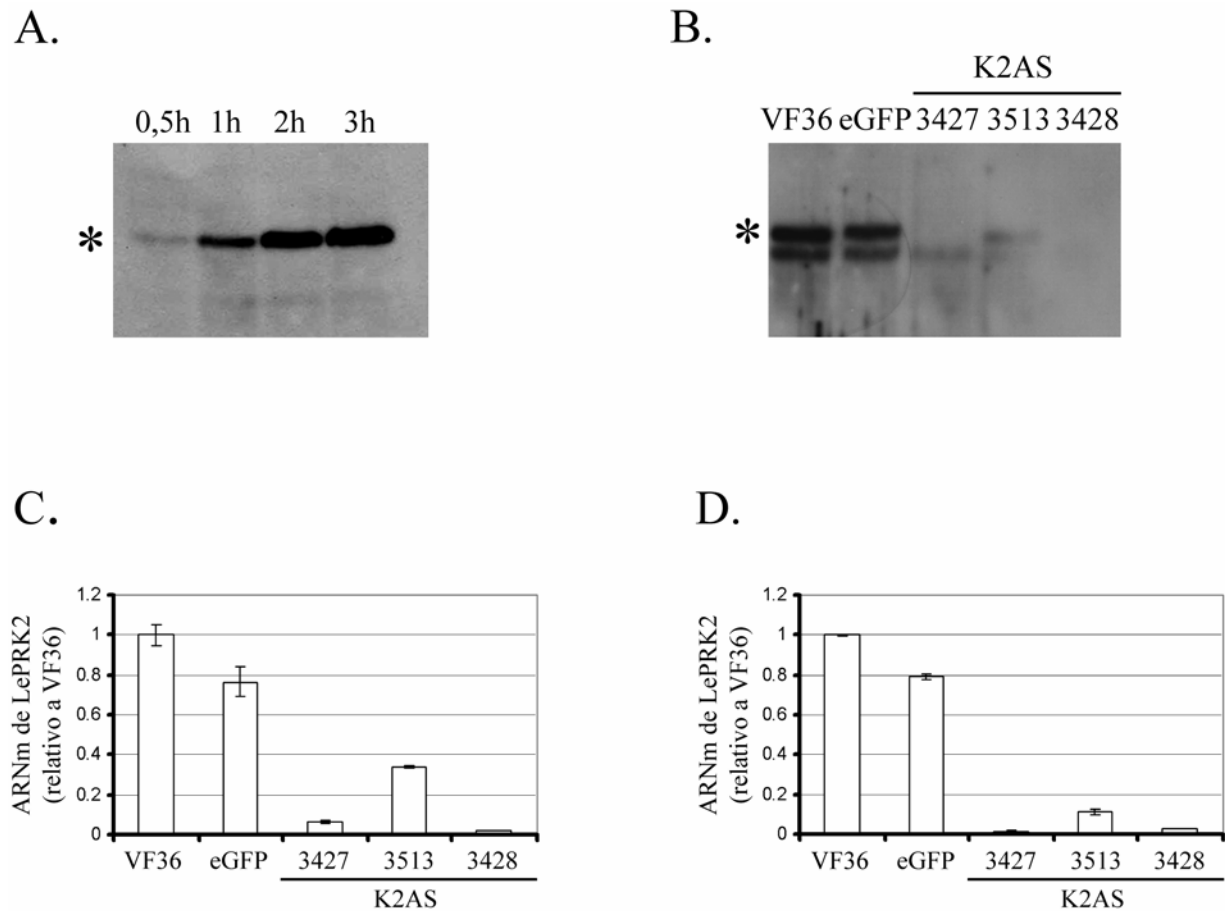
### 5.3.2. Efectos de MrX sobre el crecimiento del tubo polínico de plantas transgénicas eGFP, K2AS y K1OX

En la sección anterior observamos que a medida que transcurre el tiempo de germinación, parecería aumentar la sensibilidad del tubo polínico por MrX. La primera concentración de MrX que produce cambios significativos para 1 hora de germinación es 3.10<sup>-4</sup> Abs 280 nm / μl de PGM, mientras que para 3 horas es 2.10<sup>-4</sup> Abs 280 nm / μl de PGM. Lamentablemente, no pudimos verificar esta observación realizando experimentos a tiempos más largos o a mayores concentraciones de MrX por dificultades técnicas (los tubos polínicos son más largos que el diámetro del campo del microscopio utilizado). El aumento de la percepción en función del tiempo podría explicarse a través del aumento

de la expresión de LePRK2 a medida que transcurre el tiempo de germinación, tal como se muestra en la figura 5.6.A, para que esto ocurra LePRK2 debería ser responsable de la transducción de la señal de MrX.

Para verificar la hipótesis que LePRK2 es necesaria para la percepción de MrX, utilizamos polen de tres líneas homocigotas independientes de plantas K2AS (líneas 3427, 3513 y 3428). Las plantas K2AS expresan el gen de LePRK2 en dirección antisentido bajo el promotor fuerte específico de polen LAT52. En el mismo locus, llevan la construcción LAT52::eGFP, que permite el reconocimiento del polen transgénico por la expresión de la proteína verde fluorescente. La construcción antisentido del gen de LePRK2 provoca la disminución del número de copias de ARNm para LePRK2 en polen maduro y germinado, y en la ausencia de la proteína LePRK2 en el polen germinado por 24 horas (Figura 5.6, paneles B, C y D). Las líneas de plantas K2AS utilizadas muestran diferentes niveles de ARNm para LePRK2 y la proteína LePRK2 en un *western blot*: 3513, mayor expresión; 3427, expresión intermedia; y, 3428, menor expresión. Como control, utilizamos polen de plantas Lat52::eGFP homocigotas (eGFP).

En principio, comparamos la capacidad de crecer del polen de las plantas transgénicas con el de las plantas salvajes. Para ello, germinamos polen de las tres líneas transgénicas K2AS, eGFP y de polen salvaje por 3 horas de acuerdo al protocolo detallado en las figuras 5.1 y 5.2. En la figura 5.7, observamos que el polen de 2 líneas K2AS presenta tubos polínicos significativamente más cortos que las plantas salvajes (VF36 mayor que 3427,  $p < 0,001$ ; VF36 mayor que 3513,  $p < 0,001$ ), o los controles de eGFP (eGFP mayor que 3427,  $p < 0,001$ ; eGFP mayor que 3513,  $p < 0,001$ ). La tercera línea K2AS (3428) también mostraba una longitud menor, aunque no determinamos si las diferencias eran estadísticamente significativas por no contar con el suficiente número de réplicas. En base a estas observaciones, la ausencia de LePRK2 provoca una disminución de la tasa de crecimiento del tubo polínico. Podemos concluir que LePRK2 es una proteína necesaria para el normal crecimiento del tubo polínico.



**Figura 5.6: Expresión de LePRK2 en polen de plantas salvajes (VF36), eGFP y K2AS de Tomate.** *A.* *Western blot* contra LePRK2 de muestras proteicas de polen de tomate salvaje VF36 germinado por 0,5, 1, 2 y 3 horas y separadas electroforéticamente en un SDS-PAGE 8%. *B.* *Western blot* contra LePRK2 de muestras proteicas de polen de tomate luego de 24 horas de germinación. VF36, polen salvaje; eGFP, polen de plantas LAT52::eGFP; 3427, 3513 y 3428, tres líneas independientes de plantas K2AS. *C.* Determinación de abundancia de ARNm para LePRK2 en polen maduro relativas al polen de plantas salvajes. *D.* Determinación de abundancia de ARNm para LePRK2 en polen germinado por 24 horas relativas al polen de plantas salvajes. El asterisco (\*) indica la señal correspondiente a LePRK2.

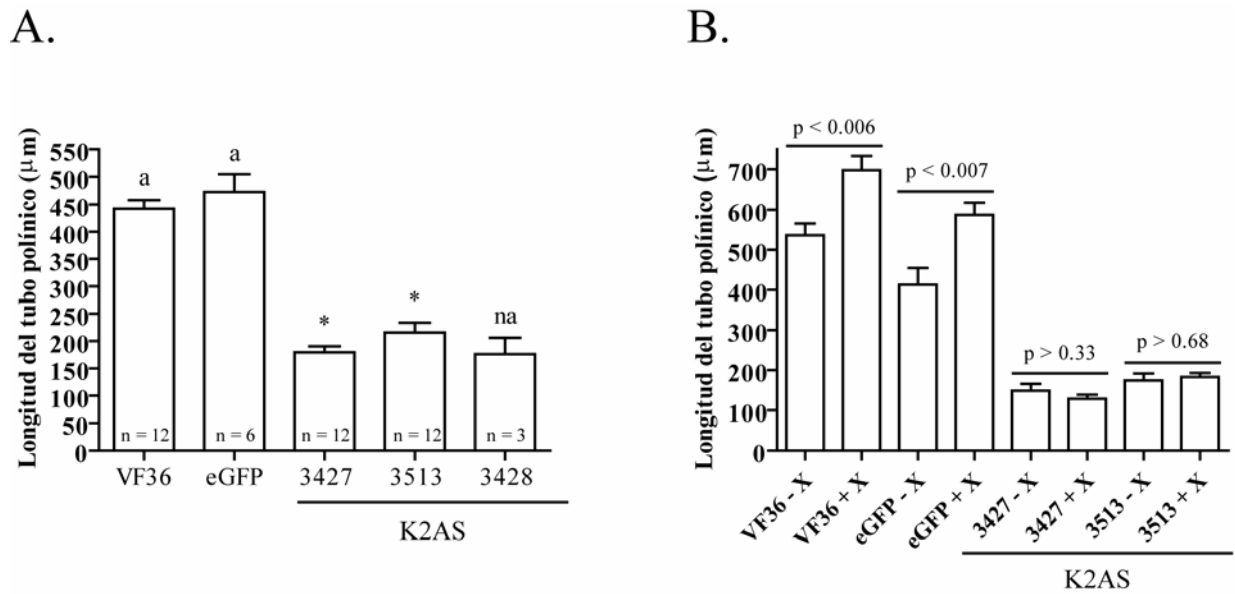
*B, C y D,* realizadas por la Dra. Weihua Tang (Laboratorio de la Dra. Sheila McCormick, Plant Gene Expression Center – Universidad de California en Berkeley – USDA, Albany, California, EE. UU.).



Previamente hemos demostrado que, MrX induce cambios bioquímicos en el polen tales como la defosforilación específica de LePRK2; que el polen salvaje de tomate responde a la presencia de MrX aumentando su tasa de crecimiento; y que LePRK2 es necesaria para el normal crecimiento del tubo polínico. Por lo tanto, decidimos estudiar el efecto de MrX sobre el crecimiento del polen de las plantas K2AS, utilizando plantas eGFP y salvajes como controles. La comparación de los resultados de estos experimentos indicaría si la respuesta de aumento en la tasa de crecimiento inducida por MrX es consecuencia directa de la presencia de LePRK2. Para estos experimentos, utilizamos una concentración de MrX de  $3 \times 10^{-4}$  Abs 280 nm /  $\mu$ l de PGM que en todos los experimentos anteriores mostró un aumento estadísticamente significativo sobre el crecimiento de polen salvaje. En la figura 5.7.B, observamos que para 3 horas de germinación, MrX promueve el crecimiento del polen salvaje y eGFP de la misma forma que demostramos antes, pero no tuvo efecto alguno sobre el polen de ninguna de las 2 líneas de plantas K2AS ensayadas. Esto demuestra que MrX ejerce su acción estimulante del crecimiento del tubo polínico a través de LePRK2.

En este contexto, decidimos analizar la participación de LePRK1 en el crecimiento del tubo polínico. Para ello, utilizamos dos líneas independientes de plantas sobreexpresantes del gen LePRK1 fusionado a eGFP (K1OX). El primer resultado que observamos fue que para ninguna de las líneas fue posible obtener plantas K1OX homocigotas. Teniendo en cuenta sólo el gametofito masculino, existen diferentes motivos por los cuales puede no obtenerse descendencia transgénica homocigota: letalidad del polen, imposibilidad del grano de polen para hidratarse y/o germinar; o en el caso que los primeros pasos de la germinación no estén afectados, puede haber defectos en el crecimiento del tubo polínico y/o germinación [133]. La falta absoluta de descendencia transgénica homocigota, indicaba que el defecto podía estar en los primeros pasos de la germinación. De estar afectado el crecimiento del tubo polínico, deberíamos poder obtener plantas transgénicas homocigotas aunque sea en una muy baja proporción con respecto a los salvajes y heterocigotas, como se obtuvieron para K2AS. Decidimos analizar la capacidad del polen de plantas K1OX heterocigotas de germinar *in vitro* y producir un tubo polínico. En ninguna de las líneas K1OX analizadas fuimos capaces de obtener tubos polínicos de polen transgénico (visualizados por la expresión de eGFP), a

pesar de mostrar una hidratación normal (resultados no mostrados). El 50% de los granos de polen correspondientes a los no transgénicos dentro del mismo preparado (provenientes de la misma planta madre), generaron tubos polínicos normales al igual que aquellos provenientes de plantas salvajes o eGFP. Este arresto en la germinación en granos de polen K1OX tampoco pudo ser rescatado por MrX ( $3 \times 10^{-4}$  Abs280nm /  $\mu$ l de PGM) luego de 1 o 3 horas de incubación (datos no mostrados).



**Figura 5.7: Germinación por 3 horas de polen de tomate de plantas salvajes (VF36), eGFP y K2AS en ausencia y presencia de MrX.** A. Longitud del tubo polínico de plantas salvajes, eGFP y tres líneas independientes de K2AS (3427, 3513 y 3428). La letra “a” indica que no existen diferencias significativas entre VF36 y eGFP. El asterisco (\*) indica diferencias significativas con VF36 ( $p < 0,001$ ). La sigla “na” indica que los datos no fueron analizados estadísticamente. B. Polen de plantas salvajes, eGFP y dos líneas independientes de K2AS (3427 y 3513) germinados en presencia y ausencia de  $3 \cdot 10^{-4}$  Abs 280 nm /  $\mu$ l de MrX. Los valores de p corresponden a un análisis de t de Student entre las columnas señaladas. Los datos provienen de 2 experimentos independientes con un total de 6 réplicas.

Ver sección 5.2.1 para información adicional de las líneas.

## 5.4. Conclusiones

Existen numerosos trabajos en la literatura que demuestran el efecto de compuestos de diferente naturaleza en la promoción [79, 81] o inhibición del crecimiento [173] o desarrollo del tubo polínico. Algunos de ellos están involucrados con procesos metabólicos, actuando como fuente nutricional [131]; otros arretando el crecimiento, como en los procesos de autoincompatibilidad [96]; regulando la entrada de agua al grano de polen, permitiendo la correcta hidratación del mismo [164, 174]; promoviendo la adhesión a la matriz extracelular [126, 127, 163]; u orientando el tubo polínico [125, 129, 131-133, 158, 173].

Nuestro trabajo demuestra que MrX, un compuesto peptídico proveniente del tejido femenino (estigma-estilo) de tomate y tabaco, promueve un aumento de la tasa de crecimiento del tubo polínico. Este efecto está mediado por LePRK2, dado que su ausencia en plantas K2AS resulta en la pérdida absoluta del efecto inductor. Esto indicaría que la regulación bioquímica del complejo de LePRKs estaría directamente involucrada en la modulación del crecimiento del tubo polínico.

Como hemos mencionado en la Introducción, cuando el polen de tomate germina, se produce un aumento en la expresión de LePRK2. En un experimento realizado en el laboratorio, observamos que este incremento es evidente luego de 1 hora de crecimiento, y continua al menos hasta las 3 horas (figura 5.6.A). Además, hemos demostrado también que LePRK1 junto con LePRK2 forman un complejo de alto peso molecular en el grano de polen maduro [78]. Este complejo persiste luego de la germinación, dado que *western blots* de separaciones cromatográficas de extractos proteicos de polen germinado muestran a ambas proteínas en las fracciones correspondientes al complejo y no a los monómeros. Es en este contexto que debemos analizar los resultados obtenidos. Luego de 1 hora de crecimiento, sólo la más alta de las concentraciones de MrX ensayadas produjo un incremento estadísticamente significativo en el largo del tubo polínico ( $3 \times 10^{-4}$  Abs 280 nm /  $\mu$ l de PGM). El resto de las concentraciones más bajas respondía a la misma tendencia de aumento en respuesta a MrX. Cuando estudiamos el efecto a 3 horas de germinación, los tubos polínicos son más largos en presencia de MrX que en el control, siendo las diferencias estadísticamente significativas incluso para concentraciones más

bajas que a 1 hora ( $2 \times 10^{-4}$  Abs 280 nm /  $\mu$ l). Las concentraciones que estadísticamente no produjeron un incremento en el largo con respecto al control, también muestran un aumento, pero poseen una mayor dispersión de los datos. Es posible que un mayor número de experimentos hubiera validado estas observaciones. En conjunto, estos resultados, indicarían que a medida que el tiempo de germinación aumenta, también lo hace la sensibilidad del tubo polínico a la presencia de MrX. Es posible que la mayor sensibilidad a MrX en función del tiempo pueda explicarse por el aumento de LePRK2 y su presencia en el complejo de alto peso molecular. Esta hipótesis podría haber sido estudiada repitiendo el experimento a tiempos más largos y verificando si las concentraciones requeridas para detectar largos significativamente mayores con respecto al control eran menores. Sin embargo, para llevar a cabo este análisis, sería necesario reformular el experimento, ya que luego de más de 3 horas de crecimiento, el tubo polínico es más largo que el diámetro del campo óptico del microscopio.

Si observamos la figura 5.3.B, resulta evidente que no se ha alcanzado una saturación del efecto de MrX. Sería esperable obtener una respuesta creciente en función de la concentración de MrX, alcanzando una meseta y, quizás, terminando con la aparición de fenotipos aberrantes, como se ha observado en otros sistemas [27, 52]. De acuerdo a los resultados obtenidos, nos encontraríamos al principio de esta curva. Esta afirmación supone que los efectos de MrX deberían ser aún mayores a concentraciones más altas antes de encontrar una concentración a la cuál los efectos de MrX son nocivos. Cuál es la cantidad de MrX que satura el sistema, aún está por ser determinado.

También, realizamos un análisis sobre los datos de germinación en presencia de MrX con el fin de estudiar de qué forma estaría influyendo éste sobre el crecimiento del tubo polínico. Calculamos la tasa de crecimiento y el incremento en longitud para las diferentes concentraciones utilizando los valores promedios de longitud entre 1 y 3 horas. Los datos obtenidos sugieren que el incremento en longitud sería constante para las diferentes concentraciones, y la tasa de crecimiento aumentaría en función de la concentración de MrX. Este resultado indicaría que el tubo polínico tiene la capacidad de percibir a MrX desde el comienzo de la germinación, estableciéndose una velocidad de crecimiento directamente proporcional a la cantidad de MrX. Sin embargo, sólo podemos sugerirlo a partir de las observaciones obtenidas. Tanto la tasa de crecimiento como el

incremento en longitud fueron calculados a partir de una media para 1 hora y una media para 3 horas (siendo el error estadístico del nuevo valor, la propagación de los errores de cada uno de las medias), lo que imposibilitan la verificación estadística de las hipótesis [el experimento original fue diseñado con el fin de determinar los efectos de MrX, y no contábamos con mediciones de los mismos tubos polínicos (no fijados) a 1 y 3 horas de crecimiento que nos permitieran obtener un número de réplicas apropiados para el análisis].

El estudio de las plantas transgénicas utilizadas en este capítulo nos permitió observar que el polen de plantas transgénicas K2AS tienen la misma tasa de germinación que el polen salvaje (datos no mostrados); puede crecer *in vitro* sin la aparición de fenotipos morfológicos destacables y generar descendencia homocigota para el transgén *in vivo*, a pesar que la tasa de crecimiento es notoriamente menor al de plantas salvajes, como lo demostramos en la sección 5.3.2. Además, los granos de polen que no expresan LePRK2 son insensibles a la presencia de MrX, lo que les imposibilitaría detectar esta señal proveniente del pistilo que en tubos polínicos salvajes promueve el crecimiento. Por otro lado, hemos estudiado el comportamiento de polen de plantas K1OX. En este caso, ha sido imposible obtener plantas homocigotas debido a que aquellos granos de polen que llevan el transgén, se hidratan pero no germinan (datos no mostrados, trabajo realizado por la Dra. Weihua Tang y colaboración del autor de esta tesis). Este comportamiento también se ha observado en ensayos de germinación *in vitro*, donde ni siquiera se pudo rescatar el fenotipo incubando con MrX.

Las plantas K2AS y K1OX podrían interpretarse diferentes graduaciones de la relación LePRK1/LePRK2, siendo mayor en ambas transgénicas con respecto a las plantas salvajes. Es esperable encontrar una mayor relación LePRK1/LePRK2 en plantas K1OX, seguidas por las plantas K2AS, dependiendo de la eficiencia del transgén para disminuir el ARNm endógeno; y, por último, las plantas salvajes. Reinterpretando los datos, podemos plantear la siguiente hipótesis: menores relaciones LePRK1/LePRK2 correlacionan con una tasa de crecimiento mayor; a medida que la relación aumenta, la tasa de crecimiento disminuye. De acuerdo a esta hipótesis, LePRK1 tendría un efecto negativo sobre la germinación, mientras que el de LePRK2 sería un efecto positivo sobre el crecimiento del tubo. Ambos efectos actuarían en simultáneo, regulando finamente la

germinación y el normal crecimiento del tubo polínico. Esto explicaría por qué la sobreexpresión de LePRK1 inhibe por completo la germinación del polen, la expresión antisentido de LePRK2 disminuye la velocidad de crecimiento y, también, por qué en plantas salvajes el aumento de LePRK2 con la germinación resulta en un fenotipo que requiere menores cantidades de MrX en función del tiempo.

Resumiendo, hemos demostrado que MrX es un promotor del crecimiento del tubo polínico, siendo esta respuesta totalmente dependiente de la presencia de LePRK2. MrX no actuaría como una fuente nutricional, sino como ligando del complejo LePRKs. El aumento de la expresión de LePRK2 resultaría en una percepción aumentada de MrX.

## **6. Conclusiones finales y perspectivas**

## 6. Conclusiones finales y perspectivas

LePRK1 y LePRK2 son dos receptores quinasa de polen de tomate que forman parte de un complejo de alto peso molecular (~400 kDa) que se localiza en la membrana plasmática del grano de polen maduro y en el tubo polínico germinado. Este complejo tendría la capacidad de percibir a MrX, una señal peptídica proveniente del pistilo. La unión de este ligando a los dominios extracelulares de los receptores conduciría a la disociación del complejo y la desfosforilación de LePRK2, resultando en la estimulación del crecimiento del tubo polínico.

Homólogos de LePRK1 y LePRK2 han sido encontrados en otras especies vegetales como tabaco, papa y especies salvajes de tomate [101]. La conservación de estos receptores en distintos organismos nos hizo suponer que también podría estar conservada la presencia de MrX, su ligando. Es por ello que luego de haberlo encontrado en tomate, lo buscamos en tabaco. Su hallazgo, nos permitió desarrollar un protocolo de purificación exitoso, del cual logramos obtener MrX en estado puro. Sin embargo, la determinación estructural ha sido imposible de realizar hasta el momento debido a la resistencia que este compuesto presenta a su ruptura a fragmentos peptídicos más pequeños de más fácil estudio por espectrometría de masa. En la bibliografía consultada durante la realización de esta tesis, hemos encontrado numerosos ejemplos de biomoléculas de naturaleza peptídica provenientes de diferentes organismos con características similares a MrX, como resistencia al calor, proteasas, tratamientos hidrolíticos varios, etc (ver tabla 6.1). Pero ninguna de estas moléculas presenta todas las características que MrX presenta al mismo tiempo. Sólomente los ciclótidos, otro grupo de compuestos también proveniente de plantas, parece poseer prácticamente las mismas propiedades que MrX [151, 154, 155]. Sin embargo, a diferencia de los ciclótidos, MrX no interactúa con resinas de fase reversa y es resistente a tratamientos hidrolíticos ácidos. A pesar de ello, en el futuro los métodos de estudio utilizados para realizar las determinaciones estructurales de los péptidos cíclicos se aplicarán a MrX, con el fin de determinar la presencia de puentes disulfuro e intentar fragmentar la molécula (ver sección 4.4).



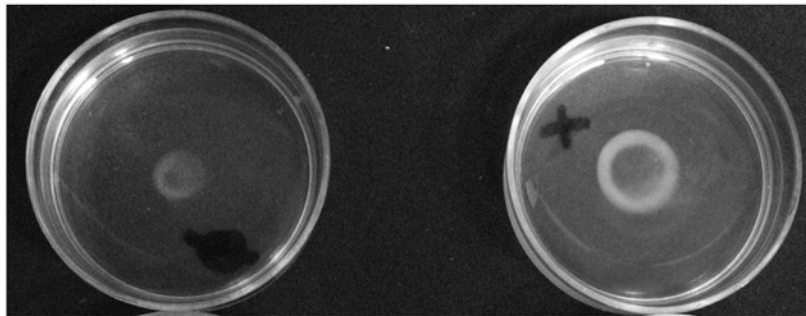
Proteína	Organismo	Peso Molecular	Resistente a	Referencia
<u>Bacterias y Arqueas</u>				
Endotoxina	Bacterias	-	Tratamiento ácido (HCl/ác. acético), tripsina, quimiotripsina, pronasa	[175]
Lactococcina (bacteriocina)	<i>Lactococcus lactis</i> MMFII	~4,1 kDa	Calor	[176]
Metabolitos antifúngicos (¿péptido cíclico?)	<i>Bacillus pumilus</i>	-	Calor, tripsina, quimiotripsina, proteinasa K, pepsina, lisozima, carboxipeptidasa A	[177]
Proteína tipo apoA-1	<i>Mycoplasma arthritidis</i>	~28 kDa	Calor, proteinasa K	[178]
MTAP (Fosforilasa de Metil Adenosina)	<i>Sulfolobus solfataricus</i> (Arquea)	26,5 kDa (monómero)	Calor, tripsina, DTT	[179]
<u>Insectos y Mamíferos</u>				
Microfilina	<i>Boophilus microplus</i> (garrapata)	~1,7 kDa	Calor, proteinasa K (parcialmente)	[180]
ApPS (aminopeptidasa sensible a puromicina)	<i>Homo sapiens</i>	~97 kDa	Tripsina, quimiotripsina, proteasa V8	[181]
CsAct/Saponina B (Activador de sulfato de cerebrósido)	<i>Sus domesticus</i> (cerdo)	~9,7 kDa (glicosilado)	Calor, Proteasas	[152]
Mitógeno de células uterinas	<i>Sus domesticus</i>	~4,8 kDa	Calor	[182]
PrP <sup>Sc</sup> (proteína prión <i>scrapie</i> )	Hámster Sirio	33-35 kDa	Proteinasa K	[183]
<u>Plantas</u>				
Ciclótidos	Plantas (Violaceae, Rubiaceae, Cucurbitaceae)	2-4 kDa	Calor, tripsina, endoGlu-C, pepsina, termolisina, parcialmente a la hidrólisis ácida	[151, 155]
Fitosulfoquina	<i>Asparagus officinalis</i> (espárrago)	~0,8 kDa	Calor	[115]

**Tabla 6.1: Ejemplos de proteínas resistentes a tratamientos drásticos descritas en la literatura.**

En una serie de experimentos no mostrados en esta tesis, hemos observado que MrX se expresa desde el comienzo de la diferenciación de la flor y se encuentra en mayores concentraciones en los tejidos más próximos al ovario, disminuyendo hacia el estigma. En este escenario, podría existir un mecanismo de retroalimentación positiva donde el aumento de expresión de LePRK2 con la germinación y las mayores concentraciones de MrX en el estilo, resultarían en una percepción aumentada de este ligando en función del tiempo. Por lo tanto, la tasa de crecimiento del tubo polínico aumentaría a medida que este crece por el estilo. Esta posibilidad podría comprobarse polinizando pistilos y midiendo la longitud del tubo polínico a diferentes tiempos. Si la hipótesis es correcta, la tasa de crecimiento de los tubos polínicos debería aumentar con el tiempo.

Existen estudios que demuestran que aunque el crecimiento del tubo polínico *in vitro* puede alcanzar los valores vistos *in vivo* para el comienzo de la germinación, nunca crece tan rápido o tan largo como lo hace en el tejido transmisor [99]. Esto implica que existen una serie de requerimientos nutricionales, estructurales o fisiológicos que están ausentes durante los ensayos *in vitro*. El análisis de los experimentos de germinación realizados en esta tesis concuerda con esas observaciones. Aquí describimos que MrX proveniente del pistilo modula el crecimiento del tubo polínico a través de la actividad de receptores quinasa de polen. En base a nuestras observaciones, hemos comprobado que para la mayor concentración de MrX ensayada *in vitro* ( $5 \cdot 10^{-4}$  Abs 280 nm /  $\mu$ l de PGM), logramos un aumento del ~40% de la longitud del tubo polínico con respecto al control para 3 horas de germinación (figura 5.3). Aún no hemos podido determinar cuál es la concentración fisiológica de MrX en las diferentes zonas del pistilo, por lo que resulta imposible definir cuál es el rango de concentraciones que el tubo polínico enfrenta *in vivo*. Sin embargo, el efecto mediado por MrX parecería no haber alcanzado la saturación en las condiciones ensayadas, lo que indica que es probable obtener efectos mayores. Esta última observación pudo ser comprobada experimentalmente y los resultados son evidentes a simple vista (figura 6.1). No hemos podido validar este experimento del mismo modo que lo hicimos en los realizados en el capítulo 3 por razones técnicas: los tubos polínicos luego del tratamiento son más largos que el diámetro del campo del microscopio. La comparación de los diámetros de los *clusters* de polen sin tratar o tratado

con 5 veces la primera concentración que produce cambios significativos a 3 horas de germinación ( $1,5 \cdot 10^{-3}$  Abs 280 nm /  $\mu\text{l}$  de PGM), mostró un aumento de  $\sim 70\%$  con respecto al polen control. Este resultado indica que no se han alcanzado concentraciones inhibitorias de MrX y que es posible aumentar la tasa de crecimiento del tubo polínico en ensayos de germinación *in vitro*. La determinación de la tasa de crecimiento y la concentración de MrX *in vivo* nos permitirá saber si la utilización de este ligando puro en ensayos *in vitro* en la concentración observada *in planta* produce el mismo efecto estimulador. Es decir, si es necesario algún otro agregado además de MrX para alcanzar la tasa de crecimiento *in vivo*.



**Figura 6.1: Ensayo de 3 horas de germinación de polen salvaje de tomate sin (izquierda) o con MrX (derecha,  $1,5 \cdot 10^{-3}$  Abs 280 nm /  $\mu\text{l}$  de PGM).**

Nuestras observaciones nos permiten afirmar que la estimulación del crecimiento del tubo polínico por MrX es el resultado de la activación del complejo de LePRKs, y no debido a un efecto nutricional. Al menos dos resultados independientes avalan esto. En primer lugar, la incubación de muestras microsomales de polen con MrX resultan en la desfosforilación específica de LePRK2, indicando que este ligando induce una modificación bioquímica en proteínas del polen. En segundo lugar, el polen de plantas K2AS es insensible a MrX ya que el crecimiento de los tubos polínicos no se ve estimulado, indicando que el efecto de MrX requiere de la presencia de LePRK2.

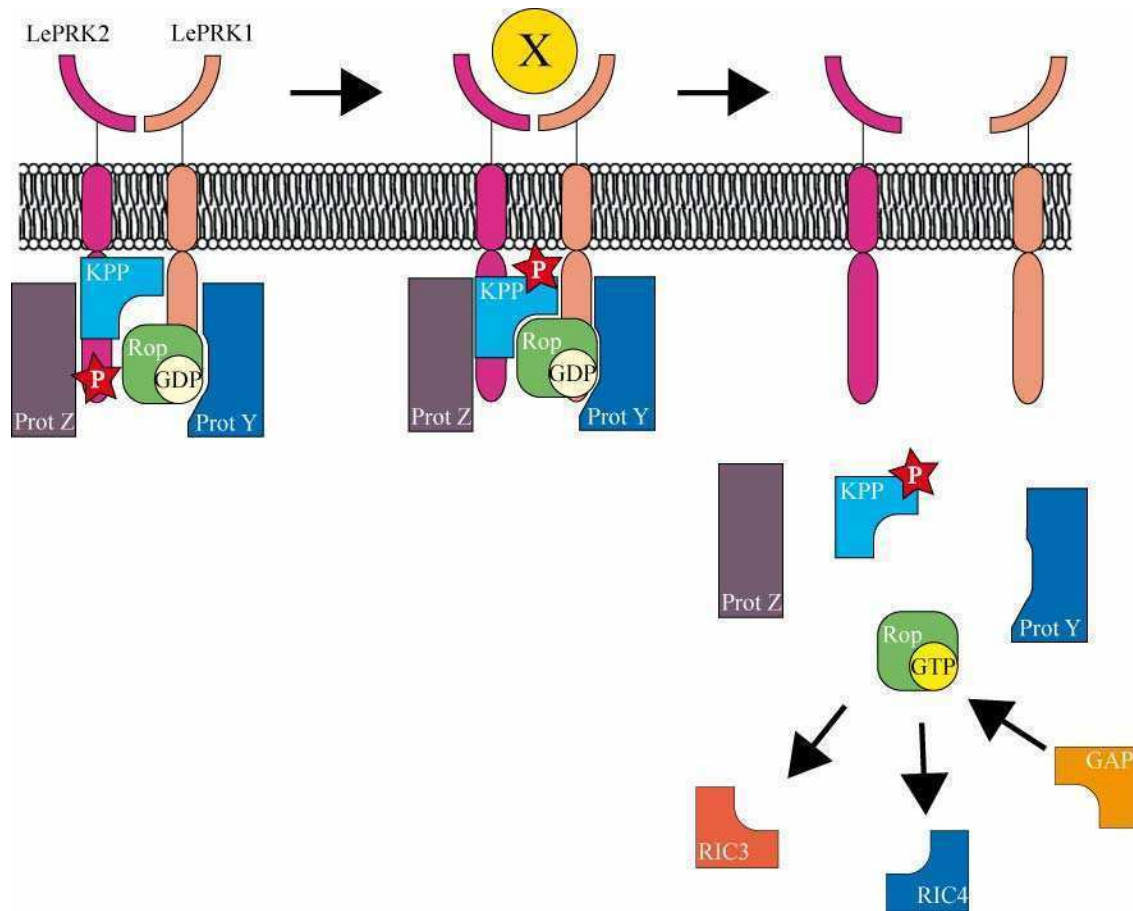
Los resultados de los ensayos de germinación en presencia de MrX sugieren que la sensibilidad por este ligando aumenta en función del tiempo. Sabemos que la expresión de LePRK2 también aumenta, sugiriendo que la mayor sensibilidad se debe a la presencia de más receptores en la membrana. Por otra parte, sabemos que la expresión de LePRK1

se mantiene constante. Este comportamiento plantea algunos interrogantes cuyas respuestas son fundamentales para la comprensión de este sistema de transducción. Los datos que hemos obtenido nos indican que LePRK2 es fundamental para promover la estimulación del crecimiento por MrX. Sin embargo, no contamos con la información que nos indique si existe una interacción directa LePRK2-MrX o si la interacción es con LePRK1 y LePRK2 es la encargada de transmitir esta señal al citoplasma. Debemos contar con MrX puro y marcado (con un fluoróforo o radiactivamente) para determinar los sitios de unión a membrana de polen germinado por diferentes tiempos. También será necesario contar con algún sistema de expresión heteróloga, como levaduras, para determinar si el pegado de MrX requiere la presencia de ambas LePRKs. Por otra parte, la expresión diferencial de los receptores y su asociación a un complejo de alto peso molecular en ausencia de MrX, sugieren que es probable que existan diferentes complejos con diferentes integrantes, o bien, donde la estequiometría de las proteínas dentro del complejo sea diferente. Esta familia de complejos podría tener una diferente afinidad por el ligando o por nuevos componentes citoplasmáticos, resultando en una red de complejos y cascadas transduccionales distintas, todos afectando el crecimiento del tubo polínico. En el marco de esta hipótesis, debemos mencionar que a pesar que la expresión de LePRK2 aumenta en función del tiempo de germinación, ensayos de fosforilación con muestras de polen germinado por diferentes tiempos no parece mostrar una mayor cantidad de LePRK2 marcada (resultados no mostrados). Esto sugiere que sólo una pequeña población de LePRK2 está capacitada para ser fosforilada. La población de LePRK2 “capacitada” podría tener alguna relación con la cantidad de LePRK1 asociada a ella. Esta hipótesis podría ser estudiada aumentando la expresión de LePRK1 y verificando el estado de fosforilación de LePRK2. Lamentablemente, la generación de plantas K1OX resultó en polen imposibilitado de germinar, por lo que se deberán idear estrategias alternativas para la modulación de la expresión de LePRK1.

Es intrigante como LePRK1, un receptor sin actividad autofosforilante *in vitro* o quinasa sobre otras proteínas, puede ser tan fundamental para la regulación del proceso de germinación. Se ha descrito la presencia de numerosas proteínas receptoras quinasas atípicas sin actividad fosforilante. Algunas de ellas son fosforiladas por otras proteínas cuando estas unen el ligando y se activan, interactuando con los efectores intracelulares.

También pueden actuar como andamiaje para la formación de complejos multiproteicos [184]. Esta última información plantea una posibilidad muy interesante: LePRK1 podría actuar a través de otras proteínas modulando la fisiología del tubo polínico. En ensayos de fosforilación *in vitro*, nunca hemos logrado fosforilar a LePRK1. Sin embargo, esto podría ser el resultado de no haber encontrado las condiciones para producir esta reacción. Están por ser determinadas cuántas son las isoformas de LePRK1 en polen germinado, indicando si la fosforilación de LePRK1 *in vivo* forma parte de la transducción de la señal.

De acuerdo a nuestro modelo, la actividad del complejo de LePRKs ocurriría a través de KPP, una proteína perteneciente a la familia de ROPGEFs de plantas, regulando la actividad de ROP en el tubo polínico (figura 6.2). Hemos demostrado que esta proteína interactúa *in vivo* con LePRK2 y con ambas LePRKs en ensayos *in vitro*. A pesar de no poseer ningún dominio de anclaje a membrana, KPP se encuentra en la membrana plasmática, colocalizando con el complejo de LePRKs. Por otra parte, KPP se encontraría fosforilada, ya que detectamos diferentes isoformas en geles bidimensionales [52]. Este último dato concuerda con la predicción de sitios realizado a través de diferentes algoritmos computacionales. Hasta el momento no hemos podido fosforilar a KPP en ensayos *in vitro* y desconocemos si esta fosforilación ocurre a través de LePRK2. Por lo tanto, no hemos podido determinar si KPP es quien transduce la señal del complejo río abajo. El estudio del patrón de fosforilación de KPP en plantas K2AS y K2OX (aún no generadas) será fundamental para determinar si es o no sustrato de fosforilación de LePRK2 *in vivo*. Por otro lado, hemos observado que KPP forma parte del complejo de LePRKs (resultados no publicados; colaboración con la Dra. Antje Berken, Instituto Max Planck de Fisiología Molecular, Dortmund, Alemania), junto con la proteína homóloga a ROP en tomate [78]. Este resultado en conjunto con el reciente trabajo publicado por el laboratorio de la Dra. Sheila McCormick indicarían que nuestra hipótesis es correcta. En este trabajo, analizando AtRopGEF12 y AtPRK2a, homólogas a KPP y LePRK2 en polen de *Arabidopsis*, se demostró que la fosforilación de una serina en el dominio carboxiterminal de AtRopGEF12, liberaría a ésta de la inhibición producida por este dominio, promoviendo el crecimiento isotrópico del tubo polínico. También se demostró que la interacción entre AtRopGEF12 y AtPRK2a ocurre a través del dominio carboxiterminal de AtRopGEF12, y que esta interacción es menor cuando AtPRK2 se



**Figura 6.2: Modelo molecular del complejo de LePRKs en polen de tomate.** LePRK1 y LePRK2 se encuentran formando un complejo de alto peso molecular con otras proteínas, entre ellas KPP (ROPGEF) y, probablemente, ROP de tomate. Aquí, LePRK1 inhibe la estimulación del crecimiento por parte de LePRK2. En presencia de MrX, LePRK2 se desfosforila y KPP se activa por fosforilación, permitiendo la interacción directa con ROP. Esta interacción promueve el intercambio de GDP por GTP en ROP. Luego de la disociación del complejo de LePRKs, ROP activada promovería la actividad de sus efectores río abajo, afectando  $[Ca^{2+}]_i$  y el citoesqueleto de actina, promoviendo el crecimiento del tubo polínico.

encuentra mutada en una lisina indispensable para la actividad quinasa (K366R) [185]. De ser el sistema de Arabidopsis similar al de tomate, entonces el complejo de LePRKs sería el eslabón fundamental para la regulación del crecimiento del tubo polínico por señales extracelulares en polen de tomate. Además, este sistema regulatorio estaría presente en otras especies como Arabidopsis [185], y probablemente también en aquellas donde se han descrito proteínas homólogas a LePRK1 y LePRK2 [101].

La proteína ROP es el interruptor molecular del crecimiento apical [169, 186]. Esta proteína regula a través de sus efectores la polimerización del citoesqueleto de actina y  $[Ca^{2+}]_i$ . En nuestro modelo, donde la presencia de MrX activa a KPP a través del complejo de LePRKs, ROP es uno de los componentes centrales de la cascada de transducción de la señal. Aún no hemos determinado cuál de las rutas reguladas por ROP es la afectada por MrX. Debemos determinar en el futuro si la presencia de MrX está asociada directamente a una mayor proliferación del citoesqueleto o a la activación de proteínas asociadas a él, o bien, si existe una modificación en las  $[Ca^{2+}]_i$ . Sobre la base de esta hipótesis, es de gran importancia el estudio de la actividad de KPP y ROP mediada por el complejo de LePRKs en respuesta a la presencia de MrX. Como se mencionó más arriba, no hemos logrado alcanzar el efecto máximo de estimulación de la germinación por MrX. Sin embargo, sería esperable llegar a un *plateau* de estimulación y no a la inducción del crecimiento isotrópico en condiciones salvajes de expresión de los receptores quinasa. La sobreexpresión de LePRK1 o LeRPK2 y, por consiguiente la localización errónea de los mismos, resulta en la deformación del ápice del tubo. De acuerdo a nuestra hipótesis, la presencia de MrX en el contexto de una localización errónea de los receptores, debería resultar en un fenotipo aún más aberrante que el obtenido en ausencia de MrX. También sería muy interesante analizar los efectos de MrX sobre polen sobreexpresante de KPP o sus versiones constitutivamente activadas (ausencia del dominio carboxiterminal o versión mutante de S→D) y constitutivamente desactivadas (versión S→A). Ningún efecto debería ser observado cuando KPP pierda la regulación por fosforilación.

Para comprender el funcionamiento de este sistema de transducción de señales, será necesario profundizar la investigación detallada de cada una de las proteínas que sabemos están involucradas. En principio, deberemos identificar cuáles son los sitios fosforilados *in vivo* en LePRK2, KPP y, quizás, en LePRK1. La identificación y modificación de estos residuos nos permitirán estudiar bioquímicamente el funcionamiento del complejo. En segunda instancia, deberemos investigar si la percepción de la señal está asociada a una invaginación del receptor o desensibilización del sistema, tal como ocurre en otros sistemas [91]. Para llevar a cabo experimentos que apunten a la resolución de estos interrogantes, es vital contar con MrX puro y marcado.

Por otro lado, la utilización de versiones mutadas de LePRK1, LePRK2 o KPP asociadas a eGFP que emulen el estado constitutivamente activado o desactivado, y su expresión transitoria, nos permitirán asociar las diferentes modificaciones a la localización y funcionamiento del complejo multiproteico *in vivo*.

La localización de MrX en el estigma y estilo aún no ha sido determinada, pero sería esperable que este ligando sea producido por las células secretorias del tejido transmisor del estilo y estigma, que es la zona por donde crece el tubo polínico. Dado que MrX es un péptido apoplástico, no sería extraño que se encuentre glicosilada, justificando el comportamiento de esta molécula en los diferentes pasos cromatográficos realizados. Sin embargo, de acuerdo a los resultados observados en esta tesis, estas modificaciones no serían absolutamente necesarias para la función de MrX, ya que tratamientos drásticos que resultarían en la hidrólisis de las cadenas glicosídicas no tienen efecto sobre la actividad.

Siguiendo la hipótesis que MrX se localiza en el tracto transmisor del estigma y estilo, y no en otros tejidos dentro del pistilo, el crecimiento del tubo polínico se vería estimulado cuando éste crece en los tejidos que producen el ligando e inhibido fuera de este tejido. Como el crecimiento del tubo polínico ocurre apicalmente, esta estimulación resultaría en fusión de nuevas vesículas en la zona expuesta a MrX. En este sentido, el crecimiento del tubo polínico estaría siempre restringido al tracto transmisor y no fuera de él. Por otro lado, la presencia de MrX rodeando el ápice del tubo polínico resultaría en la estimulación del crecimiento rectilíneo del tubo. Esta hipótesis implica que el complejo de LePRKs activo debe localizarse apicalmente para transducir la señal y que la aplicación direccionada de MrX resulta en una reorientación del crecimiento. Se ha observado en ensayos de expresión transitoria de LePRK2 en granos de polen de tabaco, que el tubo polínico desarrolla un ápice globoso (resultados no publicados de las doctoras Weihua Tang y Yan Zhang, bajo la dirección de la doctora Sheila McCormick, PGEC-USDA-UC Berkeley, Estados Unidos de Norteamérica). Esto indicaría que la localización de LePRK2 es apical y que su sobreexpresión resulta en una expansión de la zona donde este receptor está presente produciendo el crecimiento isodiamétrico del ápice. Por otro lado, en esta tesis hemos demostrado que la presencia de MrX en el medio de cultivo en ensayos *in vitro* seguiría el comportamiento esperado: la estimulación del



crecimiento longitudinal del tubo. Para verificar la segunda implicancia relacionada a la reorientación del crecimiento, será necesaria la aplicación de MrX de forma puntual y estudiar si se produce una modificación en la dirección de crecimiento.

El hecho de haber purificado MrX a partir de estigmas y estilos de tabaco, y que éste conserve la actividad en el complejo proveniente de tomate nos brinda dos indicios importantes. El primero sugiere que este mismo complejo estaría conservado al menos en dos especies de Solanáceas. La profundización del estudio de estas proteínas en otras especies indicaría si el mecanismo de regulación del crecimiento es general o se restringe sólo a este grupo de plantas. En principio, la identificación de homólogas a LePRK2 en especies como *Arabidopsis* o maíz [101], sugiere que éste sería un mecanismo conservado en Angiospermas. El segundo indicio, sugiere que éste mecanismo no está relacionado al rechazo interespecífico del polen. Por lo tanto, una nueva línea de investigación podría ser desarrollada con el fin de determinar cuáles son los factores que impiden que los granos de polen de una especie germinen y desarrollen un tubo polínico sobre estigmas y estilos de otra especie relacionada.

El aislamiento de MrX presenta la interesante posibilidad del hallazgo de una nueva familia de moléculas señalizadoras. La obtención de la estructura molecular, la secuencia aminoácídica y la deducción de la nucleotídica permitirán aislar el gen que codifica para MrX, mediante el rastreo de bibliotecas de ADNc de pistilo de tomate y tabaco. De esta forma, y luego del aislamiento de proteínas homólogas en otras especies, podremos determinar si existe una estructura o dominios conservados. Esta información nos dará las herramientas para la búsqueda de proteínas tipo MrX en otras familias taxónomicas de plantas. Por otro lado, podremos analizar si estas proteínas están involucradas en caminos diferentes a los relacionados a la interacción polen-pistilo, estableciendo una nueva estrategia general de las plantas para la transducción de señales.

## **7. Referencias**

## 7. Referencias

1. Mouradov, A., F. Cremer, and G. Coupland, *Control of flowering time: interacting pathways as a basis for diversity*. Plant Cell, 2002. **14 Suppl**: p. S111-30.
2. Boavida, L.C., J.D. Becker, and J.A. Feijo, *The making of gametes in higher plants*. Int J Dev Biol, 2005. **49**(5-6): p. 595-614.
3. Boavida, L.C., et al., *Gametophyte interaction and sexual reproduction: how plants make a zygote*. Int J Dev Biol, 2005. **49**(5-6): p. 615-32.
4. Angenent, G.C. and L. Colombo, *Molecular control of ovule development*. Trends in Plant Science, 1996. **1**(7): p. 228-232.
5. Schneitz, K., *The molecular and genetic control of ovule development*. Curr Opin Plant Biol, 1999. **2**(1): p. 13-7.
6. Goldberg, R.B., T.P. Beals, and P.M. Sanders, *Anther development: basic principles and practical applications*. Plant Cell, 1993. **5**(10): p. 1217-29.
7. McCormick, S., *Male Gametophyte Development*. Plant Cell, 1993. **5**(10): p. 1265-1275.
8. McCormick, S., *Control of male gametophyte development*. Plant Cell, 2004. **16 Suppl**: p. S142-53.
9. Cheung, A.Y. and H.M. Wu, *Structural and functional compartmentalization in pollen tubes*. J Exp Bot, 2006.
10. Parton, R.M., et al., *Pollen tubes exhibit regular periodic membrane trafficking events in the absence of apical extension*. J Cell Sci, 2003. **116**(Pt 13): p. 2707-19.
11. Parton, R.M., et al., *Dynamics of the apical vesicle accumulation and the rate of growth are related in individual pollen tubes*. J Cell Sci, 2001. **114**(Pt 14): p. 2685-95.
12. Campanoni, P. and M.R. Blatt, *Membrane trafficking and polar growth in root hairs and pollen tubes*. J Exp Bot, 2006.
13. Lovy-Wheeler, A., et al., *Differential organelle movement on the actin cytoskeleton in lily pollen tubes*. Cell Motil Cytoskeleton, 2007. **64**(3): p. 217-32.
14. Cardenas, L., et al., *Actin polymerization promotes the reversal of streaming in the apex of pollen tubes*. Cell Motil Cytoskeleton, 2005. **61**(2): p. 112-27.
15. Lovy-Wheeler, A., et al., *Oscillatory increases in alkalinity anticipate growth and may regulate actin dynamics in pollen tubes of lily*. Plant Cell, 2006. **18**(9): p. 2182-93.
16. Lovy-Wheeler, A., et al., *Enhanced fixation reveals the apical cortical fringe of actin filaments as a consistent feature of the pollen tube*. Planta, 2005. **221**(1): p. 95-104.
17. Chen, T., et al., *Disruption of actin filaments by latrunculin B affects cell wall construction in Picea meyeri pollen tube by disturbing vesicle trafficking*. Plant Cell Physiol, 2007. **48**(1): p. 19-30.
18. Ren, H. and Y. Xiang, *The function of actin-binding proteins in pollen tube growth*. Protoplasma, 2007. **230**(3-4): p. 171-82.

19. Lisboa, S., G.E. Scherer, and H. Quader, *Localized endocytosis in tobacco pollen tubes: visualisation and dynamics of membrane retrieval by a fluorescent phospholipid*. Plant Cell Rep, 2007.
20. Hormanseder, K., G. Obermeyer, and I. Foissner, *Disturbance of endomembrane trafficking by brefeldin A and calyculin A reorganizes the actin cytoskeleton of Lilium longiflorum pollen tubes*. Protoplasma, 2005. **227**(1): p. 25-36.
21. Bushart, T.J. and S.J. Roux, *Conserved Features of Germination and Polarized Cell Growth: A Few Insights from a Pollen-Fern Spore Comparison*. Ann Bot (Lond), 2006.
22. Holdaway-Clarke, T.L. and P.K. Hepler, *Control of pollen tube growth: role of ion gradients and fluxes*. 2003. p. 539-563.
23. Krichevsky, A., et al., *How pollen tubes grow*. Dev Biol, 2007. **303**(2): p. 405-20.
24. Malho, R., et al., *Signalling pathways in pollen germination and tube growth*. Protoplasma, 2006. **228**(1-3): p. 21-30.
25. Cheung, A.Y. and H.M. Wu, *Overexpression of an Arabidopsis formin stimulates supernumerary actin cable formation from pollen tube cell membrane*. Plant Cell, 2004. **16**(1): p. 257-69.
26. Hwang, J.U., et al., *Oscillatory ROP GTPase activation leads the oscillatory polarized growth of pollen tubes*. Mol Biol Cell, 2005. **16**(11): p. 5385-99.
27. Fu, Y., G. Wu, and Z. Yang, *Rop GTPase-dependent dynamics of tip-localized F-actin controls tip growth in pollen tubes*. J Cell Biol, 2001. **152**(5): p. 1019-32.
28. Frietsch, S., et al., *A cyclic nucleotide-gated channel is essential for polarized tip growth of pollen*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(36): p. 14531-6.
29. Qu, H.Y., et al., *Identification of hyperpolarization-activated calcium channels in apical pollen tubes of Pyrus pyrifolia*. New Phytol, 2007. **174**(3): p. 524-36.
30. Shang, Z.L., et al., *Ca<sup>2+</sup> influx into lily pollen grains through a hyperpolarization-activated Ca<sup>2+</sup>-permeable channel which can be regulated by extracellular CaM*. Plant Cell Physiol, 2005. **46**(4): p. 598-608.
31. Schiott, M., et al., *A plant plasma membrane Ca<sup>2+</sup> pump is required for normal pollen tube growth and fertilization*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(25): p. 9502-7.
32. Feijo, J.A., et al., *Growing pollen tubes possess a constitutive alkaline band in the clear zone and a growth-dependent acidic tip*. J Cell Biol, 1999. **144**(3): p. 483-96.
33. Monteiro, D., et al., *Phosphoinositides and phosphatidic acid regulate pollen tube growth and reorientation through modulation of [Ca<sup>2+</sup>]<sub>c</sub> and membrane secretion*. J Exp Bot, 2005. **56**(416): p. 1665-74.
34. Camacho, L. and R. Malho, *Endo/exocytosis in the pollen tube apex is differentially regulated by Ca<sup>2+</sup> and GTPases*. J Exp Bot, 2003. **54**(380): p. 83-92.
35. Rato, C., et al., *Calmodulin activity and cAMP signalling modulate growth and apical secretion in pollen tubes*. Plant J, 2004. **38**(6): p. 887-97.
36. Mouline, K., et al., *Pollen tube development and competitive ability are impaired by disruption of a Shaker K(+) channel in Arabidopsis*. Genes Dev, 2002. **16**(3): p. 339-50.

37. Zonia, L., et al., *Oscillatory chloride efflux at the pollen tube apex has a role in growth and cell volume regulation and is targeted by inositol 3,4,5,6-tetrakisphosphate*. *Plant Cell*, 2002. **14**(9): p. 2233-49.
38. Monteiro, D., et al., *Modulation of endocytosis in pollen tube growth by phosphoinositides and phospholipids*. *Protoplasma*, 2005. **226**(1-2): p. 31-8.
39. Pan, Y.Y., et al., *Characterization of phosphatidylinositol-specific phospholipase C (PI-PLC) from Lilium daviddi pollen*. *Plant Cell Physiol*, 2005. **46**(10): p. 1657-65.
40. Moutinho, A., et al., *cAMP acts as a second messenger in pollen tube growth and reorientation*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. **98**(18): p. 10481-6.
41. Vernoud, V., et al., *Analysis of the small GTPase gene superfamily of Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 2003. **131**(3): p. 1191-208.
42. Hepler, P.K., L. Vidali, and A.Y. Cheung, *Polarized cell growth in higher plants*. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2001. **17**: p. 159-87.
43. de Graaf, B.H., et al., *Rab11 GTPase-regulated membrane trafficking is crucial for tip-focused pollen tube growth in tobacco*. *Plant Cell*, 2005. **17**(9): p. 2564-79.
44. Yang, Z., *Small GTPases: versatile signaling switches in plants*. *Plant Cell*, 2002. **14 Suppl**: p. S375-88.
45. Li, H., et al., *Control of pollen tube tip growth by a Rop GTPase-dependent pathway that leads to tip-localized calcium influx*. *Plant Cell*, 1999. **11**(9): p. 1731-42.
46. Kost, B., et al., *Rac homologues and compartmentalized phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate act in a common pathway to regulate polar pollen tube growth*. *J Cell Biol*, 1999. **145**(2): p. 317-30.
47. Lin, Y., et al., *Localization of a Rho GTPase Implies a Role in Tip Growth and Movement of the Generative Cell in Pollen Tubes*. *Plant Cell*, 1996. **8**(2): p. 293-303.
48. Chen, C.Y., et al., *The regulation of actin organization by actin-depolymerizing factor in elongating pollen tubes*. *Plant Cell*, 2002. **14**(9): p. 2175-90.
49. Wu, G., et al., *A genome-wide analysis of Arabidopsis Rop-interactive CRIB motif-containing proteins that act as Rop GTPase targets*. *Plant Cell*, 2001. **13**(12): p. 2841-56.
50. Gu, Y., et al., *A Rho family GTPase controls actin dynamics and tip growth via two counteracting downstream pathways in pollen tubes*. *J Cell Biol*, 2005. **169**(1): p. 127-38.
51. Gu, Y., et al., *Members of a novel class of Arabidopsis Rho guanine nucleotide exchange factors control Rho GTPase-dependent polar growth*. *Plant Cell*, 2006. **18**(2): p. 366-81.
52. Kaothien, P., et al., *Kinase partner protein interacts with the LePRK1 and LePRK2 receptor kinases and plays a role in polarized pollen tube growth*. *Plant J*, 2005. **42**(4): p. 492-503.
53. Wu, G., H. Li, and Z. Yang, *Arabidopsis RopGAPs are a novel family of rho GTPase-activating proteins that require the Cdc42/Rac-interactive binding motif for rop-specific GTPase stimulation*. *Plant Physiol*, 2000. **124**(4): p. 1625-36.
54. Klahre, U. and B. Kost, *Tobacco RhoGTPase ACTIVATING PROTEIN1 Spatially Restricts Signaling of RAC/Rop to the Apex of Pollen Tubes*. 2006. p. 3033-3046.

55. Klahre, U., et al., *Nt-RhoGDI2 regulates Rac/Rop signaling and polar cell growth in tobacco pollen tubes*. *Plant J*, 2006. **46**(6): p. 1018-31.
56. Morillo, S.A. and F.E. Tax, *Functional analysis of receptor-like kinases in monocots and dicots*. *Curr Opin Plant Biol*, 2006. **9**(5): p. 460-9.
57. Clark, S.E., R.W. Williams, and E.M. Meyerowitz, *The CLAVATA1 gene encodes a putative receptor kinase that controls shoot and floral meristem size in Arabidopsis*. *Cell*, 1997. **89**(4): p. 575-85.
58. Jeong, S., A.E. Trotochaud, and S.E. Clark, *The Arabidopsis CLAVATA2 Gene Encodes a Receptor-like Protein Required for the Stability of the CLAVATA1 Receptor-like Kinase*. 1999. p. 1925-1934.
59. Sharma, V.K., J. Ramirez, and J.C. Fletcher, *The Arabidopsis CLV3-like (CLE) genes are expressed in diverse tissues and encode secreted proteins*. *Plant Mol Biol*, 2003. **51**(3): p. 415-25.
60. Johnson, K.L. and G.C. Ingram, *Sending the right signals: regulating receptor kinase activity*. *Curr Opin Plant Biol*, 2005. **8**(6): p. 648-56.
61. Trotochaud, A.E., et al., *The CLAVATA1 receptor-like kinase requires CLAVATA3 for its assembly into a signaling complex that includes KAPP and a Rho-related protein*. *Plant Cell*, 1999. **11**(3): p. 393-406.
62. Haubrick, L.L. and S.M. Assmann, *Brassinosteroids and plant function: some clues, more puzzles*. *Plant Cell Environ*, 2006. **29**(3): p. 446-57.
63. Li, J. and J. Chory, *A putative leucine-rich repeat receptor kinase involved in brassinosteroid signal transduction*. *Cell*, 1997. **90**(5): p. 929-38.
64. Clouse, S.D., M. Langford, and T.C. McMorris, *A brassinosteroid-insensitive mutant in Arabidopsis thaliana exhibits multiple defects in growth and development*. *Plant Physiol*, 1996. **111**(3): p. 671-8.
65. Kinoshita, T., et al., *Binding of brassinosteroids to the extracellular domain of plant receptor kinase BRI1*. *Nature*, 2005. **433**(7022): p. 167-71.
66. Li, J., et al., *BAK1, an Arabidopsis LRR receptor-like protein kinase, interacts with BRI1 and modulates brassinosteroid signaling*. *Cell*, 2002. **110**(2): p. 213-22.
67. Nam, K.H. and J. Li, *BRI1/BAK1, a receptor kinase pair mediating brassinosteroid signaling*. *Cell*, 2002. **110**(2): p. 203-12.
68. Wang, X., et al., *Autoregulation and homodimerization are involved in the activation of the plant steroid receptor BRI1*. *Dev Cell*, 2005. **8**(6): p. 855-65.
69. Montoya, T., et al., *Cloning the tomato curl3 gene highlights the putative dual role of the leucine-rich repeat receptor kinase tBRI1/SR160 in plant steroid hormone and peptide hormone signaling*. *Plant Cell*, 2002. **14**(12): p. 3163-76.
70. Narvaez-Vasquez, J. and C.A. Ryan, Jr., *The systemin precursor gene regulates both defensive and developmental genes in Solanum tuberosum*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(24): p. 15818-21.
71. Scheer, J.M. and C.A. Ryan, Jr., *The systemin receptor SR160 from Lycopersicon peruvianum is a member of the LRR receptor kinase family*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(14): p. 9585-90.
72. Wang, Z.Y., et al., *Nuclear-localized BZR1 mediates brassinosteroid-induced growth and feedback suppression of brassinosteroid biosynthesis*. *Dev Cell*, 2002. **2**(4): p. 505-13.

73. Yin, Y., et al., *BES1 accumulates in the nucleus in response to brassinosteroids to regulate gene expression and promote stem elongation*. Cell, 2002. **109**(2): p. 181-91.
74. Li, J., *Brassinosteroid signaling: from receptor kinases to transcription factors*. Curr Opin Plant Biol, 2005. **8**(5): p. 526-31.
75. Wang, Z.Y., et al., *The brassinosteroid signal transduction pathway*. Cell Res, 2006. **16**(5): p. 427-34.
76. Belkhadir, Y., X. Wang, and J. Chory, *Brassinosteroid signaling pathway*. Sci STKE, 2006. **2006**(364): p. cm4.
77. Muschietti, J., Y. Eyal, and S. McCormick, *Pollen tube localization implies a role in pollen-pistil interactions for the tomato receptor-like protein kinases LePRK1 and LePRK2*. Plant Cell, 1998. **10**(3): p. 319-30.
78. Wengier, D., et al., *The receptor kinases LePRK1 and LePRK2 associate in pollen and when expressed in yeast, but dissociate in the presence of style extract*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(11): p. 6860-5.
79. Tang, W., et al., *A cysteine-rich extracellular protein, LAT52, interacts with the extracellular domain of the pollen receptor kinase LePRK2*. Plant Cell, 2002. **14**(9): p. 2277-87.
80. Muschietti, J., et al., *LAT52 protein is essential for tomato pollen development: pollen expressing antisense LAT52 RNA hydrates and germinates abnormally and cannot achieve fertilization*. Plant J, 1994. **6**(3): p. 321-38.
81. Tang, W., et al., *LeSTIG1, an extracellular binding partner for the pollen receptor kinases LePRK1 and LePRK2, promotes pollen tube growth in vitro*. Plant J, 2004. **39**(3): p. 343-53.
82. Guyon, V.N., et al., *Isolation and characterization of cDNAs expressed in the early stages of flavonol-induced pollen germination in petunia*. Plant Physiol, 2000. **123**(2): p. 699-710.
83. Goldman, M.H., R.B. Goldberg, and C. Mariani, *Female sterile tobacco plants are produced by stigma-specific cell ablation*. Embo J, 1994. **13**(13): p. 2976-84.
84. Berken, A., C. Thomas, and A. Wittinghofer, *A new family of RhoGEFs activates the Rop molecular switch in plants*. Nature, 2005. **436**(7054): p. 1176-80.
85. Shiu, S.H. and A.B. Bleeker, *Plant receptor-like kinase gene family: diversity, function, and signaling*. Sci STKE, 2001. **2001**(113): p. RE22.
86. Gomez-Gomez, L., Z. Bauer, and T. Boller, *Both the extracellular leucine-rich repeat domain and the kinase activity of FSL2 are required for flagellin binding and signaling in Arabidopsis*. Plant Cell, 2001. **13**(5): p. 1155-63.
87. Matsubayashi, Y., et al., *An LRR receptor kinase involved in perception of a peptide plant hormone, phytosulfokine*. Science, 2002. **296**(5572): p. 1470-2.
88. Tichtinsky, G., et al., *Making inroads into plant receptor kinase signalling pathways*. Trends Plant Sci, 2003. **8**(5): p. 231-7.
89. Trotochaud, A.E., S. Jeong, and S.E. Clark, *CLAVATA3, a multimeric ligand for the CLAVATA1 receptor-kinase*. Science, 2000. **289**(5479): p. 613-7.
90. Tanaka, H., et al., *ACR4, a putative receptor kinase gene of Arabidopsis thaliana, that is expressed in the outer cell layers of embryos and plants, is involved in proper embryogenesis*. Plant Cell Physiol, 2002. **43**(4): p. 419-28.

91. Russinova, E., et al., *Heterodimerization and endocytosis of Arabidopsis brassinosteroid receptors BRI1 and AtSERK3 (BAK1)*. *Plant Cell*, 2004. **16**(12): p. 3216-29.
92. Wang, X., et al., *Identification and functional analysis of in vivo phosphorylation sites of the Arabidopsis BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE1 receptor kinase*. *Plant Cell*, 2005. **17**(6): p. 1685-703.
93. Holton, N., et al., *Tomato BRASSINOSTEROID INSENSITIVE1 is required for systemin-induced root elongation in Solanum pimpinellifolium but is not essential for wound signaling*. *Plant Cell*, 2007. **19**(5): p. 1709-17.
94. Chinchilla, D., et al., *A flagellin-induced complex of the receptor FLS2 and BAK1 initiates plant defence*. *Nature*, 2007. **448**(7152): p. 497-500.
95. Heese, A., et al., *The receptor-like kinase SERK3/BAK1 is a central regulator of innate immunity in plants*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. **104**(29): p. 12217-22.
96. Takayama, S. and A. Isogai, *Self-incompatibility in plants*. *Annu Rev Plant Biol*, 2005. **56**: p. 467-89.
97. Coligan, J.E., et al., *Current Protocols in Protein Science*. 1996.
98. Foreman, P.K. and R.W. Davis, *Cloning vectors for the synthesis of epitope-tagged, truncated and chimeric proteins in Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, 1994. **144**(1): p. 63-8.
99. Lord, E.M., *Adhesion and guidance in compatible pollination*. *J Exp Bot*, 2003. **54**(380): p. 47-54.
100. Higashiyama, T., H. Kuroiwa, and T. Kuroiwa, *Pollen-tube guidance: beacons from the female gametophyte*. *Curr Opin Plant Biol*, 2003. **6**(1): p. 36-41.
101. Kim, H.U., et al., *New pollen-specific receptor kinases identified in tomato, maize and Arabidopsis: the tomato kinases show overlapping but distinct localization patterns on pollen tubes*. *Plant Mol Biol*, 2002. **50**(1): p. 1-16.
102. Matsubayashi, Y. and Y. Sakagami, *Peptide hormones in plants*. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 2006. **57**(1): p. 649-674.
103. Lopez-Bucio, J., et al., *Novel signals for plant development*. *Current Opinion in Plant Biology*, 2006. **9**(5): p. 523-529.
104. Mouchel, C.F. and O. Leyser, *Novel phytohormones involved in long-range signaling*. *Curr Opin Plant Biol*, 2007. **10**(5): p. 473-6.
105. Hara, K., et al., *The secretory peptide gene EPF1 enforces the stomatal one-cell-spacing rule*. *Genes Dev*, 2007. **21**(14): p. 1720-5.
106. Pearce, G., et al., *A Polypeptide from Tomato Leaves Induces Wound-Inducible Proteinase Inhibitor Proteins*. 1991. p. 895-897.
107. McGurl, B., et al., *Structure, expression, and antisense inhibition of the systemin precursor gene*. *Science*, 1992. **255**(5051): p. 1570-3.
108. Narvaez-Vasquez, J. and C.A. Ryan, *The cellular localization of prosystemin: a functional role for phloem parenchyma in systemic wound signaling*. *Planta*, 2004. **218**(3): p. 360-9.
109. Pearce, G., et al., *Production of multiple plant hormones from a single polyprotein precursor*. *Nature*, 2001. **411**(6839): p. 817-20.
110. Pearce, G. and C.A. Ryan, *Systemic signaling in tomato plants for defense against herbivores. Isolation and characterization of three novel defense-signaling*



- glycopeptide hormones coded in a single precursor gene*. J Biol Chem, 2003. **278**(32): p. 30044-50.
111. Pearce, G., et al., *RALF, a 5-kDa ubiquitous polypeptide in plants, arrests root growth and development*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(22): p. 12843-7.
  112. Germain, H., et al., *Characterization of five RALF-like genes from Solanum chacoense provides support for a developmental role in plants*. Planta, 2005. **220**(3): p. 447-54.
  113. Olsen, A.N., J. Mundy, and K. Skriver, *Peptomics, identification of novel cationic Arabidopsis peptides with conserved sequence motifs*. In Silico Biol, 2002. **2**(4): p. 441-51.
  114. Scheer, J.M., G. Pearce, and C.A. Ryan, *LeRALF, a plant peptide that regulates root growth and development, specifically binds to 25 and 120 kDa cell surface membrane proteins of Lycopersicon peruvianum*. Planta, 2005. **221**(5): p. 667-74.
  115. Matsubayashi, Y. and Y. Sakagami, *Phytosulfokine, sulfated peptides that induce the proliferation of single mesophyll cells of Asparagus officinalis L*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(15): p. 7623-7.
  116. Takayama, S., et al., *Direct ligand-receptor complex interaction controls Brassica self-incompatibility*. Nature, 2001. **413**(6855): p. 534-8.
  117. Mishima, M., et al., *Structure of the male determinant factor for Brassica self-incompatibility*. J Biol Chem, 2003. **278**(38): p. 36389-95.
  118. Vanoosthuysse, V., et al., *Two large Arabidopsis thaliana gene families are homologous to the Brassica gene superfamily that encodes pollen coat proteins and the male component of the self-incompatibility response*. Plant Mol Biol, 2001. **46**(1): p. 17-34.
  119. Fletcher, J.C., et al., *Signaling of cell fate decisions by CLAVATA3 in Arabidopsis shoot meristems*. Science, 1999. **283**(5409): p. 1911-4.
  120. Kondo, T., et al., *A plant peptide encoded by CLV3 identified by in situ MALDI-TOF MS analysis*. Science, 2006. **313**(5788): p. 845-8.
  121. Ito, Y., et al., *Dodeca-CLE peptides as suppressors of plant stem cell differentiation*. Science, 2006. **313**(5788): p. 842-5.
  122. Ogawa, M., et al., *Arabidopsis CLV3 peptide directly binds CLV1 ectodomain*. Science, 2008. **319**(5861): p. 294.
  123. Berger, D. and T. Altmann, *A subtilisin-like serine protease involved in the regulation of stomatal density and distribution in Arabidopsis thaliana*. Genes Dev, 2000. **14**(9): p. 1119-31.
  124. Casamitjana-Martinez, E., et al., *Root-specific CLE19 overexpression and the soll2 suppressors implicate a CLV-like pathway in the control of Arabidopsis root meristem maintenance*. Curr Biol, 2003. **13**(16): p. 1435-41.
  125. Kim, S., et al., *Chemocyanin, a small basic protein from the lily stigma, induces pollen tube chemotropism*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(26): p. 16125-30.
  126. Kim, S.T., et al., *Exogenous Free Ubiquitin Enhances Lily Pollen Tube Adhesion to an in Vitro Stylar Matrix and May Facilitate Endocytosis of SCA (Stigma/stylar Cysteine-rich Adhesin)*. Plant Physiol, 2006.
  127. Chae, K., et al., *Two SCA (stigma/style cysteine-rich adhesin) isoforms show structural differences that correlate with their levels of in vitro pollen tube adhesion activity*. J Biol Chem, 2007. **282**(46): p. 33845-58.

128. Park, S.Y. and E.M. Lord, *Expression studies of SCA in lily and confirmation of its role in pollen tube adhesion*. *Plant Mol Biol*, 2003. **51**(2): p. 183-9.
129. Dong, J., S.T. Kim, and E.M. Lord, *Plantacyanin plays a role in reproduction in Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 2005. **138**(2): p. 778-89.
130. Mollet, J.C., et al., *A lily stylar pectin is necessary for pollen tube adhesion to an in vitro stylar matrix*. *Plant Cell*, 2000. **12**(9): p. 1737-50.
131. Cheung, A.Y., H. Wang, and H.M. Wu, *A floral transmitting tissue-specific glycoprotein attracts pollen tubes and stimulates their growth*. *Cell*, 1995. **82**(3): p. 383-93.
132. Wu, H.M., et al., *A pollen tube growth-promoting arabinogalactan protein from nicotiana glauca is similar to the tobacco TTS protein*. *Plant J*, 2000. **22**(2): p. 165-76.
133. Palanivelu, R., et al., *Pollen tube growth and guidance is regulated by POP2, an Arabidopsis gene that controls GABA levels*. *Cell*, 2003. **114**(1): p. 47-59.
134. Yu, G., et al., *Quantum dot-mediated detection of gamma-aminobutyric acid binding sites on the surface of living pollen protoplasts in tobacco*. *Chem Biol*, 2006. **13**(7): p. 723-31.
135. Higashiyama, T., et al., *Pollen tube attraction by the synergid cell*. *Science*, 2001. **293**(5534): p. 1480-3.
136. Kasahara, R.D., et al., *MYB98 is required for pollen tube guidance and synergid cell differentiation in Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2005. **17**(11): p. 2981-92.
137. Marton, M.L., et al., *Micropylar pollen tube guidance by egg apparatus 1 of maize*. *Science*, 2005. **307**(5709): p. 573-6.
138. Zhong, H., S.L. Marcus, and L. Li, *Microwave-assisted acid hydrolysis of proteins combined with liquid chromatography MALDI MS/MS for protein identification*. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2005. **16**(4): p. 471-481.
139. Bradshaw, T.P., *A User's Guide: Introduction to Peptide and Protein HPLC*. Phenomenex, 1998-2006. **Part No. AA0-3908**.
140. D'Suze, G., et al., *Discrepin, a new peptide of the sub-family alpha-ktx15, isolated from the scorpion Tityus discrepans irreversibly blocks K<sup>+</sup> -channels (IA currents) of cerebellum granular cells*. *Arch Biochem Biophys*, 2004. **430**(2): p. 256-63.
141. He, Y.Y., W.H. Lee, and Y. Zhang, *Cloning and purification of alpha-neurotoxins from king cobra (Ophiophagus hannah)*. *Toxicon*, 2004. **44**(3): p. 295-303.
142. Pascual, N., et al., *Orcokinin in insects and other invertebrates*. *Insect Biochem Mol Biol*, 2004. **34**(11): p. 1141-6.
143. Ribeiro, S.P., et al., *Structural and functional characterization of N-terminally blocked peptides isolated from the venom of the social wasp Polybia paulista*. *Peptides*, 2004. **25**(12): p. 2069-78.
144. Choi, S.J., et al., *Isolation and characterization of Psalmopeotoxin I and II: two novel antimalarial peptides from the venom of the tarantula Psalmopoeus cambridgei*. *FEBS Lett*, 2004. **572**(1-3): p. 109-17.
145. John, M., et al., *Lipochitooligosaccharide-induced tobacco cells release a peptide as mediator of the glycolipid signal*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. **94**(19): p. 10178-82.

146. Tang, Y.-Q., et al., *A Cyclic Antimicrobial Peptide Produced in Primate Leukocytes by the Ligation of Two Truncated -Defensins*. 1999. p. 498-502.
147. Takayama, S., et al., *Isolation and characterization of pollen coat proteins of Brassica campestris that interact with S locus-related glycoprotein 1 involved in pollen-stigma adhesion*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(7): p. 3765-70.
148. Rawlings, N.D., et al., *MEROPS: the peptidase database*. 2008. p. D320-325.
149. McMurry, J., *Química Orgánica*. Grupo Editorial Iberoamérica S.A. de C.V., 1994.
150. Appel, T.R., et al., *Acid inactivation of prions: efficient at elevated temperature or high acid concentration*. J Gen Virol, 2006. **87**(Pt 5): p. 1385-94.
151. Colgrave, M.L. and D.J. Craik, *Thermal, chemical, and enzymatic stability of the cyclotide kalata B1: the importance of the cyclic cystine knot*. Biochemistry, 2004. **43**(20): p. 5965-75.
152. Faull, K.F., et al., *Disulfide connectivity in cerebroside sulfate activator is not necessary for biological activity or alpha-helical content but is necessary for trypsin resistance and strong ligand binding*. Arch Biochem Biophys, 2000. **376**(2): p. 266-74.
153. Vaccaro, A.M., et al., *Structural analysis of saposin C and B. Complete localization of disulfide bridges*. J Biol Chem, 1995. **270**(17): p. 9953-60.
154. Pelegrini, P.B., B.F. Quirino, and O.L. Franco, *Plant cyclotides: an unusual class of defense compounds*. Peptides, 2007. **28**(7): p. 1475-81.
155. Ireland, D.C., M.L. Colgrave, and D.J. Craik, *A novel suite of cyclotides from Viola odorata: sequence variation and the implications for structure, function and stability*. Biochem J, 2006. **400**(1): p. 1-12.
156. Varki, A., et al., *Essentials of Glycobiology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press Cold Spring Harbor, New York 1999.
157. Coward-Kelly, G., F.K. Agbogbo, and M.T. Holtzapple, *Lime treatment of keratinous materials for the generation of highly digestible animal feed: 2. Animal hair*. Bioresour Technol, 2006. **97**(11): p. 1344-52.
158. Palanivelu, R. and D. Preuss, *Distinct short-range ovule signals attract or repel Arabidopsis thaliana pollen tubes in vitro*. BMC Plant Biol, 2006. **6**: p. 7.
159. Higashiyama, T., et al., *Guidance in vitro of the pollen tube to the naked embryo sac of torenia fournieri*. Plant Cell, 1998. **10**(12): p. 2019-32.
160. Mayfield, J.A. and D. Preuss, *Rapid initiation of Arabidopsis pollination requires the oleosin-domain protein GRP17*. Nat Cell Biol, 2000. **2**(2): p. 128-30.
161. Doughty, J., et al., *PCP-A1, a defensin-like Brassica pollen coat protein that binds the S locus glycoprotein, is the product of gametophytic gene expression*. Plant Cell, 1998. **10**(8): p. 1333-47.
162. Chen, Y.F., Y. Matsubayashi, and Y. Sakagami, *Peptide growth factor phytosulfokine-alpha contributes to the pollen population effect*. Planta, 2000. **211**(5): p. 752-5.
163. Park, S.Y., et al., *A lipid transfer-like protein is necessary for lily pollen tube adhesion to an in vitro stilar matrix*. Plant Cell, 2000. **12**(1): p. 151-64.
164. Sanchez, A.M., et al., *Pistil factors controlling pollination*. Plant Cell, 2004. **16** **Suppl**: p. S98-106.

165. Baker, S.C., et al., *Interactions among genes regulating ovule development in Arabidopsis thaliana*. Genetics, 1997. **145**(4): p. 1109-24.
166. Shimizu, K.K. and K. Okada, *Attractive and repulsive interactions between female and male gametophytes in Arabidopsis pollen tube guidance*. Development, 2000. **127**(20): p. 4511-8.
167. Higashiyama, T., et al., *Species preferentiality of the pollen tube attractant derived from the synergid cell of Torenia fournieri*. Plant Physiol, 2006. **142**(2): p. 481-91.
168. Cole, R.A. and J.E. Fowler, *Polarized growth: maintaining focus on the tip*. Curr Opin Plant Biol, 2006. **9**(6): p. 579-88.
169. Yang, Z. and Y. Fu, *ROP/RAC GTPase signaling*. Curr Opin Plant Biol, 2007. **10**(5): p. 490-4.
170. Johnson, M.A. and D. Preuss, *Plotting a course: multiple signals guide pollen tubes to their targets*. Dev Cell, 2002. **2**(3): p. 273-81.
171. Prasher, D.C., et al., *Primary structure of the Aequorea victoria green-fluorescent protein*. Gene, 1992. **111**(2): p. 229-33.
172. Twell, D., et al., *Isolation and expression of an anther-specific gene from tomato*. Mol Gen Genet, 1989. **217**(2-3): p. 240-5.
173. Prado, A.M., D.M. Porterfield, and J.A. Feijo, *Nitric oxide is involved in growth regulation and re-orientation of pollen tubes*. Development, 2004. **131**(11): p. 2707-14.
174. Wolters-Arts, M., W.M. Lush, and C. Mariani, *Lipids are required for directional pollen-tube growth*. Nature, 1998. **392**(6678): p. 818-21.
175. Goodman, G.W. and B.M. Sultzer, *Characterization of the chemical and physical properties of a novel B-lymphocyte activator, endotoxin protein*. Infect Immun, 1979. **24**(3): p. 685-96.
176. Ferchichi, M., et al., *Lactococcin MMFII, a novel class IIa bacteriocin produced by Lactococcus lactis MMFII, isolated from a Tunisian dairy product*. FEMS Microbiol Lett, 2001. **205**(1): p. 49-55.
177. Munimbazi, C. and L.B. Bullerman, *Isolation and partial characterization of antifungal metabolites of Bacillus pumilus*. J Appl Microbiol, 1998. **84**(6): p. 959-68.
178. Kondoh, K., et al., *Isolation and characterization of prosaposin from human milk*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1991. **181**(1): p. 286-292.
179. Cacciapuoti, G., et al., *A novel hyperthermostable 5'-deoxy-5'-methylthioadenosine phosphorylase from the archaeon Sulfolobus solfataricus*. Febs J, 2005. **272**(8): p. 1886-99.
180. Ciprandi, A., et al., *Boophilus microplus: its saliva contains microphilin, a small thrombin inhibitor*. Exp Parasitol, 2006. **114**(1): p. 40-6.
181. Ma, Z., et al., *Proteolytic cleavage of the puromycin-sensitive aminopeptidase generates a substrate binding domain*. Arch Biochem Biophys, 2003. **415**(1): p. 80-6.
182. Simmen, R.C., et al., *A uterine cell mitogen distinct from epidermal growth factor in porcine uterine luminal fluids: characterization and partial purification*. Biol Reprod, 1988. **38**(3): p. 551-61.

183. Pan, K.M., N. Stahl, and S.B. Prusiner, *Purification and properties of the cellular prion protein from Syrian hamster brain*. Protein Sci, 1992. **1**(10): p. 1343-52.
184. Castells, E. and J.M. Casacuberta, *Signalling through kinase-defective domains: the prevalence of atypical receptor-like kinases in plants*. J Exp Bot, 2007. **58**(13): p. 3503-11.
185. Zhang, Y. and S. McCormick, *A distinct mechanism regulating a pollen-specific guanine nucleotide exchange factor for the small GTPase Rop in Arabidopsis thaliana*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(47): p. 18830-5.
186. Fu, Y. and Z. Yang, *Rop GTPase: a master switch of cell polarity development in plants*. Trends Plant Sci, 2001. **6**(12): p. 545-7.