

## Tesis Doctoral

# Estudio de los residuos fosforilados del receptor quinasa LePRK2 en polen de *Solanum lycopersicum* VF36 (tomate cultivado) y su función en las interacciones polen-pistilo

Salem, Tamara Marcela

2009

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

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

Cita tipo APA:

Salem, Tamara Marcela. (2009). Estudio de los residuos fosforilados del receptor quinasa LePRK2 en polen de *Solanum lycopersicum* VF36 (tomate cultivado) y su función en las interacciones polen-pistilo. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Salem, Tamara Marcela. "Estudio de los residuos fosforilados del receptor quinasa LePRK2 en polen de *Solanum lycopersicum* VF36 (tomate cultivado) y su función en las interacciones polen-pistilo". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2009.

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Fisiología, Biología Molecular y Celular

**Estudio de los residuos fosforilados del receptor quinasa LePRK2 en polen de *Solanum lycopersicum* VF36 (tomate cultivado) y su función en las interacciones polen-pistilo**

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

**Autor: Lic. Tamara Marcela Salem**

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, 2009

*A mi mamá...*  
*“También a nuestra madre la habíamos pensado  
siempre como algo inmortal, al menos tanto  
como el mundo: porque cuando nosotros  
nacíamos, ella formaba parte del mundo,  
el mundo sin ella no era imaginable”.*

Un altar para la madre, Ferdinando Camon.

*A mi abuelo Jaime,  
por su amor, su fuerza  
en su vida y por  
haberme abierto  
las puertas al  
mundo...*

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

Salem T, Mazzella A, Wengier D, Motillo V, Parisi G, Muschietti J.

**Mutations in two putative phosphorylation motifs in the pollen receptor kinase LePRK2 show antagonistic effects on pollen tube length.**

Manuscrito enviado.

Wengier D, Mazzella M, Salem T, McCormick S, Muschietti J.

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

Manuscrito aceptado en proceso de revisión.

Motillo V, Salem T, Muschietti J, Parisi G.

**Evolutionary study of Juxtamembrane Domain in protein kinases.**

Manuscrito en preparación.

## INDICE

<b>RESUMEN</b> .....	6-7
<b>ABSTRACT</b> .....	8
<b>INTRODUCCION</b> .....	12-47
*Producción de gametas.....	13-14
*Megasporogénesis y megagametogénesis.....	14
*Microsporogénesis y microgametogénesis.....	14-16
*El grano de polen.....	16-18
*Crecimiento del tubo polínico.....	18-20
*Componentes del tubo polínico en crecimiento.....	20-22
*Crecimiento apical.....	22-23
*Concentración intracelular de $Ca^{2+}$ , pH intracelular y iones $K^+$ , $Cl^-$ .....	23-25
*Fosfoinosítidos y lípidos.....	25-27
*Proteínas pequeñas que unen GTP.....	27-31
*Citoesqueleto de actina y sus proteínas asociadas.....	31-34
*Endocitosis y exocitosis de vesículas.....	34-37
*Transducción de señales en plantas mediadas por receptores quinasas.....	38-41
*Fosforilación.....	41-44
*LePRK1 y LePRK2.....	44-47
<b>OBJETIVOS</b> .....	48
<b>MATERIALES Y METODOS</b> .....	49-76
TRANSFORMACION TRANSITORIA.....	49-61
*Material vegetal utilizado para bombardeo.....	49-50
*Vectores utilizados.....	50-51
*Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de las mutantes.....	51-52
*Mutagénesis dirigida.....	52-53
*Transformación de bacterias termocompetentes.....	53-54
*Obtención de clones mutantes para secuenciación: Minipreparaciones de ADN.....	54-56
*Secuenciación de de ADN para expresión transitoria.....	56
*Maxipreparación de ADN para expresión transitoria.....	56-57
*Transformación de polen de tabaco por biobalística.....	57-60
-Preparación de microtransportadores (micropartículas de oro).....	57

-Recubrimiento de los microtransportadores con el ADN transformante.....	57-58
-Preparación de placas de agar para disparar.....	58
-Bombardeo de polen de tabaco.....	59-60
*Observación al microscopio.....	60
*Tratamiento con Latrunculina B.....	60
*Análisis de Imágenes.....	60-61
*Análisis de datos.....	61
<b>PROTEÓMICA:</b> .....	61-75
*Material vegetal utilizado para la obtención de P <sub>100</sub> .....	61-62
*Electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida (“geles 2D”) con polen maduro y polen germinado <i>in vitro</i> .....	62-63
*Tratamiento con <i>Lambda</i> fosfatasa.....	64-66
-Corrida de la primera dimensión.....	64-65
-Corrida de la segunda dimensión; Electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE).....	65-66
*Tinción de geles con nitrato de plata o Azul de <i>Coomassie</i> .....	66-67
*Transferencia de geles SDS-PAGE a membrana de nitrocelulosa.....	67
* <i>Western blot</i> .....	68-69
*Fraccionamiento y purificación de microsomas de polen maduro de tomate.....	69-70
*Preparación de STIL.....	70-71
*Ensayo de fosforilación con <sup>32</sup> PγATP.....	71-72
*Aislamiento de <i>spots</i> o bandas de geles de poliacrilamida para secuenciación proteica.....	72
*Deshidratación de <i>spots</i> o bandas de gel y digestión con tripsina.....	73-74
-Deshidratación del gel.....	73
-Reducción del gel.....	73-74
-Digestión con tripsina.....	74
-Extracción de péptidos.....	74
*UV-MALDI-TOF MS y UV-MALDI-TOF MS/MS.....	74-75
*Glosario.....	75-76
<b>RESULTADOS</b> .....	77-129
*Análisis fenotípico de tubos polínicos sobreexpresantes de LePRK2-eGFP y	

mLePRK2-eGFP en el crecimiento del tubo polínico y en la dinámica de actina.....	77-90
*Determinación y análisis de posibles sitios de fosforilación de LePRK2 responsables de cambios fenotípicos en la germinación del tubo polínico.....	90-107
*Aislamiento e identificación <i>in vivo</i> de sitios de fosforilación de LePRK2 mediante el uso de la técnica de geles bidimensionales y su posterior secuenciación.....	108-120
*Análisis bioinformático del dominio yuxtamembrana de LePRK2.....	120-129
<b>CONCLUSIONES Y DISCUSION.....</b>	<b>130-144</b>
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>145-160</b>

## **Estudio de los residuos fosforilados del receptor quinasa LePRK2 en polen de *Solanum lycopersicum* VF36 (tomate cultivado) y su función en las interacciones polen-pistilo**

### **RESUMEN**

El crecimiento apical del tubo polínico es un modelo muy utilizado para el estudio de células polarizadas en plantas. Previamente caracterizamos a LePRK2, un receptor quinasa específico de polen de tomate (*Solanum lycopersicum*). Cuando se expresa de manera transitoria LePRK2-eGFP en polen de tabaco, se observa una disminución significativa del largo del tubo polínico y un aumento del ancho del ápice del tubo, comparado con tubos eGFP. Tubos que expresan la mutación en una lisina esencial para la actividad quinasa de LePRK2, muestran la misma longitud del tubo polínico y del ancho del ápice que los tubos eGFP control. Hemos demostrado que LePRK2 estaría presente como múltiples isoformas fosforiladas tanto en membranas de polen maduro como germinado. Utilizando un análisis comparativo de secuencias y la predicción de sitios de fosforilación, identificamos dos motivos posibles de fosforilación en el dominio citoplasmático yuxtamembrana. Mutagénesis dirigida sobre estos motivos y su sobreexpresión en polen de tabaco, muestra que ambos motivos tienen efectos opuestos en la regulación del crecimiento del tubo polínico. Sustituciones a alanina en residuos del motivo I de LePRK2, S277/S279/S282, resultó en tubos polínicos más largos, mientras que la sustitución a alanina de residuos del motivo II, S304/S307/T308, resultó en tubos más cortos. En contraste, sustituciones fosfomiméticas con ácido aspártico en estos residuos, mostró resultados recíprocos: tubos más cortos con mutaciones en el motivo I y tubos más largos con mutaciones en el motivo II. Concluimos que la longitud del tubo polínico puede estar controlada a través de una regulación negativa y positiva debida a la fosforilación de los residuos del motivo I y II respectivamente. Estos resultados sugieren que LePRK2 podría tener un papel central en el crecimiento del tubo polínico a través de la regulación de su propio estado de fosforilación. Hemos realizado distintos abordajes con polen maduro de tomate con el fin de determinar por espectrometría de masa los sitios de fosforilación de LePRK2, pero hasta el momento no hemos logrado identificarlos. Por otro lado, STIL, un ligando de LePRK2 proveniente del pistilo, desfosforila LePRK2 en membranas de polen maduro en presencia de  $^{32}\text{P}\gamma\text{ATP}$ . Nuestra hipótesis plantea que LePRK2 está involucrada en el



control del crecimiento del tubo polínico de tomate y el mismo es regulado *in vivo* por el equilibrio de distintos residuos de fosforilación, a veces organizados en motivos en su dominio yuxtamembrana. Por otro lado, alguno de los residuos de LePRK2 son desfosforilados por STIL.

Palabras claves:

LePRK2-Mutagénesis-Sitios de fosforilación-Transducción de señales.

## **Study of phosphorylated residues of the LePRK2 receptor kinase in pollen of *Solanum lycopersicum* VF36 (cultivated tomato) and its function in pollen-pistil interactions**

### **ABSTRACT**

The tip-growing pollen tube is a useful model for studying polarized cell growth in plants. We previously characterized LePRK2, a pollen-specific receptor-like kinase from tomato (*Solanum lycopersicum*). When transiently overexpressed in tobacco pollen tubes, LePRK2-eGFP significantly decreased pollen tube length and increased pollen tube tip width, relative to eGFP tubes. Tubes that expressed a mutation in a lysine essential for kinase activity showed the same length and width as the eGFP control. LePRK2 might be present as multiple phosphorylated isoforms in mature and germinated pollen membranes. Using comparative sequence analysis and phosphorylation site prediction programs we identified two putative phosphorylation motifs in the cytoplasmic juxtamembrane domain. Site-directed mutagenesis in these motifs, and overexpression in tobacco pollen, showed that both motifs have opposite effects in regulating pollen tube length. Relative to LePRK2-eGFP pollen tubes, alanine substitutions in residues of motif I, S277/S279/S282, resulted in longer pollen tubes, but alanine substitutions in motif II, S304/S307/T308, resulted in shorter tubes. In contrast, phosphomimicking aspartic substitutions at these residues gave reciprocal results: shorter tubes with mutations in motif I and longer tubes with mutations in motif II. We conclude that length of pollen tubes can be negatively and positively regulated by phosphorylation of residues in motif I and II respectively. These results suggest that LePRK2 may have a central role in pollen tube growth through regulation of its own phosphorylation status. In order to discover LePRK2 phosphorylation sites *in vivo*, some approaches were tested with tomato mature pollen. Moreover, STIL, a ligand of LePRK2 from pistil, dephosphorylates LePRK2 in mature pollen membranes in the presence  $^{32}\text{P}\gamma\text{ATP}$ . We hypothesize that LePRK2 is involved in the control of tomato pollen tube growth, and this is regulated *in vivo* by the equilibrium of different phosphorylated residues, sometimes organized in motifs in the juxtamembrane domain. On the other hand, some residues of LePRK2 are dephosphorylated by STIL.

Key words:

LePRK2-Mutagenesis-phosphorylated sites-Signal transduction.

## AGRADECIMIENTOS

\*A mi director de tesis, Dr. Jorge Muschiatti, por haberme permitido desarrollar el tema de trabajo junto a él con enriquecedoras discusiones. Por estar siempre dispuesto a buscar alternativas a experimentos y por ser una guía constante y motivante. Por no separar la ciencia de los afectos en el espacio laboral.

\*Al Dr. Gustavo Parisi por haber demostrado un gran interés desde el momento que le describí el proyecto, por haberse comprometido con su tarea, y por haberme explicado tan claramente el trabajo realizado por él.

\*Al Dr Hector Torres y Dra Mirtha Flawiá por haber permitido realizar mi Tesis Doctoral en el INGEBI y haber creado un cómodo y solidario ambiente de trabajo.

\*Al Conicet, por haberme financiado todos estos años de doctorado.

\*A Diego, por compartir todos nuestros días de alegrías y frustraciones, tanto de trabajo como personales. Por ser mi mano derecha, izquierda, mi pie...y un hermoso amigo. Porque después de todos estos años juntos, ya se trata de una comunicación visual! Por ser mi cómplice de mis chistes malos y por ayudarme siempre con el trabajo y ser mi enciclopedia abierta de biología!

\*A Gaby, por su dulzura de todos los días. Por nuestras útiles y anheladas charlas de pasillo y por demostrarme que está a mi lado cada vez que necesito una opinión. Ahh...y por haberme iniciado en la técnica de bombardeo!

\*A Agus, por haber soportado mis momentos de complicada estadística, y por haber encontrado siempre claridad a los problemas de diseño experimental y con mucho optimismo, haberme ayudado a solucionarlos.

\*A María Laura por estar siempre dispuesta a regar mis plantas cuando no he podido hacerlo, y por ser tan buena compañera. Por haberme hecho creer que le expliqué la técnica de bombardeo con tanta pasión, que dijo que le encantó!!! A Romi, por sus geniales ocurrencias y humor particular, y por brindarme su ayuda tan abiertamente. A Pato, por ser tan linda persona, por su papel de *barman* en mi cumple pasado, y por haberme ayudado a cuidar el 2D! A Mariana, la nueva integrante del laboratorio, por haberse ofrecido muchas veces a ser una lectora de la tesis en el momento de las correcciones. Por las horas compartidas juntas en la biblio y la complicidad de comentarios.

\*Al grupo Erijman: A Leo, por estar siempre dispuesto a volcar su opinión cuando se la necesita. Por el entusiasmo que me crea al escuchar sus anécdotas impredecibles y porque aunque siempre teme a repetirlos, me sorprende con algo nuevo! A la chiqui, por todos estos años compartidos, por su compañerismo y por habernos ayudado mutuamente a soportar el inicio de la fiebre del bananero en nuestro laboratorio. A Lean, por su predisposición a la hora del *pituteo*, por sus buenas ideas al estilo “Mc Giver” para solucionar problemas, por su buen humor de todos los días, y por haber sido el único que soportó ver las 24895734 fotos diarias de Shelito. A Evarinda, por compartir conmigo la llegada de este momento y por haberme empujado a creer que

## Agradecimientos

llega. A fruti, porque me hizo conocer el mejor video de *youtube* y por haberme creado el fanatismo por el agua de pera.

\*A Fernando Bravo y a su grupo, especialmente a Euge y Eze, por absolutamente toda la ayuda con la técnica de bombardeo. Por haberme prestado sin ningún inconveniente el cañón de bombardeo; por haber estado completamente disponibles ante cualquier eventualidad en el momento del bombardeo y por haber sido muy flexibles ante la reserva del cuarto de cultivo.

\*A Irma, por su buena predisposición. A Mariano, por estar siempre dispuesto a ayudar! A Rubén, por ayudarme siempre con la bomba de vacío del cañón de bombardeo y a Gladis, Mari y Pancho por su buen humor diario y ayuda a que siempre tengamos el material listo para trabajar.

\*A Sabina, mi oído del instituto fuera de la gente del laboratorio. Por ayudarme a creer que uno puede querer mucho a una persona en tan poco tiempo. Por preocuparse por mi y ayudarme a mirar las cosas con otros ojos.

\*A Caro, mi amiga del alma de la facultad, con quien compartí tantos años de estudio y a quien sigo sintiendo cerca como el primer día que nos sentamos juntas en el C.B.C. Por toda su ayuda con mi tesis, la inmunología y con todo!

\*A Dani, por ser mi hermano postizo. Por todas nuestras charlas, por tener siempre las palabras justas para todo, y por estar, a pesar de la distancia, conmigo siempre.

\*A Mai, por ser tan linda persona conmigo y estar siempre a mi lado. A Luli, por ser un ejemplo de la fuerza que puede tener una persona para salir adelante. Porque siempre me pregunta por todas mis cosas, y porque creo que es la única de los de la facu, que entiende mis chistes malos. A Pafu, por haber elegido a Luli, la mejor novia, y por eso ser ambos mi pareja prefe.

\*A Juan Perez, por ser tan especial para mi. Por tener un criterio único al pensar las cosas y por darme tranquilamente su forma de pensar, que siempre me ayuda. Por haber elegido a otra persona hermosa a su lado, a quien le quiero agradecer esa dulzura especial que tiene conmigo y por su preocupación a que tome las mejores decisiones. Gracias linda por ser tan hermosa persona conmigo!

\*A Shelito, quien nunca va a entender estas palabras, pero a quien estrujo de amor cada vez que llego a mi casa y me espera para acariciarlo. Muchos no entienden ese amor, pero es porque nunca llegaron a tener al mejor compañero del universo!

\*A Juan Burgos, por ser mi amigo del alma al que adoro cada día más. Por nuestras charlas que ojalá nunca sean escuchadas porque me daría mucha vergüenza! Por mimarme tanto y haber sufrido por mi al ir a ver a Sandra! A Naty Berco, por ser parecida a mi en varias cosas y por eso entenderme tan fácilmente. Por estar siempre viviendo junto a mi cada cosa que pasa, aún a la distancia.

\*A mi secretaria personal, Jime, que me ayudó de una manera extraordinaria a poder tener la compu con la cual escribí esta tesis. Por sus consejos y por preguntarme siempre

## Agradecimientos

por mis tomatitos. A Maga, por transmitirme esa energía contagiosa de ganas de hacer las cosas y encontrar aquellas para disfrutar.

\*A mis amigas del alma, mi negrita Sachu, que creo que junto con Verito, mi IDOL, son las personas con las que más he intercambiado palabras en toda mi vida. Por el amor incondicional que les tengo a las dos, y porque cada una, a su manera, me ayudan a ser feliz día a día.

\*A Joaquín, a quien le dedico gran parte de este trabajo, ya que con su amor, tranquilidad, compañía y paciencia, compartió conmigo todo este camino. Por haberme enseñado a darle una importancia lógica a cada cosa y por haberle inventado el apodo preferido de Shelito: “Peludo”.

\*A mi hermana, quien está siempre con su corazón abierto para darme lo mejor y quien me ayuda a seguir el camino que quiero.

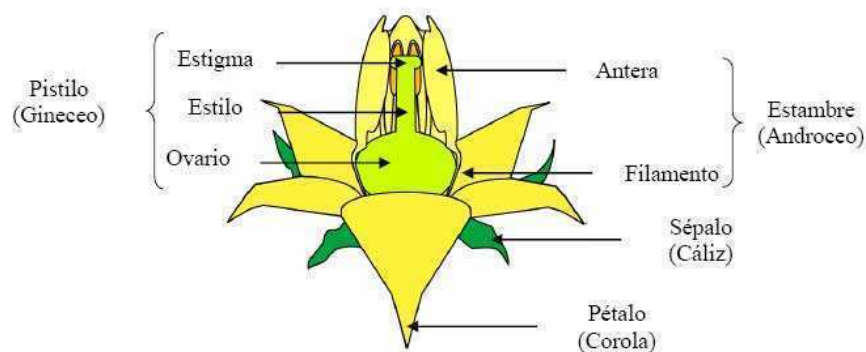
\*A mi mamá, a quien le dedico enteramente este trabajo. Quien me ayuda día a día a tener mi corazoncito calentito, quien comparte y apoya cada una de mis decisiones, y de quien aprendí que el respeto, la caricia, la perseverancia y la buena predisposición, ayudan a crecer.

## INTRODUCCION

*Solanum lycopersicum* (tomate cultivado) pertenece a la familia Solanaceae, junto a otras plantas americanas cultivadas de gran importancia económica y totalmente domesticadas como *Solanum tuberosum* (papa) y *Nicotiana tabacum* (tabaco). Dentro de la misma familia y provenientes del viejo continente se encuentran *Atropa belladonna* (belladona, medicinal) y *Solanum melongena* (berenjena). También existen especies ornamentales como *Petunia violacea* (Petunia) y *Datura arborea* (floripón). El tomate es de origen sudamericano y ya había sido cultivado por los Incas, quienes en el siglo XVI, lo denominaron “Manzana del Perú”.

Considerando la evolución de las plantas, hace 360 millones de años, las plantas vasculares se dividieron en dos linajes diferentes de plantas con semilla: Gymnospermas (Gymnos: desnudo; sperma: semilla) y Angiospermas (Angeion: vesícula; sperma: semilla). En realidad, las Angiospermas (gramíneas y leguminosas) divergieron de las Gymnospermas (coniferales) hace 130 millones de años. Existen más de 250.000 especies de Angiospermas agrupadas en 12.000 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 rápidamente la madurez reproductiva 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, doble 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 (en el caso de hormonas como la giberelina y los osciladores circadianos), para los cuales se ha descrito numerosos genes de tiempo de floración (Mouradov *et al.*, 2002). La integración de todas estas señales induce la expresión de genes que determinan la identidad del meristema apical del vástago, transformándolo en meristema floral (Boavida *et al.*, 2005 b). Seguidamente, se activan los genes de identidad floral en las distintas regiones de la flor, produciendo los cuatro tipos de órganos pertenecientes a dos ciclos estériles (pétalo y sépalo) y dos ciclos fértiles (estambre o androceo y carpelo o pistilo) (Figura 1).

Los pétalos y sépalos están asociados a la protección, 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 o estambre y el gineceo o pistilo. Una diferencia entre las Gymnospermas y las Angiospermas, es que en éstas últimas aparece la estructura nueva de gineceo o pistilo. El éxito evolutivo de la mayoría de las plantas con flor, es la aparición de la estructura reproductiva compuesta por el pistilo y los estambres (Figura 1).



**Fig. 1: Representación esquemática de una flor de tomate (*Solanum lycopersicum*).**

### Producción de 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. A diferencia de lo que ocurre en mamíferos, donde la línea germinal se diferencia durante la embriogénesis, las plantas adultas desarrollan los tejidos fértiles como respuesta a los estímulos endógenos y a aquellos provenientes del medio ambiente (Boavida *et al.*, 2005 a y b). Tal como ocurre en otros organismos con alternancia de generaciones haploides y diploides, en el esporofito se produce la megasporogénesis y microsporogénesis, generando por meiosis esporas con la mitad del contenido cromosómico que son las responsables de generar las gametas. Los procesos por los cuales se producen las gametas femeninas y masculinas se llaman megagametogénesis y microgametogénesis, respectivamente. En plantas superiores, la formación de semillas

es totalmente dependiente de una eficiente polinización y fertilización. La polinización asegura el mantenimiento de la especie y permite aumentar la diversidad genética y el potencial para adaptarse a nuevos ambientes.

La fertilización va a ocurrir cuando el núcleo de una de las gametas presentes en el polen se fusione con el de la ovocélula (haploide), mientras que el núcleo de la otra gameta masculina contribuye con su núcleo haploide a la célula central binucleada del saco embrionario, formando la célula madre del endosperma, un tejido triploide que nutre al cigoto. Como producto de esta doble fecundación, se genera el cigoto ( $2n$ ) y la célula madre del 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. Como se verá luego, las plantas han adquirido una estrategia que les permite alcanzar los óvulos.

### **Megasporogénesis y megagametogénesis**

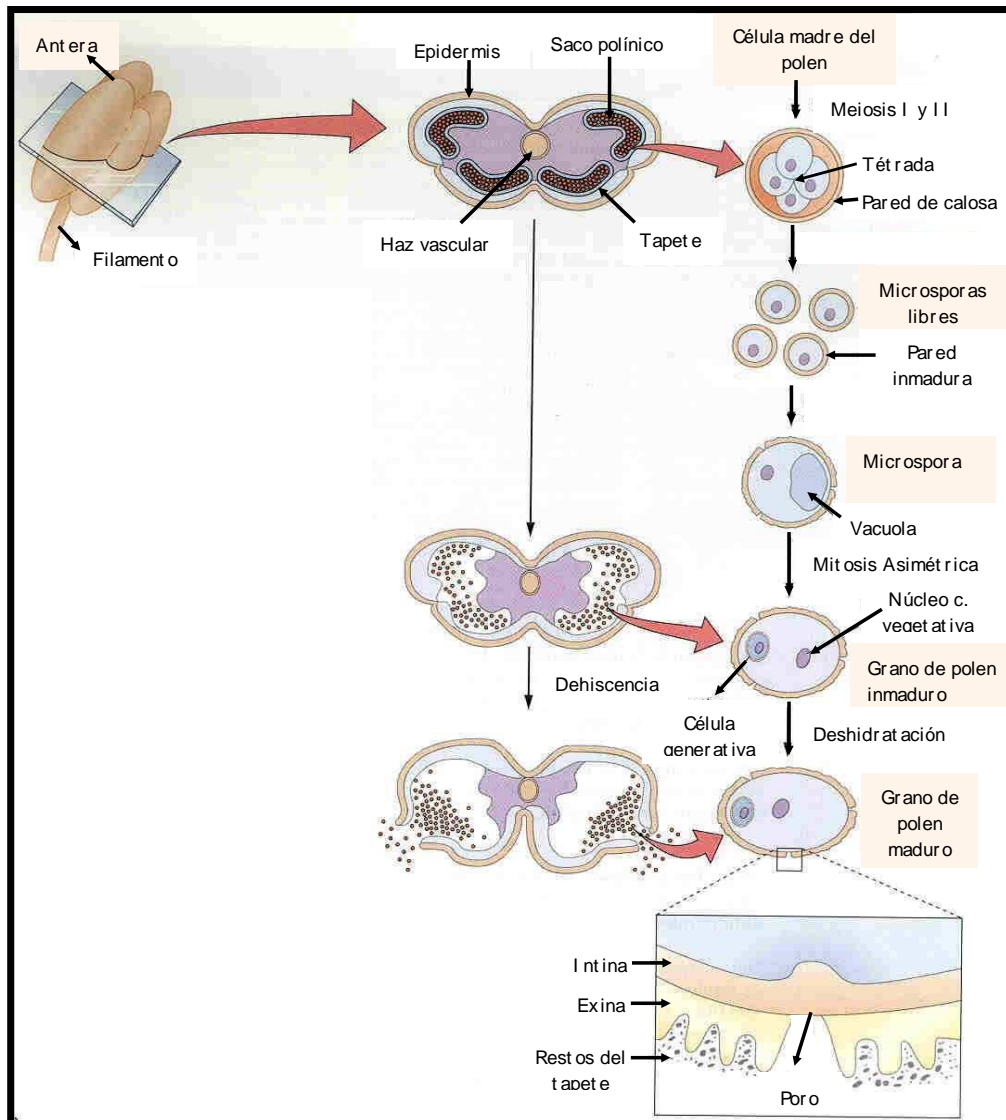
El pistilo es el órgano reproductivo femenino. Está formado por el estigma, estilo y ovario (Figura 1). Este último, contiene a los óvulos. En la nucela de cada uno de los óvulos, una célula sufre meiosis; tres de los productos de esta división degeneran y el cuarto forma una megaspora. Esta, luego de tres mitosis sucesivas, da origen al saco embrionario o gametofito femenino. El saco embrionario está compuesto por siete células y ocho núcleos: tres células antípodas, dos sinérgidas, una célula central binucleada (que contiene dos de los núcleos haploides) y una célula huevo, que es la gameta femenina.

### **Microsporogénesis y microgametogénesis**

El estambre, como se muestra en la figura 1, es el órgano reproductivo masculino. Consiste en un filamento largo que contiene un haz vascular que conduce agua y nutrientes desde el receptáculo de la flor hacia la antera (con un saco en su parte superior) que alberga al polen. Por lo tanto, 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 (Figura 2). En su interior, las anteras poseen un grupo de células arquesporales diploides que darán origen al endotelio, involucrado en la dehiscencia de la antera, el tapete y los microsporangios (sacos polínicos) (Goldberg *et al.*, 1993). La formación del gametofito masculino empieza en la antera, cuando una célula esporofítica se divide en una célula que dará origen a los estratos de la pared de la antera (cumpliendo función de nutrición de las microsporas) y a las células madres del polen. Esta sufre meiosis, dando lugar a la formación de una tétrada de células haploides (microsporas) albergadas todas juntas por una cubierta de calosa ( $\beta$ -1,3 glucano), a la vez que comienzan a sintetizar la pared del grano de polen. La cubierta de calosa es degradada por la calasa (enzima producida por las células del tapete luego de finalizada la meiosis), permitiendo la liberación de las microsporas. Luego, 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 en una mitosis asimétrica, dando lugar a una célula vegetativa (que recibe la mayor parte del citoplasma de la microspora y será responsable del desarrollo del tubo polínico) y una célula generativa más pequeña contenida dentro de la anterior con su núcleo condensado y un citoplasma muy reducido. La célula generativa, se divide por mitosis, formando dos células espermáticas que, en el 70% de las Angiospermas (polen bicelular tomate, por ejemplo), ocurre tardíamente durante el crecimiento del tubo polínico a través del pistilo (Bewley *et al.*, 2000). En otras especies, la célula generativa se divide antes que el polen se libere, formando dos células espermáticas idénticas (polen tricelular; Arabidopsis y maíz, por ejemplo). Los pasos finales de la maduración del polen coinciden con la apertura de la flor y la desecación y apertura de las anteras, finalizando con la liberación de los granos de polen deshidratados que contienen en promedio un 15-30% de contenido de agua (Boavida *et al.*, 2005 a; McCormick., 2004; McCormick., 1993).



**Fig. 2: Esquema de Microsporogénesis y microgametogénesis.**  
 Extraído de Bewley *et al.*, 2000.

### El grano de polen

Las flores de tomate son perfectas actinomorfas y tienen cinco sépalos, cinco pétalos, un gineceo súpero de dos carpelos con numerosos óvulos y cinco estambres. Estos poseen filamentos cortos y anteras fusionadas lateralmente, formando un único tubo. La dehiscencia de las anteras es intrusa, por lo que los granos de polen caen al interior del tubo y luego son liberados al exterior por sus polinizadores (viento y animales).

El grano de polen maduro tiene una doble pared celular: la exina (externa) y la intina (interna) (Figura 2). La intina está compuesta por celulosa, pectina y proteínas. Esta capa interna de la cubierta es lisa y extensible. La exina está compuesta por un polímero llamado esporopolenina que es muy resistente a la desecación. Además presenta pigmentos y está frecuentemente decorada con patrones de espinas y rayas que facilitan su transporte (polinización) ayudando a identificar la especie productora del polen. La composición química de la exina es desconocida, debido a la gran estabilidad de la esporopolenina, que imposibilita ser degradada en sus componentes más sencillos facilitando 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 báculos de la superficie de la exina proveyendo 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 (Boavida *et al.*, 2005 a y b). Análisis químicos han demostrado en Brassica y Arabidopsis, la presencia de ésteres no polares de ácidos grasos de cadena media y larga, ácidos de cadena muy larga, proteínas pequeñas y glicoproteínas en la trifina. Mayfield *et al.*, 2001, han detectado que en Arabidopsis, el 90% de las proteínas de más de 10 kD de la cubierta del polen, corresponden a lipasas (denominadas EXL, *Extracellular lipase*) y a oleosinas, denominadas GRP (*Glicine-Rich Protein*) que afectan el tamaño y las características de los lípidos.

El grano de polen posee poros por los cuales se desarrollará el tubo polínico. Al momento de la citocinesis de la tétrada de microsporas, se determinan las zonas donde posteriormente se van a ubicar los poros de germinación, los cuales no contienen exina. El grano de polen “elige” uno de estos poros para germinar, produciéndose una extensión de la cubierta de intina, iniciando la formación del tubo polínico (Boavida *et al.*, 2005 b). La intina conformará la pared del tubo polínico que no contiene exina.

En el tomate, una planta con estigma húmedo, el grano de polen posee tres poros y el tubo se desarrolla sólo por uno de ellos (Bewley *et al.*, 2000). Una vez finalizada la formación del polen maduro, éste puede llegar al estigma, transportado por polinizadores, donde ocurre un reconocimiento al tejido femenino. Finalmente, la hidratación del grano de polen a partir del exudado del estigma (compuesto en su

mayoría por triglicéridos (Lush *et al.*, 2000), genera un ambiente propicio para el desarrollo de un tubo polínico. En el caso de plantas de estigma seco como las Brasicáceas, la pared del grano de polen contiene proteínas relacionadas a la hidratación (Mayfield *et al.*, 2000; ver sección “Crecimiento del tubo polínico”).

### **Crecimiento del tubo polínico**

Durante la polinización, ocurren procesos complicados y muy controlados, que envuelven señalizaciones entre el grano de polen o tubo polínico y el pistilo. A pesar de que el crecimiento del tubo ocurre fisiológicamente en tejido femenino, el polen de distintas especies puede germinar *in vitro* y desarrollar el tubo polínico, cuando es incubado en un medio líquido o sólido (Taylor *et al.*, 1997). Sin embargo, la velocidad de crecimiento del tubo polínico *in vitro*, no es tan rápida como *in vivo*, lo que sugiere que deben existir moléculas señalizadoras provenientes del pistilo que le permiten nutrirse, orientarse y adherirse, contribuyendo así al reconocimiento inicial entre el polen y el pistilo, al óptimo crecimiento del tubo polínico y posterior fertilización. Es por esto que a pesar que granos de polen de diferentes especies se depositan sobre el estigma, sólo aquellos de la misma especie o relacionadas producirán una exitosa polinización.

Dada la estructura del pistilo, el polen no puede llegar directamente al óvulo una vez liberado de la antera. La función principal del tubo polínico es transportar las células espermáticas por el estilo y guiarlas hacia el tejido femenino. El polen es transportado por agentes bióticos o abióticos y llega al estigma, donde se deposita. El polen al contactar al estigma, se hidrata, desarrolla un tubo y de este modo, a través de una estructura tubular de crecimiento apical, 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 y realizar la doble fertilización dentro del saco embrionario. Mientras el tubo crece, se generan vacuolas en el tubo, las cuales se fusionan formando una gran vacuola central. En este momento se puede observar el inicio de una conspicua reorganización del citoplasma.

El estigma es el primer tejido que recibe al polen y en plantas autocompatibles el polen de la misma flor puede hidratarse, germinar y penetrar el estilo (Lord., 2003). En

plantas de estigmas secos como *Arabidopsis*, 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 estabilizando otros componentes señalizadores en la capa de trifina o la pared celular. En otras Brasicáceas, la pared del grano de polen contiene el determinante masculino de autoincompatibilidad SCR (Takamaya *et al.*, 2005) y proteínas de bajo peso molecular involucradas en la adhesión del grano de polen como la fitosulfoquina (Takayama *et al.*, 2000; Doughty *et al.*, 1998). En plantas de estigma húmedo como tomate y tabaco, los granos de polen se hidratan inmediatamente y los tubos polínicos crecen sobre o a través de la matriz extracelular del estilo, formándose paredes de calosa por detrás del citoplasma de los tubos. Esta pared permite concentrar los componentes celulares como las células espermáticas, el núcleo vegetativo y todo el citoplasma hacia la punta del tubo. Durante el crecimiento del tubo, éste sigue moléculas quimioattractantes que indican el camino hacia el ovario.

En *Lilium longiflorum*, se han descrito dos proteínas involucradas en la interacción polen-pistilo: SCA (*Stigma/stylar Cysteine-rich Adhesin*) que se encuentra asociada a pectina y a ubicuitina extracelular (Kim *et al.*, 2006), y está involucrada en la adhesión a sustratos artificiales y a la matriz extracelular del pistilo (Kim *et al.*, 2006; Park *et al.*, 2003); la segunda es la quimiocianina, que atrae a los tubos polínicos *in vitro* (Kim *et al.*, 2003). En *Arabidopsis*, la sobreexpresión de plantacianina (una proteína con un 86,8% de similitud aminoacídica con la quimiocianina de *Lilium longiflorum*), resulta en un crecimiento anormal del tubo polínico (Dong *et al.*, 2005). 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 guiando a los tubos polínicos hacia los óvulos (Sanchez *et al.*, 2004). 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 crecimiento del tubo polínico *in vitro* (Wu *et al.*, 2000). 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 las glicoproteínas del estilo ricas en galactosa (GaRSGP) o proteínas específicas de pistilo tipo extensina (PELP). Sin embargo, estas proteínas no tienen actividad quimiotrópica (Sanchez *et al.*, 2004).

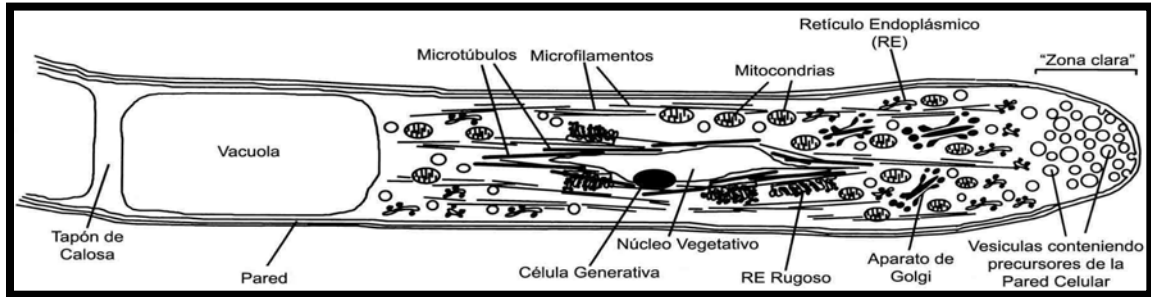
El crecimiento del tubo polínico es polarizado, extendiéndose mediante un crecimiento apical. Para que esto ocurra la pared celular de la base del tubo debe ser más resistente a tensiones por estrés que la pared de la zona apical del tubo polínico, para asegurar que esta última ceda primero, permitiendo así expandirse desde el ápice. Esta diferencia en las propiedades físicas de las partes del tubo polínico, se basan en la diferente composición de la pared celular, presentando una alta abundancia de calosa y celulosa en la base del tubo reforzando así su estructura, a diferencia de la presencia mayoritaria de pectina en el ápice del tubo (Chebli y Geitmann., 2007). El establecimiento y mantenimiento de este crecimiento involucra múltiples caminos de señalización, dentro de los cuales participan el  $\text{Ca}^{2+}$ , proteínas quinasas, AMPc (Adenosín Monofosfato cíclico), GTPasas pequeñas del tipo Ras, fosfoinosítidos, proteínas blanco de fusión de vesículas y otras involucradas en el rearreglo específico del citoesqueleto.

### **Componentes del tubo polínico en crecimiento**

El tubo polínico posee una polarización celular interna que se va a mantener hasta que se descarguen las gametas (Figura 3; Cheung *et al.*, 2007). En el ápice del tubo polínico se encuentra la zona clara (Figura 3), definida de este modo por su poca refractividad al microscopio óptico, debido a la ausencia de amiloplastos, de las vacuolas de gran tamaño y de los núcleos y organelas. Esta zona está caracterizada por la presencia de numerosas vesículas secretorias que se disponen en forma de embudo invertido y que contienen precursores de la pared celular generados en el aparato de Golgi (Campanoni *et al.*, 2007); estas vesículas se incorporan a la pared, con la consecuente elongación del tubo polínico. De este modo, la zona apical del tubo es esencial para la modulación del crecimiento del tubo polínico dado que controla la tasa de fusión de las vesículas y la organización local del citoesqueleto de actina (Zonia y Munnik., 2009). Por detrás se encuentra la zona subapical altamente poblada de organelas metabólicamente activas como las mitocondrias, el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi. Estas organelas nunca penetran la zona clara, aún cuando no existe ninguna estructura celular evidente que lo impida (Cheung y Wu., 2007; Lovy-Wheeler *et al.*, 2007). Por detrás de la zona subapical, está la zona nuclear, donde se encuentra el

núcleo de la zona vegetativa y las dos células espermáticas, junto con las organelas de mayor tamaño (mitocondrias y retículos endoplásmicos rugosos). 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. Esta restringe el citoplasma a la parte apical del tubo (Figura 3). 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 subapical y nuclear (Figura 4) 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 (Cardenas *et al.*, 2005). El citoesqueleto de actina forma cables longitudinales corticales, más o menos paralelos entre sí que se extienden hasta la zona subapical y las proteínas asociadas al citoesqueleto son las responsables de dicho movimiento citoplasmático. En la zona subapical, la actina se encuentra formando filamentos cortos, finos y densos, por lo que el movimiento de las vesículas sería sólo *browniano*. Esta estructura anular subapical altamente sensible a perturbaciones extra e intracelulares, llamada “franja de actina” (*apical actin fringe*), marcaría el lugar donde las corrientes citoplasmáticas revierten su sentido (Hwang *et al.*, 2005). Allí la actina se pone en contacto con la membrana plasmática, fusionándose, aportando material de pared y membrana celular. El exceso de membrana plasmática se recupera por invaginación de vesículas (Chen *et al.*, 2007).

Hay evidencias que la extensión de la pared del tubo polínico es principalmente dependiente de los cambios de la presión de turgencia en la región apical. También están involucrados, la incorporación de agua y la resistencia mecánica de la pared del tubo. A partir de la presión aplicada, la pared celular preexistente va cediendo en forma controlada, lo que permite una expansión de la superficie celular mientras que simultáneamente se va insertando nuevo material. La combinación de estos dos procesos resulta en un cambio en la estructura celular (Chebli y Geitmann., 2007). La región apical de tubos polínicos de tabaco se comporta con propiedades elásticas, rápidamente aumentando o disminuyendo su volumen celular en respuesta a condiciones extracelulares (Zonia *et al.*, 2006). La expansión del tubo polínico a través del ápice minimiza el área superficial en la cual ocurre fricción con el tejido circundante (Chebli y Geitmann., 2007).



**Fig. 3: Polarización celular del tubo polínico.**

Diagrama generalizado de la representación de un tubo polínico polarizado.

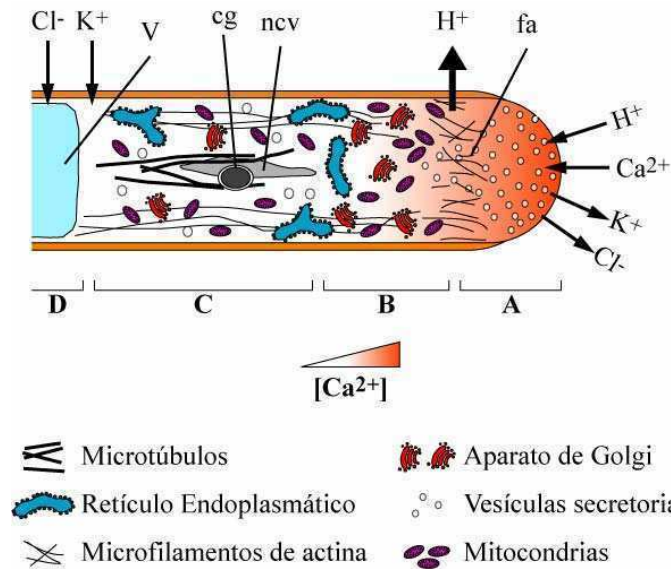
Extraído de Franklin-Tong., 1999.

### Crecimiento apical

El crecimiento apical es esencial para el desarrollo y la morfogénesis de muchas células eucarióticas, como axones neuronales de animales, hifas fúngicas, pelos radiculares en plantas y tubos polínicos (Cole y Fowler., 2006; Govek *et al.*, 2005; Wendland., 2001). La tasa de crecimiento del tubo polínico no es lineal, sino oscilatoria desde ciclos rápidos a lentos. La tasa de crecimiento comienza a oscilar cuando el tubo alcanza ciertos niveles de organización y se hace evidente alrededor de 2-3 horas posteriores al inicio de la germinación. Esto corresponde a largos de alrededor de 150-300  $\mu\text{m}$  en *Nicotiana tabacum* y *Lilium longiflorum*.

El tubo polínico es un sistema dinámico compuesto por redes bioquímicas y biofísicas interconectadas, que pueden ser moduladas para obtener un óptimo crecimiento y función. Estas redes están integradas por muchos caminos de señalización y numerosos factores que actúan concertadamente permitiendo el mecanismo de crecimiento apical: el citoesqueleto de actina y sus proteínas asociadas, la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, el pH intracelular y otros iones ( $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ), fosfoinosítidos y lípidos y las proteínas pequeñas que unen GTP, entre otros (Chebli y Geitmann., 2007). Todos estos componentes no actúan en forma aislada, sino que tienen sus efectos sobre los demás, formando una red compleja finamente regulada. Por este motivo, la perturbación de cualquiera de los componentes de la red resulta en fenotipos aberrantes similares, como ser el arresto del crecimiento y/o la formación de un ápice globoso (Ren and Xiang., 2007; Krichevsky *et al.*, 2007).





**Fig. 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.

### Concentración intracelular de Ca<sup>2+</sup>, pH intracelular y iones K<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup>

Los tubos polínicos en crecimiento mantienen un gradiente decreciente de concentración de Ca<sup>2+</sup> desde el ápice hacia la base del tubo (Campanoni y Blatt., 2007). En *Lilium longiflorum*, la concentración de Ca<sup>2+</sup> en el ápice alcanza valores de 10 μM, disminuyendo a 0,2 μM en la zona subapical. Los tubos polínicos también mantienen el extremo apical ligeramente ácido. Por detrás de la misma zona donde se localiza la “franja de actina”, se detecta una región llamada “banda alcalina”, donde el pH citoplasmático puede ser de 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 (Cheung y Wu., 2007).

La entrada de Ca<sup>2+</sup> se produce principalmente a través de canales ubicados en la membrana plasmática necesarios para la generación del gradiente (Frietsch *et al.*, 2007; Qu *et al.*, 2007). Por otro lado, también se ha detectado la salida subapical de Ca<sup>2+</sup> desde el tubo a través de bombas de Ca<sup>2+</sup> localizadas en la membrana plasmática. Los mutantes de pérdida de función de *Arabidopsis* en un gen que codifica para una Ca<sup>2+</sup>-ATPasa que se localiza en la membrana plasmática, mostraron esterilidad masculina (Schiott *et al.*, 2004). Mientras que la principal fuente de Ca<sup>2+</sup> es extracelular, se ha

demostrado también que la liberación regulada desde depósitos internos podría contribuir en la dinámica de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (Cheung y Wu., 2007). El  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático es un activador importante de proteínas quinasas que contienen dominios similares a calmodulina (CDPKs, *Calcium Dependent Protein Kinases*). En tubos polínicos de *Petunia*, se caracterizaron dos proteínas CDPKs que tienen diferente localización y función: CDPK1, se localiza en la membrana plasmática del tubo y es importante para el mantenimiento de su polaridad, mientras que CDPK2, se localiza en membranas de compartimentos citoplasmáticos y está involucrada en el crecimiento del tubo, pero no así en su polaridad (Yoon *et al.*, 2006). Los autores sugieren que CDPK1 estaría involucrada en el mantenimiento de la homeostasis de  $\text{Ca}^{2+}$  ya que su sobreexpresión causa un aumento en el  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático durante el crecimiento del tubo. En *Arabidopsis thaliana* se encontraron 34 proteínas CDPKs; 10 se expresan en polen, pero sólo se conoce la función de dos de ellas, denominadas CPK17 y CPK34 que se expresan en la membrana plasmática del ápice del tubo polínico y que son esenciales para la reproducción. Tubos polínicos de mutantes nula para CPK17 y CPK34 resultaron de lento crecimiento y deficientes en su habilidad de encontrar óvulos (Myers *et al.*, 2009).

Alguna de las funciones de  $\text{Ca}^{2+}$  durante el crecimiento del tubo polínico, estarían relacionadas principalmente con la regulación del citoesqueleto y la endocitosis y exocitosis (Monteiro *et al.*, 2005; Camacho y Malhó., 2003). El aumento de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular está asociado a la fusión de vesículas a la membrana plasmática (Camacho y Malhó., 2003), proceso en el cual estarían involucrados calmodulina (CaM) y AMPc. Se ha descrito que la disminución localizada de los niveles de cualquiera de estos dos segundos mensajeros por separado resulta en una inhibición de la actividad secretoria, seguida de una reorientación del crecimiento del tubo polínico. Para disminuir los niveles de CAM se inyectaron tubos polínicos con una solución de un péptido de 20 aminoácidos, el cual bajo el tratamiento con luz UV, se une a CAM, inactivando su función (Rato *et al.*, 2004). Para el caso del AMPc, se expusieron los tubos polínicos a moduladores de la actividad de la adenilato ciclasa (forskolina, activador de la adenilato ciclasa, y 2',5'-dideoxiadenosina, inhibidor de la misma) (Rato *et al.*, 2004).

Con respecto al pH intracelular, se ha detectado una corriente que ingresa protones en el ápice del tubo y otra que los libera, localizada en el límite entre la zona

clara y la subapical (Figura 4). Esto mantiene el gradiente intracelular de pH y la generación de la banda alcalina cercana a la zona de presencia de numerosas vesículas secretorias en forma de embudo invertido (Campanoni y Blatt., 2007; Feijo *et al.*, 1999).

Las funciones de  $K^+$  y  $Cl^-$  en el crecimiento apical son menos conocidas que las de  $Ca^{2+}$  y protones (Campanoni *et al.*, 2007; Holdaway-Clarke *et al.*, 2003). El  $K^+$  es necesario para el crecimiento de los tubos polínicos, dado que mutantes de *Arabidopsis* en un canal de  $K^+$  tipo *inward-rectifying* (SPIK), perteneciente a la familia de los canales  $K_v$ , inhibe el crecimiento, resultando en una disminución de la competitividad reproductiva (Mouline *et al.*, 2002). Por otro lado, el  $Cl^-$  está completamente ausente en el ápice del tubo polínico, pero ingresa subapicalmente. La inhibición de la entrada de  $Cl^-$  (mediante la inhibición de sus canales utilizando inositol-3,4,5,6-tetrakisfosfato), resulta en un bloqueo del crecimiento y en el aumento del ancho del tubo polínico (Zonia *et al.*, 2002).

### **Fosfoinosítidos y lípidos**

El fosfatidilinositol (4,5)-bifosfato (PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>, PIP<sub>2</sub>) y sus derivados, participan en general, en numerosos procesos celulares, incluyendo la dinámica de actina, tráfico de vesículas y transporte de iones como la homeostasis de  $Ca^{2+}$  y otros, todos importantes en el proceso de crecimiento apical (Malhó *et al.*, 2006; Krichevsky *et al.*, 2007). Dependiendo de la fosfolipasa que procese el PIP<sub>2</sub>, los productos que se obtienen son inositol 1,4,5-trifosfato (IP<sub>3</sub>) y diacilglicerol (DAG) cuando la fosfolipasa es del tipo C (PLC) o ácido fosfatídico (PA) por acción de la fosfolipasa D (PLD). Se ha descrito en plantas que PA es importante en los caminos de señalización en respuesta a estrés (Wang., 2005; Zonia y Munnik., 2004). Alternativamente, el DAG producido por la PLC puede ser convertido por acción de la DAG quinasa en PA (Krichevsky *et al.*, 2007). PIP<sub>2</sub> no sólo funciona como sustrato de la PLC, sino que también es un importante lípido señalizador por sí mismo. Recluta, organiza y activa el citoesqueleto y complejos proteicos en la membrana plasmática (Van Leeuwen *et al.*, 2004) y tiene un papel importante en el tráfico de membrana (Itoh y Takenawa., 2004; Roth., 2004). PIP<sub>2</sub> también estimula la actividad de PLD, afectando caminos alternativos de señalización

en mamíferos (McDermott *et al.*, 2004; Cockcroft., 2001) y otros involucrados en el desarrollo de *Arabidopsis* y en su respuesta a estrés (Wang *et al.*, 2000).

En polen, se ha demostrado que la función principal del IP<sub>3</sub> sería la liberación de Ca<sup>2+</sup> desde reservorios internos como el retículo endoplásmico. Tanto el IP<sub>3</sub> como el PIP<sub>2</sub> participan en el mantenimiento del gradiente de concentración de Ca<sup>2+</sup> interno y la secreción de vesículas en el extremo apical del tubo. Se ha descrito también que el PIP<sub>2</sub> se acumula en el ápice del tubo polínico, probablemente como consecuencia de la actividad de PIP5K4 quinasa (*Fosfatidilinositol-4-monofosfate-5 Kinase*) (Sousa *et al.*, 2008); esta enzima regula el crecimiento del tubo polínico y su polaridad, modulando el tráfico de vesículas y el rearrreglo del citoesqueleto. La disrupción de la actividad de PIP5K4 en *Arabidopsis* inhibe la germinación y el crecimiento del tubo con perturbaciones en la polaridad y deposición de material de la pared celular, así como en su endocitosis, fusión de vesículas y reciclado.

Se ha descrito en tubos polínicos de *Agapanthus umbellatus* que la concentración interna de Ca<sup>2+</sup> y la tasa de crecimiento dependen de la modulación de las concentraciones de IP<sub>3</sub> o PIP<sub>2</sub> (Monteiro *et al.*, 2005a). El aumento de PIP<sub>2</sub> inhibe la secreción de vesículas y reduce, pero no arresta, el crecimiento. Sin embargo, el aumento de IP<sub>3</sub>, aún cuando produce un pico de liberación de Ca<sup>2+</sup> similar al producido por PIP<sub>2</sub>, estimula la secreción de vesículas y arresta el crecimiento (Monteiro *et al.*, 2005a). Estos resultados podrían ser producto de diferentes respuestas celulares para IP<sub>3</sub> o PIP<sub>2</sub>, o bien, que el catabolismo de PIP<sub>2</sub> además de producir IP<sub>3</sub> genera PA, sumando efectos adicionales. Una de las propiedades del PA es la formación de vesículas secretoras, involucrándose en la dinámica del tráfico de membrana en el ápice del tubo polínico. La reducción de PA por acción de antagonistas de acción directa o inhibidores de la PLD, arrestan el crecimiento polarizado. La disminución de la concentración de PA resulta en la disipación del gradiente de Ca<sup>2+</sup> e inhibe el reciclado de la membrana apical (Monteiro *et al.*, 2005a).

En *Petunia inflata*, se ha descrito una PLC que se localiza específicamente en la membrana plasmática del ápice del tubo polínico. La expresión en tubos polínicos de mutantes dominantes negativas de PLC inhibe el gradiente apical de Ca<sup>2+</sup> provocando la disrupción del citoesqueleto de actina, el arresto en el crecimiento y la formación de un ápice globoso (Dowd *et al.*, 2006). En *Lillium davidii*, se reportaron evidencias que la actividad de una PLC necesaria para el mantenimiento del gradiente de Ca<sup>2+</sup>, estaría

regulada por una proteína G heterotrimérica, además de ser estimulada por la presencia de CaM extracelular (Pan *et al.*, 2005).

Se ha descrito que IP<sub>3</sub> también regula la concentración intracelular del AMPc. En polen de *Agapanthus umbellatus*, se ha demostrado que el AMPc participa en la orientación del tubo polínico (Moutinho *et al.*, 2001). La aplicación extracelular de compuestos que elevan los niveles de AMPc como forskolina o dibutilil AMPc en la proximidad del extremo apical del tubo germinado *in vitro*, dirigen el crecimiento del tubo hacia el agonista.

### **Proteínas pequeñas que unen GTP**

En mamíferos y levaduras las proteínas pequeñas que unen GTP, o proteínas G pequeñas, o superfamilia de proteínas Ras o GTPasas, poseen un bajo peso molecular y están involucradas en la señalización. Dichas proteínas incluyen a 5 familias: Ras, Rab, Arf, Ran y Rho (Boureaux *et al.*, 2007). 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 (junto con otras proteínas GAPs descritas posteriormente) las convierte en su forma inactiva unida a GDP.

En plantas se han reportado cuatro familias de GTPasas: Rab GTPasas, Arf GTPasas, Ran GTPasas y Rho GTPasas (Vernoud *et al.*, 2003). En numerosos organismos eucariotas, las RhoGTPasas regulan la organización del citoesqueleto de actina y el desarrollo de la polaridad, la endocitosis, exocitosis y citocinesis, (Ridley., 2006); se ha descrito que también controlan la expresión génica, la síntesis de pared, la producción de peróxido de hidrógeno y la progresión del ciclo celular y diferenciación celular (Takai *et al.*, 2001). Muchas RhoGTPasas están modificadas en un residuo de cisteína con un lípido isoprenilo. En este caso, la isoprenilación es responsable de la asociación de RhoGTPasas a membrana, lo cual sería esencial para su actividad (Klahre *et al.*, 2006 a). Existe un equilibrio entre RhoGTPasas unidas a membrana y libres en citoplasma; estas últimas son mantenidas por otro grupo de proteínas regulatorias (RhoGDIs, ver más adelante dentro de esta sección) (Klahre *et al.*, 2006 a y b).

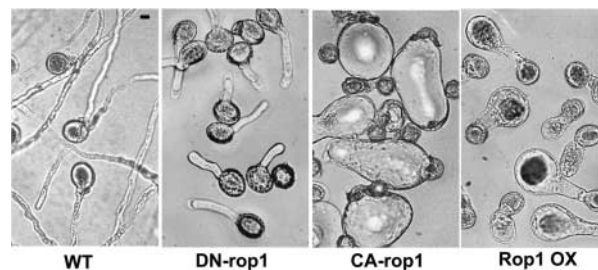
En tubos polínicos las GTPasas están implicadas en al menos dos procesos vitales: la regulación del tráfico de vesículas y la dinámica de los microfilamentos de actina (Krichevsky *et al.*, 2006).

En plantas existe una única subfamilia de Rho, denominada RopGTPasas (*Rho-related GTPase from Plants*). Dada su alta homología con la subfamilia Rac dentro de las RhoGTPasas, las Rho de plantas muchas veces son llamadas Racs en la literatura. Las proteínas Rops son específicas de plantas y aparentemente no poseen Cdc42 (*Cell division cycle 42*)/Rho/Rac (Zheng *et al.*, 2000; Vernoud *et al.*, 2003).

Se ha encontrado que las RopGTPasas tienen una importante función en la elongación del tubo polínico en arveja (Lin *et al.*, 1996), tabaco (Chen *et al.*, 2002) y Arabidopsis (Li *et al.*, 1999), entre otros. La sobreexpresión de AtRop1 (proteína ROP1 de Arabidopsis) en polen induce crecimiento despolarizado y la severidad de esta despolarización está correlacionada con su nivel de expresión y su acumulación en el ápice del tubo polínico (Li *et al.*, 1999; Yang., 2002) (Figura 5). Tal como se ve en la figura 5, la sobreexpresión de una mutante de AtRop1 que se encuentra constitutivamente activada unida a GTP (CA-AtRop1), provoca una completa pérdida del crecimiento polarizado del tubo polínico, registrándose un crecimiento isodiamétrico de su ápice dando un aspecto globoso. Además, la estabilización de la actividad de ROP1 por su sobreexpresión o sobreactivación, resulta en un arresto del crecimiento del ápice (Li *et al.*, 2008). Un fenotipo similar de crecimiento isodiamétrico del ápice del tubo polínico, se obtiene también al sobreexpresar NtRop4 de tabaco (Klahre *et al.*, 2006 a), AtRop4 y AtRop9 (Cheung *et al.*, 2003), en polen de tabaco. Sin embargo cuando se sobreexpresó NtRop4 junto con NtRhoGDI2 (una proteína reguladora negativa de ROP: ver descripción de las RopGDIs continuando con esta sección), se observó un crecimiento normal del tubo polínico, sugiriendo que ambas proteínas formarían un complejo inactivo en el citoplasma. Por otro lado, la expresión de una mutante dominante negativa de AtRop1 en la cual la proteína siempre se encuentra unida a GDP (DN-AtRop1) resulta en un arresto del crecimiento sin generación de ningún fenotipo distintivo (Li *et al.*, 1999; Yang., 2002) (Figura 5). Estos experimentos demuestran la posición central de las proteínas ROPs en la regulación del crecimiento del tubo polínico. La proteína AtRop1 también controla la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), la formación del gradiente de  $\text{Ca}^{2+}$  en el ápice y la exocitosis de vesículas a la membrana del tubo (Li *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2008).

Durante el crecimiento del tubo polínico, AtRop1 se localiza preferencialmente en la membrana plasmática de la zona apical del tubo. Esta distribución de AtRop1 es importante para el mantenimiento de la polaridad y rápido crecimiento del tubo.

En *Arabidopsis* existen 11 proteínas ROPs y varias de ellas se expresan en polen: AtRop1, AtRop3, AtRop5 (las dos últimas también se expresan en tejido vegetativo) y AtRop8-AtRop11 (Vernoud *et al.*, 2003; Gu *et al.*, 2003, Gu *et al.*, 2004). En el ápice, AtRop5 activa la fosfatidilinositol monofosfato quinasa (PtdInk P-K), llevando a la formación de PIP<sub>2</sub> que, como ya lo hemos dicho anteriormente participa en la liberación de Ca<sup>2+</sup> de reservorios intracelulares. La sobreexpresión de CA-AtRop5 y de DN-AtRop5 en tubos polínicos resultó en la formación de microfilamentos de actina largos o cortos, respectivamente, indicando que AtRop5 está involucrada en la dinámica del citoesqueleto de actina (Kost *et al.*, 1999).



**Fig. 5: AtRop1 regula el desarrollo de polaridad y crecimiento del tubo polínico.** Fenotipos de polen WT (*Wild Type*), e inducidos por DN-Rop1 (versión dominante negativa de ROP1), CA-Rop1 (versión constitutivamente activada de ROP1) y Rop1 OX (sobreexpresante de ROP1) en polen de plantas transgénicas de *Arabidopsis*. Extraído de Yang., 2002; Li *et al.*, 1999.

Debido a que las velocidades de reacción de intercambio GDP-GTP y de hidrólisis del GTP de las proteínas ROP suelen ser lentas, su actividad y las interacciones con sus efectores pueden ser moduladas por proteínas reguladoras de ROPs tales como:

- 1) RopGAPs (*ROP GTPase Activating Proteins*) que activan la actividad GTPásica intrínseca de ROP, inactivando esta proteína.
- 2) RopGEFs (*Guanine nucleotide Exchange Factors*) que se localizan en la membrana plasmática. Las RopGEFs estimulan la disociación del complejo ternario GEF-ROP-GDP a un complejo binario de alta afinidad: GEF-ROP, rápidamente disociado por GTP; en proteínas de plantas, dicha actividad reside en un dominio denominado PRONE (*Plant specific ROP-Nucleotide Exchanger*)/DUF315, el cual

también es esencial para la localización de RopGEFs en la membrana plasmática y para su unión a ROP (Gu *et al.*, 2006). En polen, se localizan en membrana plasmática apical y regulan el crecimiento polarizado del tubo (Zhang *et al.*, 2007).

- 3) RopGDIs (ROP *Guanine nucleotide Dissociation Inhibitors*) que translocan las ROPs inactivas desde la membrana plasmática hacia el citoplasma u otras zonas de la membrana plasmática. De esta manera inhiben el intercambio de RopGDP por GTP, acción llevada a cabo por las RopGEFs unidas a membrana plasmática. Las RopGDIs actúan de este modo como un regulador negativo de las ROPs. En polen, son importantes para mantener el crecimiento polarizado del ápice del tubo polínico.

La actividad de ROP ocurre por la activación de sus efectores llamados RICs (por *Rop interactors with CRIB motif*). Los dominios CRIB (por *Cdc42/Rac-Interactive Binding*) se unen específicamente a GTPasas activadas y se hallan en proteínas efectoras de Cdc42/Rac en levaduras y animales (Takai *et al.*, 2001). En plantas, las RhoGAPs y las proteínas RICs contienen dominios CRIB (Klahre *et al.*, 2006 b). En el caso de las RhoGAPs, el dominio CRIB, es necesario para otorgarle especificidad a las RhoGAP, tanto en su actividad como para su localización. A través de este dominio, las RhoGAP se unen a las proteínas pequeñas unidas a GTP, regulando positivamente su actividad (Wu *et al.*, 2000).

En polen, se ha demostrado que dos integrantes de la familia RICs, RIC3 y RIC4, interactúan con AtROP1 en caminos que se contrarrestan mutuamente. RIC3 promueve el aumento del  $Ca^{2+}$  intracelular, induciendo la despolimerización de los microfilamentos de actina, mientras que RIC4 promueve la polimerización de F-actina (Gu *et al.*, 2005; ver sección “Endocitosis y exocitosis de vesículas”).

Por otro lado, en polen se han identificado las proteínas RIPs (ROP *Interactive Partners*) o ICR1 (*Interactor of Constitutive active ROPs 1*). Pertenecen a una familia de cinco miembros que comparten el extremo carboxilo-terminal que interactúa con ROP, que se encuentran en la región apical del tubo polínico. La localización de AtRIP1 en el ápice del tubo requiere de la activación de AtROP1 y a su vez AtRIP1 promueve o estabiliza ROP1 en la membrana plasmática. Se propone que AtRIP1/ICR1 actúa como un componente clave en una retroalimentación positiva de la activación y localización de ROP1 en la membrana plasmática; de esta manera se facilita el establecimiento de un sitio polar para la germinación del polen y crecimiento del ápice



del tubo polínico. En polen maduro, la proteína de fusión GFP-AtRIP1 se encuentra en el núcleo; una vez que se incuba el polen en medio de germinación, GFP-RIP1 sale del núcleo, puede interactuar con ROP1 en el citosol, formando un complejo que se dirige a la membrana plasmática.

A partir de un *screening* de mutantes de inserción de polen que inducen sobreexpresión de ROP1, se ha encontrado la proteína AtREN1 (ROP1 *Enhancer* 1), una RhoGAP que se expresa en polen maduro y germinado. Los granos de polen de plantas mutantes nula *ren1* son estériles y desarrollan tubos con engrosamiento del ápice, similar a aquellos causados por la expresión constitutiva de ROP1 activado (CA-Rop1) (Hwang *et al.*, 2008). La proteína AtREN1 se localiza en el ápice del tubo polínico y en vesículas exocíticas localizadas en la misma zona. AtREN1 actúa en polen, como un inhibidor global, limitando a ROP1 en la señalización. ROP1 activada promueve la acumulación de AtREN1 asociada a las vesículas exocíticas en el ápice del tubo. Una vez que las vesículas exocíticas se fusionan a la membrana plasmática, REN1 queda confinada a la membrana plasmática e inactiva el ROP1 activado previniendo la posterior activación del exceso de ROP1 y la despolarización del crecimiento del ápice del tubo. Luego de la inactivación de ROP1, REN1 vuelve al citoplasma, permitiendo que un nuevo ciclo de activación de ROP1 (Hwang *et al.*, 2008).

### **Citoesqueleto de actina y sus proteínas asociadas**

La actina es una proteína conservada del citoesqueleto, que en forma pura existe como monómero en soluciones de baja fuerza iónica y espontáneamente se ensambla, a través de un proceso dinámico, en filamentos ante la presencia de sal y ATP. Bajo microscopio electrónico, la actina se dispone como filamentos de 8 nm de ancho que consisten en una hélice ajustada de moléculas de actina (actina globular o G-actina) uniformemente distribuidas. Un filamento de actina es una estructura polar, con dos terminaciones estructuralmente diferentes: un extremo de crecimiento lento o extremo “-” (*minus end*) y un extremo de crecimiento rápido o extremo “+” (*plus end*).

Redes de actina se han reportado en la zona apical de células con crecimiento polarizado, tales como las hifas de oomicetes (Heath *et al.*, 2000), protonemata (Braun y Wasteneys., 1998) y en pelos radiculares (Baluska *et al.*, 2000). Así, los filamentos de

actina, ya sea en forma de un conjunto de haces cortos o como redes más o menos densas, parecen ser un componente esencial del ápice de aquellas células con crecimiento polarizado.

En el caso del polen, se ha descrito que los filamentos de actina existen como estructuras especuladas que forman almacenamientos de actina en el estado deshidratado del grano de polen. Luego de su hidratación, estas estructuras gradualmente se dispersan en una red de haces finos de filamentos y luego esa fina red de F-actina es organizada en haces circulares de filamentos de actina paralelos orientados hacia la apertura del polen (Xu *et al.*, 2004). Una vez germinado, estos haces funcionan como caminos para el rápido movimiento citoplasmático de partículas dirigidas por miosina, lo cual asegura el envío de vesículas de exocitosis desde el aparato de Golgi hacia la zona de crecimiento del tubo polínico (Parton *et al.*, 2001). Por otro lado, las dos células espermáticas en el tubo polínico requieren del citoesqueleto de actina para migrar y de este modo ser transportadas hacia el ápice de los tubos polínicos. Los cables de actina que se mueven hacia adelante y hacia atrás del tubo polínico, son abundantes en el tubo, pero no invaden la zona clara. La zona subapical es marcada por una red de actina con forma de embudo con cables más cortos y finos de actina (Cheung *et al.*, 2004). Tanto perturbaciones farmacológicas como genéticas del ensamblado de actina resultan en una inhibición del crecimiento polarizado en tubos polínicos (Samaj *et al.*, 2004).

Se observaron dos fenotipos anormales asociados a la presencia de filamentos de actina en el ápice del tubo: en primer lugar, la extensión de los cables del tubo dentro del ápice en tubos tratados con 5 nM de Latrunculina B (una droga que promueve la despolimerización de filamentos de actina secuestrando sus monómeros (Gibbon *et al.*, 1999), resultan en un arresto del crecimiento (Cheung y Wu., 2004; Fu *et al.*, 2001 a); en segundo lugar, en el sobreexpresante de AtRop1 en el tubo polínico de tabaco, 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 (Fu *et al.*, 2001 b). Existen otras drogas, como el jasplakinolide que sobreestabiliza el citoesqueleto de actina (Bloch *et al.*, 2005), agregándolo, aumentando el grosor de los haces de filamentos de actina. Facilita la polimerización de actina ya que disminuye la concentración de G-actina y aumenta su nucleación. Por otro lado, esta droga restringe la corriente citoplasmática en forma de “fuente invertida”, antes

descrita a lo largo del tubo polínico, hacia su ápice, aumenta su grosor, disminuye la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en esta zona y causa una redistribución de la banda alcalina en la misma (Cárdenas *et al.*, 2005).

Existen varias proteínas que unen actina, afectando diferentes aspectos de la polimerización de actina y su organización (Ren y Xiang., 2007; Bushart y Roux., 2006). Las forminas y el complejo Arp2/3 son dos familias de proteínas conocidas por tener actividad de nucleación de actina (paso limitante en la polimerización de actina). En plantas se han encontrado dos clases de forminas, grupos I y II (Cheung y Wu., 2004). El grupo I está compuesto por proteínas de la superficie celular que funcionarían como conectores moleculares entre el ambiente extracelular y el citoesqueleto de actina. AFH1 es una de las 20 forminas del grupo I en *Arabidopsis*. Se ha visto que tubos polínicos que sobreexpresan AFHI inducen la formación de cables de actina en la membrana subapical del tubo, un crecimiento despolarizado con el concomitante arresto del mismo y un ápice engrosado (Cheung y Wu., 2004). Las proteínas gelsolinas y *capping* intervienen en la nucleación de la actina estabilizando los oligómeros de actina. Otras proteínas como la cofilina/factor despolimerizante de actina (ADF, *Actin Depolymerizing Factor*), promueve la liberación de monómeros de actina, uniéndose a los extremos “-” de los filamentos. Se ha descrito que los tubos polínicos que sobreexpresan ADF muestran una disrupción de la organización del citoesqueleto normal de actina y una inhibición del crecimiento. Se ha visto que la fosforilación de la serina 6 del extremo amino-terminal de la ADF en plantas promueve la despolimerización de la actina, aumentando su unión a actina contrarrestando, el efecto de sobreexpresión de NtRop3 en tabaco. Por su lado, NtRop3 media la fosforilación de ADF en dicha serina 6, modulando su actividad de unión a actina y despolimerizante, afectando la reorganización de actina durante el crecimiento polar del tubo (Chen *et al.*, 2003). La unión de ADF a actina aumenta cuando ADF es fosforilada en residuos de tirosina (Guillén *et al.*, 1999). Se ha visto que la fosforilación reversible en tirosina de proteínas que participan durante la germinación del polen está involucrada en la reorganización del citoesqueleto de actina y en el crecimiento del tubo polínico. Esto se demostró a partir de la utilización en la germinación y crecimiento del polen, de dos inhibidores específicos de fosfatasas y quinasas de tirosina como el óxido fenilarsínico (PAO) y genisteína respectivamente. Ambos causan una reducción en la germinación y crecimiento del polen y alteran la morfología de los tubos. En el caso de la utilización

de genisteína, se observa un crecimiento del tubo con curvas de 90°, mientras que el PAO provocó engrosamiento del ápice (Huijun *et al.*, 2007) similar a aquellos observados por sobreexpresión en polen de tabaco de AtRop1 (Fu *et al.*, 2001 a) o NtRop3 (Chen *et al.*, 2003). Este fenómeno sugiere que existe una fuerte relación entre el crecimiento polarizado del tubo polínico y la fosforilación en tirosina.

Las actividades de proteínas que se unen a la actina asegurarían la distribución específica de los microfilamentos en respuesta a cambios iónicos citoplasmáticos y en respuesta a proteínas transductoras de señales y segundos mensajeros tales como el AMPc, GMPc (Guinidina Monofosfato Cíclica), NO (óxido nítrico) y los fosfoinosítidos.

Una herramienta importante en el estudio de la dinámica de los filamentos de actina es el uso de drogas que lo estabilizan o desestabilizan. La citocalasina D, es un producto fúngico que previene la polimerización de actina debido a que se une al extremo positivo de los filamentos de actina. La faloidina es una toxina aislada de un hongo que se une fuertemente alrededor de los lados de los filamentos, estabilizándolos ante la despolimerización. Por otro lado, la cafeína desensambla la F-actina, produciendo la inhibición del crecimiento del tubo polínico tanto como la Latrunculina B (Fu *et al.*, 2001a). Por otro lado, Latrunculina B causa la reversión de patrones de actina causados por la sobreexpresión de AtRop1 en tubos polínicos de tabaco (Fu *et al.*, 2001a).

### **Endocitosis y exocitosis de vesículas**

El proceso de crecimiento polarizado requiere de una coordinación espacio-temporal de exocitosis de vesículas, del amarre y de su fusión a la membrana apical; es decir, de un sistema secretor activo que provea la gran cantidad de material requerido para la elongación del tubo polínico. El flujo de organelas y vesículas que se mueve a lo largo del borde del tubo, alcanza la región subapical, revierte su dirección y vuelve hacia el grano a través del centro del tubo, dando lugar a un patrón de corriente citoplasmática inverso, en forma de “fuente invertida”, tal como fue descrito anteriormente. Dada la cantidad de material necesaria, la exocitosis es el mayor contribuyente al crecimiento polarizado, abasteciendo de membrana plasmática,

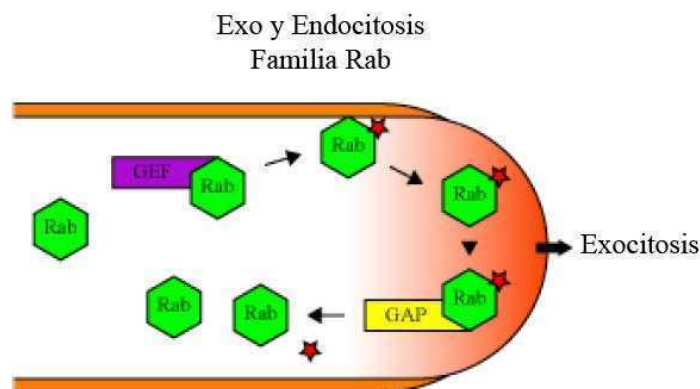
materiales de pared, enzimas y receptores que perciban las señales del tejido femenino (Hepler *et al.*, 2001). En plantas, la Brefeldina A (BFA) debido a que es un inhibidor de la secreción vesicular, promueve la formación de grandes grupos de vesículas fusionadas. BFA interfiere con las proteínas de factor de intercambio ArfGEFs (*Guanine Exchange Factor for ARF GTPases*) en el tráfico vesicular (Geldner *et al.*, 2003). Las ArfGTPasas cumplen un papel importante durante el tráfico vesicular. Actúan reclutando proteínas citoplasmáticas de cubierta vesicular, esenciales para el transporte, tales como COP-I, COP-II y clatrina (Vernoud *et al.*, 2003). En presencia de BFA, la exocitosis es completamente bloqueada y se induce la agregación de membranas (Parton *et al.*, 2003; Parton *et al.*, 2001). Recientemente se encontró también a la proteína ArfGAP, la cual juega un papel en el tráfico vesicular durante el desarrollo del tubo polínico (Song *et al.*, 2006).

Una manera de comprobar la endocitosis activa en el ápice, fue utilizando los compuestos fluorescentes impermeables FM4-64 (emite en longitud del rojo) y FM1-43 (emite en longitud del verde) (Lisboa *et al.*, 2007). Estos compuestos son importados en la región del ápice por medio de endocitosis tiñendo inmediatamente la membrana plasmática y la parte central de la zona clara del tubo polínico; después de 10 minutos, se tiñen las vesículas en la zona subapical (Samaj *et al.*, 2006). Se ha visto que la actina es importante también en la motilidad de los endosomas y en la endocitosis *per se* en algunas células de crecimiento polarizado, incluyendo el tubo polínico. Una disrupción farmacológica de actina disminuye la internalización endocítica de estos compuestos fluorescentes, pero no la inhibe completamente.

Se sugiere que mediante la endocitosis se recupera parte de la membrana celular proveniente de las vesículas fusionadas previamente a la membrana plasmática. Manteniendo un balance entre el tráfico de vesículas endocíticas como exocíticas hacia el ápice como desde éste hacia la zona subapical, se logra tanto el crecimiento como el reciclado de membranas, convirtiendo estos dos procesos en la fuerza motora de la expansión de la membrana celular del tubo polínico (Krichevsky *et al.*, 2006).

La exocitosis y endocitosis se lleva a cabo por el funcionamiento de una maquinaria de fusión celular que es similar en los organismos eucariotas. Por ejemplo, *Arabidopsis* codifica para proteínas homólogas de complejo SNARE (*Soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein Attachment protein Receptor*), involucrado en la fusión entre vesículas y las membranas de destino (Krichevsky *et al.*, 2006). Aunque

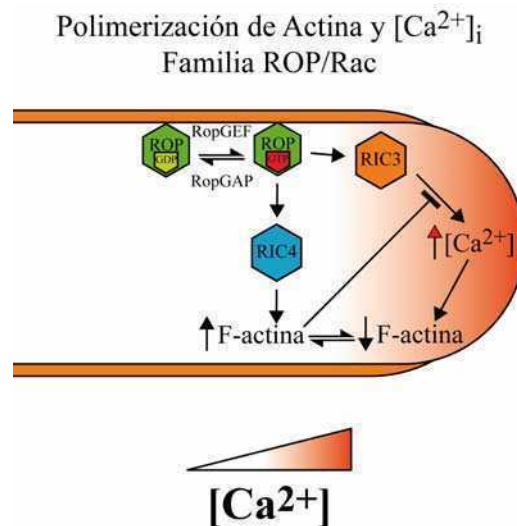
aún no se han encontrado en plantas verdaderas proteínas pequeñas que unen GTP del tipo Ras, sí se encuentran proteínas ortólogas de Rab y Ypt de mamíferos y levaduras, respectivamente, que regulan el transporte retrógrado y anterógrado entre endomembranas y la membrana plasmática. Rab es la familia más grande de proteínas pequeñas que unen GTP y controla el acoplamiento de las vesículas al citoesqueleto, el transporte y anclaje de vesículas en plantas. 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 de los tubos, dando evidencia de su posible asociación a vesículas secretorias (de Graaf *et al.*, 2005). NtRab11b estaría involucrada en la endocitosis, ya que su inhibición funcional 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 la expresión de una versión dominante negativa de NtRab11b unida a GDP en polen, bloquea su acumulación apical, mientras que una versión constitutivamente activa unida a GTP, resulta en una acumulación uniforme de la mutante en el ápice. 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 (de Graaf *et al.*, 2005).



**Fig. 6: Proteínas G pequeñas involucradas en el tráfico vesicular.**

La familia Rab está involucrada en la exocitosis 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 (identificado con una estrella roja) y se activa, acercándose a la membrana plasmática e iniciando el tráfico vesicular hasta el ápice del tubo. GAP estimula la actividad RabGTPasa, inactivándola. Rab-GDP se localiza nuevamente en el citoplasma.

Como detallamos anteriormente, la dinámica de F-actina modulada por ROP1 regula el crecimiento del ápice del tubo polínico, activando dos caminos distintos: RIC4 y RIC3. La activación de RIC4 es necesaria para la acumulación de vesículas en el ápice e inhibe la exocitosis a la membrana apical; por otro lado, RIC3, a través de un mecanismo dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ , despolimeriza la F-actina, reduciendo la acumulación de vesículas en el ápice, por lo que su función es indispensable para la exocitosis de vesículas en el sitio de crecimiento (Gu *et al.*, 2005). Ambos caminos regulan la dinámica de F-actina y consecuentemente coordinan el direccionamiento de vesículas y la exocitosis. Se propone que cuando la F-actina se ensambla, las vesículas se dirigen hacia el ápice, pero no se anclan ni se fusionan a la membrana hasta que los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  sean altos para desarmar la F-actina cortical. Se sugiere que el tiempo de exocitosis está en fase con el  $\text{Ca}^{2+}$ , el cual se halla ligeramente retrasado con respecto a la expansión del ápice (Lee *et al.*, 2008). Cuando las vesículas endocíticas son inhibidas en el ápice, pero la exocitosis y el flujo hidrodinámico continúa, el ápice adquiere morfología engrosada o de *balloon tip* (Zonia y Munnik., 2008). En la zona de crecimiento, se propone la presencia de varias poblaciones de vesículas, incluyendo las endosomales, las exocíticas, aquellas cubiertas por clatrina y algunas organelas pequeñas (Zonia., 2009).



**Fig. 7: Proteínas G pequeñas involucradas en la dinámica de actina.**

La subfamilia RopGTPasas está relacionada al citoesqueleto y la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ . Por acción de RopGEF, ROP se activa, promoviendo la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  apical mediante la acción de RIC3. Por otro lado, RIC4 promueve la polimerización de actina en las zonas de bajas concentraciones intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$ . La hidrólisis del GTP asociado a ROP estimulada por RopGAP, resultaría en una disminución de la actividad de los efectores RIC3 y RIC4.

## Transducción de señales en plantas mediadas por receptores quinasas

Las células modulan su actividad en respuesta a señales de su medio ambiente. Para transmitir la información desde el exterior al interior, las células desarrollan un complejo sistema de señalización que les permite funcionar frente a estímulos extracelulares y generar una determinada respuesta biológica. La transferencia de información hacia el interior de la célula como consecuencia de la estimulación de un receptor por un ligando, es lo que hoy se conoce como mecanismo de transducción de señales. Los receptores celulares unen con alta afinidad moléculas señalizadoras del exterior, convirtiendo este evento extracelular, en una o más señales intracelulares que alteran finalmente el comportamiento de la célula.

En plantas hay diferentes tipos de receptores de superficie que perciben distintas señales y estímulos del medio ambiente y transducen señales al citoplasma de la célula que los posee. Una de las maneras más comunes de transducir señales, es a través de mecanismos de fosforilación/desfosforilación de proteínas. Estudios genómicos demostraron que *Arabidopsis* y arroz presentan en su genoma alrededor de 610 y 1.100 genes correspondientes a receptores quinasas denominados RLKs (*Receptor Like Kinases*) (Morillo y Tax., 2006) respectivamente. Estos resultados sugieren que dichos receptores con sus respectivos ligandos juegan un papel importante en eventos de morfogénesis en plantas. Los RLKs participan en plantas en diversos procesos tales como regulación del desarrollo, percepción de hormonas, resistencia a enfermedades, morfogénesis y diferenciación, entre otros. Sin embargo, sólo algunos representantes de esta familia, como el sistema CLAVATA y el receptor de brasinosteroides (BRI1), han sido caracterizados bioquímicamente. Los receptores quinasas con dominios extracelulares ricos en leucina (LRR-RLK), constituyen un grupo de genes dentro de la gran familia de RLK. Contienen de 1 a 32 segmentos ricos en leucina en el dominio extracelular que generalmente participan en la interacción proteína-proteína (Shiu-Han *et al.*, 2001). Dentro de esta gran familia de receptores LRR-RLK, podemos encontrar los siguientes ejemplos:

\**Petunia inflata* PRK1, es un RLK con 5 LRRs (Mu *et al.*, 1994). Se expresa en *Petunia* en las anteras con polen binucleado, en polen maduro y en los tubos polínicos. Una disminución de este receptor en plantas transgénicas que poseen el transcritpo



antisentido de PRK1, resulta en la inviabilidad del polen, sugiriendo que PRK1 juega un papel importante en el desarrollo postmeiótico de la microspora (Lee *et al.*, 1996).

\*PSKR (*Phytosulfokine Kinase Receptor*) de zanahoria, es un RLK de 150 kDa, con 21 LRRs. La fitosulfoquina (PSK), un pentapéptido sulfatado, es el ligando del receptor PSKR, e induce desdiferenciación y crecimiento de callos (Matsubayashi *et al.*, 2001).

\*NARK de soja consiste en un receptor serina/treonina quinasa, con un dominio extracelular con repeticiones LRR. Está involucrado en la autorregulación de la nodulación en legumbres. Este receptor se autofosforila y fosforila a través de su dominio catalítico a KAPP1 y KAPP2 que son dos proteínas homólogas a KAPP (*Kinase Associated Protein Phosphatase*) de *Arabidopsis* (Miyahara *et al.*, 2008).

\*CLAVATA1 (CLV1) de *Arabidopsis thaliana* actúa en el meristema apical del vástago, regulando negativamente el tamaño y la diferenciación del meristema (Morillo y Tax., 2006). 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) (Morillo y Tax., 2006). CLV1, es un RLK que contiene 20 LRRs en su dominio extracelular y es regulado por su pequeño ligando polipeptídico secretado, CLV3 (Sharma *et al.*, 2003). CLV2 codifica para un receptor con motivos LRR sin dominio quinasa (Jeong *et al.*, 1999). Sólo se conocen dos componentes citoplasmáticos asociados al sistema CLAVATA: la proteína ROP y la proteína fosfatasa KAPP. KAPP se une a numerosos efectores además de CLV1 (Johnson e Ingram., 2005; Trotochaud *et al.*, 1999). Sin embargo, no existen estudios que muestren el camino por el cual KAPP actúa sobre el sistema de CLAVATA.

\*BRI1 de *Arabidopsis thaliana*, es un RLK con 25 LRRs en su dominio extracelular (Li *et al.*, 1997) que interviene en respuestas asociadas al crecimiento y desarrollo (Morillo y Tax., 2006; Haubrick y Assmann., 2006). Mutaciones en el gen BRI1 resulta en un retardo de la senescencia y reducción de la fertilidad de la planta (Tichtinsky *et al.*, 2003).

En algunos casos, la unión del ligando al receptor, provoca la formación de “complejos proteicos de señalización”. Por ejemplo:

\*CLAVATA1 de *Arabidopsis thaliana*, forma parte de un complejo proteico activo de 450 kDa, conteniendo a su ligando, CLV3, a KAPP, ROP y posiblemente a CLAVATA2 (Trotochaud *et al.*, 1999).

\*Por otro lado, Giranton *et al.*, 2000, encontraron que SRK (*S-locus Receptor Kinase*) en Brassica, está presente en un complejo de alto peso molecular (presumiblemente inactivo), antes de unir al ligando.

\*BRI1 de *Arabidopsis thaliana* se encuentra asociado a otras quinasas de membrana, BSKs (*BR-Signaling Kinases*), en ausencia del ligando. La hormona induce la homodimerización de BRI1 y la posterior dimerización con otro receptor quinasa que es BAK1 (*BRI1-Associated Kinase 1*); luego BRI1 fosforila a BSK y a su vez se fosforila en múltiples sitios de serina/treonina ya sea como resultado de autofosforilación y/o transfosforilación por BAK1. Luego el complejo se disocia y se activa una señal río abajo que regula la expresión de genes por respuesta a BR (Tang *et al.*, 2008).

Varios receptores animales también forman complejos con su respectivos ligandos, permitiendo así la activación de señales. Por ejemplo:

\*Receptor de superficie celular TNFR1 (*type 1 Tumor Necrosis Factor Receptor*): sus ligandos (TNF y linfotóxina  $\alpha$ ) inducen la trimerización del receptor (en condiciones de ausencia de ligandos, la maquinaria de transducción está frenada). La unión de moléculas (TRADD, RIP, FADD) al dominio citoplasmático de TNFR1, desencadena una cascada de señales regulada por diversos factores, los cuales determinan si ocurre proliferación o apoptosis (Sheik *et al.*, 2003).

\*Receptores TGF- $\beta$ R I y II: su ligando, TGF- $\beta$ , induce la formación de un complejo heterotetramérico (2 receptores TGF- $\beta$ R I y 2 receptores TGF- $\beta$ R II); en estas condiciones, TGF- $\beta$ R II fosforila a TGF- $\beta$ R I, activando la señal río abajo de este receptor. La interacción entre ambos receptores ocurre a través de los dominios citoplasmáticos de cada uno de ellos (Kang *et al.*, 2009).

También existen aquellos receptores animales que forman complejos en membrana celular previo a la unión del ligando. Tal es el caso de los receptores de INF- $\gamma$  (INF- $\gamma$ R1 e INF- $\gamma$ R2), que se encuentran formando complejos antes de la unión del ligando (INF- $\gamma$ ) (Krause *et al.*, 2002). El receptor de superficie celular FAS/Apo1/CD95, en ausencia de su ligando trimérico (FASL), existe en un complejo inactivo preformado. La interacción con su ligando permite la formación de un complejo mayor de señalización denominado DISC (*Death-Inducing Signaling Complex*). Dicho complejo está también formado por efectores reclutados, tales como

FADD (*Fas-Associated Death Domain protein*), caspasa 8 y 10, dando una respuesta apoptótica más fuerte que la observada a partir del receptor TNFR1. (Wajant., 2002).

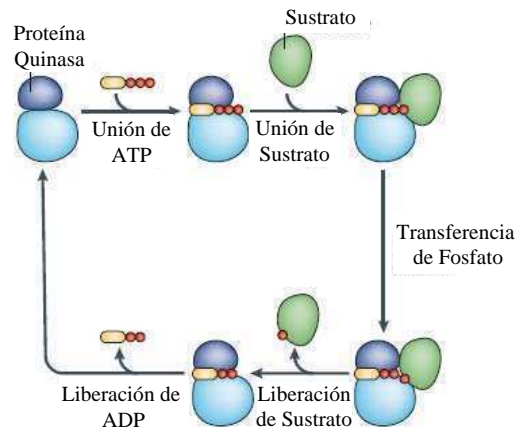
Estos receptores se caracterizan en su mayoría, por desencadenar señales a través de reacciones de fosforilación realizando, luego del camino de transducción, las respuestas biológicas.

## Fosforilación

Las modificaciones *post*-traduccionales pueden afectar de distinta forma la función de una proteína. Dentro de todas ellas, la fosforilación es la más abundante modificación proteica. Se ha estimado que en células de mamífero más de un tercio de las proteínas pueden estar modificadas por fosforilación y más de un 5% de los genes de vertebrados codifica para proteínas quinasas o para fosfatasa (Hunter., 2000). La mayoría de los procesos celulares están regulados de un modo u otro, por la fosforilación o desfosforilación de proteínas modificando su actividad, su interacción con otras proteínas, o su localización subcelular; por lo tanto la identificación de las proteínas quinasas, sus sustratos y los sitios específicos de fosforilación son la llave para la comprensión de los procesos de señalización.

La fosforilación proteica es un proceso reversible que incluye la transferencia de un grupo fosfato desde una adenosina trifosfato (ATP) a un residuo aceptor, generando así adenosina difosfato (ADP) (Blom *et al.*, 2004). Se inicia cuando el ATP se une al sitio activo de una proteína quinasa (enzima que cataliza la fosforilación), a donde luego se une el sustrato. Luego de la fosforilación, el sustrato es liberado de la misma y finalmente, el ADP es liberado del sitio activo. El orden de este proceso difiere para las distintas proteínas quinasas. Su carga o hidrofobicidad, generalmente aumenta la unión preferencial del sustrato. Los aminoácidos aledaños a sitios de fosforilación del sustrato contribuyen al reconocimiento por proteínas quinasas. En la mayoría de los casos, el sitio activo de la quinasa interacciona con 4 aminoácidos a cada lado del sitio de fosforilación del sustrato. Existen secuencias fuera de este sitio que pueden interaccionar con porciones de la proteína quinasa que están fuera del sitio activo (Uberax y Ferrel., 2007). Es decir que la especificidad de proteínas quinasas es regulada por residuos adyacentes a los residuos fosforilados. Esta gran variación hace difícil la

predicción manual de sitios biológicos de fosforilación. Es por esto que existe un gran número de algoritmos que fueron usados para implementar estrategias de predicción (Blom *et al.*, 2004). Por otro lado, las nuevas técnicas proteómicas en las que se utilizan una combinación de 2 o más métodos para enriquecimiento de fosfopéptidos, acopladas a técnicas de espectrometría de masa, permitieron la identificación de más de 1.000 sitios de fosforilación en animales y levaduras (Sugiyama *et al.*, 2008).



**Fig. 8: Mecanismo de fosforilación de un sustrato por una proteína quinasa.** Comenzando de izquierda arriba, el ATP se une al sitio activo de la quinasa. Esto es seguido por la unión del sustrato al sitio activo. Una vez unido, el  $\gamma$ -fosfato (uno de los tres círculos rojos) es transferido a un residuo del sustrato a ser fosforilado. Luego de la fosforilación, el sustrato es liberado de la quinasa. El último paso mostrado es la liberación del ADP del sitio activo. El orden de cada paso puede diferir entre distintas quinasa: por ejemplo, algunas quinasa se unen a sus sustratos antes de unirse al ATP y otras liberan el ADP antes de liberar el sustrato. Extraído de Uberrax y Ferrell., 2007.

Se conocen nueve aminoácidos que pueden fosforilarse: tirosina, treonina, serina, histidina, ácido aspártico, ácido glutámico y menos frecuentemente, lisina, arginina y cisteína (Kaufmann *et al.*, 2001). En células procariontas, la histidina, ácido aspártico y ácido glutámico son los blancos preferidos de las quinasa en proteínas. En el caso de células eucariotas, las proteínas se fosforilan principalmente en tirosina, treonina y serina, siendo la de serina más frecuente que la de tirosina. La fosforilación es un proceso sub-estequiométrico en el cual no todas las copias de una dada proteína son fosforiladas simultáneamente. Es decir, distintas especies fosforiladas de una proteína pueden coexistir en un dado tiempo. Por esta razón, la detección y cuantificación de sitios de fosforilación no muy abundantes, es técnicamente difícil (Rossignol., 2006).

En plantas los residuos fosforilados más abundantes son treonina y serina. Sin embargo, recientemente se han encontrado proteínas de plantas fosforiladas en tirosina

(Sugiyama *et al.*, 2008). La abundancia relativa de fosfotreonina, fosfoserina y fosfotirosina en *Arabidopsis thaliana* fue estimada en 85,0, 10,7 y 4,3% respectivamente, valores que inesperadamente son muy cercanos al perfil fosfoproteómico de humano (Sugiyama *et al.*, 2008). Se descubrió que la mayoría de las proteínas fosforiladas en tirosina estaban hiperfosforiladas (76,3%) (Sugiyama *et al.*, 2008). Por otro lado, no se ha observado alguna proteína quinasa de plantas que presente motivos conservados con proteínas tirosina-quinasa de humanos, sugiriendo que no comparten mecanismos de fosforilación de tirosina. Es por esto que se sugiere que la fosforilación en tirosina en plantas, debería estar llevada a cabo por una nueva clase de quinasas específica de plantas. Un candidato podría ser una familia de proteínas quinasas de tirosina, quinasa *like* (TKLs) (Rudrabhatla *et al.*, 2006), la cual podría llevar a cabo importantes funciones dada su abundancia en plantas: 776 loci en *Arabidopsis* y cerca de 1.000 en arroz, comparado con 55 en humanos (Miranda-Saavedra y Barton., 2007). Paralelamente cada vez más son las proteínas de plantas que se encuentran fosforiladas en tirosina:

Se identificaron dos sitios de autofosforilación en tirosina en el receptor BRI1: tirosina-831 que no es esencial para la actividad quinasa pero sí para la señalización de BR *in vivo* y tirosina-1052, esencial para la actividad quinasa *in vitro* e *in vivo* (Man-Ho *et al.*, 2009). Se ha visto que PRK1 de *Petunia inflata* se autofosforila en serina y tirosina *in vitro* (Mu *et al.*, 1994).

*In vivo*, el marcaje radiactivo con  $^{32}\text{P}$ - $\gamma$ -ATP, uso de anticuerpos específicos para aminoácidos fosforilados y/o el corrimiento de una banda en un gel de poliacrilamida de una dimensión, son métodos que permiten demostrar que una dada proteína se fosforila en respuesta a un estímulo (Ubersax *et al.*, 2003). El uso de anticuerpos comerciales mono o policlonales dirigidos contra fosfoaminoácidos, ya sean fosfoserina, fosfotirosina y fosfotreonina, representa una alternativa para detectar proteínas fosforiladas. Sin embargo, estos anticuerpos específicos no detectan ciertas proteínas fosforiladas, dado el impedimento estérico que posee el sitio de reconocimiento, sobre todo para los anticuerpos fosfoserina y fosfotirosina (Kaufmann *et al.*, 2001).

En algunos casos, la fosforilación en una proteína puede servir de identificación para su ubicuitinación y posterior degradación. Algunos ejemplos conocidos, son proteínas del ciclo celular (Bloom y Pagano., 2004). En otros casos, la fosforilación genera sitios de anclaje para la interacción proteína-proteína. Este es el caso de ciertos

residuos fosfotirosina, que crean un sitio de anclaje para proteínas que contienen dominios Src (D'Ambrosio *et al.*, 2006). Dado que el proceso de fosforilación es esencial para el funcionamiento de un alto número de procesos celulares, no es sorprendente que la perturbación en el equilibrio de la actividad quinasa-fosfatasa esté fundamentalmente involucrada en muchas enfermedades tales como la fibrosis quística (Gadsby *et al.*, 1999) y el mal de Alzheimer (Hanger *et al.*, 1998).

### LePRK1 y LePRK2

En polen maduro de tomate cultivado (*Solanum lycopersicum* VF36), nuestro laboratorio ha caracterizado 3 proteínas receptoras quinasas (RK), LePRK1, LePRK2 y LePRK3 (por *L. esculentum* *Pollen Receptor Kinase*). LePRK1 y LePRK2 son específicas del grano de polen y están enclavadas en la membrana del tubo polínico (Muschietti *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 2002). LePRK1 (~75 kDa) y LePRK2 (~70 kDa) presentan un dominio extracelular compuesto por 6 y 5 LRRs (*Leucine-Rich Repeat*) consecutivos de 22 a 26 aminoácidos respectivamente, potencialmente involucrados en interacción proteína-proteína; un dominio transmembrana y uno citoplasmático que contiene un dominio yuxtamembrana variable y el típico dominio quinasa donde reside la actividad fosforilante (Muschietti *et al.*, 1998). El receptor LePRK2 presenta actividad quinasa *in vitro*. Ambos se expresan en los estadios más tardíos del desarrollo mientras que la proteína LePRK2 aumenta su expresión luego de la germinación. LePRK2 está fosforilada en membranas de polen y es desfosforilada específicamente luego de que dichas membranas son incubadas con extracto de estilo de tomate (Muschietti *et al.*, 1998); este último resultado sugiere que por lo menos LePRK2 estaría involucrada en la interacción polen-pistilo. El mismo resultado fue obtenido utilizando extractos de pistilo de *Nicotiana tabacum*, por lo que esta señal debería ser compartida entre distintas especies de la familia Solanaceae.

Los dominios extracelulares de LePRKs no son similares, lo que sugiere que se unirían a ligandos diferentes. Mediante la técnica de doble híbrido en levaduras, utilizando como oligonucleótidos los dominios extracelulares de LePRK1 y LePRK2, se ha encontrado una proteína de polen rica en cisteína, LAT52 (número de acceso en *GenBank*: CAA33854). LAT52 se une al dominio extracelular de LePRK2 sólo antes de

la germinación y débilmente a LePRK1; esto sugiere que actuaría en forma autócrina en el proceso de señalización de LePRK2 activando una cascada de señales necesaria para la iniciación del crecimiento del tubo polínico (Tang *et al.*, 2002). LAT52, se expresa en altos niveles en polen maduro y granos de polen de plantas que expresa el gen antisentido de LAT52 no germinan y los pocos granos que lo logran, desarrollan un tubo retorcido que no llega a fertilizar al óvulo (Muschietti *et al.*, 1994). Experimentos de desplazamiento sugieren 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.

Otro ligando identificado proveniente de la biblioteca de ADNc de polen fue denominado LeSHY (número de acceso en *GenBank*: AY376852) (Guyon *et al.*, 2000). LeSHY es una proteína con alta expresión en polen maduro y germinado que posee un péptido señal amino-terminal seguido de 10 LRR. Posee una identidad de secuencia aminoacídica del 69% con una proteína de *Petunia*, PGPS/D4 o SHY (Guyon *et al.*, 2000). 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.

También por doble híbrido en levaduras, pero en este caso rastreando una biblioteca de estigma/estilo de tomate, se encontró un nuevo ligando para LePRK2 (Tang *et al.*, 2004). Se lo nombró LeSTIG1 (número de acceso en *GenBank*: AY376851) de acuerdo a su similitud de secuencia con otra proteína descrita anteriormente en tabaco (Goldman, *et al.*, 1994). LeSTIG1 se une a los dominios extracelulares de LePRK1 y LePRK2, es una proteína rica en cisteína y posee un péptido señal amino-terminal.

Fracciones enriquecidas en LAT52 desplazan la unión entre LeSHY y LePRK2, pero no la unión 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 por LePRK2. LeSTIG1 sustituiría a LAT52 al comienzo de las etapas de germinación, cuando el polen maduro entra en contacto con el estigma. También se comprobó que LeSTIG1, pero no LeSHY o LAT52, estimulaba *in vitro* el crecimiento del tubo polínico aunque no modificaba su orientación (Tang *et al.*, 2004). Estos resultados sugieren que existe una unión de varios ligandos diferentes (LAT52, LeSTIG1, LeSHY) a los dominios extracelulares de los receptores LePRK1 y LePRK2

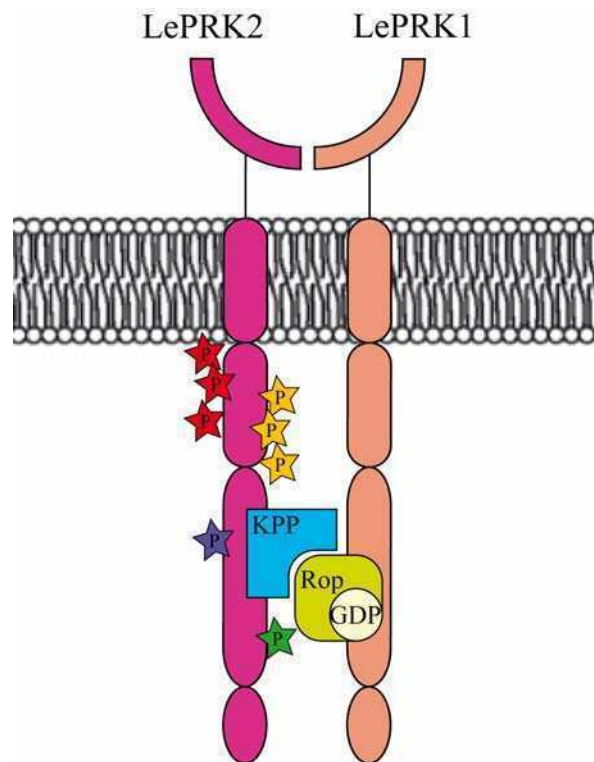
en distintas etapas de la germinación del polen. Esta hipótesis es muy factible, considerando el crecimiento del tubo polínico, los diferentes tejidos que atraviesa y los procesos que esto implica. Por lo tanto, dichos receptores tendrían más de una interacción en etapas asociadas a la polinización, a diferencia del receptor quinasa de polen en *Petunia* (PRK1) que sólo parece estar involucrado en estadíos tempranos del desarrollo del polen (Lee *et al.*, 1996).

Con el objetivo de encontrar proteínas de polen que interaccionen con los dominios citoplasmáticos de LePRK1 y LePRK2, se llevó a cabo un ensayo de doble híbrido en levaduras, rastreando una biblioteca de polen maduro de tomate. Así se aisló una proteína denominada LeKPP (*Lycopersicon esculentum Kinase Partner Protein*) (Kaothien *et al.*, 2005). KPP se encuentra en membrana, tanto de polen maduro como germinado. Una sobreexpresión de KPP induce un crecimiento del tubo polínico despolarizado, con la formación de ápice globoso en los tubos polínicos de tomate, similar al inducido por la sobreexpresión de ROP1 en *Arabidopsis*. Tubos polínicos que sobreexpresan transitoriamente LePRK2 y KPP conjuntamente, muestran ápices aún más globosos que sobreexpresando ambas proteínas individualmente (Zhang *et al.*, 2008). La sobreexpresión de KPP en polen de tabaco también causa un rearrreglo aberrante del citoesqueleto de actina (Kaothien *et al.*, 2005) similar al fenotipo observado cuando diferentes ROPs son sobreexpresadas en polen (Cheung *et al.*, 2003). Por otro lado, KPP posee más de 25 sitios potenciales de fosforilación, por lo cual resulta esperable que sea fosforilada por los receptores LePRKs (Kaothien *et al.*, 2005). Estos resultados sugieren que KPP posee un papel funcional en el crecimiento del tubo polínico (Shichrur y Yalovsky., 2006).

Por otro lado, se ha visto en nuestro laboratorio, que tanto en polen maduro como en germinado *in vitro*, los receptores LePRK1 y LePRK2 forman un complejo de alto peso molecular de aproximadamente 400 kDa (Wengier *et al.*, 2003). Extractos de estilo de tomate o tabaco inducen la desfosforilación de LePRK2 en membrana de polen y son responsables de la disociación del complejo en sus componentes monoméricos, posiblemente iniciando la transducción de alguna señal involucrada en el desarrollo del tubo polínico (Wengier *et al.*, 2003). En el laboratorio hemos comprobado que LAT52 y LeSTIG1 no tuvieron efecto alguno sobre el estado de fosforilación de LePRK2 (experimentos no mostrados).



No se sabe cuál es la forma activa de estos receptores, sólo se ha sugerido que LePRK1 y LePRK2 transducen señales del estilo a través de una desfosforilación de LePRK2 y de la disociación del complejo en sus componentes monoméricos. No se ha resuelto si sólo la desfosforilación de LePRK2 es responsable de la disociación del complejo, o si LePRK1 está también involucrada en la unión del/os componente/s del estilo y en la disociación del complejo. Es así, como en algunos casos, tal como se describió previamente, la unión del ligando al receptor provoca la formación de un complejo activo (CLAVATA1 y SRK en plantas y TNF $\alpha$ , FASR y TGF- $\beta$ R I y II, en animales) y en otros casos, la formación del mismo es un requisito para la unión del ligando, tal como sería el caso de los receptores LePRKs en plantas.



**Fig. 9: 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 la cual frente a una futura activación intercambiará GDP por GTP en ROP) y probablemente, ROP de tomate. LePRK2 se encontraría fosforilada en alguna parte de sus dominios citoplasmáticos.

## OBJETIVOS

Los objetivos de esta tesis fueron los siguientes:

1. Análisis fenotípico de tubos polínicos sobreexpresantes de LePRK2-eGFP y mLePRK2-eGFP en el crecimiento del tubo polínico y en la dinámica de actina.
2. Determinación y análisis de posibles sitios de fosforilación de LePRK2 responsables de cambios fenotípicos en la germinación del tubo polínico.
3. Aislamiento e identificación *in vivo* de sitios de fosforilación de LePRK2 mediante el uso de la técnica de geles bidimensionales y su posterior secuenciación. Estudio de los efectos de STIL en el mapa de fosforilación de LePRK2.

## MATERIALES Y METODOS

### TRANSFORMACION TRANSITORIA

#### Material vegetal utilizado para bombardeo

El polen de tabaco se obtuvo de *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi D8 crecidas a 28°C y con 16 horas de luz. Para recoger el polen, el caliz 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. Con pequeños golpes manuales, se desprendió el polen de las anteras, dentro del microtubo. En el caso de haberlo recolectado el día de realizar la técnica de bombardeo, el polen fue utilizado con tal fin. De caso contrario, fue congelado para luego ser utilizado para bombardeo.



**Fig.10: Flor de *Nicotiana tabacum*.**

Extraído de

<http://images.google.com.ar/images?q=flor+de+tabaco&gbv=2&ndsp=21&hl=es&sa=N&imgsz=xga>.

La estrategia utilizada para determinar los posibles sitios fosforilables de LePRK2 responsables de algún cambio fenotípico en la germinación del tubo polínico, se llevó a cabo a partir de la técnica de transfección transitoria en tubos polínicos de tabaco.

La misma comenzó con la selección de posibles sitios fosforilables de LePRK2. Para esto se utilizaron inicialmente dos programas computacionales: 1) Netphos 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>) y 2) GPS 2.0 (<http://973->

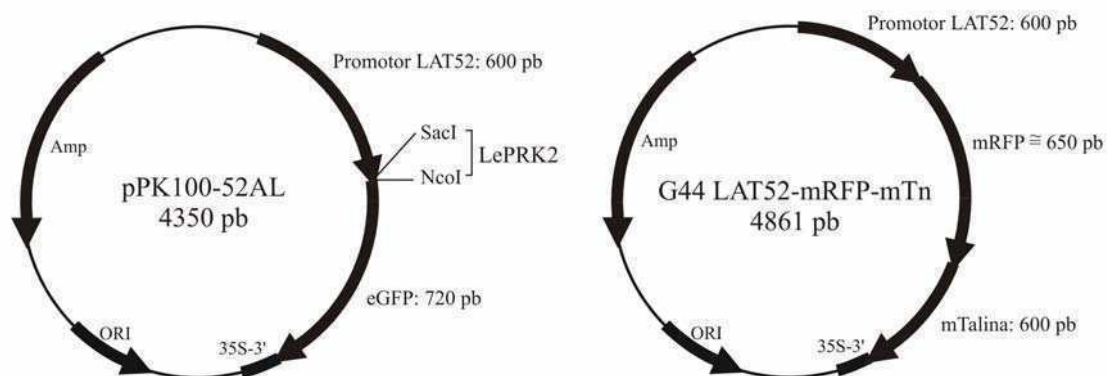
*proteinweb.ustc.edu.cn/gps/gps\_web/*). Por otro lado se utilizó el programa *Clustal X* (<http://www.clustal.org/>) para alinear secuencias ortólogas a LePRK2. En la búsqueda de similitud secuencial se utilizó el programa BLAST y PSI-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Para el estudio de filogenia a partir de fragmentos de LePRK2, se utilizó el programa PHYML (*Phylogenetic estimation using Maximum Likelihood*; <http://atgc.lirmm.fr/phyml/>). Para la detección de segmentos o motivos secuenciales comunes a un conjunto de secuencias se utilizó el programa MEME (*Multiple EM for Motif Elicitation*; [http://meme.sdsc.edu/meme4\\_1\\_1/cgi-bin/meme.cgi](http://meme.sdsc.edu/meme4_1_1/cgi-bin/meme.cgi)). Para la búsqueda de similitud estructural se usó el programa VAST (*Vector Alignment Search Tool*; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/VAST/vast.shtml>).

Una vez elegidos los sitios a mutagenizar, se construyeron los oligonucleótidos para cada mutante, según lo recomendado por el *kit* empleado. Se siguió el protocolo comercial para la obtención de las mutantes; se aislaron colonias de cada mutante, se purificaron los ADN plasmídicos y se secuenciaron para corroborar que la mutación deseada haya sido realizada. Posteriormente, se eligieron varios clones positivos para cada mutante y se realizaron maxipreparaciones de ADN para cada una de ellas. Con dicho ácido nucleico, se procedió con la técnica de bombardeo.

### **Vectores utilizados**

- 1) pPK100-52AL (en este vector se clonó la proteína LePRK2 sobre la cual se realizaron sucesivas mutaciones).
- 2) G44 LAT52-mRFP-mTn: RFP fue fusionada a mTalina (RFP-*mouse* talina).

Estos vectores fueron cedidos gentilmente por las Dras. Sheila McCormick y Weihua Tang. Ambos vectores son apropiados para el bombardeo de polen (Zhang *et al.*, 2007) debido a su pequeño tamaño y a su promotor específico de polen, LAT52 (Zhang *et al.*, 2007).



**Fig. 11: Esquema de vectores utilizados.**

pb: pares de bases; ORI: origen de replicación; Amp: resistencia a Ampicilina; 35S-3': terminador de la traducción.

### Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de las mutantes

Se utilizaron oligonucleótidos seleccionados a partir de la secuencia de LePRK2, con modificaciones en los nucleótidos de los codones correspondientes a los aminoácidos que se seleccionaron para mutar. Fue importante considerar los siguientes parámetros en el momento del diseño de los oligonucleótidos:

- Longitud de entre 25 y 45 bases por oligonucleótido.
- Temperatura de hibridación mayor o igual a 78°C.
- 40% de contenido de GC.
- La mutación deseada debe estar en el medio del oligonucleótido, con 10-15 bases a ambos lados.

Oligonucleótidos de mutantes 3A-WT, WT-3A, T358A y S396A:

3A-WT F	CAT CAT TAA CTG CTT CCG CTC CAA CAG CTC AAG ACC AAA AAC
3A-WT R	GTT TTT GGT CTT GAG CTG TTG GAG CGG AAG CAG TTA ATG ATG
WT-3A F	GGC CAA TCA GCA GCT GCA GCA GCT CCT GAT CG
WT-3A R	CGA TCA GGA GCT GCT GCA GCT GCT GAT TGG CC
T358A F	GGA AGT GGA GTG TTT GGT TCA GCT TAC AAA GC
T358A R	GCT TTG TAA GCT GAA CCA AAC ACT CCA CTT CC
S396A F	GAG AAG GCT TGG AAG ATT GGC TCA TAA GAA CTT GCT TCC
S396A R	GGA AGC AAG TTC TTA TGA GCC AAT CTT CCA AGC CTT CTC

### Oligonucleótidos de mutantes A2S-WT, SAS-WT y 2S-WT:

A2S-WT F	CAT CAT TAA CTG CTT CCT CAC CAA CAA GTC AAG ACC AAA AAC
A2S-WT R	GTT TTT GGT CTT GAC TTG TTG GTG AGG AAG CAG TTA ATG ATG
SAS-WT F	CAT CAT TAA CTT CTT CCG CTC CAA CAA GTC AAG ACC AAA AAC
SAS-WT R	GTT TTT GGT CTT GAC TTG TTG GAG CGG AAG AAG TTA ATG ATG
2SA-WT F	CAT CAT TAA CTT CTT CCT CAC CAA CAG CTC AAG ACC AAA AAC
2SA-WT R	GTT TTT GGT CTT GAG CTG TTG GTG AGG AAG AAG TTA ATG ATG

### Oligonucleótidos de mutantes 3D-WT, D2S-WT, SDS-WT, 2SD-WT, WT-3D y T358D:

3D-WT F	CAT CAT TAA CTG ATT CCG ATC CAA CAG ATC AAG ACC AAA AAC
3D-WT R	GTT TTT GGT CTT GAT CTG TTG GAT CGG AAT CAG TTA ATG ATG
D2S-WT F	CAT CAT TAA CTG ATT CCT CAC CAA CAA GTC AAG ACC AAA AAC
D2S-WT R	GTT TTT GGT CTT GAC TTG TTG GTG AGG AAT CAG TTA ATG ATG
SDS-WT F	CAT CAT TAA CTT CTT CCG ATC CAA CAA GTC AAG ACC AAA AAC
SDS-WT R	GTT TTT GGT CTT GAC TTG TTG GAT CGG AAG AAG TTA ATG ATG
2SD-WT F	CAT CAT TAA CTT CTT CCT CAC CAA CAG ATC AAG ACC AAA AAC
2SD-WT R	GTT TTT GGT CTT GAT CTG TTG GTG AGG AAG AAG TTA ATG ATG
WT-3D F	GGC CAA TCA GAT GCT GCA GAT GAT CCT GAT CG
WT-3D R	CGA TCA GGA TCA TCT GCA GCA TCT GAT TGG CC
T358D F	GGA AGT GGA GTG TTT GGT TCA GAT TAC AAA GC
T358D R	GCT TTG TAA TCT GAA CCA AAC ACT CCA CTT CC

La mutante 3A-3D fue realizada utilizando los oligonucleótidos ya diseñados anteriormente para las mutantes 3A-WT y WT-3D. Así también, la mutante 3D-3A fue diseñada a partir de los oligonucleótidos de las mutantes WT-3A y 3D-WT.

### Oligonucleótidos de mutante mLePRK2:

K2mLisina F	GTA CTG GCC CTG TCA TGG TTG TTG CTA GGT TTA GAC ATA TG
K2mLisina R	CAT ATG TCT AAA CCT AGC AAC AAC CAT GAC AGG GCC AGT AC

## Mutagénesis dirigida

Esencialmente se procedió siguiendo las indicaciones del *Kit QuickChange II-E Site-Directed Mutagénesis Kit*, Stratagene.

Se realizó una PCR (reacción en cadena de la polimerasa) del siguiente modo:

• <i>Buffer</i> de Reacción 10X	5 $\mu$ l
• Templado (30 ng)	5 $\mu$ l
• Oligonucleótido <i>forward</i> (2 $\mu$ M)	5 $\mu$ l
• Oligonucleótido <i>reverse</i> (2 $\mu$ M)	5 $\mu$ l
• Mezcla de dNTPs (provista por el <i>kit</i> )	1 $\mu$ l
• Agua	29 $\mu$ l

A dicha reacción se adicionó 1  $\mu$ l de enzima *PfuUltra High-Fidelity* ADN polimerasa (2,5 U/ $\mu$ l). Los tubos fueron colocados en el termociclador *PTC<sup>TM100</sup> Programmable Thermal Controller* (MJ Research). La reacción comenzó con un ciclo a 95°C por 30 segundos, seguido por 16 ciclos en las siguientes condiciones:

- 95 °C durante 30 segundos.
- 55 °C durante 1 minuto.
- 68 °C durante 1 minuto/kpb de longitud de plásmido.

Finalizada la reacción, se dejó enfriar el tubo en hielo durante 2 minutos hasta alcanzar una temperatura de 37°C. Luego se agregó 1  $\mu$ l de enzima de restricción Dpn I (que permite la digestión de la cadena parental, reconociendo los metilos de la misma) y se dejó incubar la reacción durante 1 hora a 37°C.

Posteriormente, se resuspendió por *vortex* la resina provista por el *kit* (*StrataClean resin*), hasta hacerlo completamente. Luego se agregaron 7  $\mu$ l de la resina a la reacción de mutagénesis. Se agitó la mezcla durante 30 segundos y se incubó a temperatura ambiente durante 1 minuto. Se la centrifugó a 2.500 xg por 1 minuto. Finalmente, se removió el sobrenadante conteniendo el ADN a un tubo nuevo de microcentrífuga. Dicha reacción de mutagénesis fue congelada a -20°C hasta posterior uso.

### **Transformación de bacterias termocompetentes**

A 50  $\mu$ l de bacterias termocompetentes (*Escherichia coli*, cepa DH5 $\alpha$ ) se le agregaron 2  $\mu$ l de reacción de mutagénesis. Se dejó 30 segundos en hielo.

Posteriormente, se realizó un *shock* térmico que consistió en 90 segundos a 42°C y luego 2 minutos en hielo. Las bacterias termotransformadas se resuspendieron rápidamente en 200 µl de SOC, se transfirieron a un tubo y se incubaron a 37°C durante una hora. Finalizado este intervalo, se distribuyeron (con bolitas de vidrio) 100 µl en cada placa de LB agar-ampicilina (100 µg/ml). Las placas se dejaron durante toda la noche en estufa a 37°C.

### SOC:

Triptona o peptona	2%
Extracto de levadura	0,5%
NaCl	10 mM
KCl	2,5 mM
MgCl <sub>2</sub>	10 mM
MgSO <sub>4</sub>	10 mM
Glucosa	20 mM

### LB Líquido (1 litro):

Triptona o Peptona	10 g
Extracto de Levadura	5 g
NaCl	10 g
Agua c.s.p	1 litro

### LB Agar (1 litro):

Triptona o Peptona	10 g
Extracto de Levadura	5 g
NaCl	10 g
Agar	15 g
Agua c.s.p	1 litro

### **Obtención de clones mutantes para secuenciación: Minipreparaciones de ADN**

Se tomaron 10 clones mutantes elegidos al azar y se inocularon 10 ml de LB líquido con ampicilina (100 µg/ml) con cada uno de ellos. Al día siguiente se aisló el



plásmido de cada una de las transformantes, utilizando la técnica de minipreparación de ADN tal como se detalla a continuación:

- Se centrifugó el cultivo durante 3 minutos a máxima velocidad y se descartó el sobrenadante.
- Se agregaron 3 ml de solución I fría.
- Se agregaron 3 ml de solución II, se mezcló por inversión y se dejó 5 minutos en hielo.
- Se agregaron 3 ml de solución III, se mezcló por inversión y se dejó 10 minutos en hielo.
- Se centrifugó 15 minutos a 4°C a máxima velocidad.
- Se pasaron 8 ml del sobrenadante a un tubo nuevo.
- Se agregaron 10 µl de RNAsa A (Promega) (10 µg/µl) y se incubó 2 horas a 37°C.
- Se agregaron 6 ml de cloroformo:isoamílico (24:1) y se mezcló por inversión.
- Se centrifugó 5 minutos a temperatura ambiente y se pasó la fase superior (acuosa) a un tubo nuevo. Se agregaron 6 ml de isopropanol, se mezcló y se incubó 30 minutos a temperatura ambiente.
- Se centrifugó 30 minutos a máxima velocidad y se descartó el sobrenadante.
- Se lavó el precipitado con 1 ml de etanol 70% muy suavemente con pipeta (el precipitado puede despegarse del tubo).
- Se centrifugó 5 minutos y se descartó el sobrenadante.
- Se secó el precipitado 10 minutos bajo lámpara.
- Se resuspendió en 350 µl de agua estéril.

### Solución I:

Tris-HCl pH 8	50 mM
EDTA	10 mM

Se conservó en la heladera.

### Solución II (Lisis):

NaOH	0,2 M
SDS	1%

### Solución III (Neutralización):

KCOOCH<sub>3</sub>                    5 M

Acido Acético glacial 11%

Se conservó en la heladera.

### **Secuenciación de ADN para expresión transitoria**

Con el fin de corroborar las mutaciones introducidas en las diferentes construcciones, se secuenció cada una de ellas (Macrogen, Korea; [www.macrogen.com](http://www.macrogen.com)), de las que se realizó una minipreparación. Los oligonucleótidos utilizados para secuenciar las construcciones hibridaron con la región de LePRK2 a ambos lados de las mutaciones introducidas.

Para la construcción 3A-WT y sus mutantes individuales, se utilizó el oligonucleótido *reverse* JM2R (correspondiente a la región yuxtamembrana de LePRK2), a una concentración 5  $\mu$ M: AGTGAGCTCTTAATCAGGCAAGTCAAATTTCTC (5' 3').

Para todas las otras construcciones, se utilizó el siguiente oligonucleótido *forward* interno a la secuencia de LePRK2, TM2F (hibrida con la región transmembrana de LePRK2), a una concentración 5  $\mu$ M:

ATTCCGCGGTATTGCCCTTATTGTGGTTATAG (5' 3').

### **Maxipreparación de ADN para expresión transitoria**

A partir de los resultados de secuenciación, se seleccionó un clon de cada mutante para luego realizar una maxipreparación de ADN de alta calidad de pureza (*QIAfilter Plasmid Maxi Kit*; QIAGEN). Para ello se utilizaron cultivos de 400 ml inoculados con las bacterias correspondientes y 100  $\mu$ g/ml de ampicilina como antibiótico.

Durante todo el trabajo con ADN (maxipreparaciones de ADN como resultados de digestiones), los fragmentos se separaron por electroforesis en geles de agarosa 1% p/v (en TAE 1X), con Bromuro de Etidio 10  $\mu$ g/ml. Se sembró la cantidad necesaria de ADN, según el objetivo en cada caso y se corrió el ADN en TAE 1X a 75 *Volts*. Como marcador de peso molecular, se utilizó *1kb Ladder Plus* (Promega). Los geles

fueron corridos hasta que el azul de bromofenol migró hasta la mitad de la longitud del gel; el ADN se visualizó por transiluminación por UV y los geles fueron fotografiados.

La cuantificación de ADN fue realizada por dos métodos:

- Por gel: el ADN a cuantificar fue sembrado en calles contiguas junto con un marcador de ADN de masa conocida (*EZ Load Precision Molecular Mass*, Bio-Rad).
- Por luz UV: se midió absorbancia a 260 nm, utilizando el equipo *Ultrospec 2000* (GE Healthcare Life Sciences).

### TAE 50X (1 litro):

Tris	242 g
Acido Acético Glacial	57,1 ml
EDTA 0,5 M	200 ml
Agua c.s.p	1 litro

### **Transformación de polen de tabaco por biobalística**

#### Preparación de microtransportadores (micropartículas de oro)

15 mg de partículas de oro de 1  $\mu\text{m}$  de diámetro (1  $\mu\text{m}$  *Gold Microcarriers*, Bio-Rad) se mezclaron por agitación con *vortex* durante 5 minutos en 1 ml de etanol absoluto y se dejó reposar durante 15 minutos a temperatura ambiente. Luego se centrifugaron a 1.200 xg entre 2 y 5 segundos a temperatura ambiente. Se descartó el sobrenadante y se agregó al precipitado 1 ml de agua estéril, resuspendiendo con agitación durante 1 minuto. Esta mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 1 minuto, se volvió a centrifugar a 1.200 xg durante 3 segundos y se descartó el sobrenadante. Este lavado se repitió 3 veces más. Finalmente las partículas se resuspendieron en 250  $\mu\text{l}$  de glicerol 50% estéril, para obtener una concentración de 60 mg/ml. Las partículas se conservaron a temperatura ambiente por 2 semanas.

#### Recubrimiento de los microtransportadores con el ADN transformante

Se tomaron 50  $\mu\text{l}$  de la preparación de partículas de oro resuspendidas por *vortex* y se transfirieron a un tubo de microcentrífuga. Se agregaron en orden

secuencial y agitando con *vortex* cada vez, 10 µl de plásmido para transformar a una concentración 2 µg/µl, 50 µl de CaCl<sub>2</sub> 2,5 M y 20 µl de espermidina 0,1 M (Sigma). En el caso de co-bombardeos, se utilizaron 10 µg de cada uno de los dos plásmidos, ajustando el volumen necesario según las concentraciones de los mismos. La mezcla se incubó con agitación a 4°C durante 20 minutos. Luego se agregaron 200 µl de etanol absoluto, se agitó con *vortex* y se centrifugó a 800 xg durante 1 minuto a 4°C. Se descartó el sobrenadante con pipeta y con cuidado de no remover el precipitado. Las partículas se lavaron de esta misma forma 2 veces con 200 µl de etanol absoluto, resuspendiendo muy bien entre cada centrifugación. Finalmente, el precipitado se resuspendió en 40 µl de etanol absoluto, pudiéndose conservar en hielo 30 minutos antes de su utilización. Este volumen permitió completar 3 disparos con cada preparación de ADN.

### Preparación de placas de agar para disparar

Se prepararon en el flujo laminar, tres placas de petri con agar 0,8% por cada ADN transformante. Una vez solidificadas, se colocó un círculo de 2 cm de diámetro de *nylon* de poro de 20 micrones (TSI Filtration Technologies, Inc.), arriba de un cuadrado de papel de filtro (Whatman Internacional Ltd.), en el centro de la placa. Finalmente, y previo al inicio del bombardeo, se juntaron 2,5 mg de polen de tabaco por placa a bombardear y se lo mezcló en medio de resuspensión. Rápidamente, se lo dispersó sobre el *nylon*, con un *tip* de 200 µl cortado en la punta. La placa de petri fue tapada, evitando que se seque el polen.

### Medio de resuspensión de polen de tabaco:

PEG 4000	4%
MES pH 6	25 mM
MgSO <sub>4</sub>	0,8%
KCl	1 mM
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1,6 mM
Sacarosa	6%
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	1 mM

### Bombardeo de polen de tabaco

Los macrotransportadores (*Macrocarriers*, Bio-Rad), previamente esterilizados por inmersión en etanol absoluto durante 15 minutos, se secaron en el flujo laminar y se ensamblaron con los soportes para macrotransportadores (*Macrocarriers Holders*, Bio-Rad), esterilizados de igual manera. Aproximadamente 13 µl de partículas de oro recubiertas con el ADN, se distribuyeron sobre la zona central de 3 macrotransportadores y se dejaron secar en el flujo laminar.

El bombardeo se realizó utilizando el dispositivo para biobalística PDS-1000/He *Particle Delivery System* (Bio-Rad). Los discos de ruptura (1100 psi *Rupture Disks*, Bio-Rad) se esterilizaron con etanol absoluto y se dejaron secar en el flujo laminar. Un disco de ruptura por disparo se ensambló en la rosca soporte (*Rupture Disk Retaining Cap*, Bio-Rad) sellando la cámara de alta presión de helio. Se colocaron una malla de detención (*Stopping Screen*, Bio-Rad) y el macrotransportador cargado con la mezcla de partículas de oro y ADN, en la bandeja de detención (*Stopping Plate*, Bio-Rad). La distancia entre el disco de ruptura y la cubierta del macrocarrier (*Macrocarrier Cover Lid*, Bio-Rad) fue de 0,625 cm (1/4 de pulgada). La bandeja con la placa de petri conteniendo el polen a bombardear se colocó a una distancia de 9 cm abajo de la bandeja de detención. Se cerró la cámara y se hizo vacío hasta alcanzar una presión de 28 mmHg. A continuación se permitió el ingreso de helio con una presión de 1.350 psi hasta que se produjo el disparo. Se liberó el vacío y el polen bombardeado se recolectó con una espátula en un pocillo que contenía 500 µl de medio de germinación de polen de tabaco, de una placa de 24 pocillos. Se cubrió la placa con papel aluminio y se la dejó incubando con agitación horizontal (60 rpm) a 28°C durante 12-16 horas. Como control, el primer disparo siempre se hizo utilizando un macrotransportador no cargado con partículas.

### Medio de germinación de polen de tabaco:

PEG 4000	24%
MES pH 6	20 mM
MgSO <sub>4</sub>	0,02%
KNO <sub>3</sub>	0,01%
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,01%
Sacarosa	2%

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

### **Observación al microscopio**

Transcurrida la incubación, se procedió a observar el polen al microscopio de epifluorescencia (Olympus, modelo BX41). Para ello, se colocaron 20 µl de cada preparación de polen cubierta con un cubreobjeto de 2 x 2 cm. Se repitió esto tantas veces hasta acabar con la muestra completa. Se sacaron fotos a los tubos polínicos transfectedados, es decir, aquellos observados de color verde fluorescente (en el caso de LePRK2 y de sus respectivas mutantes) por producto de emisión de la proteína eGFP y de color rojo fluorescente (en el caso de observar mTalina), por emisión de la proteína mRFP. Para las imágenes de co-bombardeos se utilizó un microscopio confocal (Nikon C1).

### **Tratamiento con Latrunculina B**

Se bombardeó polen por duplicado con las construcciones de las mutantes eGFP, LePRK2-eGFP o mLePRK2-eGFP (6 bombardeos en total, posteriormente 3 tratados con Latrunculina B y los otros 3 utilizados como control de tratamiento). El polen del bombardeo de cada construcción fue colocado, de manera separada, en pocillos que contenían cada uno 500 µl de medio de germinación de polen y fue agitado horizontalmente a 28°C a 60 rpm durante tres horas. Pasado este tiempo, a tres pocillos que contenían cada uno una de las tres construcciones, se le agregó 1,2 µl de una solución 2,5 mM de Latrunculina B (Sigma-Aldrich) diluida en 100 µl de medio de germinación de polen hasta una concentración final de 5 nM y luego se continuó con la agitación. DMSO fue agregado a los otros tres pocillos como parte del experimento control. Luego de 4 horas de incubación, se observaron los tubos polínicos en el microscopio de epifluorescencia.

### **Análisis de Imágenes**

Las imágenes obtenidas se analizaron utilizando el *software ImageJ* (<http://rsb.info.nih.gov/ij>) que nos permitió medir el largo del tubo polínico presente

en cada fotografía y el ancho del ápice de tubo polínico. El largo del tubo polínico se cuantificó desde el final del grano hasta el final del ápice. Por su lado, el ancho del tubo polínico se calculó midiendo el diámetro de la región más ancha del ápice. La intensidad de fluorescencia del ápice del tubo se obtuvo substrayendo la intensidad de fluorescencia de la misma área de granos no transfectados. Finalmente, para cada construcción analizada, se definieron grupos de intensidad entre 0-25 y mayor a 25 (unidades arbitrarias). Todos los largos y anchos de tubos polínicos registrados, fueron clasificados en estos grupos dependiendo de sus valores de intensidad.

### **Análisis de datos**

Para cada mutante, se realizaron experimentos independientes. En cada réplica (bombardeo individual), el largo del tubo, ancho del ápice e intensidad de fluorescencia fueron determinados. En todos los casos, por lo menos 50 tubos polínicos fueron utilizados para calcular el promedio del largo y ancho del ápice del tubo en cada réplica. Cada experimento fue realizado tres veces, salvo que se indique lo contrario en la leyenda y los valores fueron promediados para realizar un análisis estadístico.

Los datos fueron siempre analizados estadísticamente utilizando el programa *Prism 4.0 (GraphPad Software)*. Se realizaron análisis de regresión lineal para cada clon y las variables largo y ancho fueron analizadas. Para el caso de las mutantes de fosforilación, sólo tubos con intensidades entre 0-25 (unidades arbitrarias) fueron considerados. Los datos fueron analizados utilizando análisis de varianza (ANOVA) y diferencias entre las medias fueron comparadas utilizando la prueba de *Tukey* ( $p < 0,05$ ) o la de *t* de *Student* ( $p < 0,05$ ).

## **PROTEÓMICA**

### **Material vegetal utilizado para la obtención de P<sub>100</sub>**

El polen maduro de tomate se obtuvo por vibración de las anteras de *Solanum lycopersicum* VF36 (tomate cultivado) crecido a 28°C y con 16 horas de luz. La

mayor cantidad del 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 12).



**Fig. 12: Flores de *Solanum lycopersicum*.**

Extraído de [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).

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 sobre la base de las mismas. Se colectó el polen necesario según el protocolo a seguir, de un grupo de flores y cada microtubo fue inmediatamente almacenado a  $-80^{\circ}\text{C}$  o directamente usado para la obtención de  $\text{P}_{100}$ .

### **Electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida (“geles 2D”) con polen maduro y polen germinado *in vitro***

Se recolectó polen de tomate y se determinó la masa. El mismo fue resuspendido en medio de germinación (PGM) de polen de tomate logrando una suspensión de 1 mg de polen/ml de medio. Al polen se lo germinó en placas de 5 cm de diámetro a  $28^{\circ}\text{C}$  con agitación (60 rpm) durante 3 horas. Luego se traspasó el polen germinado con pipeta a microtubos de 1,5 ml. Se centrifugó a máxima velocidad por 3 minutos y se descartó el sobrenadante. Al precipitado se le agregó 100  $\mu\text{l}$  de 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 50 mM NaCl, 100  $\mu\text{l}$  de 100% metanol y 50  $\mu\text{l}$  de cloroformo. Se rompió el tejido vigorosamente con un émbolo. Se mezcló bien el



líquido hasta que se tornó blanquecino. A continuación, se centrifugó 5 minutos a máxima velocidad y se conservó la interfase y fase orgánica, retirando la acuosa. Luego, se agregaron 450 µl de metanol 100% a la fase orgánica y a la interfase y se mezcló bien. Se centrifugó durante 5 minutos a máxima velocidad y se descartó el sobrenadante. Posteriormente, se secó el precipitado por 20-30 segundos en un bloque termostático a 100°C y se lo resuspendió con pipeta en 125 µl de *buffer* de Resuspensión para IEF (isoelectroenfoco). Se incubó a 37°C por 1 hora. Transcurrido este tiempo, se centrifugó a 12.000 rpm por 10 minutos. Una vez descongelado el *strip* (*Inmobiline DryStrip* pH 4-7 o 3-10, 7 cm, GE Healthcare Life Sciences) a temperatura ambiente, se colocaron los 125 µl en forma de línea evitando la formación de burbujas y se puso el *strip* con el gel hacia abajo sobre la muestra evitando la formación de burbujas. Finalmente se cubrió el *strip* con aceite mineral (*Cover fluid*, GE Healthcare Life Sciences) y se lo incubó a 30°C durante toda la noche (máximo de 16 horas).

En el caso de haber realizado geles bidimensionales con muestras de polen maduro, el mismo fue recolectado y directamente procesado, o en muchos casos se utilizó polen maduro criopreservado. En ambos casos, el polen fue resuspendido directamente en 100 µl de 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 50 mM NaCl, 100 µl de 100% metanol y 50 µl de cloroformo y luego se continuó del mismo modo que el descrito para el polen germinado.

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

PEG 4000	24%
Sacarosa	2,5%
MES pH 6	20 mM
MgSO <sub>4</sub>	0,02%
KNO <sub>3</sub>	0,01%
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,01%
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	3 mM

**Tratamiento con *Lambda*-fosfatasa**

La reacción de defosforilación por *lambda* fosfatasa se realizó agregando los siguientes componentes y en el orden en que figuran:

• <i>Buffer</i> fosfatasa (BioLabs)	5 $\mu$ l
• MnCl <sub>2</sub>	5 $\mu$ l
• Membrana de polen (P <sub>100</sub> )	200 $\mu$ g
• Enzima fosfatasa ( <i>Lambda Protein Phosphatase</i> , BioLabs)	1 $\mu$ l (400 U)
• Agua c.s.p	50 $\mu$ l

Se incubó la reacción durante 3 horas a 37°C. Finalizado este tiempo, se le agregó *buffer* SDS 1X y se calentó a 80°C. Una vez enfriado el microtubo en la mesada, se agregó un volumen de metanol junto con 0,5 volúmenes de cloroformo. Se mezcló bien, y se centrifugó 5 minutos a 12.000 rpm. Se descartó la fase orgánica y se agregó metanol (9 veces el volúmenes de cloroformo inicial). Se volvió a mezclar bien y se centrifugó a 12.000 rpm durante 5 minutos. Finalmente, se descartó el sobrenadante y se procedió tal como se describió anteriormente, con el secado del precipitado y los pasos previos a la corrida de la primera dimensión.

*Buffer* SDS 4X:

SDS	12%
Glicerol	40%
Tris-HCl pH 6,8	160 mM
$\beta$ -Mercaptoetanol	25%

Corrida de la primera dimensión

Terminado el tiempo de incubación a 30°C, el *strip* fue retirado de la estufa. Se hidrataron 2 papelitos (*Paper electrode*, GE Healthcare Life Sciences) que funcionaron de contacto, con 250  $\mu$ l de agua desionizada. Se escurrió el aceite del *strip* y se lo colocó con el gel hacia arriba. Rápidamente se aseguraron los electrodos en un soporte de cerámica con pocillos para *strips* (*Ettan IPGphor Manifold*) y se colocó el conjunto electrodos-soporte, en el aparato de IEF (*Ettan IPGphor 3 IEF*

*System*, GE Healthcare Life Sciences). Se completó el pocillo del soporte (donde está colocado el *strip*) con 4 ml de aceite mineral hasta cubrir totalmente el pocillo.

Posteriormente se comenzó la corrida:

Temperatura de corrida: 20°C.

- Paso 1: 500 *Volts* por 30 minutos.
- Paso 2: 1000 *Volts* por 30 minutos.
- Paso 3: 5000 *Volts* por 100 minutos, hasta un total de 8000 *Volts*/hora.

Finalizada la corrida, se escurrió el *strip* y se lo colocó en una caja de petri a -80°C hasta su uso posterior. Luego, se colocó el *strip* en un tubo de 15 ml, con 4 ml de *buffer* de Equilibrio, 40 mg de DTT sólido y se dejó incubando a temperatura ambiente durante una hora, con agitación, corroborando que el *strip* quede bien embebido en la solución. Luego se traspasó el *strip* a otro tubo de 15 ml, con 4 ml de *buffer* de Equilibrio y 225 mg de Iodoacetamida sólida y se lo agitó vigorosamente a temperatura ambiente durante una hora.

### Corrida de la segunda dimensión; Electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE)

Durante el transcurso de esta tesis, se realizaron geles 8 y 10% de acrilamida-bisacrilamida (poliacrilamida). El *strip* se sumergió 3 veces en *buffer* de corrida Tris Glicina 1X, SDS 0,2%. En la calle del gel, se colocó el *strip* y sobre este, la agarosa 0,5% fundida (realizado en el *buffer* de electroforesis: Tris Glicina 1X, SDS 0,1%), evitando la formación de burbujas. Una vez solidificada la agarosa, se armó el dispositivo de geles y se comenzó la corrida. Los geles se corrieron a 10 mA, hasta llegar las muestras al final del gel concentrador (*stacking*) y luego a 25 mA durante el gel separador (*running*). Como *buffer* de electroforesis, se utilizó el descrito anteriormente y Tris Glicina 1X, SDS 0,2% para aquel que estaba directamente en contacto con el gel.

### Tris Glicina 10X (1 litro):

Tris	30,25 g
Glicina	144 g

Agua c.s.p                      1 litro

### Buffer de Resuspensión para IEF:

Urea	7 M
Tiourea	2 M
CHAPS	2,0%
Tritón X-100	2,0%
Anfolitos (IGP <i>buffer</i> adecuado)	0,5%
DTT	60 mM

### Buffer de Equilibrio:

Tris-HCl pH 8,8	50 mM
Urea	6M
Glicerol	30%
SDS	2%
Azul de bromofenol	0,01%

### **Tinción de geles con Nitrato de plata o Azul de *Coomassie***

Cuando se realizó la técnica de geles de dos dimensiones, se corrieron en paralelo dos muestras idénticas, salvo que se indique lo contrario. Uno de los geles fue teñido con nitrato de plata o azul de *Coomassie*, según la sensibilidad requerida en el experimento y la otra, transferida a una membrana de nitrocelulosa para el posterior *Western blot*.

Para la tinción de azul de *Coomassie* se mezclaron 4 partes del colorante con 1 parte de metanol. Se dejó el gel tiñendo toda la noche. Posteriormente se destiñó con distintos lavados de agua, hasta obtener la claridad deseada de los *spots*.

### Azul de *Coomassie* (500 ml):

(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	50 g
<i>Coomassie</i> G250	0,5 g
Acido Fosfórico (85%)	5,8 ml
Agua c.s.p	500 ml

Para la tinción con nitrato de plata, se utilizó un *kit* comercial *SilverSNAP Stain for Mass Spectrometry* (Pierce).

### **Transferencia de geles SDS-PAGE a membrana de nitrocelulosa**

Se realizó transferencia húmeda (todos los pasos se realizaron embebiendo los elementos en *buffer* de transferencia):

Polo positivo

- Esponja.
- 2 papeles de filtro Whatman 3MM.
- Membrana de nitrocelulosa (*Hybond ECL*, GE Healthcare Life Sciences).
- Gel a transferir.
- 2 papeles de filtro Whatman 3MM.
- Esponja.

Polo negativo

#### Buffer de Transferencia:

Tris Glicina	1X
Metanol	20%

Los geles fueron transferidos durante una hora a 100 *Volts*. Una vez finalizada la transferencia, para poder visualizar la posición de cada calle y verificar la eficiencia de la transferencia, las membranas de nitrocelulosa se tiñeron con Rojo *Ponceau S* (Sigma) Luego se lavó la membrana con agua desionizada.

#### Solución Rojo Ponceau S:

Rojo <i>Ponceau S</i>	1% p/v
Acido Acético	1% v/v

### ***Western blot***

Las membranas de nitrocelulosa fueron incubadas con la solución de bloqueo durante media hora. Luego fueron incubadas con el primer anticuerpo específico, en una dilución 1/1.000 preparada en solución de bloqueo, o.n a 4°C. Seguido se lavaron las membranas con una solución de TBS Tritón X-100 0,2%, durante 30 minutos a temperatura ambiente (tres lavados de 10 minutos cada uno). Finalmente se incubaron con el segundo anticuerpo durante una hora a temperatura ambiente y luego se lavaron siguiendo las mismas condiciones descritas anteriormente.

El primer anticuerpo utilizado es el descrito según Muschietti *et al.*, 1998. Fue generado contra el dominio extracelular de LePRK2 (anticuerpo anti-ECD2 (*Extracelular Domain of LePRK2*)). El segundo anticuerpo utilizado fue el HRP-SAM (*anti-Horse Radish Peroxidase, Sheep Anti-Mouse*, GE Healthcare Life Sciences). Todas las incubaciones con cada anticuerpo fueron realizadas con agitación y la solución de anticuerpos luego de ser utilizada fue congelada para un posterior uso.

#### TBS 10X (Solución madre):

Tris-HCl pH 7,4	0,5 M
NaCl	1,5 M

#### Solución de Bloqueo:

TBS	1X
Tritón X-100	0,2%
Leche descremada (Molico)	4%
Glicina	2%

Para el revelado, se utilizó una solución de ECL (*Enhanced Chemoluminescence*) confeccionada en el laboratorio, incubando la membrana de nitrocelulosa durante tres minutos. Se colocó la membrana entre un *film* autoadherente (*Rolopac*), retirando el excedente de solución reveladora. Se realizó el revelado exponiendo películas radiográficas (GE Healthcare Life Sciences) por diferentes tiempos y utilizando soluciones comerciales de revelador y fijador (AGFA).

También se utilizó una solución de revelado comercial (*SuperSignal Western Dura Substrate Working Solution*, Pierce). Se mezclaron en partes iguales dos soluciones provistas por el *kit*. Luego, se embebió la membrana en dicha mezcla durante 5 minutos y se realizó el revelado del mismo modo que el descrito anteriormente.

### Soluciones ECL:

#### Solución Luminol (50 ml):

Luminol (Sigma) 2,5 mM

DMSO 0,5 ml

Se disolvió y se agregó 50 ml de Tris-HCl 0,1 M pH 8. Esta solución se mantuvo alejada de la luz.

#### Solución Enhancer:

Ácido p-coumárico (Sigma) 90 mM

DMSO 1,25 ml

Se agregó 220 µl de solución *enhancer*, a 50 ml de solución luminol. Se filtró con una membrana de 0,3 µm (Millipore). Se guardó a -20°C.

### Solución H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:

A 50 ml de solución 0,1 M Tris-HCl pH 8 se le agregó 102 µl de solución H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 9%.

En el momento de revelar, se mezcló la solución *luminol-enhancer* en una proporción 1:1 con la solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y se dejó incubar 3 minutos previo a exponer la membrana a la placa radiográfica.

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

Se resuspendieron ~50 µl de polen maduro en 500 µl de *buffer* de lisis para polen (BLP) a 4°C. Posteriormente, se realizaron 5 ciclos de 1 minuto cada uno con un homogenizador de vidrio tipo *Tenbroeck* (7 ml, Kontes), interrumpido por 2 minutos cada uno, en hielo. Luego se transfirió la mezcla a un tubo de

microcentrífuga. El homogenizador se enjuagó con 500 µl de BLP y ese enjuague se transfirió también al microtubo. El homogenato completo se centrifugó a 10.000 xg por 15 minutos a 4°C. El sobrenadante obtenido, conteniendo principalmente microsomas, ribosomas y proteínas citoplasmáticas se transfirió a un tubo para ultracentrífuga.

La muestra se ultracentrifugó a 100.000 xg por 90 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante y el precipitado conteniendo la fracción microsomal se transfirió a un microtubo de 1,5 ml y se agregó BLP con 0,5% de NP-40 (concentración final, BLP+NP-40) y antiproteasa 1X, hasta lograr una concentración de proteínas igual o menor que 15 µg/µl, con el fin de evitar la formación de agregados. Utilizando microbarras magnéticas (10 mm x 3 mm), se agitó la muestra en un baño agua-hielo por 60 minutos hasta resuspender completamente. El precipitado resuspendido de ultracentrifugación (P<sub>100</sub>) se fraccionó y se conservó en una ultracongeladora (-80°C). La determinación de proteínas se realizó por el método de *Bradford* modificado para microplacas (Coligan *et al.*, 1996).

### Buffer de lisis para polen (BLP):

Tris-HCl pH 7,5            50 mM

NaCl                        50 mM

EDTA pH 8                1 mM

1X *Cocktail* de antiproteasas (*Complete EDTA-free*: PMSF, Pefabloc SC, Pefabloc SC Plus, Aprotinina, Leupeptina, α<sub>2</sub>-macroglobulina y E-64; Roche)

### **Preparación de STIL**

Se cortaron 100 pistilos (estigma y estilo) en forma transversal, en segmentos de 5 mm y se incubaron con 50 mM de bicarbonato de amonio (25 ml) toda la noche a 4°C con agitación suave, obteniéndose un exudado. El exudado de pistilos fue filtrado con gasa y papel de filtro y luego sometido a una extracción con metanol/cloroformo. La fase acuosa fue secada en un rotor por evaporación y el precipitado fue disuelto en agua. Este, fue centrifugado 10 minutos a 10.000 xg en una centrífuga de mesada y el sobrenadante fue fraccionado en una columna manual de DEAE Sefarosa. La presencia de STIL en las fracciones eluidas fue ensayada por desfosforilación



específica de LePRK2 en fracción de proteínas microsomales de polen maduro de tomate (P<sub>100</sub>). Cada fracción de STIL fue ensayada en la capacidad de desfosforilar LePRK2, siguiendo el protocolo de la sección “Ensayo de fosforilación con <sup>32</sup>PγATP” a continuación, pero utilizando 15 μg de proteína P<sub>100</sub>/fracción de STIL. Se tomaron alícuotas de cada fracción y se agregó *buffer* de fosforilación a una concentración final de 1X. El ensayo comenzó con el agregado de 0,125 μCi de <sup>32</sup>PγATP/reacción al *stock*, mezclando inmediatamente y administrándolo a cada muestra. Luego de la incubación de las muestras por 10 minutos a temperatura ambiente, el ensayo se detuvo con el agregado de *Cracking buffer* 5X. Las muestras se calentaron 3-5 minutos a 100°C, se centrifugaron por 3 minutos a 10.000 xg y las proteínas en los sobrenadantes se separaron por electroforesis desnaturizante en geles de poliacrilamida 8% con SDS (ver sección “Corrida de la segunda dimensión; Electroforesis en geles desnaturizantes de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE)”). Aquellas fracciones que mostraron desfosforilación fueron juntadas y utilizadas en algunos ensayos de geles 2D.

### Cracking buffer 5X:

SDS	10%
Glicerol	50%
β-Mercaptoetanol	25%
Azul de bromofenol	0,004%
Tris-HCl pH 7,4	125 mM

### **Ensayo de fosforilación con <sup>32</sup>PγATP**

Se preparó un *stock* conteniendo 200 μg de proteína P<sub>100</sub>/reacción en 1X de *buffer* de fosforilación. Por otro lado, las muestras con o sin STIL (ya sea de la fracción de purificación de metanol/cloroformo o de DEAE), se llevaron a un mismo volumen final y *buffer* de fosforilación 1X. El ensayo comenzó con el agregado de 0,125 μCi de <sup>32</sup>PγATP/reacción al *stock*, mezclando inmediatamente y administrándolo a cada muestra. Las reacciones se incubaron 10 minutos a temperatura ambiente (25-30°C) y la reacción se detuvo con el agregado de *buffer* SDS 1X y calentamiento a 80°C. Una vez enfriado el microtubo en la mesada, se

agregó un volumen de metanol junto con 0,5 volúmenes de cloroformo. Se mezcló bien y se centrifugó 5 minutos a 12.000 rpm. Se descartó la fase orgánica y se agregó metanol (9 veces el volúmenes de cloroformo inicial). Se volvió a mezclar bien y se centrifugó a 12.000 rpm durante 5 minutos. Finalmente, se descartó el sobrenadante y se procedió tal como se describió anteriormente, con el secado del precipitado y los pasos previos a la corrida de la primera dimensión.

### Buffer de fosforilación 5X:

HEPES	250 mM
MnCl <sub>2</sub>	10 mM
MgCl <sub>2</sub>	10 mM
CaCl <sub>2</sub>	5 mM
DTT	5 mM

Para detectar señal radiactiva se utilizó el sistema de pantalla autorradiográfica la cual se reveló en el aparato 820 *PhosphoImager* (GE Healthcare Life Sciences).

### **Aislamiento de *spots* o bandas de geles de poliacrilamida para secuenciación proteica**

Para dicho aislamiento, el gel de poliacrilamida ya desteñado (de su tinción previa ya sea con azul de *Coomassie* o con nitrato de plata), se enjuagó varias veces con agua desionizada. Posteriormente se lo apoyó sobre un acetato y con un *tip* de 200 µl cortado con tijera, se aislaron los *spots* correspondientes; para ello se hundió la punta del *tip* en la zona del gel donde se encuentra el *spot* de interés y se lo extrajo, tal como se hace con un sacabocado. El fragmento de gel fue introducido en un microtubo de 1,5 ml. En el caso de aislar una banda del gel, la misma fue cortada con el bisturí, e introducida directamente en un microtubo. Los fragmentos de geles fueron conservados a 4°C hasta el momento de ser deshidratados, digeridos con tripsina y luego enviados a secuenciar. Todo este procedimiento fue realizado con guantes sin polvo, ya que el mismo interfiere en la secuenciación.

## **Deshidratación de *spots* o bandas de gel y digestión con tripsina**

### Deshidratación del gel

- Se cortaron los *spots* o las bandas ya escindidas del gel en piezas aún más pequeñas y las mismas fueron mantenidas en tubos de 1,5 ml.
- Se agregó aproximadamente 100 µl (o lo suficiente para cubrir las piezas de gel) de la solución 1 y se agitó por *vortex* durante 10 minutos.
- Se descartó el sobrenadante.
- Se repitió el paso de lavado con 100 µl de solución 1 una o dos veces y se volvió a descartar el sobrenadante en cada caso, hasta que la tinción utilizada en el gel haya desaparecido en el caso de haber teñido con azul de *Coomassie*, o sea más tenue en el caso de tinción con nitrato de plata. Los lavados pudieron también ser llevados a cabo alternando agua desionizada y acetonitrilo.
- Se liofilizaron las piezas de gel hasta un completo secado (aproximadamente 20 minutos).

Solución 1: 25 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$  en 50% acetonitrilo.

Solución 2: 50 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ .

Solución 3: 1:1 acetonitrilo: ácido trifluoroacético 0,5%.

Tripsina: 12,5 ng/µl de tripsina en 50 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$  (diluido en el momento).

### Reducción del gel

- Se realizó luego el paso de reducción, agregando 25 µl de la solución de DTT (o lo suficiente para cubrir las piezas de gel) a las piezas secas. Se agitó por *vortex* y se realizó una centrifugación rápida a máxima velocidad. Se dejó la reacción proceder a 56°C durante 1 hora a temperatura ambiente.
- Se realizó luego el paso de alcalinización, descartando la solución excedente del paso anterior y agregando 25 µl de la solución de IA a las piezas de gel. Se agitó por *vortex* y se realizó una centrifugación rápida a máxima velocidad. Se dejó la reacción proceder durante 45 minutos en oscuridad a temperatura ambiente.

- Se descartó el sobrenadante y se lavaron las piezas de gel con aproximadamente 100 µl de la solución 2 y se agitó por *vortex* y se realizó una centrifugación rápida a máxima velocidad.
- Se descartó el sobrenadante y se deshidrataron las piezas de gel con 100 µl (o lo suficiente para cubrir las piezas de gel) de 25 mM de la solución 1. Se agitó por *vortex*, se centrifugó rápidamente a máxima velocidad y se repitió este paso una vez más.
- Se liofilizaron las piezas de gel hasta un completo secado (aproximadamente 20 minutos). Se procedió con la digestión con tripsina.

Solución de Ditiotretitol (DTT): 10 mM DTT en 50 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>.

Solución de Iodoacetamida (IA): 55 mM de IA en 50 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>.

### Digestión con tripsina

- Se agregó la solución de tripsina (3X volúmenes de muestra) hasta cubrir las piezas de gel (alrededor de 5-10 µl).
- Se rehidrataron las piezas de gel en hielo durante 10 minutos. Se realizó una rápida centrifugación y se descartó el exceso de tripsina que no fue absorbido por las piezas de gel.
- Se agregó solución 2 hasta cubrir las piezas de gel. Se realizó una rápida centrifugación y se incubó a 37°C durante 4 horas.

### Extracción de péptidos

- Se transfirió la solución de digestión a un tubo limpio de 0,5 ml.
- Se transfirió 0,4 µl de la solución de digestión a un tubo de 200 µl y se agregó 0,4 µl de la matriz ácido α-ciano-4-hidroxicinámico 0,4 mg/ml en solución 3.

## **UV-MALDI-TOF MS y UV-MALDI-TOF MS/MS**

La determinación de la presencia de LePRK2 en muestras de polen de tomate, 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 (<http://www.pasteur.edu.uy/UBPA.html>). La muestra se disolvió en agua y las medidas de masa se realizaron en un espectrómetro de masa MALDI TOF/TOF Voyager-DE™ PRO (Applied Biosystems 4800 Analyzer), equipado con un láser de Nitrógeno (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).

Los espectros resultantes (o los picos resultantes de la fragmentación iónica generados por cromatografía líquida-MS/MS) fueron utilizados en el hallazgo de la proteína de interés. Para ello se utilizó el mismo espectrómetro de masa que para realizar MALDI-TOF (ver anteriormente) y la base de datos NCBItr (<ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/blast/db/>), usando el buscador *Mascot* ([www.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com)). La búsqueda fue realizada usando los siguientes parámetros:

- Enzima proteolítica: tripsina.
- Modificación fija: Carbamidometilación de cisterna.
- Modificación variable: Oxidación de metionina.
- Tolerancia de masa peptídica:  $\pm 0,08$  Da.

### Glosario:

ADN: Ácido Desoxirribonucleico.

BSA: Albúmina Sérica Bovina.

BPB: Azul de bromofenol.

CaCl<sub>2</sub>: Cloruro de calcio.

Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>: Nitrato de calcio.

CHAPS: 3-[(3-colamidopropil)-dimetilamino]-propanosulfonato.

c.s.p: cantidad suficiente para.

DMSO: Dimetilsulfóxido.

dNTPs: desoxirribonucleótidos.

DTT: Ditiotreitól.

ECL: *Enhanced Chemiluminescence*.

EDTA: Ácido etilen-diamino-tetraacético.

H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>: Ácido bórico.

IA: Iodoacetamida.

IEF: Isoelectroenfoque.

KCl: Cloruro de potasio.

KNO<sub>3</sub>: Nitrato de potasio.

Kpb: Kilo pares de bases.

LB: Caldo Luria.

Luminol: 3-aminofal hidracida.

NaOH: Hidróxido de sodio.

NP-40: Nonidet P-40.

nm: nanómetros.

MES: Ácido 2-(N-morfolino) etanosulfónico.

MgCl<sub>2</sub>: Cloruro de magnesio.

MgSO<sub>4</sub>: Sulfato de magnesio.

mm: milímetros.

mm Hg: milímetros de mercurio.

(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>: Carbonato de amonio.

(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: Sulfato de amonio.

MnCl<sub>2</sub>: Cloruro de manganeso.

NaCl: Cloruro de sodio.

o.n: toda la noche.

Pb: Pares de bases.

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa.

PBS: Solución salina de fosfato.

PEG: Polietilenglicol.

*PFU: Pyrococcus furiosus.*

SDS: Dodecil sulfato de sodio.

SDS-PAGE: Electroforesis en Geles de Poliacrilamida.

TAE: Solución salina de Tris-ácido acético-EDTA.

TBS: Solución salina de Tris.

Tris-HCl: Solución salina de Tris con ácido clorhídrico.

UV: Ultravioleta.

## RESULTADOS

### **Análisis fenotípico de tubos polínicos sobreexpresantes de LePRK2-eGFP y mLePRK2-eGFP en el crecimiento del tubo polínico y en la dinámica de actina**

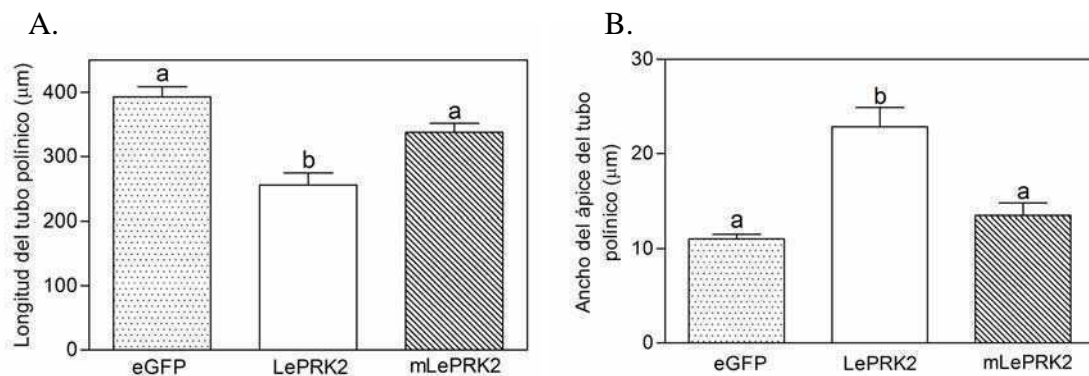
Con el fin de determinar los sitios de fosforilación de LePRK2 posiblemente involucrados en la regulación de la germinación del tubo polínico, nos basamos en la técnica de mutagénesis dirigida de LePRK2 y posterior transfección transitoria con las construcciones obtenidas de granos de polen de tabaco. Para los ensayos de biobalística utilizamos granos de polen de tabaco y no de tomate, ya que aquellos son más fáciles de transfectar que los de tomate y además, de una misma flor se obtiene mayor cantidad de polen. Por otro lado, los tubos polínicos de tabaco crecen más rápido que los de tomate y son más tolerantes a la irradiación lumínica importante para la obtención de imágenes en el microscopio. Es importante remarcar que la transfección transitoria es un sistema robusto y ampliamente utilizado por la gran mayoría de los laboratorios que estudian el crecimiento del tubo polínico (Lee *et al.*, 2008; Klahre *et al.*, 2006; Gu *et al.*, 2005; Cheung *et al.*, 2003; Kost *et al.*, 1999), aún los que trabajan con polen de *Arabidopsis thaliana* (Zhang *et al.*, 2007).

### **LePRK2, pero no mLePRK2, reduce el crecimiento del tubo polínico e induce el engrosamiento de su ápice**

Antes de analizar las mutantes de sitios de fosforilación de LePRK2, nos abocamos a caracterizar el sistema de trabajo, estudiando de qué manera la sobreexpresión de LePRK2 afecta la morfología de los tubos polínicos. Se ha visto anteriormente que tubos polínicos que sobreexpresan transitoriamente LePRK2-eGFP muestran ápices globosos o *balloon tips* (Zhang *et al.*, 2008). Para dicho estudio utilizamos la construcción pLAT52-LePRK2-eGFP en la cual el gen correspondiente a LePRK2 está fusionado al gen reportero eGFP bajo el promotor LAT52 de tomate que presenta una fuerte y específica expresión en polen (Zhang *et al.*, 2007). Como control negativo utilizamos la construcción pLAT52-eGFP. Para determinar si la actividad quinasa de LePRK2 era relevante para la obtención de los posibles fenotipos, usamos la construcción pLAT52-mLePRK2-eGFP. La misma corresponde a una versión mutada

de LePRK2, en donde la lisina 372 del subdominio II del dominio quinasa (K372) en la construcción pLAT52-LePRK2-eGFP está sustituida por alanina. En las proteínas quinasa previamente analizadas, se ha demostrado que esta lisina es esencial para la actividad quinasa (Hanks y Hunter., 1995). En nuestro caso, el dominio citoplasmático de LePRK2 con dicha lisina mutada, no mostró actividad quinasa *in vitro*, (Muschiatti *et al.*, 1998). Además por medio de ensayos de coimmunoprecipitación, se demostró que dicha lisina de LePRK2 también es necesaria para su interacción con LePRK1 (Wengier *et al.*, 2003).

Para analizar el papel de LePRK2 durante el crecimiento del tubo polínico se realizaron ensayos de bombardeo con las tres construcciones descritas anteriormente. Los datos correspondientes a diferentes eventos de transfección transitoria fueron cuantificados y volcados en la siguiente figura:



**Fig. 13: LePRK2 y no mLePRK2 reduce el crecimiento del tubo polínico e induce engrosamiento de su ápice.**

Longitud del tubo polínico (A) y ancho del ápice (B) de tubos bombardeados con pLAT52-eGFP, pLAT52-LePRK2-eGFP o pLAT52-mLePRK2-eGFP. Distintas letras indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ). Los datos corresponden al promedio  $\pm$  ES de tres réplicas experimentales.

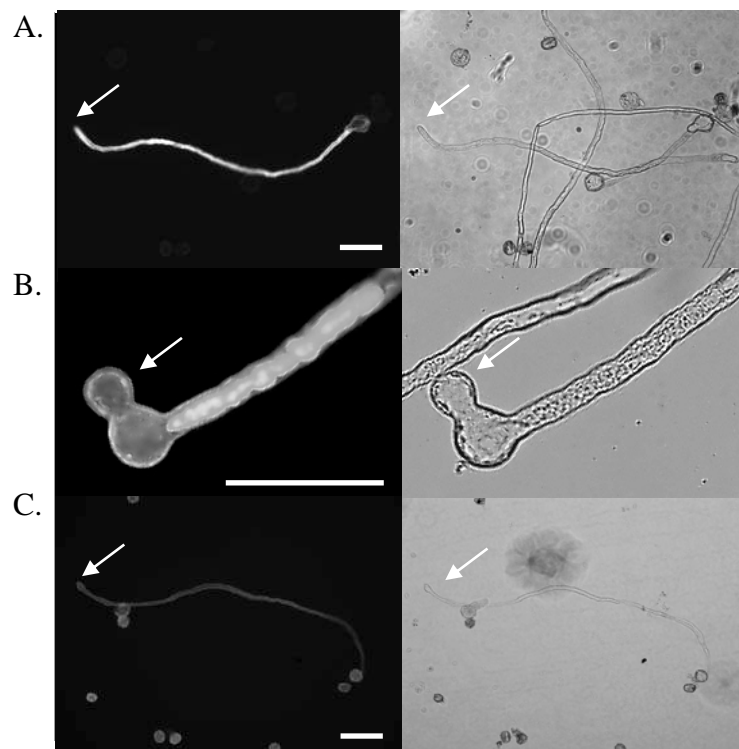
En la figura 13 se observa que la longitud del tubo polínico en tubos que sobreexpresan LePRK2-eGFP (en todas sus intensidades de fluorescencia de GFP) disminuye significativamente, mientras que a su vez el ancho del ápice del tubo aumenta también significativamente (fenotipo *balloon tip*), comparándolo en ambos casos con tubos polínicos que sobreexpresan eGFP. Esto sugiere que la sobreexpresión de LePRK2 genera un crecimiento isotrópico del tubo polínico similar al inducido por AtRop1 (*Arabidopsis Rho-related GTPase from plants*) (Li *et al.*, 1999), AtRop9 (Cheung *et al.*, 2003; Vernoud *et al.*, 2003), NtRop4 (*Nicotiana tabacum* ROP4)



(Klahre *et al.*, 2006), PiCDPK1 (*Petunia Calmodulin-like Domain Protein Kinase1*) (Yoon *et al.*, 2006) y LeKPP (*Lycopersicum esculentum Kinase Partner Protein*) (Kaothien *et al.*, 2005).

Como se aclaró anteriormente, con el fin de determinar si la actividad quinasa de LePRK2 era relevante para los fenotipos descritos anteriormente, se sobreexpresó también la mutante mLePRK2-eGFP en polen de tabaco. A diferencia de los tubos polínicos sobreexpresantes de LePRK2-eGFP, se observó que los tubos polínicos sobreexpresantes de mLePRK2-eGFP eran estadísticamente similares en largo y ancho a los tubos sobreexpresantes de eGFP, registrando tubos largos con ápices angostos (Figura 13).

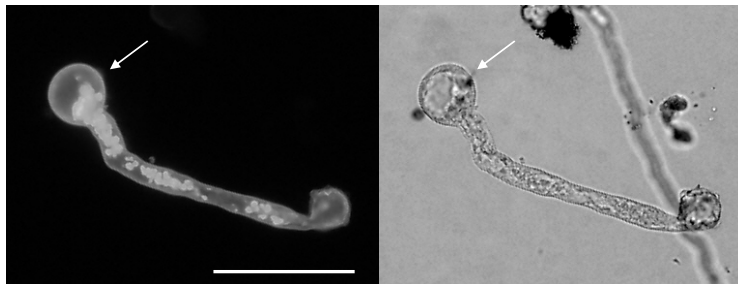
En la figura 14 se observa que mientras que los tubos control sobreexpresantes de eGFP eran similares a los tubos no transformados (dato no mostrado), aquellos que sobreexpresaban LePRK2-eGFP, poseían ápices globosos. La mayoría de los tubos con ápices globosos también mostraron una o más vacuolas que ocupaban la mayoría del volumen del ápice del tubo (Figura 15); esto también se observó en tubos que sobreexpresaban LeKPP (Kaothien *et al.*, 2005) y AtRop9 (Cheung *et al.*, 2003).



**Fig. 14: Los tubos LePRK2 muestran un ápice engrosado (*balloon tip*).**

Representación de tubos polínicos germinados *in vitro* de (A) eGFP (B) LePRK2-eGFP y (C) mLePRK2-eGFP. La barra de escala representa 100  $\mu$ m. Las flechas indican el ápice del tubo. Canal GFP (panel de la izquierda) y luz blanca (panel de la derecha).

En todos los tubos polínicos que expresaban LePRK2-eGFP, la proteína siempre estaba localizada en la membrana plasmática del tubo polínico, predominantemente en el ápice, zona subapical y nuclear (Figuras 14 y 15) (Muschiatti *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 2002). En algunos casos de alta sobreexpresión, LePRK2-eGFP estaba localizada en compartimentos citoplasmáticos vesiculares (Figuras 14 y 15). Esta compartimentalización de la proteína podría ser una forma que tienen los tubos polínicos, como cualquier otra célula, de ajustarse a los cambios producidos por los altos niveles de expresión del gen introducido (Gong *et al.*, 1996). Esta localización vesicular es similar a la obtenida en tubos polínicos tratados con Brefeldina A (BFA), una droga que inhibe el reciclaje de proteínas internas a la membrana (Cheung *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2005).

**Fig. 15: Alta vacuolización y *balloon tip* en tubos LePRK2 con alto nivel de expresión.**

Representación de tubos polínicos germinados *in vitro* de LePRK2-eGFP. La barra de escala representa 100  $\mu$ m. La flecha indica el ápice del tubo. Canal GFP (panel de la izquierda) y luz blanca (panel de la derecha).

En algunos casos en tubos sobreexpresantes de LePRK2-eGFP, luego de la aparición de *balloon tip*, los tubos polínicos continuaron creciendo lateralmente, definiendo un nuevo ápice, exhibiendo la pérdida de crecimiento polarizado, resultando en tubos con ápice de “palo de *hockey*” (Figuras 14 B y 16); este fenotipo también fue observado al sobreexpresar AtRop9 (Cheung *et al.*, 2003) y PiCDPK1/DN (Dominante negativo de PiCDPK1; Yoon *et al.*, 2006).

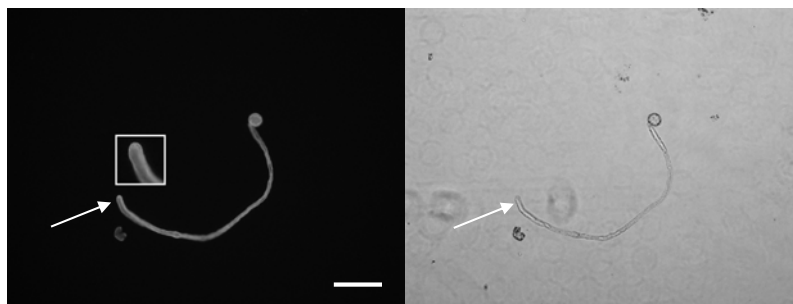


**Fig. 16: Pérdida del crecimiento polarizado en tubos LePRK2.**

Representación de tubos polínicos germinados *in vitro* de LePRK2-eGFP. La barra de escala representa 100  $\mu\text{m}$ . La flecha indica el ápice del tubo. Canal GFP (panel de la izquierda) y luz blanca (panel de la derecha).

En todos los casos, se observó una correlación entre los niveles de expresión de LePRK2-eGFP y la severidad de los fenotipos. Tubos polínicos con alto nivel de fluorescencia eran aquellos que mostraban severos engrosamientos del ápice y además el crecimiento de los mismos era arrestado en estadios tempranos de la germinación. Sin embargo, tubos LePRK2-eGFP con baja intensidad de fluorescencia también eran más cortos y con el ápice más ancho comparados con tubos eGFP. Como era de esperar, los tubos eGFP no se encontraron influenciados por los niveles de intensidad y su crecimiento fue similar al de los tubos no transformados (dato no mostrado).

Por otro lado, al igual que ocurrió con los tubos LePRK2-eGFP, todos los tubos mLePRK2-eGFP mostraron una localización de dicha proteína en membrana plasmática (ver *inset* de la figura 17), indicando que la pérdida del fenotipo aberrante no se debe a una diferente localización de mLePRK2 con respecto a LePRK2. Todos estos resultados indican que la actividad quinasa de LePRK2 es necesaria para el mantenimiento del crecimiento polarizado de los tubos polínicos. Una situación similar se registró cuando el ortólogo de LePRK2 en *Arabidopsis thaliana*, AtPRK2a, se sobreexpresó en polen de tabaco, obteniéndose tubos con ápice más ancho que los correspondientes a su versión mutante (mAtPRK2a) en la misma lisina del subdominio II (Zhang *et al.*, 2007).



**Fig. 17: El crecimiento despolarizado de LePRK2 es anulado por la mutante defectiva en actividad quinasa (mLePRK2).**

Representación de tubos polínicos germinados *in vitro* de mLePRK2-eGFP. La barra de escala representa 100  $\mu\text{m}$ . Las flechas indican el ápice del tubo. El *inset* de la figura muestra el ápice de un tubo polínico sobreexpresante de mLePRK2-eGFP. Canal GFP (panel de la izquierda) y luz blanca (panel de la derecha). Esta figura junto con la 14 C, son ejemplos de tubos polínicos de la mutante mLePRK2-eGFP.

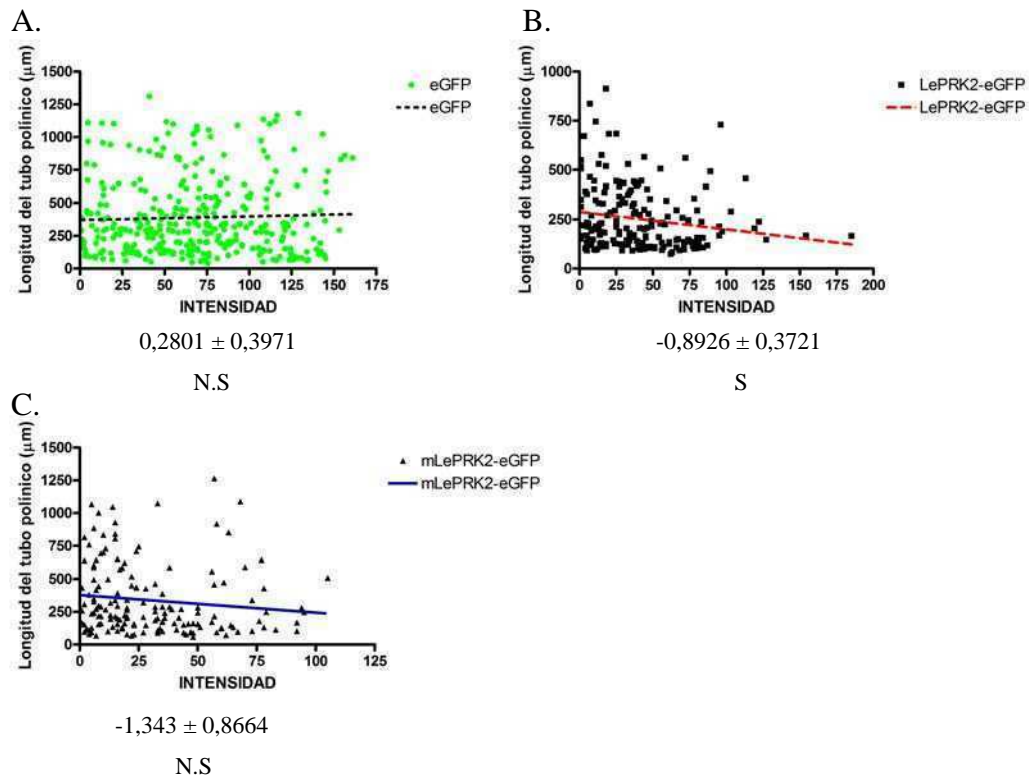
El aumento de la relación ancho/largo es una medida del crecimiento isotrópico de los tubos polínicos (Fu *et al.*, 2001a; Gu *et al.*, 2005). Como se muestra en la tabla 1, debido a que los tubos sobreexpresantes de LePRK2-eGFP poseen ápices más anchos y una longitud menor que los que sobreexpresan eGFP o mLePRK2-eGFP, la relación ancho/largo es mayor para los tubos LePRK2-eGFP que para los sobreexpresantes de eGFP y de mLePRK2-eGFP.

	Largo ( $\mu\text{m}$ )	Ancho ( $\mu\text{m}$ )	Ancho/Largo
GFP	392,71 $\pm$ 15,98	11,04 $\pm$ 0,47	0,028
LePRK2-GFP	255,46 $\pm$ 18,88	22,83 $\pm$ 2,05	0,089
mLePRK2-GFP	337,85 $\pm$ 13,77	13,47 $\pm$ 1,32	0,039

**Tabla 1: Tabla comparativa de largo y ancho de tubos eGFP, LePRK2-eGFP y mLePRK2-eGFP.**

El largo del tubo polínico y el ancho del ápice de LePRK2-eGFP, son significativamente diferentes a los de los tubos de eGFP y mLePRK2-eGFP ( $p < 0,05$ ). Los datos corresponden al promedio  $\pm$  ES de las tres réplicas experimentales de la figura 13.

Con el fin de visualizar la distribución de longitudes y anchos del tubo polínico en función de la intensidad, se realizaron gráficos de distribución que se muestran a continuación (los datos son equivalentes a los de la figura 13 A, pero mostrados individualmente cada valor de longitud de tubos polínicos en función a la intensidad de fluorescencia):



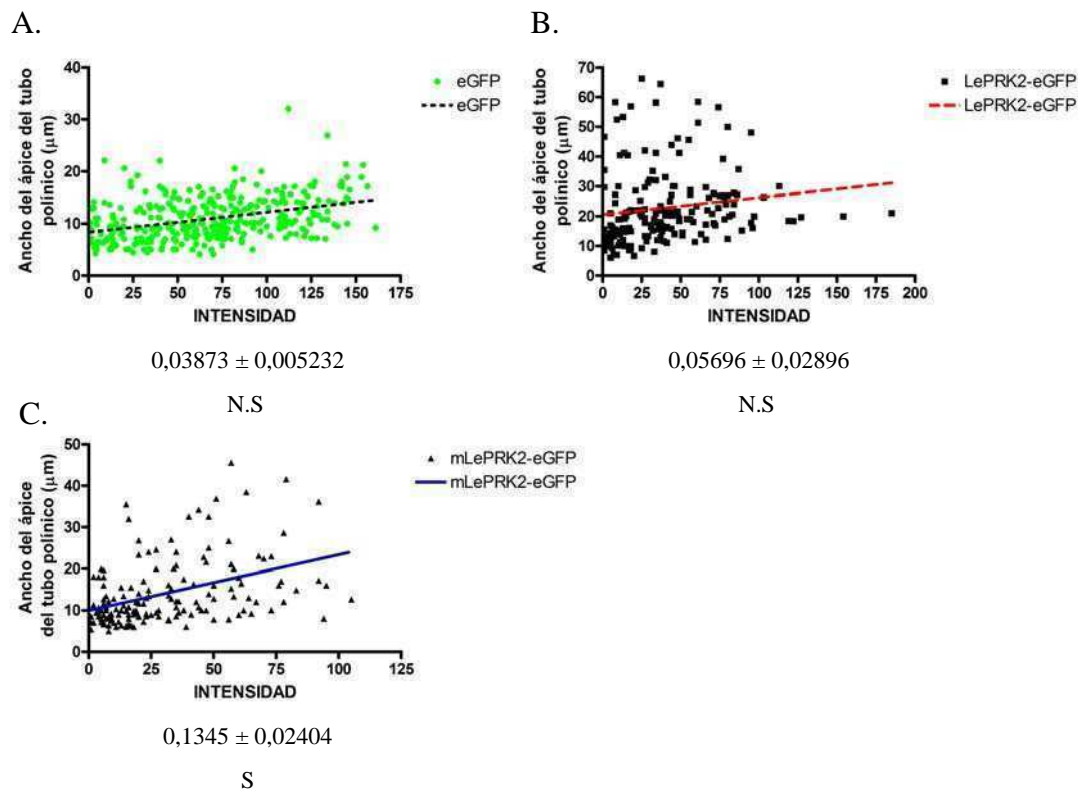
**Fig. 18: Distribución de longitudes de tubos polínicos en función de la intensidad de fluorescencia de tubos de eGFP, LePRK2-eGFP y mLePRK2-eGFP.**

Regresión lineal de longitudes de tubos polínicos. (A) eGFP, (B) LePRK2-eGFP y (C) mLePRK2-eGFP. Los puntos en cada gráfico corresponden a datos individuales de longitud de tubo polínico. La letra S indica pendiente “significativa” y las N.S, “no significativa”, y se indica en número, la pendiente de la curva con su error estándar.

Los tres gráficos muestran el análisis del largo del tubo polínico en función de la intensidad de fluorescencia, en donde cada punto corresponde a un valor experimental. La regresión lineal de los tubos sobreexpresantes de eGFP y de mLePRK2-eGFP no posee una pendiente significativa, a diferencia de la pendiente para los tubos sobreexpresantes de LePRK2-eGFP. Se puede observar que para los tubos sobreexpresantes de LePRK2-eGFP y de mLePRK2-eGFP, la mayor población se localiza a bajas intensidades de fluorescencia aunque es evidente que a mayores intensidades los tubos LePRK2-eGFP son más cortos. Por otro lado, tal como fue descrito anteriormente, los tubos polínicos sobreexpresantes de mLePRK2-eGFP eran más largos que los tubos LePRK2-eGFP. En cambio, la longitud de los tubos eGFP tenía una distribución menos marcada, ya que se observaron tubos sobreexpresando eGFP con longitudes variables independientemente de la intensidad.

En la figura 19 se muestra el análisis de la distribución de puntos del ancho del

ápice del tubo en función a la intensidad de fluorescencia (los datos son equivalentes a los de la figura 13 B).



**Fig. 19: Distribución de anchos de tubos polínicos en función de la intensidad de fluorescencia de tubos de eGFP, LePRK2-eGFP y mLePRK2-eGFP.**

Regresión lineal de anchos del ápice de tubos polínicos (A) eGFP, (B) LePRK2-eGFP y (C) mLePRK2-eGFP. Los puntos en cada gráfico corresponden a datos individuales de ancho de tubo polínico. La letra S indica pendiente “significativa” y las N.S, “no significativa” y se indica en número, la pendiente de la curva con su error estándar.

En la figura 19 se observa que a baja intensidad, los ápices de los tubos que sobreexpresan LePRK2-eGFP son en general más anchos que los tubos sobreexpresantes de eGFP y de mLePRK2-eGFP.

La mayoría de los análisis de transfecciones transitorias hechos por otros laboratorios de investigación son realizados en un período de 5-6 horas de germinación (Fu *et al.*, 2001a). En cambio, todos nuestros experimentos fueron realizados germinando el polen a 10 horas con el fin de aumentar el número de tubos polínicos fluorescentes. Para corroborar que los fenotipos observados no eran función del mayor tiempo de germinación, repetimos los experimentos de sobreexpresión de LePRK2-eGFP, LePRK2-eGFP y eGFP, con un tiempo de germinación de 5 horas, siendo el

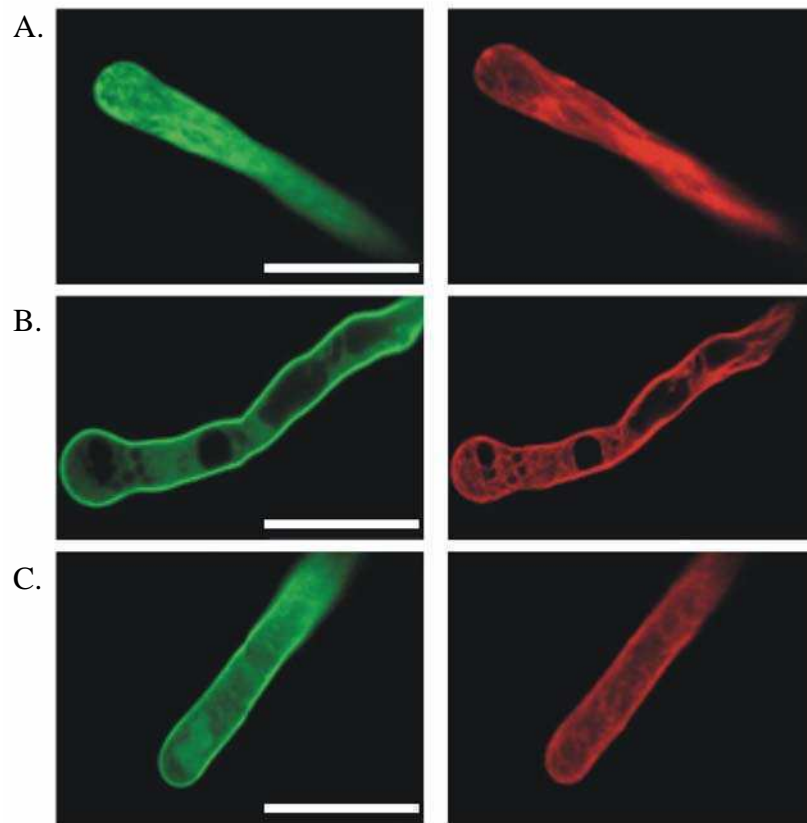
resultado el mismo que obtuvimos para la germinación a 10 horas (resultados no mostrados).

### **La sobreexpresión de LePRK2 influencia la dinámica de actina**

Como describimos en la introducción, la zona apical del tubo polínico es importante para la modulación del crecimiento del tubo, dado que controla la tasa de fusión de las vesículas (Zonia y Munnik., 2008) y la organización local del citoesqueleto (Vidali y Hepler., 2001). Es por esto que quisimos analizar si el citoesqueleto de actina se veía afectado en los tubos polínicos transfectados con LePRK2. Para visualizar la dinámica de actina en los tubos polínicos, sobreexpresamos transitoriamente en polen de tabaco la construcción pLAT52-mRFP-mTalina junto a cada una de las tres construcciones por separado, descritas anteriormente. La talina (en este caso de ratón) es una proteína abundante del citoesqueleto que “decora” cables axiales y es utilizada comunmente como indicadora de la localización y dinámica del citoesqueleto de actina (Kost *et al.*, 1998).

Tal como se ha descrito anteriormente (Kost *et al.*, 1998; Vidali y Helper., 2001; Zheng y Yang., 2000), observamos que el citoesqueleto de actina en tubos polínicos transfectados con el control negativo pLAT52-eGFP (Figura 20 A), mostró una deposición longitudinal al eje de crecimiento del tubo, excluyéndose de la zona apical. Sin embargo, la sobreexpresión de LePRK2-eGFP junto con mRFP-mTalina, genera una organización diferente de la actina. Esta se extiende al ápice engrosado del tubo polínico (Figura 20 B). En el caso de ápices globosos que mostraron una o más vacuolas, los filamentos de actina localizaron alrededor de estas vacuolas. Por otro lado, la construcción pLAT52-mLePRK2-eGFP mostró una localización más cercana a la normal de actina (Figura 20 C), observándose en el tubo filamentos que terminan cerca del ápice, similar al de los tubos control que sobreexpresaban eGFP.

Es importante aclarar que la sobreexpresión de mTalina junto con LePRK2-eGFP o con mLePRK2-eGFP no afectó la localización de LePRK2-eGFP en la membrana plasmática del tubo; del mismo modo, aquellos tubos que sobreexpresaban eGFP siguieron registrando una localización citoplasmática de eGFP. Por otro lado la sobreexpresión de mTalina tampoco modificó el crecimiento y la morfología de los tubos polínicos.

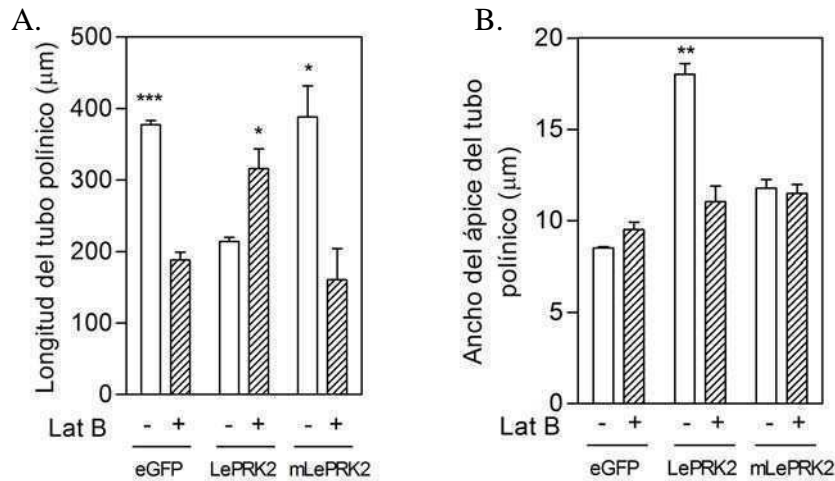


**Fig. 20: LePRK2, pero no mLePRK2, induce una estable red de actina en el ápice del tubo polínico.**

Representación de tubos polínicos germinados *in vitro* de (A) eGFP, (B) LePRK2-eGFP o (C) mLePRK2-eGFP, co-expresados en forma transitoria con mRFP-mTalina en polen de tabaco y visualizados utilizando microscopio confocal: canal GFP (panel de la izquierda) y RFP (panel de la derecha). La escala de barra representa 100  $\mu\text{m}$ .

Para analizar si el crecimiento despolarizado del tubo polínico está directamente causado por la sobreexpresión de LePRK2, hemos utilizado Latrunculina B (Lat B), una droga que promueve la despolimerización de filamentos de actina secuestrando sus monómeros (Gibbon *et al.*, 1999). Los tubos transfectados con cada una de las tres construcciones anteriormente analizadas fueron incubados por 4 horas con Lat B a una concentración de 5 nM (ver Materiales y Métodos), concentración utilizada para bloquear el crecimiento del tubo polínico sin afectar su morfología (Gibbon *et al.*, 1999).





**Fig. 21: La Latrunculina B revierte la inhibición sobre la longitud del tubo causada por la sobreexpresión de LePRK2.**

Efectos de Latrunculina B (Lat B) en la longitud (A) y en el ancho del ápice (B) de tubos polínicos que sobreexpresan eGFP, LePRK2-eGFP y mLePRK2-eGFP. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  y \*\*\* $p < 0,001$ . Los datos corresponden al promedio  $\pm$  ES de tres réplicas experimentales.

- Observamos que en presencia de Lat B se revirtió la inhibición de la longitud del tubo polínico causada por la sobreexpresión de LePRK2-eGFP. Por otro lado, los tubos que sobreexpresaron mLePRK2-eGFP o eGFP mostraron ambos la lógica disminución de la longitud debido a la acción de Lat B sobre la despolimerización de actina. Por otro lado, tal como fue descrito anteriormente (Gibbon *et al.*, 1999), el tratamiento con Lat B 5 nM no afectó el ancho del ápice de los tubos control que sobreexpresaban eGFP. En cambio, para los tubos sobreexpresantes de LePRK2-eGFP, se observó una disminución del ancho de su ápice; esto es debido a que la despolimerización de actina ocasionada por la droga, hizo disminuir la formación de ápices globosos. Para el caso de tubos sobreexpresantes de mLePRK2-eGFP, comprobamos que no se afectó el ancho de los tubos sometidos a la droga. Todos estos resultados sugieren que LePRK2 está involucrada en el crecimiento del tubo polínico a través de la regulación de la dinámica de los filamentos de actina. La despolimerización de actina (causada por Latrunculina B) en tubos LePRK2-eGFP revierte el fenotipo despolarizado de tubos cortos y engrosamiento del ápice, contrarrestando los efectos extremos de los tubos LePRK2-eGFP.

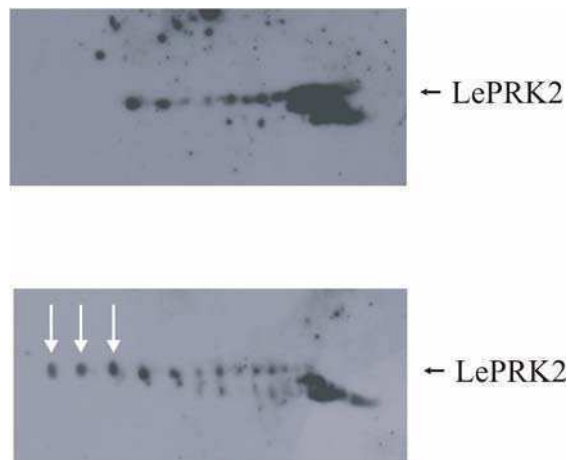
## **LePRK2 se encontraría hiperfosforilada en microsomas de polen de tomate**

Hemos visto que la lisina 372 de LePRK2 resultó esencial para la actividad quinasa de este receptor (Muschietti *et al.*, 1998). Por otro lado hemos mostrado previamente que LePRK2 se halla fosforilada en microsomas de polen de tomate (Muschietti *et al.*, 1998; Wengier *et al.*, 2003). En esta tesis, hemos demostrado que la lisina 372 es necesaria para el mantenimiento del crecimiento polarizado de los tubos polínicos (figuras 13, 20 y 21). Para estudiar más en detalle la importancia del estado de fosforilación de LePRK2 en microsomas de polen de tomate, utilizamos la técnica de electroforesis de geles en dos dimensiones (geles 2D). Para ello decidimos separar mediante geles 2D muestras de fracción de proteínas microsomales de polen maduro de tomate y luego someterlas a *western blot* utilizando anticuerpos policlonales específicos anti-LePRK2 (Muschietti *et al.*, 1998). Otro gel 2D fue corrido en forma paralela con una muestra de polen tratada con *lambda* fosfatasa, enzima que remueve inespecíficamente los fosfatos de los residuos fosforilados. Utilizamos inicialmente *strips* de pI de 3-10 dado que el pI teórico de LePRK2 es de 7,58 (calculado utilizando el *software* de la página [http://www.expasy.ch/cgi-bin/pi\\_tool](http://www.expasy.ch/cgi-bin/pi_tool)). Igualmente, decidimos probar con *strips* de rango de pI de 4-7 con el objetivo de obtener una mayor separación de las isoformas de LePRK2 que permitiera el aislamiento de cada *spot* y su posterior secuenciación. No observamos diferencias en lo que respecta al número de *spots* con respecto a la utilización de *strips* de 3-10, por lo que continuamos los análisis con el rango de 4 a 7.

Tal como se observa en la figura 22, LePRK2 se encontraría hiperfosforilada en microsomas de polen maduro de tomate. Teniendo en cuenta el total de los geles corridos de muestras independientes, hemos llegado a contabilizar un promedio de 38 *spots*. La presencia de un elevado número de *spots* sugiere que diversos residuos de LePRK2 se fosforilarían diferencialmente. El patrón observado en el gel 2D puede ser descrito como un “collar de perlas” dispuesto horizontalmente, en el cual cada perla correspondería a una isoforma diferente de LePRK2.

Es posible que estos *spots* correspondan no sólo a isoformas fosforiladas de LePRK2, sino a otras modificaciones post-traduccionales, tales como glicosilación

(Mills *et al.*, 2001; Dai *et al.*, 2006), acetilación (Wang *et al.*, 2006) y desaminación (Haugen *et al.*, 2008).



**Fig. 22: LePRK2 se encontraría hiperfosforilada en fracciones de proteínas microsomales de polen maduro.**

Fracciones de membrana de polen maduro (200  $\mu$ g) fueron incubadas sin (panel superior) o con (panel inferior)  $\lambda$ -fosfatasa, separadas en geles 2D (*strip* utilizado de pH 4-7) y reveladas con anticuerpo anti-LePRK2. El extremo ácido del gel (pH 4) corresponde a la derecha de cada panel. Las flechas (panel inferior) muestran nuevos *spots* observados luego del tratamiento con  $\lambda$ -fosfatasa.

Cuando la muestra fue tratada con  $\lambda$ -fosfatasa se pudo observar la aparición de nuevos *spots* en la zona alcalina (ver flechas en la figura 22, panel inferior) en comparación con las fracciones microsomales no tratadas con la enzima (Figura 22, panel superior). Estos nuevos *spots* corresponderían a isoformas de LePRK2 que se encontraban fosforiladas previo al tratamiento con la fosfatasa; por otro lado, los *spots* que no modificaron su posición posiblemente correspondan a otro tipo de modificaciones post-traduccionales o a isoformas fosforiladas cuyos grupos fosfatos no fueron completamente removidos. De igual manera, la intensidad de los *spots* más ácidos disminuye en cantidad e intensidad luego del tratamiento. Esto indicaría que hay por lo menos varias isoformas fosforiladas de LePRK2 en membrana de polen.

Debido a que la fosforilación es un proceso post-traduccionales y subestequiométrico, es decir, que no todas las copias de una dada proteína se fosforilan simultáneamente, la detección y cuantificación de sitios poco abundantes de fosforilación es técnicamente difícil. Igualmente, es importante conocer dichos sitios de fosforilación, ya que los mismos deberían afectar las propiedades de LePRK2, así como su actividad, interacción con otras proteínas y el contexto celular en el cual realiza su

función.

## **Determinación y análisis de posibles sitios de fosforilación de LePRK2 responsables de cambios fenotípicos en la germinación del tubo polínico**

Con el fin de analizar de qué manera diversos residuos fosforilables de LePRK2 son capaces de regular el crecimiento del tubo polínico, hemos empleado una estrategia que comprende la identificación y posterior evaluación fisiológica de dichos residuos. Esta estrategia comprendió inicialmente el uso de modelos computacionales con el fin de predecir cuáles son los residuos potencialmente fosforilables de LePRK2, seguida de la mutagénesis dirigida de dichos residuos y la expresión de estas mutantes de manera transitoria en polen maduro de tabaco.

Los algoritmos correspondientes a los modelos computacionales, predicen dentro de la secuencia de LePRK2 cuáles son los residuos más factibles (con más alto *score*) de ser fosforilados. Para dicho fin hemos utilizado dos programas:

1) Netphos 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>) cuyo objetivo es predecir estados generales de fosforilación de una proteína basados en una serie de sitios fosforilados experimentalmente validados (Blom *et al.*, 1999). La información se halla en una base de datos, *Phosphobase* (<http://www.cbs.dtu.dk/databases/PhosphoBase/>).

2) GPS 2.0 (*Group-based Phosphorylation Scoring*; [http://973-proteinweb.ustc.edu.cn/gps/gps\\_web/](http://973-proteinweb.ustc.edu.cn/gps/gps_web/)) que es capaz de predecir los sitios de fosforilación en proteínas para 71 diferentes grupos de proteínas quinasas (Xue *et al.*, 2005).

También basamos nuestra decisión sobre qué residuos mutagenizar en un análisis comparativo (utilizando *Clustal X*; <http://www.clustal.org/>) de la secuencia aminoacídica de los dominios citoplasmáticos de LePRK2 y la secuencia parcial de sus ortólogos en especies de tomate salvaje (*Solanum pennellii* y *Solanum pimpinellifolium*), tabaco (*Nicotiana tabacum*) y papa (*Solanum tuberosum*) (Kim *et al.*, 2002) (Figura 23).

Tomando en cuenta sólo los residuos con más alto *score* obtenidos a partir de ambos programas y los resultados del análisis comparativo de secuencias, seleccionamos los siguientes ocho residuos de serinas (S) o treoninas (T) de LePRK2 (Figura 23):

- S277, S279, S282 (ubicados dentro de lo que definimos como motivo I del dominio yuxtamembrana).
- S304, S307, T308 (ubicado dentro de lo definido como motivo II del dominio yuxtamembrana).
- T358 y S396 (dentro del dominio quinasa).

Las ocho mutaciones se observan sombreadas en negro en la figura 23:

	258	MOTIVO I	MOTIVO II	316
LePRK2	NRRNKNH-QQEVVLC	<b>GSSLTSSSPTSQ</b>	<b>SSAAST</b>	PDACNDG
LpimpPRK2	NRRNKDH-QQEVVLGGSSLTSSSPTSQDQKLI	QSHDHLNKMEQGQSSAAST	PDACNDG	
LpenPRK2	NRRNKNH-QQEVVLGGSSLTSSSPTSQDQKLI	QSHDHLNKMEQGQSSAAST	PDACNDG	
StPRK2	-RRKKNL-QQEVVLGGSSLS	SSSPTSQDQKLI	QSHDHLNKMEQGQSSAAST	PDRASNDG
NtPRK2	TRRKNNSQQEVTL-GSSNV--SPTTHEPKL--TSAD-LNKLEQGQV-AAS-PDR-SND-			
	317			* 376
LePRK2	GKRAEVAGQKLLFLKDDIEKFDLPDLLKASAEVLGSGVFGS	<b>T</b>	YKAALSTGPMVVKFRH	
LpimpPRK2	GKRAEVAGQKLLFLKDDIEKFDLPDLLKASAEVLGSGVFGS	TYKAALSTGPMVVKFRH		
LpenPRK2	GKRAEVAGQKLLFLKDDIEKFDLPDLLKASAEVLGSGVFGS	TYKAALSTGPMVVKFRH		
StPRK2	GKRAEVAGQKLLFLKDDIEKFDLPDLLKASAEVLGSGVFGS	TYKAALSTGPMVVKFRH		
NtPRK2	GKRAEQ-GQKLLFLKDDIEKFDLPDLLKASAEVLGSGVFGS	TYKAALSTGPMVVKFRH		
	377			405
LePRK2	MNKVGKEDFHEHMRRLGRL	<b>S</b>	HKNLLPVIA	
LpimpPRK2	MNKVGKEDFHEHMRRLGRL	SHKNLLPVIA		
LpenPRK2	MNKVGKEDFHEHMRRLGRL	SHKNLLPVIA		
StPRK2	MNKVGKEDFHEHMRRLGRL	SHKNLLPVIA		
NtPRK2	MNKVGKEDFHEHMRRLGRL	SHKNLLPVLA		

**Fig. 23: Alineamiento de ortólogos putativos de LePRK2.**

Le, *S. lycopersicum*; Lpimp, *S. pimpinellifolium*; Lp, *S. pennellii*; St, *S. tuberosum*; Nt, *N. tabacum*. Los números por encima de las secuencias están en referencia a la secuencia aminoacídica de LePRK2. Los residuos seleccionados para mutagénesis aparecen resaltados en negro. Los motivos I y II se muestran a través de cajas. Los subdominios I y II del dominio quinasa están subrayados respectivamente. La lisina 372 (K372), el residuo mutado en la construcción mLePRK2 del subdominio II, aparece remarcada con un asterisco.

De los ocho residuos seleccionados, los seis primeros se encuentran en el dominio yuxtamembrana que está descrito para otros receptores quinasas como una zona altamente fosforilable y regulatoria de la propia actividad (Hubbard., 2004). Tal es el caso del receptor de efrina Eph, el cual contiene en su dominio yuxtamembrana dos tirosinas necesarias para la transfosforilación y así, la posterior unión de otras proteínas, permitiendo el direccionamiento axonal (Hubbard., 2004). También se ha visto que cuando se muta un residuo de tirosina en la región yuxtamembrana del receptor específico de músculo MUSK, se pierde la unión de su ligando y su autofosforilación, impidiendo la formación de sinapsis neuromuscular (Hubbard., 2004). Por otro lado, el receptor TGF- $\beta$ R I posee dos serinas en el dominio yuxtamembrana que al autofosforilarse recluta proteínas Smad, regulando la expresión génica (Pawson., 2004).

A continuación se muestran los *scores* correspondientes al programa Netphos 2.0 para las serinas y treoninas de LePRK2 de los dominios yuxtamembrana (JMD) y quinasa (KD). En negrita se destacan aquellos seleccionados para mutagenizar:

-Predicciones de sitios de serina:

Nombre	Posición	Contexto	Score
LePRK2	273	VLGGSSSLTS	0,006
LePRK2	274	LGGSSLTSS	0,095
LePRK2	277	SSLT <b>SS</b> SPT	0,967
LePRK2	278	SLTSS <b>S</b> SPTS	0,054
LePRK2	279	LTSS <b>S</b> SPTSQ	0,993
LePRK2	282	SSPT <b>S</b> QDQK	0,963
LePRK2	291	LIPQSHDHL	0,023
LePRK2	303	EQGQSSAAS	0,068
LePRK2	304	QGQSSA <b>A</b> ST	0,848
LePRK2	307	SSA <b>A</b> STPDR	0,983
LePRK2	346	LLKASAEVL	0,432

-Predicciones de sitios de treonina:

Nombre	Posición	Contexto	Score
LePRK2	276	GSSLTSS <b>S</b> SP	0,176
LePRK2	281	SSSPTSQDQ	0,045
LePRK2	308	SAAS <b>T</b> PDRA	0,974

**Fig. 24: Resultados de predicciones de sitios de fosforilación por Netphos 2.0.**

El *score* se define de 0-1. En negrita se destacan aquellos seleccionados para el análisis de mutagénesis. Los asteriscos indican la posición del residuo analizado y los números de posición, el aminoácido de LePRK2.

Luego de haber seleccionado los residuos a estudiar, llevamos a cabo la mutagénesis dirigida en LePRK2 reemplazando las serinas (S) y/o treoninas (T) correspondientes por alanina (A) bloqueando así los potenciales sitios aceptores de los grupos fosfatos. Para ello utilizamos la construcción pLAT52-LePRK2-eGFP (mencionada anteriormente) como construcción base para realizar las mutaciones. Con el fin de simplificar la tarea de generación de las diferentes construcciones mutantes, primeramente agrupamos varios de los residuos mutados en una sola construcción, disminuyendo así el número de las mismas. Por ejemplo, los residuos S277, S279 y S282 del motivo I del dominio JMD fueron mutagenizados y ensayados al mismo tiempo en una sola construcción. Lo mismo se hizo para los residuos S304, S307 y T308 del motivo II. Posteriormente, dado los resultados obtenidos para la triple mutante correspondiente al motivo I (Figura 26), también realizamos mutaciones individuales de los residuos S277, S279 y S282 a alanina, con el fin de identificar qué residuo/s es/son responsables del cambio fenotípico del tubo polínico. Resumiendo, en una primera etapa generamos los siguientes cuatro grupos de construcciones mutantes:

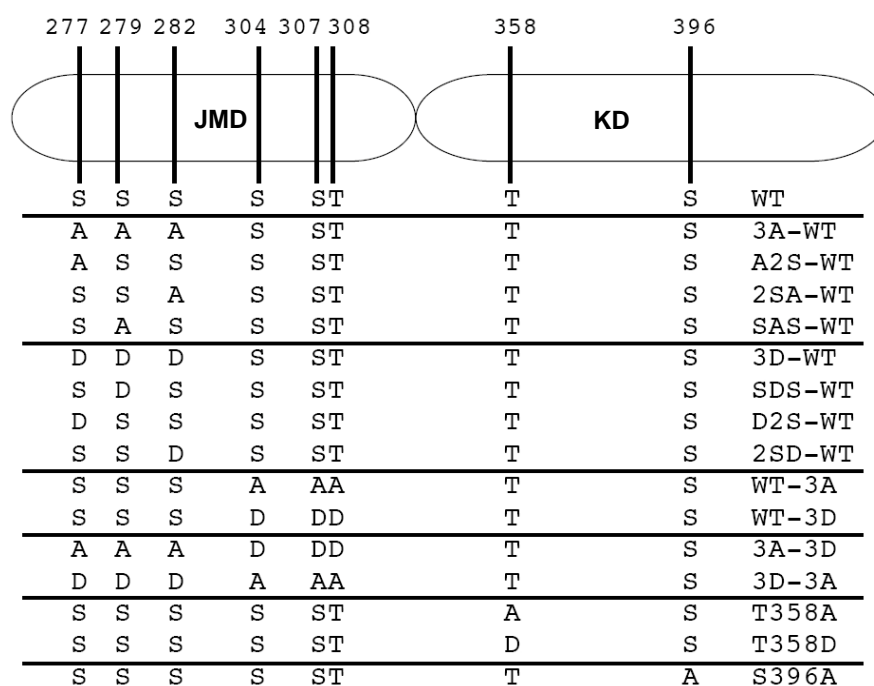
- 1) S277A/S279A/S282A;      S277/S279A/S282;      S277A/S279/S282;  
S277/S279/S282A.
- 2) S304A/S307A/T308A.
- 3) T358A.
- 4) S396A.

Posteriormente llevamos a cabo nuevas mutagénesis dirigidas reemplazando las serinas (S) y/o treoninas (T) correspondientes por ácido aspártico (D), creando versiones fosfomiméticas de los residuos modificados. Para ello utilizamos la construcción pLAT52-LePRK2-eGFP y las de las triples mutantes de alanina (construcciones 1) y 2) descritas anteriormente), como base para realizar las mutaciones. En forma complementaria a las construcciones de alanina ya descritas, realizamos una triple mutante y mutaciones individuales a ácido aspártico de los residuos S277, S279 y S282 del motivo I. Finalmente, realizamos una combinación de construcciones que derivaron

en dos séxtuples mutantes. Resumiendo, generamos en una última etapa las siguientes construcciones mutantes:

- 5) S277D/S279D/S282D; S277/S279D/S282; S277D/S279/S282; S277/S279/S282D.
- 6) S304D/S307D/T308D.
- 7) S277A/S279A/S282A-S304D/S307D/T308D.
- 8) S277D/S279D/S282D-S304A/S307A/T308A.
- 9) T358D.

A continuación se ilustra un mapa de las diferentes mutaciones realizadas en LePRK2 (Figura 25) dentro del marco del análisis de diversos residuos fosforilables de LePRK2 que sean capaces de regular el crecimiento del tubo polínico:



**Fig. 25: Mapa de las diferentes mutantes de LePRK2.**

JMD: Dominio Yuxtamembrana de LePRK2; KD: Dominio Quinasa de LePRK2. Las mutantes de LePRK2 están distribuidas en grupos. Las primeras ocho mutantes tienen mutaciones en: S277, S279 y S282 (**3A-WT**: S277A/S279A/S282A; **A2S-WT**: S277A/S279/S282; **2SA-WT**: S277/S279/S282A; **SAS-WT**: S277/S279A/S282; **3D-WT**: S277D/S279D/S282D; **SDS-WT**: S277/S279D/S282; **D2S-WT**: S277D/S279/S282; **2SD-WT**: S277/S279/S282D). El segundo grupo contiene mutaciones en S304, S307 y T308 (**WT-3A**: S304A/S307A/T308A; **WT-3D**: S304D/S307D/T308D). El tercer grupo tiene dos combinaciones de mutaciones del primer y segundo grupo (**3A-3D**: S277A/S279A/S282A/S304D/S307D/T308D; **3D-3A**:

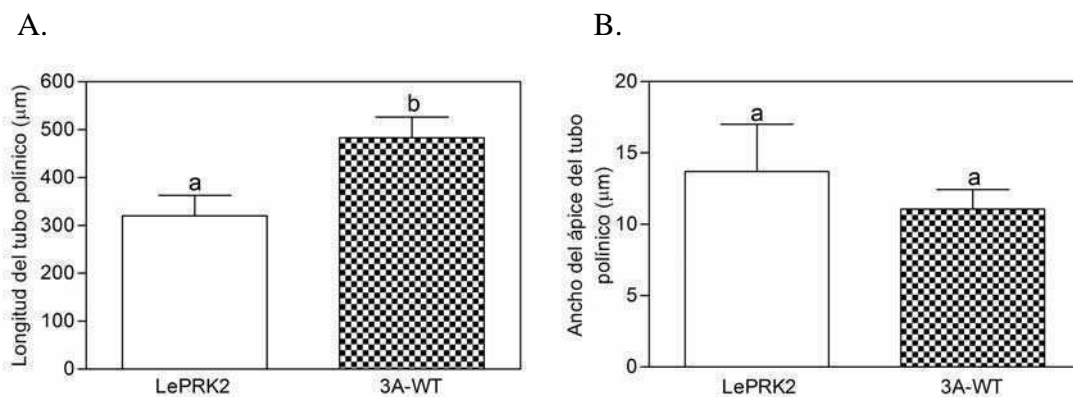


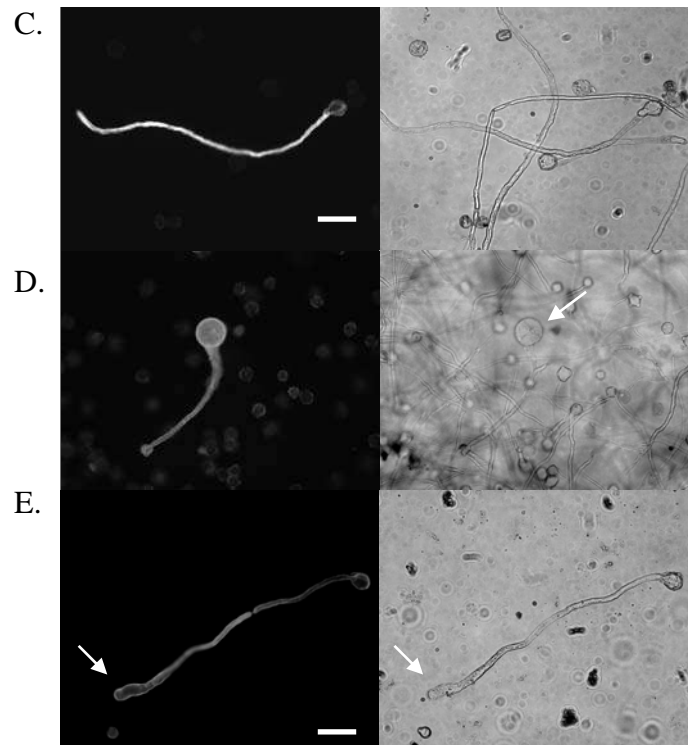
S277D/S279D/S282D/S304A/S307A/T308A). El cuarto grupo tiene mutaciones en T358 (**T358A** y **T358D**). El quinto grupo corresponde a una única mutación: **S396A**.

Para realizar el ensayo funcional tomamos ventaja del hecho mostrado anteriormente, que cuando se sobreexpresó transitoriamente pLAT52-LePRK2-eGFP, los tubos polínicos transfectados eran más cortos y con ápice más anchos que los de los tubos eGFP. En caso que alguno/s de estos residuos potencialmente fosforilables sea/n necesario/s para la actividad, cuando sobreexpresemos en granos de polen de tabaco la construcción pLAT52-LePRK2-eGFP que lleve el/los residuo/s mutados, esperaríamos ver una modificación en el largo y/o ancho de los tubos transfectados con respecto a los tubos LePRK2.

### La mutante triple de alanina 3A-WT aumenta la longitud del tubo polínico

Las mutaciones realizadas a alanina en los residuos seleccionados del motivo I del dominio JMD (G271GSSLTSSSPTS; las serinas mutagenizadas son las subrayadas) dieron lugar a la construcción pLAT52-LePRK2-S277A/S279A/S282A-eGFP (3A-WT).





**Fig. 26: El triple mutante 3A-WT aumenta el largo del tubo polínico.**

Longitud del tubo polínico (A) y ancho del ápice (B) de tubos bombardeados con pLAT52-LePRK2-eGFP o 3A-WT. Distintas letras indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ). Los datos corresponden al promedio  $\pm$  ES de cuatro réplicas experimentales. Representación de tubos polínicos germinados *in vitro* de (C) eGFP, (D) LePRK2-eGFP y (E) 3A-WT. La barra de escala representa 100  $\mu$ m. Las flechas indican el ápice del tubo polínico. Canal GFP (panel de la izquierda) y luz blanca (panel de la derecha).

Los tubos polínicos 3A-WT sobreexpresados en polen de tabaco, con bajos niveles de intensidad de fluorescencia, medido por la fluorescencia de eGFP (0-25 unidades arbitrarias), resultaron ser significativamente más largos, comparados con tubos LePRK2-eGFP, a niveles similares de fluorescencia. Además, los tubos 3A-WT mostraron una morfología normal, similar a la de los tubos eGFP (Figura 26 C, D, E).

Se han descrito en la bibliografía situaciones similares donde los fenotipos de tubos polínicos transfectedos, sólo se observan a bajas intensidades de expresión del transgen ya que a mayores niveles sólo se observa la inhibición del crecimiento polar de los tubos. Por ejemplo, con el objetivo de estudiar la interacción entre AtRop1 y su efector RIC4, Hwang *et al.*, 2005, generaron una mutante (GFP-RIC4 $\Delta$ C) que presenta una delección del extremo C-terminal. Encontraron que bajos niveles de expresión de GFP-RIC4 $\Delta$ C en tubos polínicos, no mostraban un crecimiento despolarizado de los tubos polínicos, a diferencia de la construcción GFP-RIC4 que sí lo producía (Hwang *et*

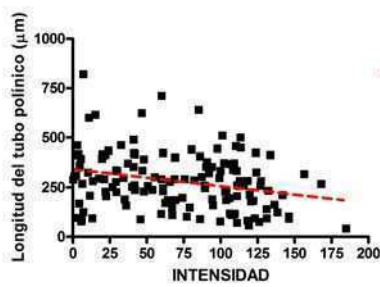
*al.*, 2005). Sin embargo, a altos niveles de expresión, ambas construcciones generaban tubos con ápice globoso sugiriendo que una excesiva expresión de GFP-RIC4 $\Delta$ C podría competir con la proteína RIC4 endógena y generar el crecimiento despolarizado. Es por eso que para analizar de qué manera la interacción de RIC4 y AtRop1 afecta el crecimiento de los tubos, estos autores decidieron trabajar con bajos niveles de expresión de GFP-RIC4 $\Delta$ C. En otros trabajos donde se estudia la acción de la proteína fosfolipasa C en tubos polínicos, los autores expresaron en polen de tabaco el dominio PH (*Pleckstrin Homology*) de la PLC $\delta_1$  (GFP-PLC $\delta_1$ -PH). Vieron que una expresión moderada de GFP-PLC $\delta_1$ -PH fue suficiente para inhibir el crecimiento del tubo polínico, mientras que los tubos que expresaban niveles bajos de esta construcción crecían normalmente (Kost *et al.*, 1999; Dowd *et al.*, 2006). Sólo trabajando a bajas intensidades de expresión, pudieron llevar a cabo el estudio de la localización y funcionalidad de la proteína de fusión.

Es por ello que en nuestro caso, para estudiar el efecto de las diferentes mutantes de fosforilación de LePRK2 durante el crecimiento del tubo polínico, decidimos analizar los resultados sólo a bajos niveles de intensidad. Suponemos que los efectos obtenidos a baja intensidad de expresión son más compatibles con la funcionalidad endógena de LePRK2 en el polen, no siendo lo mismo para niveles más altos de expresión con los cuales se desregularía por completo dicha actividad independientemente de qué construcción mutante sea la que se exprese. Es posible que cualquiera de las mutantes de fosforilación sea capaz de inducir a altos niveles de expresión un crecimiento despolarizado de los tubos debido a que otros sitios diferentes de fosforilación, no mutagenizados a alanina, sean suficientes para competir con la proteína LePRK2 endógena e inducir un crecimiento isotrópico del tubo polínico.

En lo que respecta al análisis del ancho del ápice del tubo polínico en función a la intensidad, los tubos 3A-WT poseen a intensidades de 0-25 (unidades arbitrarias), un ancho del ápice del tubo menor con respecto a los tubos sobreexpresantes de LePRK2-eGFP, aunque dicha diferencia no resultó ser significativa.

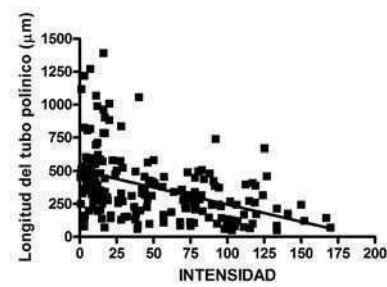
Con el fin de visualizar la distribución de longitudes y anchos del tubo polínico sobreexpresantes de 3A-WT en función de la intensidad, se realizaron los siguientes gráficos de distribución (Figura 27):

A.



$$-0,8562 \pm 0,2594$$

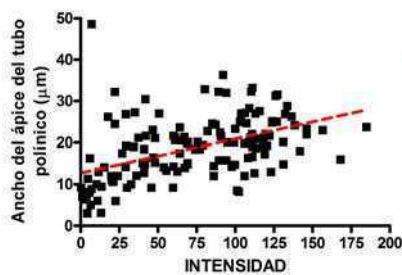
S



$$-2,600 \pm 0,3950$$

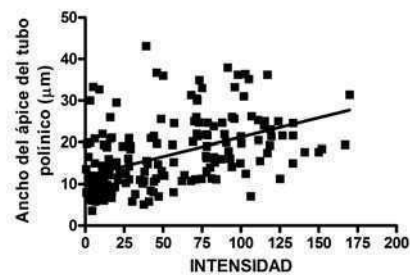
S

B.



$$0,08169 \pm 0,01292$$

S



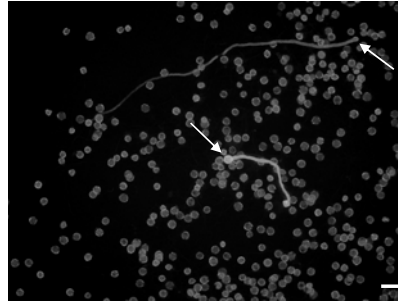
$$0,09250 \pm 0,01263$$

S

**Fig. 27: Distribución de longitudes y ancho de ápices de tubos polínicos en función de la intensidad de fluorescencia de tubos 3A-WT.**

Regresión lineal de longitudes de tubos polínicos (A) y ancho de ápices (B) de tubos polínicos de LePRK2-eGFP y 3A-WT. Los puntos en cada gráfico corresponden a datos individuales para ambas variables. La letra S indica pendiente “significativa” y las N.S, “no significativa” y se indica en número, la pendiente de la curva con su error estándar.

En el caso de los tubos 3A-WT, en la figura 27 puede observarse una pronunciada pendiente de la curva indicando que los tubos con menor intensidad de fluorescencia son más largos en comparación a aquellos con alto nivel de fluorescencia. Por otro lado, se observó una alta densidad de puntos ya sea para el largo del tubo polínico, como para el ancho de su ápice, en el rango correspondiente a baja intensidad de expresión.



**Fig. 28: El fenotipo de tubos 3A-WT varía en función a su nivel de expresión.**

Representación de tubos polínicos germinados *in vitro* de 3A-WT con distintos niveles de intensidad de fluorescencia. La barra de escala representa 100  $\mu\text{m}$ . Las flechas indican el ápice del tubo polínico. Panel mostrado: canal GFP.

Podemos concluir que la ausencia de fosforilación de los tres residuos seleccionados del motivo I permitió aumentar la longitud del tubo polínico, pero no fue suficiente para reducir el ancho del ápice del tubo, tal como sí fue descrita anteriormente para tubos mLePRK2-eGFP (Figura 13). Tal como era de esperar y como fue mostrado en la figura 13, el largo y el ancho del ápice de los tubos eGFP no fueron influenciados por los niveles de intensidad y mostraron una longitud equivalente a la de los tubos no transformados (dato no mostrado). Por otro lado, a mayores intensidades que el rango estudiado, los tubos 3A-WT comenzaron a ser más cortos y anchos presentando fenotipos similares a los obtenidos al sobreexpresar LePRK2-eGFP.

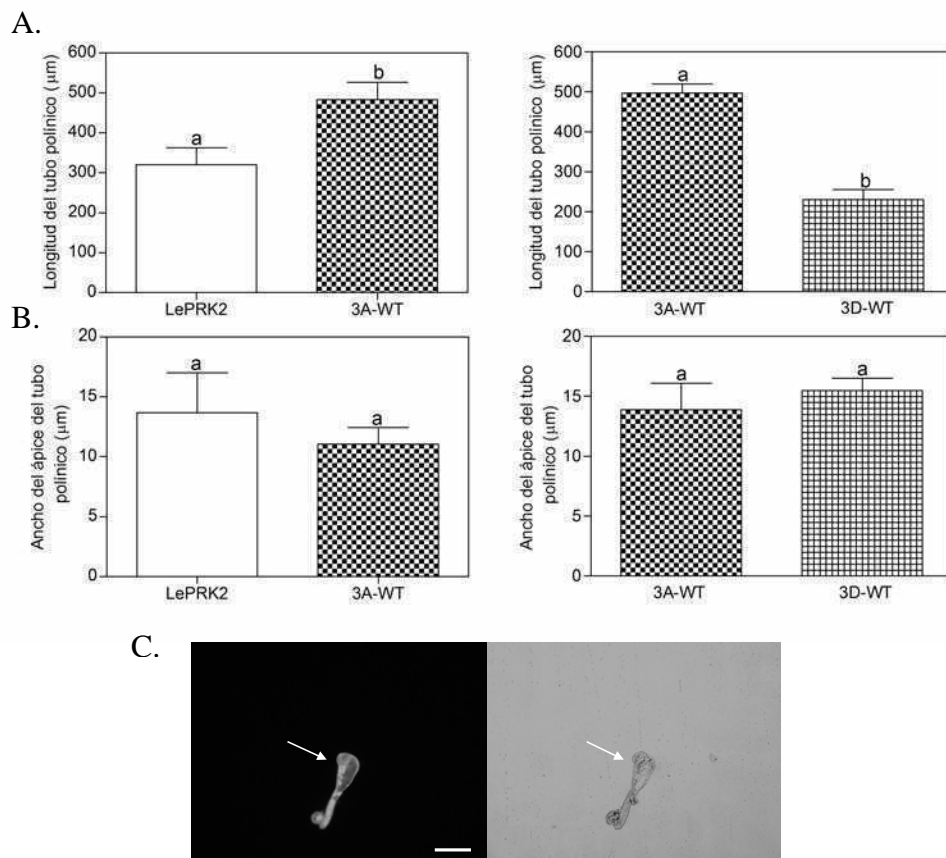
### **Sólo 3A-WT aumenta la longitud del tubo polínico y no así sus mutantes individuales de alanina**

Habiendo comprobado que los tubos 3A-WT eran significativamente más largos con respecto a los tubos LePRK2-eGFP, generamos construcciones en las que realizamos mutagénesis individual de cada uno de los tres residuos a alanina de 3A-WT. Hemos demostrado que las mutantes individuales A2S-WT, 2SA-WT y SAS-WT mostraron longitudes intermedias (A2S-WT  $525,55 \mu\text{m} \pm 66,15$ ; 2SA-WT:  $542,71 \mu\text{m} \pm 56,30$ ; SAS-WT:  $544,48 \mu\text{m} \pm 70,79$ ) entre las de las construcciones pLAT52-LePRK2-eGFP ( $350,93 \mu\text{m} \pm 27,37$ ) y 3A-WT ( $694,52 \mu\text{m} \pm 71,26$ ). La longitud de los tubos de las mutantes individuales fue similar, independientemente de qué aminoácido fue mutagenizado a alanina. Esto sugiere que ninguno de los tres residuos mutagenizados individualmente fue suficiente para lograr el efecto de reversión de la longitud del tubo

polínico, tal como se observó para la construcción 3A-WT; también sugiere que en principio, la actividad de LePRK2 dependería de cuántos residuos son inactivados en cada mutación. Por otro lado, no se encontraron diferencias significativas entre estos clones y pLAT52-LePRK2-eGFP al analizar el ancho del ápice del tubo polínico.

### Tanto 3D-WT como sus mutantes individuales generan un fenotipo despolarizado al igual que LePRK2

Del mismo modo, hemos procedido a obtener mutantes fosfomiméticas de los residuos seleccionados del motivo I; en dichas construcciones estos tres residuos fueron mutagenizados a ácido aspártico, simulando una fosforilación constitutiva de dichos sitios. De este modo, hemos obtenido la construcción pLAT52-LePRK2-S277D/S279D/S282D-eGFP (3D-WT) y sus mutantes individuales D2S-WT, 2SD-WT y SDS-WT.



**Fig. 29. El aumento de la longitud del tubo polínico de 3A-WT es neutralizado por la triple mutante 3D-WT.**

Longitud del tubo polínico (A) y ancho del ápice (B) de tubos bombardeados con 3A-WT o 3D-WT. Distintas letras indican diferencias significativas ( $p < 0,001$ ). Los datos corresponden al promedio  $\pm$  ES de cuatro experimentos independientes. Los gráficos de la izquierda son repetición de los de la figura 26 (A y B). (C) Representación de tubos polínicos germinados *in vitro* de la mutante 3D-WT. La barra de escala representa 100  $\mu\text{m}$ . Las flechas indican el ápice del tubo polínico. Canal GFP (panel de la izquierda) y luz blanca (panel de la derecha).

La figura 29 muestra que la construcción 3D-WT, la cual posee los tres residuos del motivo I reemplazados por ácido aspártico, contrarrestó completamente el fenotipo obtenido por su equivalente en alanina (3A-WT); se observaron tubos polínicos más cortos con ápices globosos con fenotipos similares a aquellos que sobreexpresaban LePRK2-eGFP.

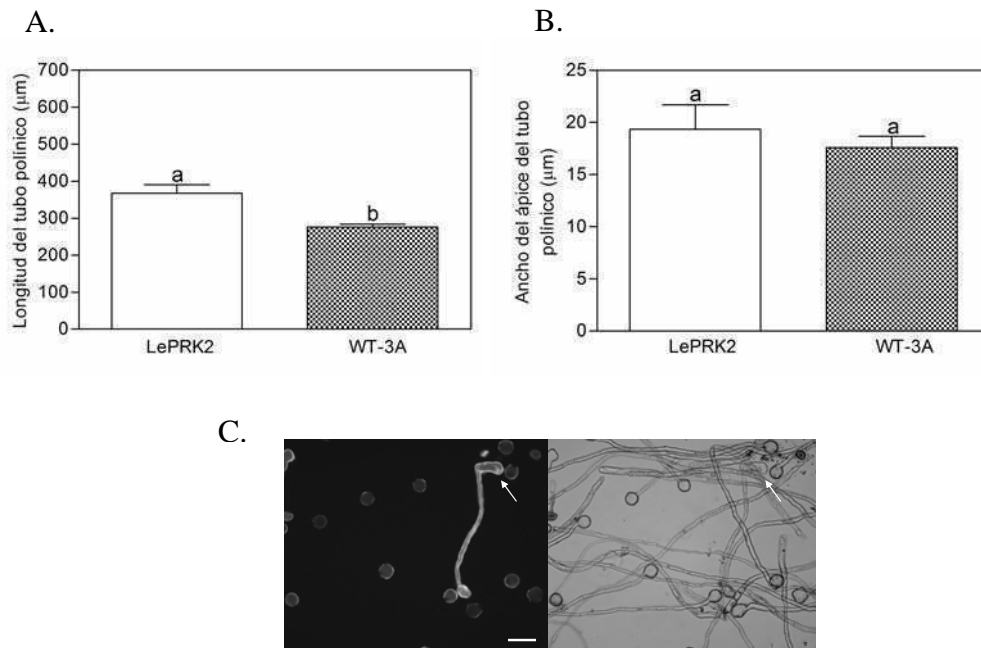
Por otro lado, las tres construcciones en las cuales sólo uno de estos tres aminoácidos fue mutado a ácido aspártico (D2S-WT, 2SD-WT y SDS-WT) mostraron una longitud del tubo similar a aquella obtenida por la construcción 3D-WT (LePRK2-eGFP:  $408,7 \mu\text{m} \pm 64,6$ ; 3D-WT:  $483,4 \mu\text{m} \pm 66,7$ ; D2S-WT:  $455,7 \mu\text{m} \pm 75,0$ ; SDS-WT:  $257,8 \mu\text{m} \pm 95,2$  y 2SD-WT:  $384,0 \mu\text{m} \pm 34,2$ ). Este resultado sugiere que reemplazando sólo uno de los tres aminoácidos del motivo I a ácido aspártico fue suficiente para restaurar el largo equivalente al registrado para los tubos 3D-WT.

Todos los resultados descritos anteriormente sugieren que los tres residuos del motivo I del dominio JMD de LePRK2 (S277/S279/S282) tienen un papel importante en la regulación del crecimiento polínico de modo tal que la fosforilación de cualquiera de los tres residuos promueven el crecimiento despolarizado de los tubos polínicos.

**La mutante triple de alanina WT-3A disminuye la longitud del tubo polínico**

El mismo análisis fue llevado a cabo para la construcción pLAT52-LePRK2-S304A/S307A/T308A-eGFP (WT-3A), cuyas mutaciones fueron realizadas sobre residuos del motivo II: G301QSSAASTP (las serinas y treonina subrayadas son las mutadas). Contrariamente a lo sucedido para la construcción 3A-WT del motivo I, los tubos polínicos WT-3A son aún significativamente más cortos que los tubos sobreexpresantes de LePRK2-eGFP (Figura 30). Por otro lado, los tubos polínicos WT-

3A no mostraron diferencias significativas en el ancho de sus ápices, en comparación a tubos sobreexpresantes de LePRK2-eGFP.



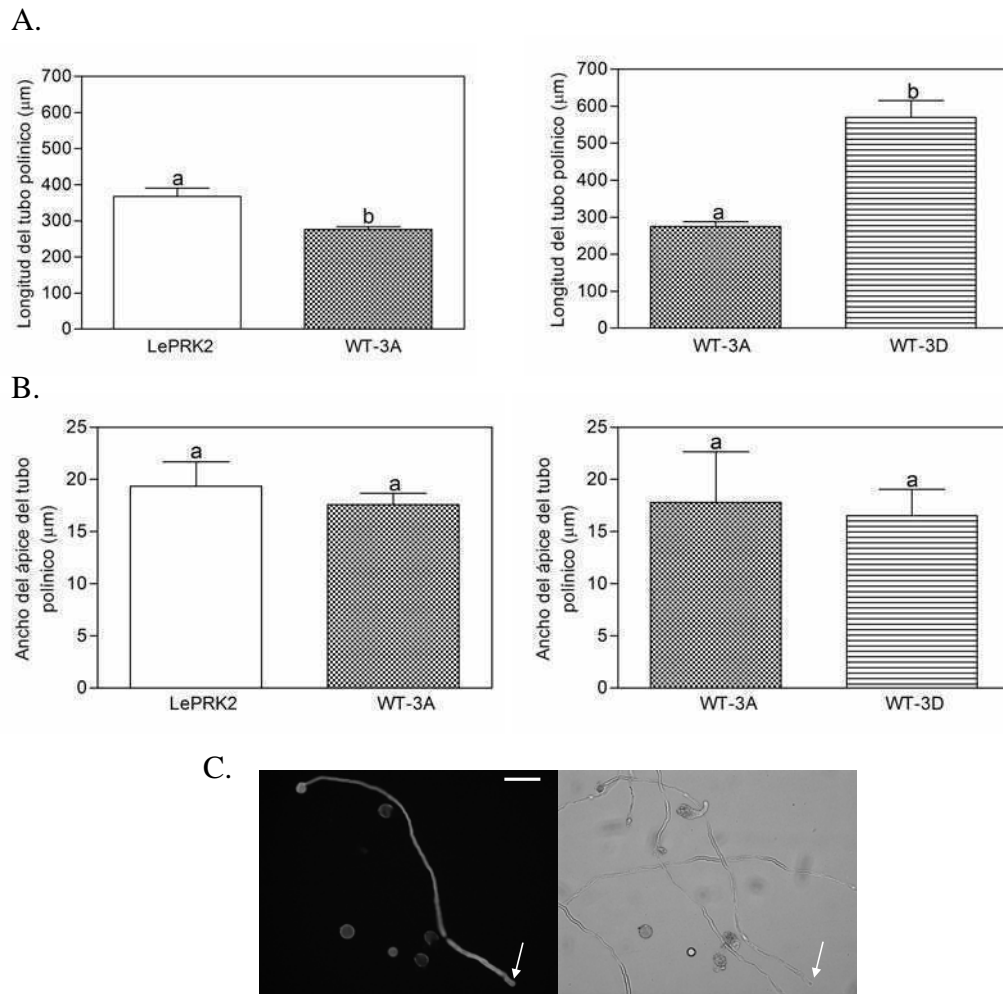
**Fig. 30: El triple mutante WT-3A disminuye el largo del tubo polínico.**

Longitud del tubo polínico (A) y ancho del ápice (B) de tubos bombardeados con pLAT52-LePRK2-eGFP o con WT-3A. Distintas letras indican diferencias significativas ( $p < 0,01$ ). Los datos corresponden al promedio  $\pm$  ES de cinco réplicas experimentales. (C) Representación de tubos polínicos germinados *in vitro* de WT-3A. La barra de escala representa 100  $\mu\text{m}$ . Las flechas indican el ápice del tubo polínico. Canal GFP (panel de la izquierda) y luz blanca (panel de la derecha).

Tal como se observó para los tubos LePRK2-eGFP, en este caso algunos de los tubos polínicos mostraron pérdida de crecimiento polarizado, observándose cambios abruptos en su dirección de crecimiento (Figura 30 C); esto sugiere que existió un arresto de su crecimiento con una posterior continuación del mismo en otra dirección.

Para determinar si las mutantes fosfomiméticas podrían revertir este fenotipo de la misma manera que ocurrió para el motivo I, se realizó una construcción en la que los tres residuos del motivo II se mutagenizaron a ácido aspártico. De este modo, se obtuvo la mutante pLAT52-LePRK2-S304D/S307D/T308D-eGFP (WT-3D) y se la comparó con su versión correspondiente a alanina (WT-3A):





**Fig. 31: La disminución del largo del tubo polínico de la triple mutante WT-3A es neutralizada por la mutante WT-3D.**

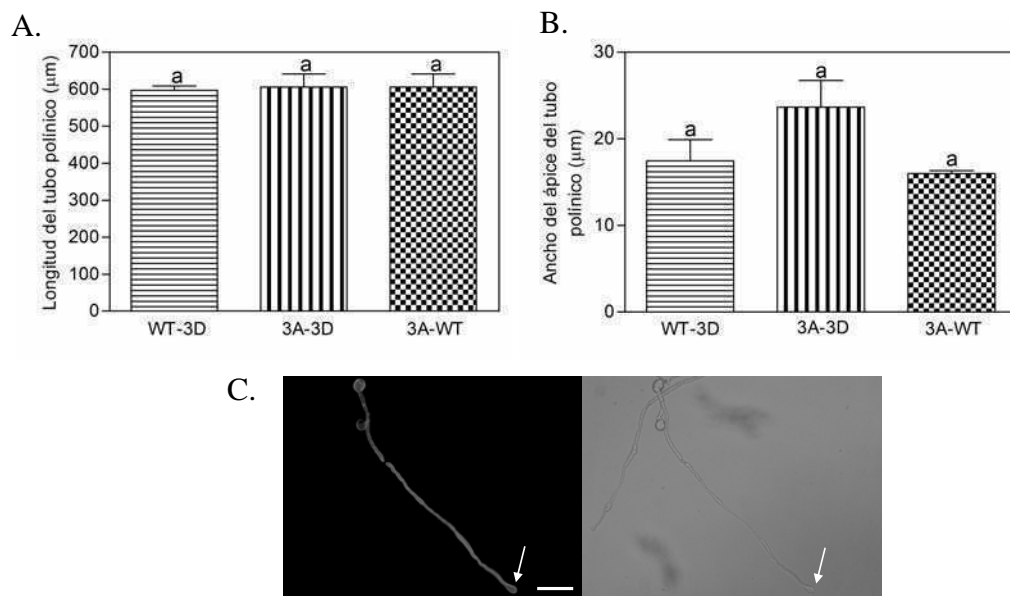
Longitud del tubo polínico (A) y ancho del ápice (B) de tubos bombardeados con WT-3A o WT-3D. Distintas letras indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ). Los datos corresponden al promedio  $\pm$  ES de cinco réplicas experimentales. Los gráficos de la izquierda son repetición de los de la figura 30 (A y B). (C) Representación de tubos polínicos germinados *in vitro* de WT-3D. La barra de escala representa 100  $\mu\text{m}$ . Las flechas indican el ápice del tubo polínico. Canal GFP (panel de la izquierda) y luz blanca (panel de la derecha).

En este caso, observamos que la expresión de la construcción WT-3D mostró un aumento de longitud del tubo polínico significativamente mayor al de WT-3A alcanzando valores de longitud solamente obtenidos con la mutante 3A-WT (ver luego figura 32). Los tubos correspondientes a WT-3D presentaron una morfología y longitud similar a la de los tubos control sobreexpresantes de eGFP. Por otro lado, nuevamente no se observaron diferencias significativas al comparar el ancho del ápice de tubos WT-3A y WT-3D.

Estos resultados proveen evidencia que la fosforilación de los residuos S304/S307/T308 del motivo II revierten la inhibición del crecimiento de los tubos polínicos de WT-3A.

### Séxtuples mutantes

Hemos demostrado anteriormente que los tubos correspondientes a las construcciones que llevan las mutaciones en alanina en el motivo I (3A-WT) y ácido aspártico en el motivo II (WT-3D), mostraron tubos más largos que los de LePRK2-eGFP. Por lo tanto, para analizar si estos dos efectos eran aditivos o no, generamos el séxtuple mutante que alberga a estos dos grupos de mutaciones (3A-3D).



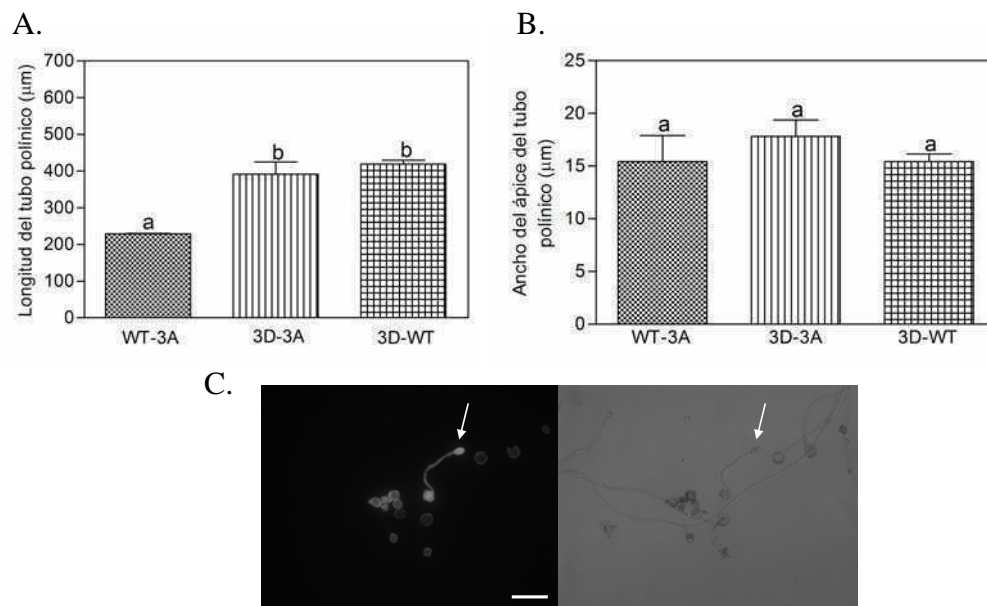
**Fig. 32: Los tubos sobreexpresantes de 3A-3D no muestran efecto aditivo en la elongación de tubos polínicos.**

Longitud del tubo polínico (A) y ancho del ápice (B) de tubos bombardeados con WT-3D, 3A-3D, 3A-WT. Los datos corresponden al promedio  $\pm$  ES de dos réplicas experimentales. (C) Representación de tubos polínicos germinados *in vitro* de la séxtuple mutante 3A-3D. La barra de escala representa 100 µm. Las flechas indican el ápice del tubo polínico. Canal GFP (panel de la izquierda) y luz blanca (panel de la derecha).

La figura 32 muestra que la séxtuple mutante 3A-3D tiene una longitud similar del tubo polínico con respecto a las construcciones 3A-WT y WT-3D. Por otro lado, la longitud de las tres mutantes fue superior a la de los tubos LePRK2-eGFP. Este resultado sugiere que los tubos polínicos no aumentan su largo más que el obtenido por

las mutantes 3A-WT y WT-3D. Siempre es posible que mutando otros residuos fosforilables de LePRK2, en conjunto o no con los sitios analizados en este trabajo, se alcance un mayor crecimiento del tubo. Al analizar el ancho del ápice del tubo polínico, no se observaron diferencias significativas entre las tres construcciones analizadas.

De forma complementaria al análisis anterior, hemos realizado otra séxtuple mutante combinando las dos construcciones, mutantes WT-3A y 3D-WT, que causaron un acortamiento significativo del tubo polínico relativo al largo de LePRK2-eGFP y de 3A-WT respectivamente.



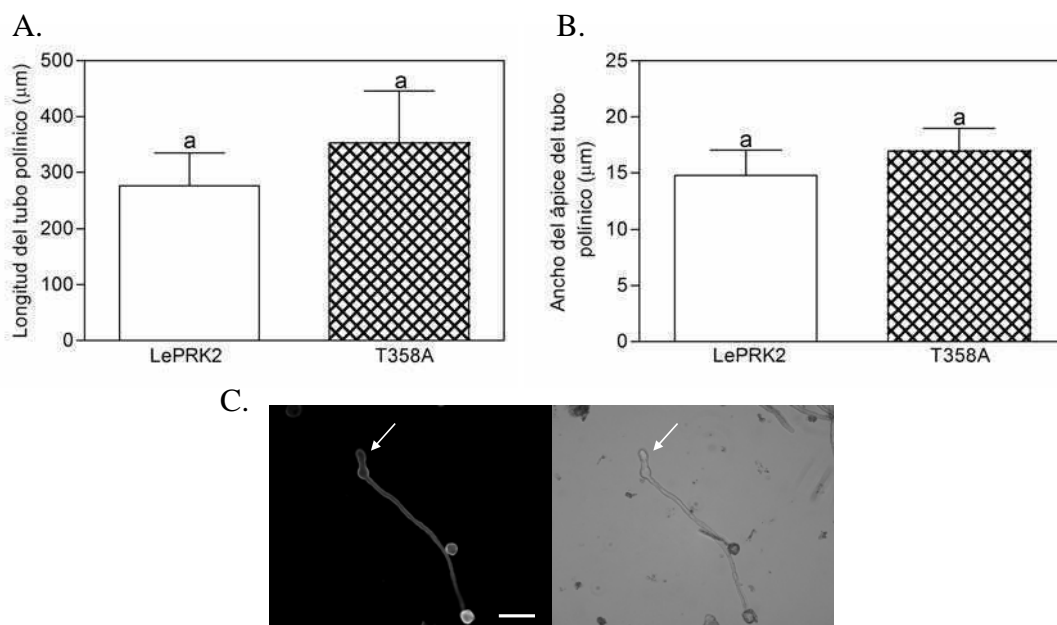
**Fig. 33: Los tubos sobreexpresantes de 3D-3A no muestran efecto aditivo en el acortamiento de tubos polínicos.**

Longitud del tubo polínico (A) y ancho del ápice (B) de tubos bombardeados con WT-3A, 3D-3A o 3D-WT. Distintas letras indican diferencias significativas ( $p > 0,05$ ). Los datos corresponden al promedio  $\pm$  ES de dos réplicas experimentales. (C) Representación de tubos polínicos germinados *in vitro* de la séxtuple mutante 3D-3A. Las flechas indican el ápice del tubo polínico. La barra de escala representa 100  $\mu$ m. Canal GFP (panel de la izquierda) y luz blanca (panel de la derecha).

En este caso, observamos que la séxtuple mutante 3D-3A muestra un largo similar al de los tubos 3D-WT y es a su vez significativamente más larga que los tubos WT-3A. Este resultado sugiere que la fosforilación de los residuos del motivo I tendría un efecto dominante sobre posibles modificaciones de los residuos del motivo II. Por otro lado, las tres mutantes comparadas en esta figura mostraron un ancho del ápice del tubo polínico similar entre sí y con LePRK2-eGFP.

## Análisis de los tubos polínicos de la mutante T358A con respecto a los tubos sobreexpresantes de LePRK2-eGFP

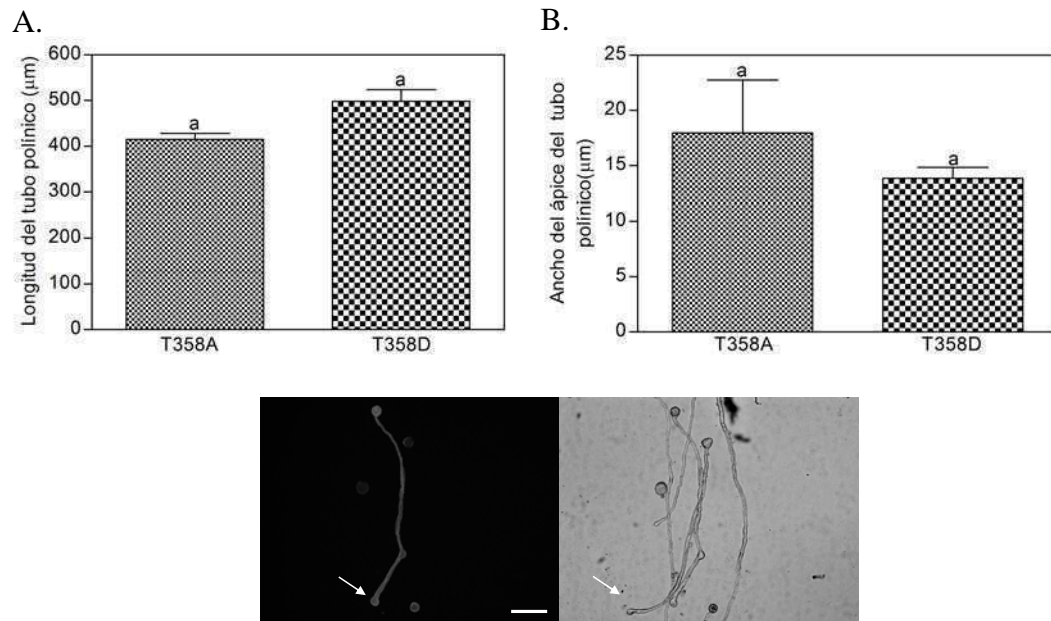
Tomando en cuenta los resultados de los análisis bioinformáticos y el alineamiento de las especies emparentadas a LePRK2 descritos anteriormente, hemos también seleccionado otros dos sitios potencialmente fosforilables que, en este caso, se encuentran en el dominio quinasa de LePRK2. Ellos son, la treonina 358 y la serina 396 (Figura 25).



**Fig. 34: La mutante T358A no muestra diferencias significativas con respecto a LePRK2-eGFP tanto en el análisis del largo del tubo polínico como en el ancho de su ápice.**

Longitud del tubo polínico (A) y ancho del ápice (B) de tubos bombardeados con pLAT52-LePRK2-eGFP o T358A. Distintas letras indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ). Los datos corresponden al promedio  $\pm$  ES de dos réplicas experimentales. (C) Representación de tubos polínicos germinados *in vitro* de T358A. La barra de escala representa 100  $\mu\text{m}$ . Las flechas indican el ápice del tubo polínico. Canal GFP (panel de la izquierda) y luz blanca (panel de la derecha).

Los tubos polínicos de la construcción pLAT52-LePRK2-T358A-eGFP no mostraron diferencias significativas con respecto a pLAT52-LePRK2-eGFP en lo que respecta a la longitud del tubo polínico y al ancho del ápice del tubo (Figura 34 A y B). A pesar de no haber encontrado diferencias en el largo y el ancho, decidimos realizar su construcción equivalente a ácido aspártico (T358D) para ver si estas diferencias se manifestaban en este caso:



**Fig. 35: La mutante T358D no muestra diferencias significativas con respecto a T358A tanto en el análisis del largo del tubo polínico como en el ancho de su ápice.** Longitud del tubo polínico (A) y ancho del ápice (B) de tubos bombardeados con T358A o T358D. Los datos corresponden al promedio  $\pm$  ES de dos réplicas experimentales. (C) Representación de tubos polínicos germinados *in vitro* de la mutante T358D. La barra de escala representa 100 µm. Las flechas indican el ápice del tubo polínico. Canal GFP (panel de la izquierda) y luz blanca (panel de la derecha).

Observamos que los tubos T358D no mostraron una diferencia significativa en sus largos, con respecto al de los tubos T358A. En el caso del ancho del ápice del tubo polínico, tampoco se observaron diferencias significativas entre ambas construcciones, pero sí se observa una disminución no significativa de T358D con respecto a tubos T358A.

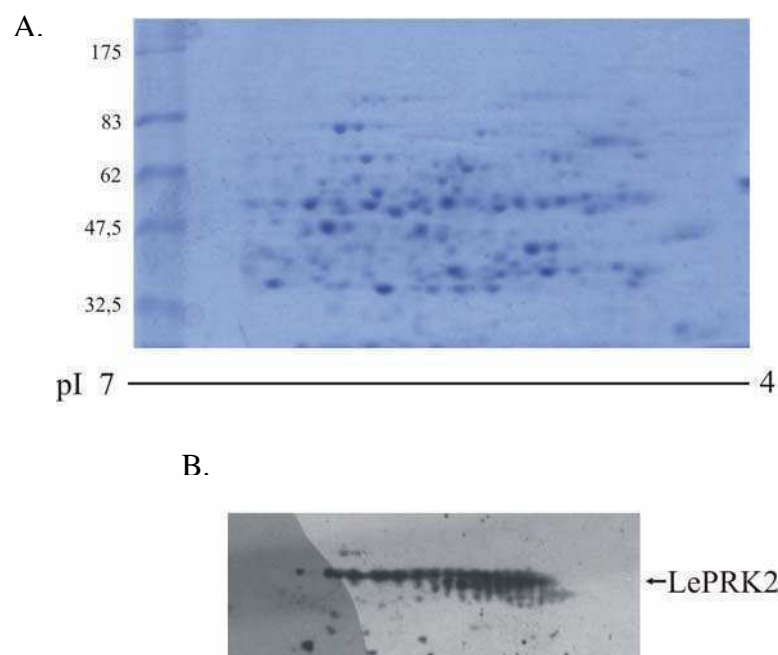
Por otro lado, para la mutante S396A, también ubicada en el dominio quinasa al igual que la mutante T358A, no se han observado diferencias significativas en el largo del tubo y en el ancho de su ápice y tampoco se registraron fenotipos diferentes a los de la construcción pLAT52-LePRK2-eGFP (resultados no mostrados).

## Aislamiento e identificación *in vivo* de sitios de fosforilación de LePRK2 mediante el uso de la técnica de geles bidimensionales y su posterior secuenciación

### La proteína LePRK2 se encontraría hiperfosforilada tanto en polen maduro como germinado

Por medio del uso de geles 2D hemos demostrado que LePRK2 se encontraría hiperfosforilada en membranas de polen maduro (Figura 22). En forma complementaria al análisis fisiológico, nuestro objetivo inicial fue identificar sitios de fosforilación de LePRK2 *in vivo*. Teniendo en cuenta que LePRK2 aumenta su expresión luego de la germinación (Muschiatti *et al.*, 1998), primeramente utilizamos polen de tomate germinado con el objetivo de aumentar la sensibilidad de la detección. Para ello, germinamos *in vitro* durante 3 horas polen de plantas de tomate salvajes, extrajimos las proteínas con metanol/cloroformo (ver materiales y métodos) y corrimos en forma paralela dos geles 2D. En el primer gel, detectamos las proteínas totales del extracto tiñendo con azul de *Coomassie* (CB), mientras que las proteínas del segundo gel fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa y sometidas a *western blot* (WB).

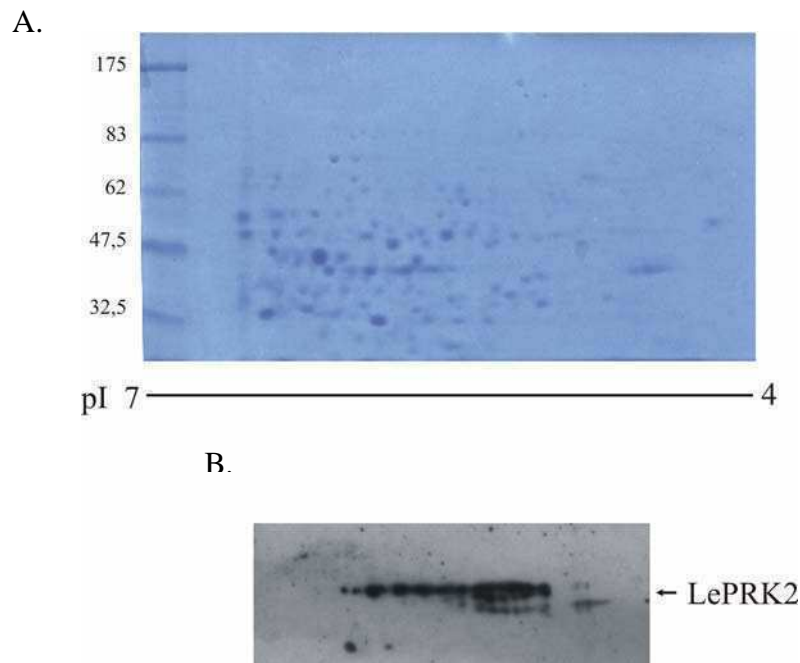
La figura 36 muestra uno de los geles teñido con CB y en el panel inferior el WB.



**Fig. 36:** Perfil proteómico de polen germinado de tomate.

Resultado representativo de tres experimentos independientes de dos geles 2D cada uno (*strip* utilizado de pH 4-7, 240  $\mu\text{g}/\text{strip}$ ) de poliacrilamida 10% corridos en forma paralela. (A) Uno de ellos teñido con CB. (B) El segundo gel transferido a membrana de nitrocelulosa y revelado con anticuerpo anti-LePRK2 (WB). El extremo ácido de los geles (pH 4) corresponde a la derecha de cada panel.

La figura 37 muestra los geles 2D teñidos con CB y el WB de polen maduro de tomate, tal como fue anteriormente observado en la figura 22. Debido a que los WBs de las isoformas de LePRK2 en polen maduro y germinado son cualitativamente similares y no observamos mayor diferencia de expresión en polen germinado, decidimos entonces, por una cuestión de conveniencia y facilidad, continuar el análisis con polen maduro crioconservado.



**Fig. 37: Perfil proteómico de polen maduro de tomate.**

Resultados representativos de cuatro experimentos independientes de dos geles 2D cada uno (*strip* utilizado de pH 4-7, 240  $\mu\text{g}/\text{strip}$ ) de poliacrilamida 8% corridos en forma paralela. (A) Uno de ellos teñido con CB. (B) El segundo gel transferido a membrana de nitrocelulosa y revelado con anticuerpo anti-LePRK2 (WB). El extremo ácido de los geles (pH 4) corresponde a la derecha de cada panel.

Cabe resaltar que en la parte más ácida de las figuras 36 y 37 B (derecha de cada gel), observamos *spots* por debajo y en disposición casi paralela al “collar de perlas” central. Dichas isoformas podrían en realidad considerarse como resultado de un fenómeno de degradación; los *spots* de menor peso molecular se observaron también

con menor intensidad, lo que sugiere que la degradación ocurriría en la población de isoformas altamente fosforiladas.

Por otro lado, tanto en las figuras 36 y 37, al intentar superponer la autorradiografía del WB con el gel teñido con CB, no hemos podido observar los *spots* correspondientes en el gel teñido, por lo cual decidimos tratar de identificar una posible zona del gel que pudiera contener a los *spots* de interés de LePRK2.

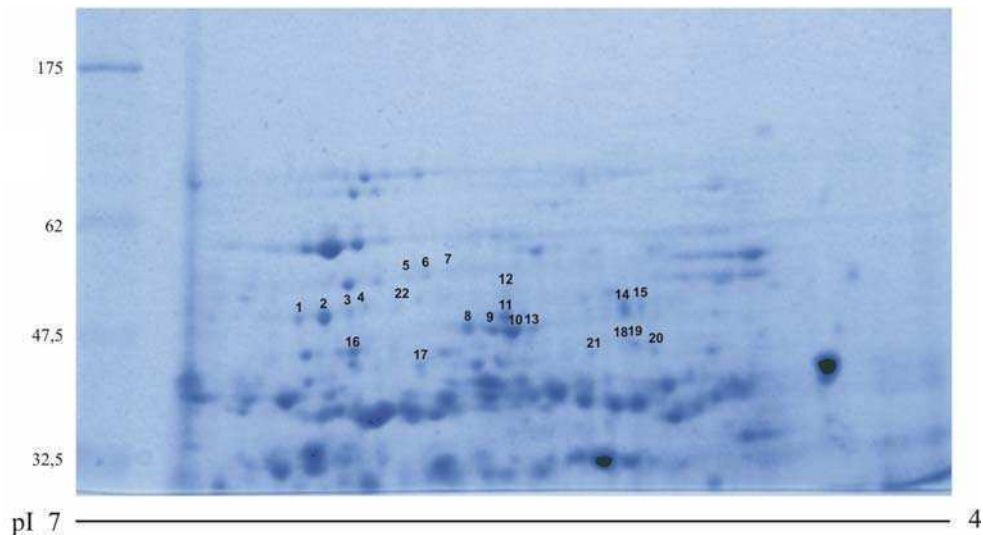
Es interesante también destacar que observando cualitativamente las figuras 36 y 37, el patrón proteico de polen maduro teñido con CB no difiere del de polen germinado.

### **Análisis de *spots* de geles 2D por UV-MALDI-TOF MS**

Posteriormente, siguiendo con el análisis proteómico, decidimos aislar de los geles de CB de polen maduro algunos de los *spots* que podrían corresponder a LePRK2 e identificarlos por espectrometría de masa UV-MALDI-TOF MS (*Ultraviolet Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight*) y/o espectrometría de masa en tándem (UV-MALDI-TOF MS/MS). Para ello, tal como se dijo anteriormente, se procedió a la alineación de los geles de polen maduro teñidos con CB y la autorradiografía del WB, identificando la posible zona del gel que pudiera contener a los *spots* de interés de LePRK2. Debemos aclarar que también se corrieron geles 8% en la segunda dimensión de geles 2D, para lograr una mayor separación de la zona del “collar de perlas” de LePRK2 observado por WB.

Con el fin de aumentar la representatividad de LePRK2 en la muestra, decidimos utilizar muestras de proteínas microsomales de polen maduro (P<sub>100</sub>) a diferencia de los geles anteriores donde usamos proteínas totales. Para ello extrajimos las proteínas microsomales de polen maduro de tomate por una solubilización con SDS y las preparamos para la separación en geles bidimensionales realizando una segunda extracción con metanol-cloroformo. Finalmente aislamos 22 *spots* correspondientes a la posible zona de presencia de LePRK2.





**Fig. 38: Identificación de 22 spots con el fin de analizarlos por UV-MALDI-TOF MS.**

Gel 2D (*strip* utilizado de pH 4-7, 240  $\mu\text{g}/\text{strip}$ ) de poliacrilamida 8% y teñido con CB. Los números corresponden a los *spots* seleccionados para la posterior secuenciación. El extremo ácido del gel (pH 4) corresponde a la derecha del panel.

Los *spots* recortados fueron digeridos con tripsina y los espectros fueron obtenidos en un espectrómetro de masa Voyager-DE<sup>TM</sup> PRO (Applied Biosystems) del servicio de Espectrometría de Masa de la Unidad de Bioquímica Analítica de la Universidad de la República Oriental del Uruguay (<http://www.pasteur.edu.uy/UBPA.html>). Como resultado de este análisis, obtuvimos espectros claros para 15 *spots* y de 11 de ellos pudimos realizar una búsqueda utilizando el software Mascot (<http://www.matrixscience.com/>) e identificar proteínas de manera estadísticamente significativa. Esta herramienta usa datos de espectrometría de masa para identificar proteínas a partir de base de datos de secuencias primarias y predice la identidad de cada proteína (Perkins *et al.*, 1999; Matrix Science Ltd). Para realizar los análisis de los *spots*, se seleccionó la base de datos NCBI nr (*National Center for Biotechnology information non-redundant*; <ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/blast/db/>). El genoma de tomate no está completamente secuenciado, pero LePRK2 está registrada (número de acceso AAC12253 y GI (*GenInfo Identifier*) 3015486) en dicha base de datos.

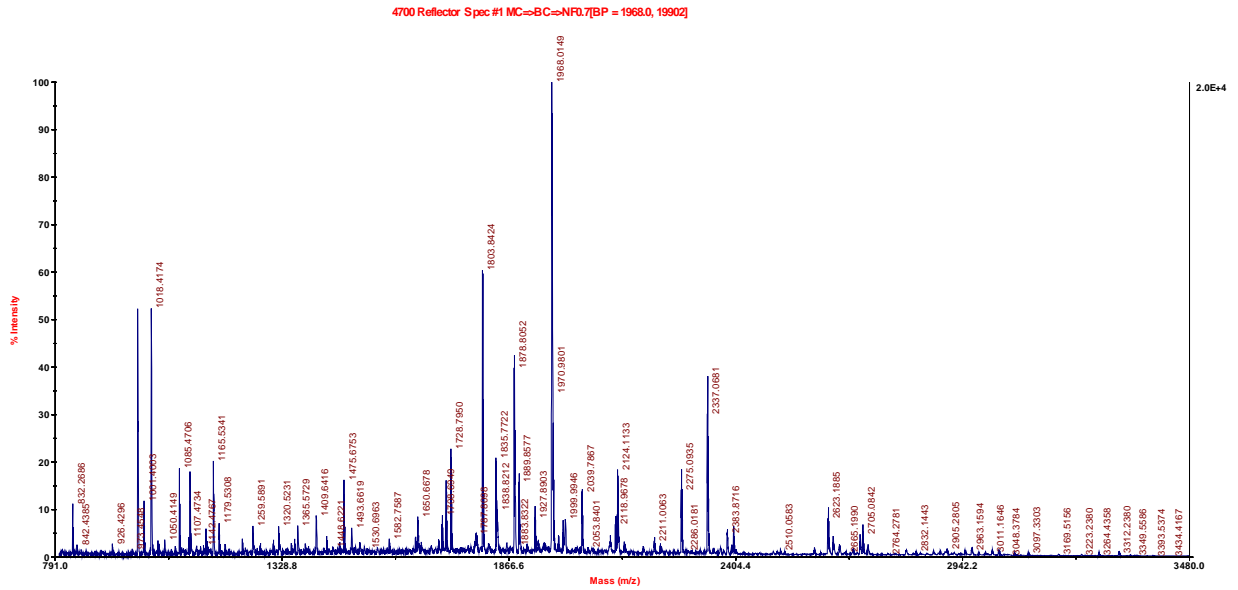
De los 22 *spots* aislados: a) 3 resultaron en espectros a partir de los cuales se identificaron proteínas (*spots* 2, 3 y 17); b) 8 espectros fueron de buena calidad y se realizó espectrometría de masa en tándem para alguno de los *spots*, no siendo posible identificar alguna proteína de manera estadísticamente significativa (*spots* 4, 5, 7, 8, 10,

16, 18, 19); c) 4 espectros fueron de buena calidad pero no se identificó alguna proteína de manera estadísticamente significativa y no se realizó espectrometría de masa en tándem (*spots* 9, 15, 20, 21) y d) 7 espectros fueron de baja calidad (*spots* 1, 6, 11, 12, 13, 14, 22).

A pesar de haber obtenidos espectros de buena calidad, ninguno de los espectros obtenidos de los *spots* picados permitió identificar a LePRK2. Esto puede deberse a que en caso que en alguno de los *spots* secuenciados puedan coexistir dos o más proteínas, alguna de estas podría ser mucho más abundante que LePRK2 y “aplastar” los picos de espectrometría correspondientes a LePRK2. También puede ocurrir que ninguno de los *spots* aislados correspondiera a LePRK2 debido a que sus diferentes isoformas se encontraron bajo el nivel de detección de la tinción de CB.

Como forma de corroborar la ausencia de hallazgo de LePRK2 a través del *Mascot*, hemos realizado la digestión *in silico* de la misma con tripsina (utilizando el *software* GPMW32 v. 4.02) y obtuvimos valores teóricos de masas monoisotópicas, considerando la posterior ionización. Luego, comparamos estos fragmentos manualmente con los mapas peptídicos obtenidos con los datos experimentales, con un error de hasta 0,06 Da. En ninguno de los espectros encontramos una coincidencia con el mapa peptídico de LePRK2. En el caso de espectros de calidad no sometidos a UV-MALDI-TOF MS/MS, los mismos no presentaron perfiles similares a los brindados por la digestión *in silico* de LePRK2. Cabe aclarar también, que la obtención de espectros de buena calidad para alguno de los *spots* analizados a partir de los cuales no se identificó alguna proteína de manera estadísticamente significativa, se debió a que el genoma de tomate no está completamente secuenciado. Para nuestro interés en particular, esto no fue impedimento, ya que como mencionamos anteriormente, sabíamos la secuencia de LePRK2.

A continuación, se muestra como ejemplo el espectro correspondiente al *spot* 2 a partir del cual se identificó una proteína de tomate:



**Fig. 39: Espectro de masa UV-MALDI-TOF MS *spot 2*.**  
Se observan los iones correspondientes al *spot 2*.

En la figura 39, mostramos uno de los tantos espectros obtenidos a partir de los *spots* picados que obtuvieron espectros de buena calidad, a pesar que ninguno de ellos correspondió al de LePRK2. Así, realizamos UV-MALDI-TOF MS para obtener el *mass fingerprinting* (PMF) de la proteína correspondiente al *spot 2*, identificando a una proteína de tomate con alta identidad a la “fosfoglucomutasa citoplasmática” de *Pisum sativum*.

Resultado del análisis de UV-MALDI-TOF MS utilizando el motor de búsqueda *Mascot*

```

User       : ubypa
Email      : ubypa@pasteur.edu.uy
Search title :
Database   : NCBIInr 20080529 (6547598 sequences; 2236320780 residues)
Timestamp  : 4 Jun 2008 at 16:35:31 GMT
Protein hits : gi|12585296 Phosphoglucomutase, cytoplasmic (Glucose phosphomutase) (PGM)
               gi|15011464 hexamerin 2 precursor [Tenebrio molitor]
               gi|21728358 RNA dependent RNA polymerase [Pepino mosaic virus]
               gi|73979584 PREDICTED: hypothetical protein XP_532846 [Canis familiaris]
               gi|50552682 hypothetical protein [Yarrowia lipolytica]
               gi|84498054 putative phosphomannomutase [Janibacter sp. HTCC2649]
               gi|124665660 alpha-2-macroglobulin [Litopenaeus vannamei]
               gi|149911012 putative excinuclease ABC, subunit A [Moritella sp. PE36]
               gi|167377943 fumarate hydratase class I, anaerobic, putative [Entamoeba dispar S&W760]
               gi|160890231 hypothetical protein BACUNI_02671 [Bacteroides uniformis ATCC 8492]
               gi|167520718 predicted protein [Monosiga brevicollis MX1]
               gi|169604378 hypothetical protein SNOG_05201 [Phaeosphaeria nodorum SN15]
               gi|25553656 putative wall-associated kinase [Oryza sativa Japonica Group]
               gi|153834993 hypothetical protein A1Q_3321 [Vibrio harveyi HY01]
               gi|160891044 hypothetical protein BACUNI_03491 [Bacteroides uniformis ATCC 8492]
               gi|50551991 hypothetical protein [Yarrowia lipolytica]
               gi|78184135 lipid-A-disaccharide synthase [Synechococcus sp. CC9902]
               gi|21230281 acyl-CoA synthetase [Xanthomonas campestris pv. campestris str. ATCC 33913]

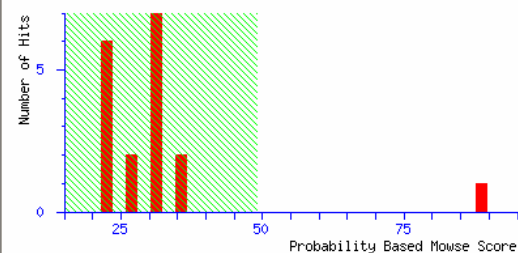
```

## Probability Based Mowse Score

Ions score is  $-10 \cdot \log(P)$ , where P is the probability that the observed match is a random event.

Individual ions scores  $> 49$  indicate identity or extensive homology ( $p < 0.05$ ).

Protein scores are derived from ions scores as a non-probabilistic basis for ranking protein hits.



**Fig. 40:** Resultado del análisis de UV-MALDI-TOF MS del *spot 2* obtenido por *Mascot*.

Resultado del análisis de *mass fingerprinting* realizado en *Mascot* con los datos de la figura 39.

Como resultado de esta búsqueda, obtuvimos un histograma con los diferentes *scores* obtenidos. En el primer histograma de la figura 40, podemos observar la identificación de la “fosfoglucomutasa citoplasmática” de *Pisum sativum* con alta significancia. Luego, el ión 986.3942 m/z fue ionizado y analizado nuevamente por MS/MS.

Resultado del análisis de UV-MALDI-TOF MS/MS utilizando el motor de búsqueda *Mascot*

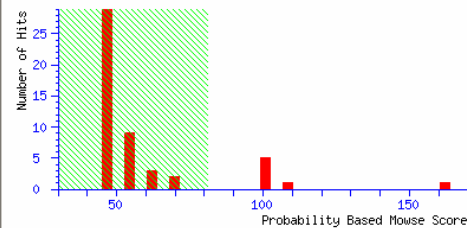
User : ubypa  
 Email : ubypa@pasteur.edu.uy  
 Search title :  
 Database : NCBI nr 20080529 (6547598 sequences; 2236320780 residues)  
 Timestamp : 4 Jun 2008 at 16:35:31 GMT  
 Warning : A Peptide summary report will usually give a much clearer picture of MS/MS search results.  
 Top Score : 162 for [gi|12585316](#), Phosphoglucomutase, cytoplasmic (Glucose phosphomutase) (PGM)

## Probability Based Mowse Score

Protein score is  $-10 \cdot \log(P)$ , where P is the probability that the observed match is a random event.

Protein scores greater than 81 are significant ( $p < 0.05$ ).

Protein scores are derived from ions scores as a non-probabilistic basis for ranking protein hits.



## Protein Summary Report

Format As: Protein Summary (deprecated) [Help](#)

Significance threshold  $p <$  0.05 Max. number of hits 20

Standard scoring  MudPIT scoring  Ions score or expect cut-off 0 Show sub-sets 0

Show pop-ups  Suppress pop-ups  Sort unassigned Decreasing Score Require bold red

Re-Search All Search Unmatched

## Index

	Accession	Mass	Score	Description
1.	<a href="#">gi 12585316</a>	63430	162	Phosphoglucomutase, cytoplasmic (Glucose phosphomutase) (PGM)
2.	<a href="#">gi 12585296</a>	63285	105	Phosphoglucomutase, cytoplasmic (Glucose phosphomutase) (PGM)
3.	<a href="#">gi 62321043</a>	26507	103	putative phosphoglucomutase [Arabidopsis thaliana]
4.	<a href="#">gi 15223226</a>	63442	102	phosphoglucomutase, cytoplasmic, putative / glucose phosphomutase, putative [Arabidopsis thaliana]

**Fig. 41: Resultado del análisis de UV-MALDI-TOF MS/MS del spot 2 obtenido por *Mascot*.**

Resultado del análisis de UV-MALDI-TOF MS/MS realizado a partir del ión parental 986.3942 m/z. La proteína identificada corresponde a una fosfoglucomutasa de *Solanum tuberosum*.

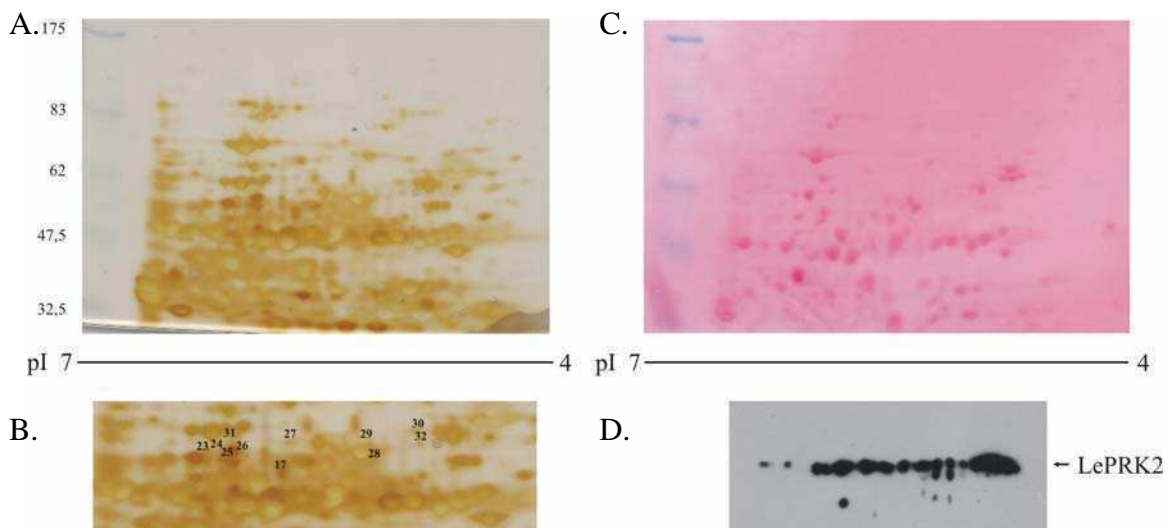
En este caso, volvimos a obtener la misma proteína aunque correspondiente a *Solanum tuberosum*, pero en este caso con un *score* mayor (162 del UV-MALDI-TOF MS/MS contra 89 en el UV-MALDI-TOF MS) y un *expectation number* muy bajo ( $4,1e^{-10}$ ).

Debido a que ninguno de los *spots* analizados a partir de los geles teñidos con CB correspondieron a LePRK2, decidimos correr nuevos geles 2D de fracción microsomal de polen maduro pero utilizando una tinción de nitrato de plata compatible para MS, con el fin de aumentar la sensibilidad de detección proteica (Figura 42). En este caso, aparecieron nuevos *spots* que no se veían en la tinción con CB dentro del área del gel

identificada como de interés, que podrían ser posibles candidatos de LePRK2. Decidimos seleccionar *spots* más débiles que fuertes, dada la baja expresión de LePRK2.

En este caso picamos nuevos *spots* de la posible zona de migración de LePRK2 y los enviamos a analizar. Con el objetivo de asegurarnos que nos encontráramos dentro de la zona posible de localización de LePRK2 en el gel, aislamos un *spot* visible por ambas tinciones (CB y nitrato de plata) y lo incluimos en el análisis como referencia en el gel teñido con nitrato de plata (ver en las figuras 38 y 42 el *spot* número 17, correspondiente a la Subunidad I de la peptidasa procesadora del Citocromo C, de papa (*Solanum tuberosum*)).

De los 10 *spots* secuenciados esta vez, a) 5 dieron espectros a partir de los cuales se identificaron proteínas (*spots* 23, 25, 28, 29, 30); b) 4 espectros fueron de buena calidad y se realizó MS/MS de alguno de los picos obtenidos, pero no fue posible identificar ninguna proteína de manera estadísticamente significativa (*spots* 26, 27, 31, 32) y c) 1 espectro fue de mala calidad (*spot* 24). En este caso y a diferencia de los espectros anteriores obtenidos a partir de geles teñidos con CB, se identificó una proteína perteneciente a tomate, “Precursor de dihidrolipoamida deshidrogenasa” (*spots* 23 y 25) y otra perteneciente a papa, “fosfoglicerato mutasa” (*spot* 28), pero nuevamente no encontramos a LePRK2.



**Fig. 42: Recorte de 10 *spots* con el fin de analizarlos por UV-MALDI-TOF MS y MS/MS.**

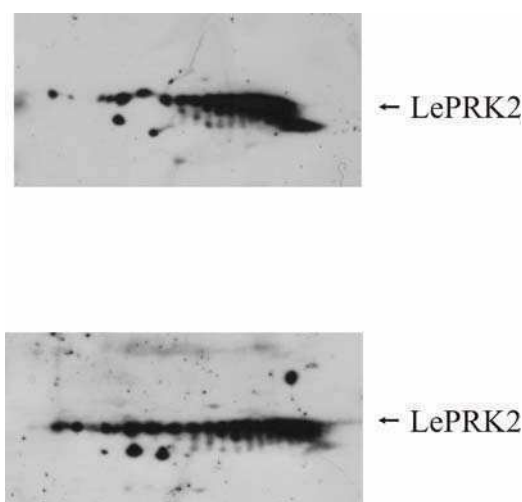
(A) Gel 2D (*strip* utilizado de pH 4-7, 240  $\mu\text{g}/\text{strip}$ ) de poliacrilamida 8% y teñido con nitrato de plata. (B) Ampliación de la zona de interés del gel 2D (*strip* utilizado de pH 4-7, 240  $\mu\text{g}/\text{strip}$ ) de poliacrilamida 8% y teñido con nitrato de plata. Los números

corresponden a *spots* seleccionados y recortados para mandar a secuenciar. (C) *Ponceau* del segundo gel 2D corrido en forma paralela a (A) y transferido a membrana de nitrocelulosa. (D) *Western blot* de membrana de (C) revelado con anticuerpo anti-LePRK2. El extremo ácido de los geles (pH 4) corresponde a la derecha de cada panel. El *spot* 17 es de referencia.

## **Estudio de los efectos de STIL en el mapa de fosforilación de LePRK2**

### **No se observan diferencias en las isoformas de LePRK2 en presencia de STIL en *western blot***

En el laboratorio se ha demostrado que la incorporación de extractos de pistilo de tomate o tabaco a fracciones microsomales de polen de tomate, provocaba una desfosforilación específica de LePRK2 (Wengier *et al.*, 2003). En el laboratorio se logró purificar este compuesto al cual se lo denominó STIL (*Style Interactor for LePRKs*) (Tesis doctoral Diego Wengier, 2008). Para analizar los efectos de STIL en el mapa de fosforilación de LePRK2, hemos realizado ensayos de geles 2D con fracción de proteínas microsomales de polen maduro de tomate en presencia y ausencia de fracciones parcialmente purificadas de STIL (fracción de metanol/cloroformo de esquema de purificación) y de mayor purificación (fracción de DEAE de esquema de purificación; ver Materiales y Métodos). Ambos geles (dos para el experimento con STIL de la fracción de metanol/cloroformo de su esquema de purificación (geles no mostrados) y otros dos para el experimento con la fracción de STIL de DEAE (Figura 43)) se corrieron en forma paralela, fueron transferidos y revelados con anticuerpo anti-LePRK2. La cantidad de STIL utilizada en los ensayos era suficiente para producir la desfosforilación completa de LePRK2, observada a través de ensayos con  $^{32}\text{P}\gamma\text{ATP}$ .



**Fig. 43: No se observan diferencias cualitativas en el tratamiento de proteínas de fracción microsomal de polen maduro tratadas o no con STIL en *western blots* de geles 2D.**

Fracciones de proteínas microsomales de polen maduro (200  $\mu\text{g}$ ) fueron incubadas sin (panel superior) o con (panel inferior) 1,2 unidades de absorbancia a 280 nm/ $\mu\text{l}$  de una fracción de purificación de DEAE de STIL y luego separadas en geles 2D (*strip* utilizado de pH 4-7, 200  $\mu\text{g}/\text{strip}$  y 8% de poliacrilamida el gel de la segunda dimensión) y reveladas con anticuerpo anti-LePRK2. El extremo ácido del gel (pH 4) corresponde a la derecha de cada panel.

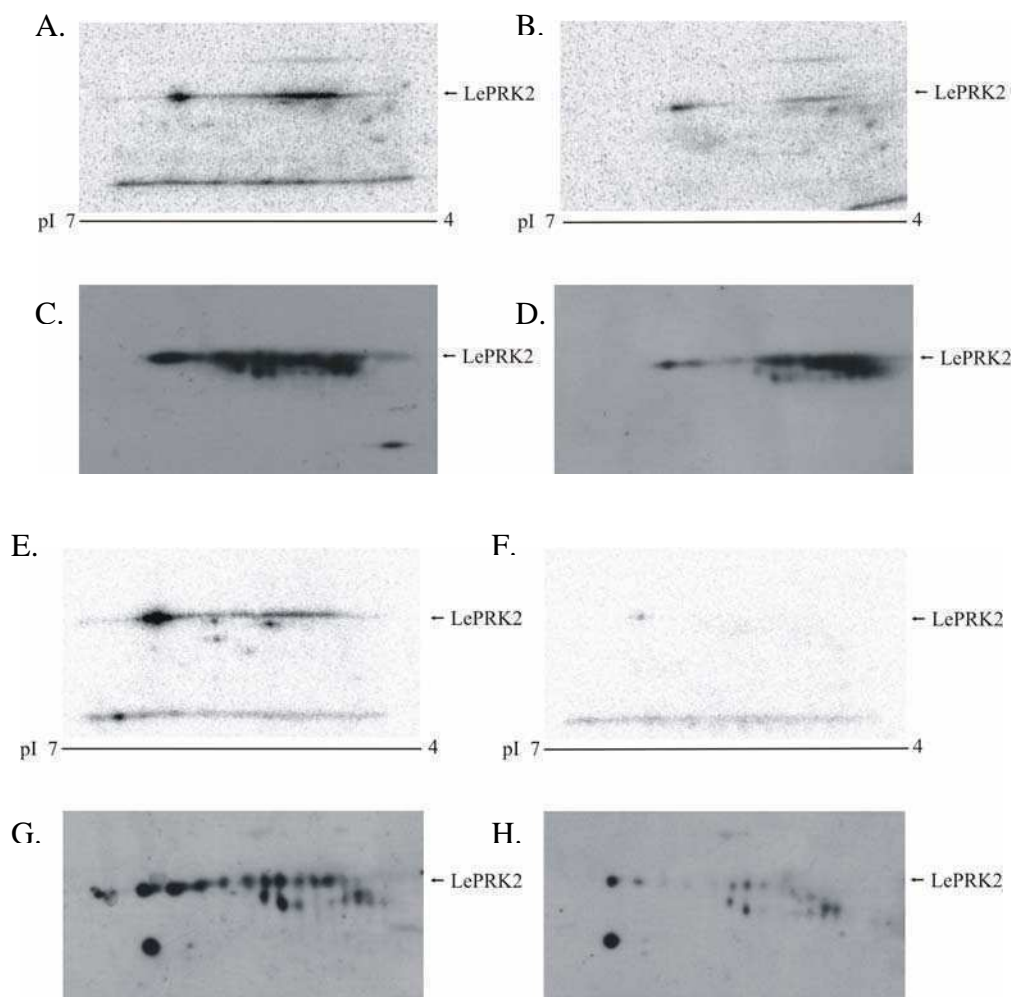
La figura 43 muestra que no hay claras diferencias en el patrón de las isoformas de LePRK2 entre los tratamientos. Hemos repetido este ensayo tres veces y no hemos observado diferencias, independientemente de qué fracción de STIL se utilizó en cada caso. Es factible que STIL esté desfosforilando a LePRK2 pero las nuevas isoformas obtenidas no sean detectadas porque la sensibilidad del WB no es la suficiente. Por esto decidimos aumentar la detección de estas posibles isoformas trabajando con radiactivo ( $^{32}\text{P}\gamma\text{ATP}$ ) (ver Figura 44 más abajo). Cabe recordar como se describió en materiales y métodos, que la presencia de STIL es evidente por la desaparición de la banda correspondiente a LePRK2 en ensayos de fosforilación en geles de una dimensión (resultados no mostrados).

### **En presencia de $^{32}\text{P}\gamma\text{ATP}$ , sólo algunas isoformas de LePRK2 se fosforilan y las mismas son desfosforiladas por STIL**

Realizamos entonces geles 2D de fracciones de proteínas microsomales de polen maduro de tomate en presencia de 0,125  $\mu\text{Ci}$  de  $^{32}\text{P}\gamma\text{ATP}$ , tratados o no con STIL (fracción de DEAE).



La figura 44 muestra autorradiografías (de un total de tres experimentos independientes) de las membranas de nitrocelulosa (panel superior) y su correspondiente WB (panel inferior). A primera vista, se puede observar que STIL produce diferencias en el tratamiento de fracción de proteínas microsomales de polen maduro en presencia de 0,125  $\mu\text{Ci}$  de  $^{32}\text{P}\gamma\text{ATP}$ . Con el fin de tener mediciones cuantitativas, decidimos calcular la relación entre la intensidad de señal radiactiva y la intensidad de señal obtenida por WB (IR/IW). En tres experimentos independientes, hemos comprobado una disminución del valor IR/IW en membranas de polen maduro tratadas con STIL (Tabla 2). Considerando se utilizó la misma masa proteica para ambos tratamientos (en presencia y ausencia de STIL) y el mismo anticuerpo y considerando que no hubo degradación mediada por STIL, la disminución de esta relación está dada por la caída de la señal radiactiva, es decir, por una desfosforilación de LePRK2 en presencia de STIL.



**Fig. 44: STIL desfosforila isoformas hiperfosforiladas de LePRK2, en tratamientos en presencia de 0,125  $\mu$ Ci de  $^{32}$ P $\gamma$ ATP, en geles 2D.**

(A-D) y (E-H) corresponden a dos experimentos independientes. Fracciones de proteínas microsomales de polen maduro (200  $\mu$ g) fueron incubadas (A) y (E) sin o (B) y (F) con STIL (fracción de DEAE) en presencia de 0,125  $\mu$ Ci de  $^{32}$ P $\gamma$ ATP, separadas en geles 2D (*strip* utilizado de pH 4-7, 200  $\mu$ g/gel y 8% de poliacrilamida el gel de la segunda dimensión) y autorradiografiadas y posteriormente reveladas respectivamente con anticuerpo anti-LePRK2 (C y D; G y H). El extremo acídico de los geles (pH 4) corresponde a la derecha de cada panel.

	Experimento 1 (% IR/IW)	Experimento 2 (% IR/IW)	Experimento 3 (% IR/IW)
Sin STIL	100 %	100 %	100 %
Con STIL	65 %	43 %	41 %

**Tabla 2: Disminución del valor IR/IW en microsomas de polen maduro tratadas con STIL.**

Porcentajes de tres experimentos, cada uno como (A-D) o (E-H), donde se calculó la relación entre el porcentaje de señal radiactiva (% IR) y el de la señal del WB (% IW). La relación resultante de los tratamientos realizados en ausencia de ligando fue considerada como 100%.

Estos últimos resultados sugieren que al agregar  $^{32}$ P $\gamma$ ATP, sólo algunas isoformas de LePRK2 son las que lo toman perdiéndolo luego con el agregado de STIL. En estos experimentos, alineamos la autorradiografía con su WB correspondiente y observamos que el patrón horizontal radiactivo que disminuye coincide con el de LePRK2 en el WB. En la figura 44, observamos que la señal radiactiva del tratamiento de fracción de proteínas microsomales de polen maduro de tomate en presencia del ligando es menor que en ausencia del mismo y las mismas isoformas que toman el fosfato radiactivo son las que lo pierden en presencia del ligando. Dado que la cantidad de radiactivo que se utiliza en los ensayos de fosforilación es suficiente para observar algunas isoformas de LePRK2 fosforiladas, las especies que lo captan también son pocas y por lo tanto, la población de LePRK2 que se desfosforila por STIL también va a ser pequeña y no detectable por la técnica de WB.

### **Análisis bioinformático del dominio yuxtamembrana de LePRK2**

Con el fin de complementar los resultados obtenidos mediante la mutagénesis de los hipotéticos residuos fosforilados de LePRK2, hemos realizado un análisis

bioinformático sobre los motivos I y II y las dos mutantes individuales del dominio quinasa descritos en esta tesis. Este trabajo fue realizado en colaboración con el Dr. Gustavo Parisi de la Universidad Nacional de Quilmes, Bernal, Buenos Aires, Argentina. Como describimos en la introducción, el receptor LePRK2 de polen de tomate (*Solanum lycopersicum*), tienen un dominio extracelular compuesto por 5 LRRs consecutivos de 22 a 26 aminoácidos, un dominio transmembrana, un dominio citoplasmático que contiene a su vez un dominio yuxtamembrana variable, uno quinasa y un dominio carboxilo-terminal (Muschietti *et al.*, 1998).

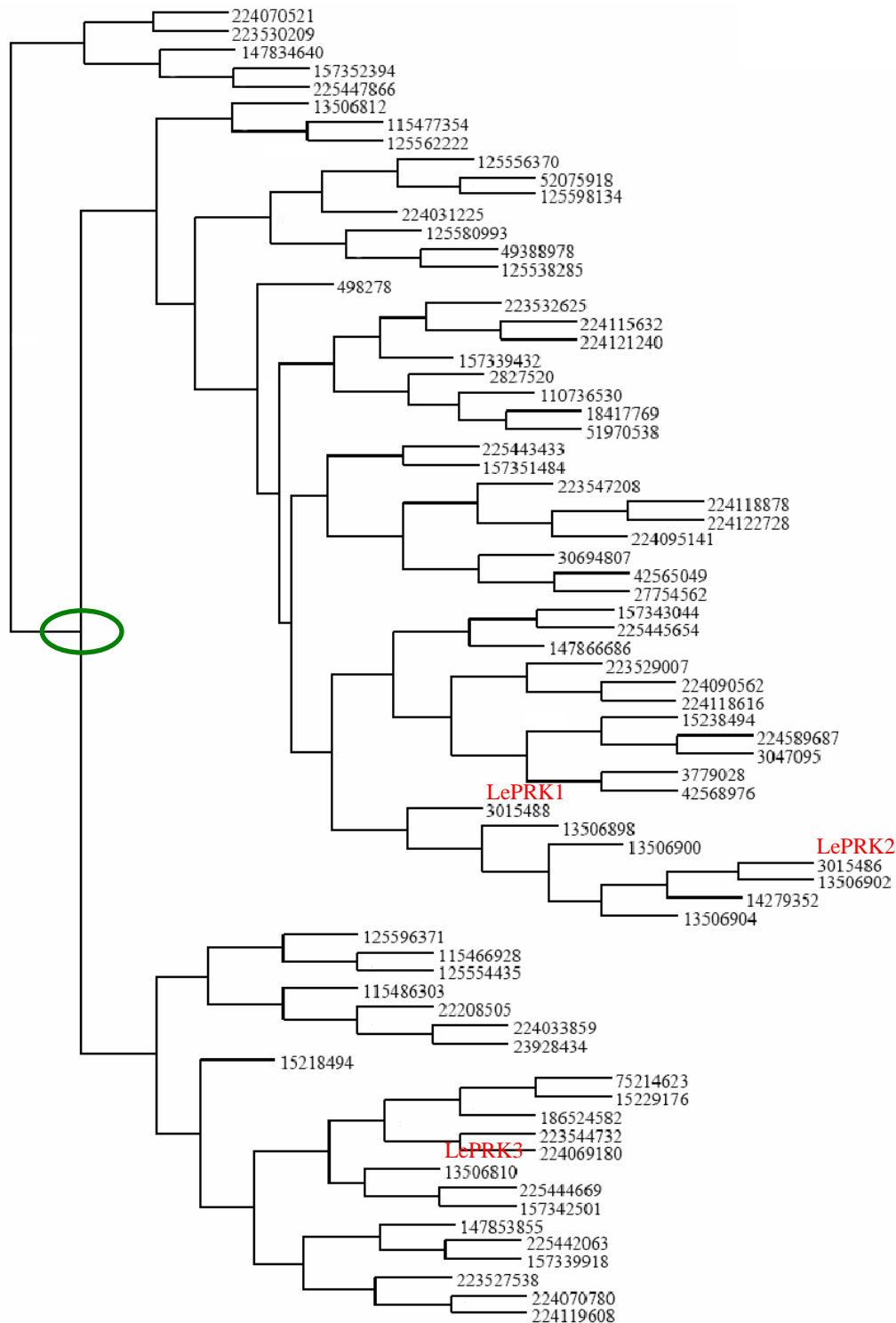


**Fig. 45: Esquema de los dominios de la proteína LePRK2.**

Cada bloque corresponde a un dominio diferente de la proteína. ECD: Dominio extracelular; TM: Dominio transmembrana; JMD: Dominio yuxtamembrana; KD: Dominio quinasa; CtD: Dominio carboxilo-terminal.

Comenzamos el análisis a partir de una búsqueda secuencial con el programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) utilizando el dominio citoplasmático entero de LePRK2. Seleccionamos las proteínas más cercanas a la LePRK2, que correspondieron a las primeras 200 secuencias obtenidas. A estas secuencias las alineamos usando el programa Clustal X (<http://www.clustal.org/>). Como era de esperar, este alineamiento destacó la gran conservación relativa del dominio quinasa (KD) y la casi completa falta de conservación del segmento JMD (resultados no mostrados).

En base a esta clara diferencia, decidimos estudiar por separado el segmento JMD del KD+CtD utilizando el programa PHYML. Para esto utilizamos alineamientos separados del JMD para las 200 secuencias reclutadas y para los segmentos KD+CtD. En base a estos alineamientos, estudiamos la relación filogenética por separado para los dos fragmentos, a través del programa PHYML (*Phylogenetic estimation using Maximum Likelihood*; <http://atgc.lirmm.fr/phyml/>). Este programa estima filogenias de alineamientos de secuencias de nucleótidos o de aminoácidos utilizando el método de máxima verosimilitud. Utilizando los segmentos KD+CtD se obtuvo el siguiente árbol:



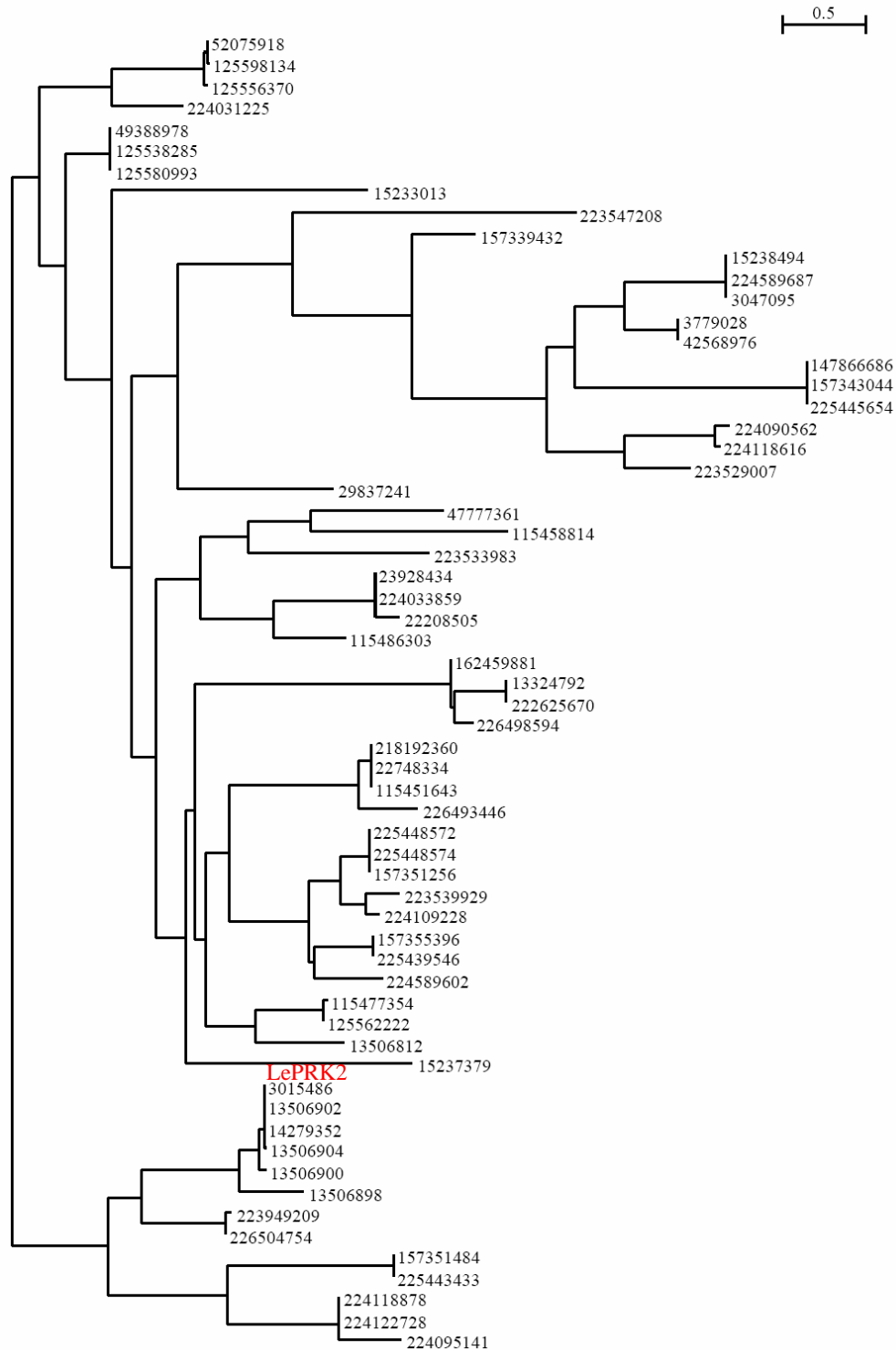
**Fig. 46: Resultado de la relación filogenética a partir de los dominios KD+CtD de LePRK2 utilizando el programa PHYML.**

Árbol filogenético basado en la comparación de la secuencia aminoacídica de los dominios KD+CtD de LePRK2 con las 200 secuencias reclutadas. Cada número corresponde a una proteína identificada a partir de un número de identificación de secuencia (GI: *GenInfo Identifier*). El círculo verde indica una duplicación temprana. Este árbol muestra en rojo las tres proteínas receptoras quinasas LePRK1, LePRK2 y

LePRK3 de *Solanum lycopersicum* (sus nombres figuran por encima de sus respectivos GI).

En la figura 46 se observa que las proteínas LePRK2 (GI 3015486) y LePRK1 (GI 3015488) están juntas en el mismo *cluster*, mientras que LePRK3 (GI 13506810) está en otro *cluster*. Esto implica que hubo probablemente una duplicación temprana (marcada con un círculo verde en el árbol de la figura 46) seguida de otra que dio lugar a las proteínas LePRK1 y LePRK2.

Llevando a cabo el mismo análisis pero para el segmento JMD, encontramos algo totalmente diferente:

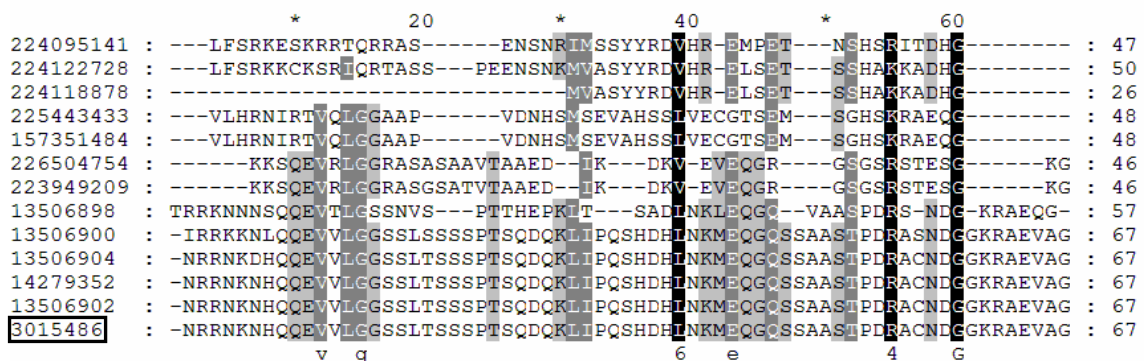


**Fig. 47: Resultado de la relación filogenética a partir del fragmento yxtamembrana de LePRK2 y 200 secuencias reclutadas, utilizando el programa PHYML.**

Árbol filogenético basado en la comparación de la secuencia aminoacídica del segmento JMD de LePRK2 con las 200 secuencias reclutadas. Cada número corresponde a una proteína identificada a partir de un número de identificación de secuencia. Este árbol muestra en rojo a la proteína receptora quinasa LePRK2 de *Solanum lycopersicum* (su nombre figura por encima de su respectivo GI).

El *cluster* que contiene a LePRK2, no contiene ni a LePRK1 ni a LePRK3. Esto sugiere desde el punto de vista evolutivo un mayor cambio secuencial en el segmento JMD con respecto al ocurrido en los dominios KD+CtD. Por otro lado, considerando que LePRK1 y LePRK2 podrían tener funciones distintas, el segmento JMD debería ser, en parte al menos, responsable de esas diferencias; igualmente no debemos olvidar que el dominio extracelular también es distinto entre LePRK1 y LePRK2 (alineamiento no mostrado).

La figura 48 muestra lo anteriormente descrito referido al alineamiento del segmento JMD respetando el *clustering* evolutivo de la figura 47. Ambas figuras muestran que LePRK2 se halla conservada junto con las proteínas de su mismo *cluster*.



**Fig. 48: Alineamiento del segmento JMD de LePRK2 junto a otras proteínas de su mismo *cluster* evolutivo.**

Para el alineamiento se utilizó el programa *Clustal X* respetando el *clustering* evolutivo, considerando las proteínas más cercanas a LePRK2 según el programa *PHYML*. Cada GI corresponde a un número de identificación de secuencia de las siguientes especies: 224095141: *Zea mays*; 224122728: *Populus trichocarpa*; 224118878: *Populus trichocarpa*; 225443433: *Populus trichocarpa*; 157351484: *Vitis vinifera*; 226504754: *Vitis vinifera*; 223949209: *Nicotiana tabacum*; 13506898: *Solanum tuberosum*; 13506900: *Solanum pimpinellifolium*; 13506904: *Solanum peruvianum*; 14279352: *Solanum pennellii*; 3015486: LePRK2 (*Solanum lycopersicum*; indicada con un rectángulo negro en su GI). Residuos altamente y débilmente conservados están enfatizados por cajas negras y grises, respectivamente.

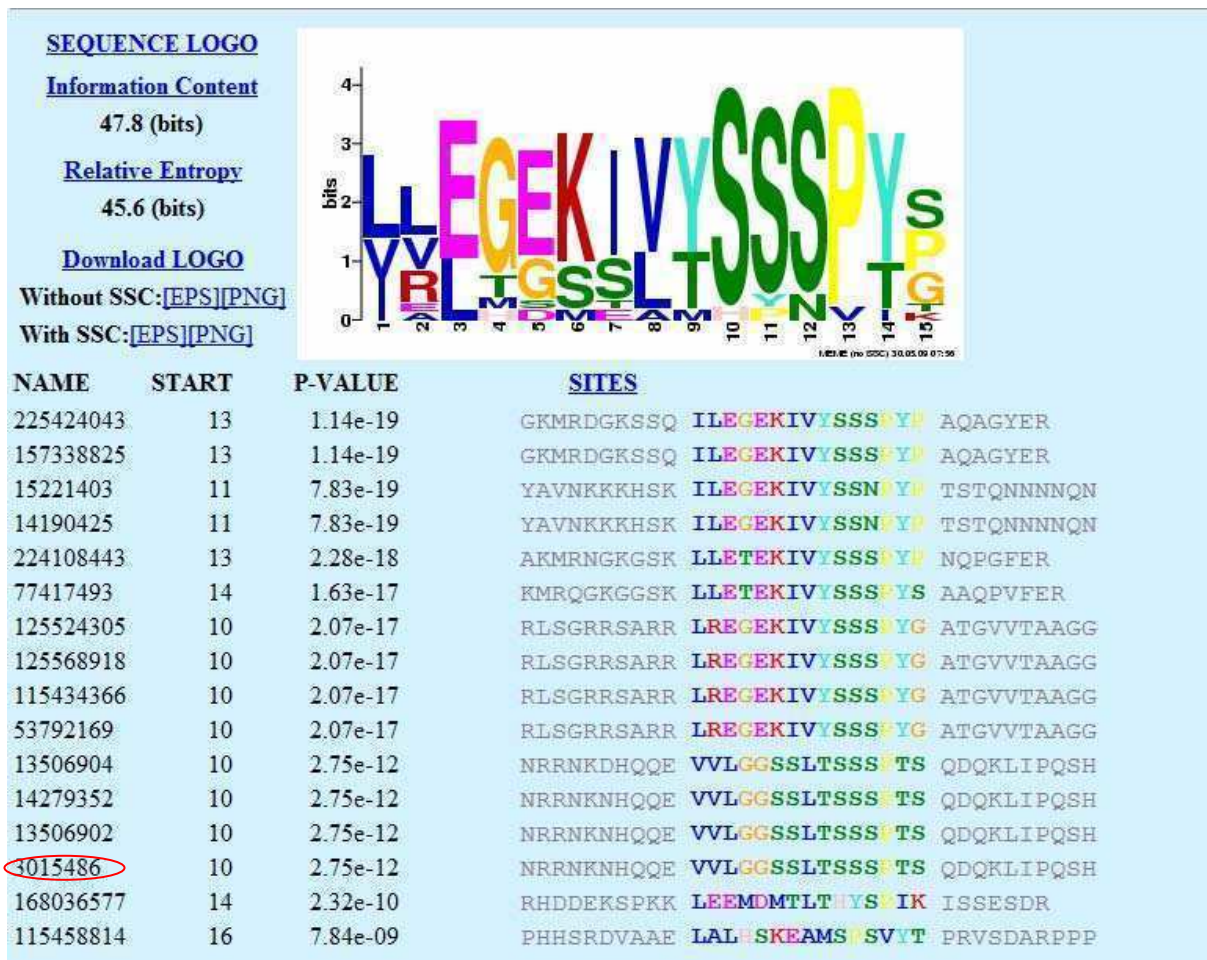
La fosforilación de motivos regulatorios fue descrita en otros receptores quinasa, tales como en el receptor TGF- $\beta$ R I (T $\beta$ RI) (Wieser *et al.*, 1995). Un motivo fosforilable en el dominio JMD de TGF- $\beta$ R I (motivo GS; GSGSGLP), regula la actividad río abajo del receptor (Wieser *et al.*, 1995) al ser fosforilado por TGF- $\beta$ R II en el marco del complejo TGF- $\beta$ R I/TGF- $\beta$ R II/TGF- $\beta$ . Dicha fosforilación permite la

interacción con la superficie básica de la proteína Smad, que luego es fosforilada por TGF- $\beta$ R I (Kang *et al.*, 2009).

Posteriormente, para determinar la existencia de algún motivo en el dominio JMD de LePRK2, realizamos una búsqueda de motivos secuenciales en las 200 proteínas obtenidas a partir de la búsqueda realizada con el programa BLAST. Para ello usamos el programa MEME (*Multiple EM for Motif Elicitation*; [http://meme.sdsc.edu/meme4\\_1\\_1/cgi-bin/meme.cgi](http://meme.sdsc.edu/meme4_1_1/cgi-bin/meme.cgi)) que detecta segmentos o motivos secuenciales comunes a un conjunto de secuencias ya sea de ADN o de proteínas y luego produce una descripción de cada patrón que descubre generando un motivo posible (Bailey *et al.*, 2006). El programa barre las secuencias ingresadas analizando ventanas de distintos tamaños y genera matrices para cada grupo encontrado, de modo de disminuir el *e-value* del motivo, que corresponde a la probabilidad de encontrar un patrón de secuencia igualmente conservado en secuencias al azar. El programa MEME tiene en cuenta la longitud de la secuencia que se ingresa para analizar (entre 6 y 50 ocurrencias son consideradas) y el número de *matches* que quiero encontrar.

Usando el MEME encontramos distintos motivos estadísticamente significativos entre las 200 secuencias analizadas. El motivo de mejor *score* mostró identidad con el dominio GS de TGF- $\beta$ R I (resultado no mostrado). Para nuestra sorpresa, el segundo motivo encontrado con mejor *score* correspondió al motivo I de LePRK2 (GI 3015486) caracterizado funcionalmente en esta tesis (Figura 49).





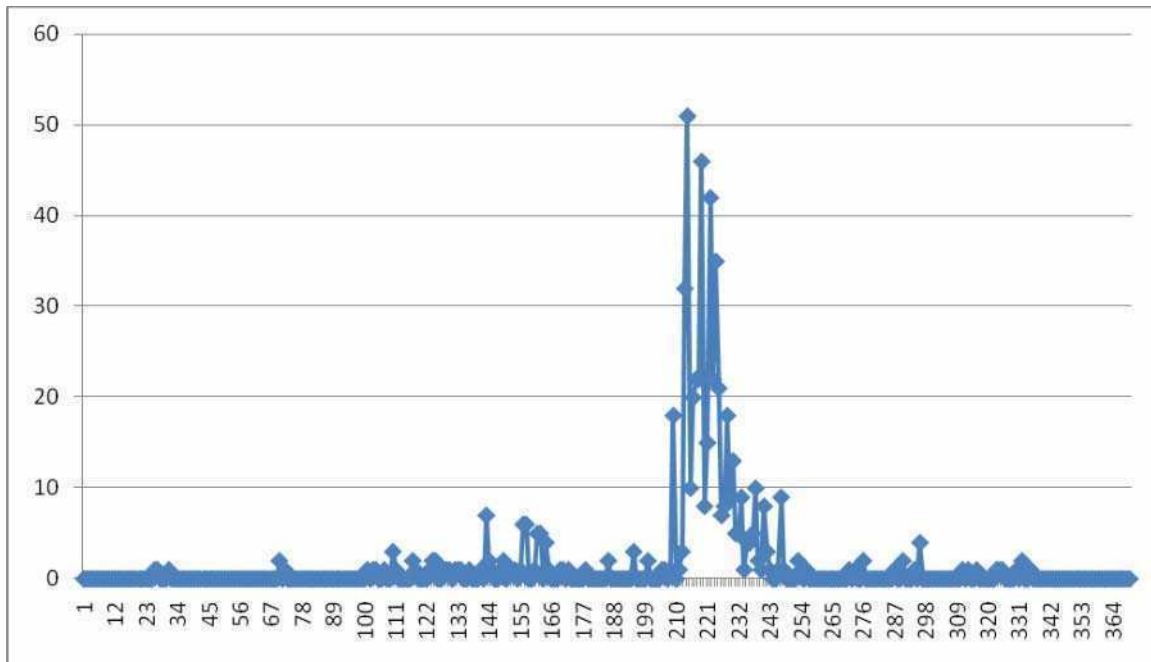
**Fig. 49: Análisis de MEME para el segmento yuxtamembrana de LePRK2.**

La figura que se muestra en fondo blanco indica el motivo aminoacídico hallado por el MEME en formato *logo* a partir de las secuencias ingresadas. En el eje Y, se muestra la composición relativa por sitio; la altura de una letra indica su frecuencia relativa a una dada posición en el motivo. En el eje X, se muestra la posición de cada aminoácido en el motivo encontrado. Los sitios identificados pertenecientes al motivo están indicados y en un código de color se muestra la conservación de cada posición del motivo. Por debajo, se muestra una lista de las 15 proteínas más cercanas a LePRK2 (identificada como 3015486 y marcada con un óvalo rojo). *NAME*: GI de una dada secuencia; *START*: número de aminoácido en el que empieza el motivo encontrado en función a la posición aminoacídica del segmento ingresado para realizar la búsqueda; el residuo 1 del resultado del MEME corresponde a L268 en la molécula LePRK2. Las proteínas ortólogas obtenidas son: 225424043 y 157338825 (*Vitis vinifera*); 15221403 y 14190425 (*Arabidopsis thaliana*); 224108443 (*Populus trichocarpa*), 77417493 (*Malus domestica*) y 12552430 (*Oryza sativa Indica*); 125568918, 115434366 y 53792169 (*Oryza sativa Japonica*); 13506904 (*Solanum pimpinellifolium*), 14279352 (*Solanum peruvianum*), 13506902 (*Solanum pennellii*), 168036577 (*Physcomitrella patens*) y 115458814 (*Oryza sativa Japonica*).

El resultado obtenido por el análisis de MEME conjuntamente con la evidencia experimental presentada sobre las mutaciones en el segmento JMD de LePRK2 sugiere fuertemente la presencia de un “nuevo” motivo regulatorio dentro de las proteínas receptoras de plantas. Más aún, dos de los tres residuos del motivo I analizados por mutagénesis en esta tesis (S277 y S279; S10 y S12 en el gráfico de la figura 49) se encuentran altamente conservados en el alineamiento del MEME. El hallazgo de este dominio conservado dentro del segmento variable yuxtamembrana, lo hace más relevante y se diferencia del dominio quinasa, el cual está muy conservado.

La situación fue diferente para el motivo II ya que sólo apareció conservado en los ortólogos cercanos a LePRK2, tal como se observa en la figura 23. Este análisis sugiere que la fosforilación del motivo I sería un mecanismo general entre todas las proteínas quinasas que comparten este dominio según el MEME y la del motivo II pudo haberse debido a diversificaciones funcionales.

Con respecto a las mutantes individuales T358 y S396, éstas se encuentran en el dominio KD. Para tratar de elaborar alguna correlación funcional entre estos dos residuos y los residuos donde ocurren con mayor frecuencia los eventos de fosforilación, estudiamos la ocurrencia de fosforilaciones en 2.000 proteínas estructuralmente similares a la del dominio quinasa del receptor FGF-R2 (receptor 2 de crecimiento de fibroblasto; <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=2PSQ>), uno de los receptores quinasas utilizado para modelar la estructural de LePRK2; igualmente esto no fue posible dada la diferencia secuencial de ambos dominios yuxtamembrana. Se buscaron proteínas de la familia estructural de la FGF-R2 usando el programa VAST (*Vector Alignment Search Tool*; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/VAST/vast.shtml>) de búsqueda de similitud estructural y se analizaron aproximadamente 2.000 alineamientos estructurales que tienen como referencia a la proteína FGF-R2. Se mapearon los residuos posiblemente fosforilados sobre la estructura de la proteína FGF-R2 y se calculó (utilizando un programa realizado en el laboratorio del Dr. Gustavo Parisi) la ocurrencia relativa de los residuos fosforilados estructuralmente similares a los que tiene la estructura FGF-R2. De esta manera se obtuvo el siguiente gráfico:



**Fig. 50: Resultado de la búsqueda de la ocurrencia relativa de los residuos fosforilados estructuralmente similares a los que tiene la estructura FGF-R2.**

En el eje X se muestran las 364 posiciones de la proteína FGF-R2 y en el eje Y, la ocurrencia de los sitios fosforilados en otras proteínas estructuralmente equivalentes a los sitios de la proteína FGF-R2.

Los residuos de LePRK2 que se mutaron en el dominio quinasa (T358 y S396) son equivalentes a las posiciones 53 y 100 del eje X del gráfico de la figura 50. Como se observa, no hay muchas proteínas con fosforilaciones en esas posiciones. En este sentido, por el momento, es difícil hacer alguna predicción al respecto. Esto puede deberse a que estructuralmente nuestra proteína sea diferente a las del grupo de FGF-R2.

El objetivo fue determinar en dónde ocurren con mayor frecuencia la fosforilación de los sitios y así poder predecir algún tipo de correlación funcional. Esto hubiera sido muy enriquecedor realizarlo para el segmento JMD, pero sólo se encontraron hasta ahora 4 proteínas cristalizadas con dominio JMD: 1b6c (estructura cristalina del dominio citoplasmático del receptor TGF- $\beta$ R I en complejo con la proteína FKBP12), 1vjy (estructura cristalina del inhibidor naftiridin del receptor TGF- $\beta$ R I), 1py5 (estructura cristalina del dominio quinasa del receptor TGF- $\beta$ R I con un inhibidor) y 1ias (dominio citoplasmático de TGF- $\beta$ R I no fosforilado cristalizado sin la proteína FKBP12). Esto no fue suficiente para determinar la frecuencia de fosforilación del dominio JMD de LePRK2, ya que ninguna de las existentes era semejante a la de LePRK2.

## CONCLUSIONES Y DISCUSION

LePRK1 y LePRK2 son dos proteínas receptoras quinasa de polen de tomate que forman parte de un complejo (LePRKs) de alto peso molecular (~400 kDa) que se localiza en la membrana plasmática del grano de polen maduro y en el tubo polínico germinado. LePRK2 se encontraría hiperfosforilada en membrana de polen tanto maduro como germinado.

Nuestro desafío durante el desarrollo de esta tesis, fue investigar la relevancia de los diferentes sitios de fosforilación presentes en la molécula de LePRK2 y determinar el significado funcional de dichos eventos de fosforilación durante las interacciones polen-pistilo. Diversas isoformas de LePRK2 se han visto a través de la técnica de geles en dos dimensiones, lo que indicaría una regulación fina del crecimiento del tubo polínico.

Debido a las descritas dificultades que supone la identificación fidedigna de los sitios de fosforilación a través de geles 2D y de espectrometría de masa, decidimos realizar en paralelo los dos abordajes descritos durante este trabajo de tesis.

### **Análisis fisiológico de LePRK2 y de mutantes en sus sitios de fosforilación**

A través de la técnica de bombardeo en polen de tabaco, hemos demostrado que la sobreexpresión de LePRK2 genera crecimiento despolarizado de los tubos polínicos. Los tubos sobreexpresantes de LePRK2 son significativamente más cortos y con ápices globosos cuando se los compara con eGFP y con tubos que sobreexpresan la versión mutada mLePRK2-eGFP que contiene una mutación en la lisina 372 del subdominio II del dominio quinasa, sustituida por alanina. El fenotipo sobreexpresante de LePRK2 no es simplemente causado por la alta expresión de esta proteína, porque tubos sobreexpresantes de mLePRK2-eGFP muestran tubos normales en largo y ancho del ápice y porque tubos LePRK2-eGFP a moderadas y bajas intensidades también muestran crecimiento despolarizado. Estos resultados también sustentan la hipótesis que la actividad quinasa de LePRK2 es responsable de los cambios observados en tubos sobreexpresantes de LePRK2-eGFP.

También hemos demostrado que LePRK2 está asociada a la regulación de los filamentos de actina durante la elongación del tubo polínico. Esta hipótesis es sustentada por el hecho que los tubos sobreexpresantes de LePRK2 muestran una deposición anormal de filamentos de actina. Por otro lado, la droga Latrunculina B en tubos sobreexpresantes de LePRK2-eGFP específicamente revierte el fenotipo despolarizado de tubos cortos y engrosamiento del ápice a tubos polínicos normales como los tubos eGFP.

La predicción *in silico* de sitios de fosforilación de una proteína es una herramienta importante ya que permite otorgar un posible *score* a un determinado sitio aminoacídico, acotando dentro de todos los residuos potencialmente fosforilables de una proteína, cuáles son los que cuentan con más probabilidad de ser fosforilados.

Por otro lado, la estructura tridimensional de una proteína en estudio puede mejorar enormemente la especificidad de la predicción de sitios (Brinkworth., 2003). A veces, tanto esta estructura como su predicción *in silico* no son fáciles de obtener, dado que a veces no poseen dominios homólogos a los de algunas proteínas ya cristalizadas, como ocurre con el dominio yuxtamembrana de LePRK2. Por lo tanto, lo que llevamos a cabo fue utilizar la enorme cantidad de secuencias primarias disponibles en bases de datos públicas para predecir sitios de fosforilación a partir de la secuencia primaria de LePRK2.

Mediante la mutación de los posibles sitios de fosforilación de LePRK2 identificados a partir de análisis computacionales, determinamos el efecto opuesto sobre la longitud del tubo polínico de los motivos I y II del dominio yuxtamembrana de LePRK2. Todos los mutantes analizados mostraron una localización normal de LePRK2 en la membrana del tubo, indicando que las diferencias encontradas en la longitud y la aparición de los fenotipos no se atribuyen a una incorrecta localización de LePRK2-eGFP. Hemos visto que el bloqueo de la fosforilación de los residuos del motivo I (S277/S279/S280) por su sustitución en alaninas, desreprime el efecto inhibitorio del crecimiento del tubo polínico causado por la sobreexpresión de LePRK2-eGFP. Por el contrario, el reemplazo por alanina de los residuos del motivo II (S304/S307/T308) exagera el efecto inhibitorio en el largo del tubo provocado por LePRK2-eGFP. Es posible especular que *in vivo* haya un equilibrio entre estos dos motivos opuestos de modo de mantener una fina regulación del crecimiento polarizado del tubo.

En teoría, la organización de residuos de fosforilación de una dada proteína en *clusters*, sugiere que su fosforilación sería secuencial con completa activación después que los fosfatos ocupan todos los sitios de dicho *cluster*. Sin embargo, esto no parece ser el caso de LePRK2, porque sólo cuando un residuo del motivo I es reemplazado por ácido aspártico, los tubos muestran un crecimiento despolarizado, similar al obtenido por el triple mutante de ácido aspártico (3D-WT) y por el sobreexpresante de LePRK2-eGFP. Una posibilidad que podría ser analizada es si la fosforilación de alguno de los residuos del motivo I inhibe la fosforilación de los residuos del motivo II o en algún otro lugar en la molécula. Por ejemplo, Yoo *et al.*, 2008, han descrito dos sitios de fosforilación en la proteína EIN3 (Ethylene-insensitive 3) de *Arabidopsis*. EIN3 es un componente nuclear en la casacada de señalización de quinasas activadas por etileno. En presencia de etileno, la fosforilación de la treonina-174 de EIN3 induce su estabilización permitiendo la transcripción de genes involucrados en la respuesta a la hormona, mientras que en ausencia de la hormona, la fosforilación de la treonina-592 induce la degradación de EIN3 (Yoo *et al.*, 2008).

A pesar que los experimentos llevados a cabo durante diferentes días no pueden ser estadísticamente comparados, la comparación de las figuras 13 A, 26 A y 30 A sugiere que 3A-WT y WT-3D muestran tubos tan largos como los de eGFP. Por otro lado, los tubos sobreexpresantes de la séxtuple mutante 3A-3D no mostraron un aumento significativo del largo del tubo cuando se los compararon con tubos sobreexpresantes de 3A-WT y con los de WT-3D, sugiriendo que la séxtuple mutante alcanza un límite fisiológico sin tener una posibilidad de aumentar su largo.

Por otro lado, las mutantes de T358, tanto en su versión alanina como en ácido aspártico, no mostraron diferencias significativas en la longitud del tubo polínico. Tal vez este residuo no tenga implicancias fisiológicas o esté involucrado en el surgimiento de otros fenotipos del tubo polínico no analizados en esta tesis, tales como el número de desviaciones sobre el crecimiento polarizado del tubo, el número de ápices por tubo, entre otras.

La situación es diferente cuando es analizado el ancho del ápice del tubo. Ninguna de los mutantes de fosforilación analizadas en esta tesis mostró diferencias significativas en el ancho del ápice al ser comparadas con tubos sobreexpresantes de LePRK2-eGFP; esto resultó opuesto a lo encontrado para los ápices de los tubos que sobreexpresaban mLePRK2-eGFP, los cuales siempre mostraron anchos normales a

todas las intensidades. Estos resultados sugieren que la eliminación de la actividad quinasa fue más efectiva en la regulación del ancho del ápice que la sustitución de hasta 6 residuos de fosforilación. Esto sugiere que deberíamos considerar la posibilidad que otros fosforesiduos en LePRK2 estén involucrados directamente en la regulación del ancho del ápice de los tubos polínicos.

### **Análisis bioinformático del dominio yuxtamembrana de LePRK2**

Los receptores serina/treonina quinasa en plantas corresponden a un cuarto de todas las fosfoproteínas de *Arabidopsis* (Nühse *et al.*, 2004). A partir de análisis fosfoproteómicos, se han encontrado que tres cuartos de los péptidos fosforilados de estos receptores provenían de la región yuxtamembrana y carboxilo-terminal de los mismos (Nühse *et al.*, 2004).

Motivos regulatorios de fosforilación han sido encontrados en otros receptores quinasa, como ha sido explicado para el receptor quinasa TGF- $\beta$ R I (Wieser *et al.*, 1995). Ha sido demostrado que dos motivos de fosforilación en TGF- $\beta$ R I regulan su actividad de fosforilación, uno en el dominio yuxtamembrana (motivo GS) y el otro en una zona adyacente al comienzo del dominio quinasa (Wieser *et al.*, 1995). A partir de 200 secuencias de RLK encontradas por BLAST utilizando el dominio citoplasmático de LePRK2 como secuencia consulta y a través de la implementación de un método de rastreo de motivos (MEME), encontramos dos motivos estadísticamente significativos. El de mayor *score* mostró identidad con el motivo GS de TGF- $\beta$ R I (Wieser *et al.*, 1995) mientras que el segundo en orden de *score*, resultó ser el motivo I de LePRK2 caracterizado en esta tesis. Fundamentando este hallazgo, dos de los residuos mutagenizados del motivo I (S277 y S279) que mostraron actividad biológica (Figura 29) se encontraron altamente conservados en el alineamiento del programa MEME. La situación fue diferente para el motivo II ya que estaba sólo conservado en los “parientes cercanos” de LePRK2, tal como se muestra en la figura 23. Este análisis sugiere que la fosforilación del motivo I podría ocurrir también en otros receptores quinasa que lo posean, mientras que la del motivo II, parecería ser propio de LePRK2.

Existen numerosos ejemplos de fosforilación en el dominio yuxtamembrana de receptores quinasa de plantas, tales como:

\*Receptor AtBRI1: A partir de ensayos de coimmunoprecipitación seguida de cromatografía líquida en *tandem* de espectrometría de masa, se han identificado varios sitios fosforilados *in vivo* en la región yuxtamembrana del receptor BRI1 de *Arabidopsis*: S-838, S-858, T-872 y T-880. La autofosforilación en la región yuxtamembrana y carboxilo-terminal (Wang X., 2005) crea un sitio de anclaje para sustratos específicos de quinasas (Pawson T., 2004). Un alineamiento del dominio citoplasmático de 213 receptores quinasas LRR RLKs de plantas, muestra que por fuera del dominio catalítico quinasa, las serinas y treoninas están solamente conservadas en las posiciones equivalentes a T-872 y T-880 del dominio yuxtamembrana del receptor de brasinoesteroides (Wang, X., 2005). La T-872 está altamente conservada cuando se lleva a cabo el alineamiento de las proteínas LRR RLKs que poseen el residuo aspártico en el subdominio VIb del dominio quinasa, requerido para la actividad catalítica (D-1009 en BRI1); esto sugiere que la fosforilación en T-872 sería un mecanismo general entre estas quinasas. Por otro lado se vio en ensayos *in vitro* que T-872A resultó, en un aumento de aproximadamente 10 veces de la fosforilación de un péptido sustrato. La conclusión es que T-872 podría tener un efecto negativo en la actividad de la quinasa cuando está fosforilada y la remoción de este fosfato podría permitir la activación de la quinasa y un aumento en el reconocimiento de sustratos específicos.

\*Receptor XA21: El gen de arroz Xa21 confiere resistencia contra *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo) y codifica para un receptor quinasa. Wei-Hui Xu *et al.*, 2006, demostraron la autofosforilación de los residuos S-686, T-688 y S-689 en la región yuxtamembrana del receptor. La sustitución de estos residuos por alanina no afectó la función de autofosforilación de esta quinasa, pero sí desestabilizó la resistencia de la proteína *in vivo* e *in vitro* (Wei-Hui Xu *et al.*, 2006). Es por esto que los autores postulan que la autofosforilación en estos residuos prevendría la degradación de XA21.

\*Receptor SERK: El receptor de embriogénesis somática, SERK1 (*Somatic Embryogenesis receptor-like kinase 1*) de *Arabidopsis thaliana*, es miembro de una pequeña familia de 5 RLKs relacionados, los cuales poseen 5 LRRs y una región yuxtamembrana rica en serina-prolina (Hecht *et al.*, 2001). Sólo dos residuos del dominio JMD fueron encontrados autofosforilados: S-291 y S-299. Se ha identificado que S-299 es transfosforilado por el dominio quinasa del receptor BRI1 (Karlova R., 2009).



\*Receptor SYMRK: El receptor SYMRK (*Simbiosis Receptor Kinase*) de *Lotus japonicus* es necesario para el paso compartido entre la simbiosis del hongo y la planta. Una mutación de inserción en la región extracelular correspondiente a las repeticiones ricas en leucina, elimina la interacción microbiana en una etapa temprana. Se ha encontrado que la T-593, localizada en el dominio yuxtamembrana, es necesaria para la completa actividad quinasa del receptor ya que su mutación a alanina reduce significativamente dicha actividad quinasa (Yoshida y Parniske., 2005).

Por otro lado, la región yuxtamembrana difiere considerablemente en longitud y secuencia entre los receptores tirosina-quinasa. Los sitios fosforilados en tirosina son utilizados para reclutar proteínas que se hallan río abajo en el camino de señalización y en otros receptores, como un modo de regular la actividad catalítica. Se ha visto a partir de análisis bioquímicos y estructurales, que la actividad quinasa de alguno de estos receptores es autoinhibida por la región yuxtamembrana. Esta inhibición cesa al estimular la fosforilación del receptor en el dominio yuxtamembrana, por intermedio de la unión al ligando (Hubbard., 2004). Un ejemplo de un receptor tirosina-quinasa es el receptor de la familia Eph. Las efrinas son proteínas de membrana que median la orientación del crecimiento axonal, migración celular y morfogénesis. La mutación de la tirosina-759 del dominio yuxtamembrana a alanina, resulta en un aumento significativo de la actividad quinasa, desestabilizando la conformación inhibitoria propia de esta región. Cuando el receptor EPHB2 (*Ephrin receptor B2*) se oligomeriza por estimulación, ocurre una fosforilación en *trans* de los residuos de tirosina-604 y 619 del receptor, que desestabilizan la conformación autoinhibitoria de la región yuxtamembrana (Hubbard., 2004).

En otros receptores tirosina-quinasa, tal como el EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*), la región yuxtamembrana no es autoinhibitoria sino que está involucrada en la estabilización del homodímero asimétrico formado por un receptor quinasa denominado “receptor” y el otro receptor quinasa denominado “activador”. De este modo, la quinasa receptora que tiene actividad catalítica fosforila residuos de tirosina en el extremo carboxilo-terminal del receptor activador (Hubbard., 2009) y no así en el *activation loop*, como ocurre en la mayoría de los receptores tirosina-quinasa.

## Análisis proteómico de LePRK2

La fosforilación proteica es una importante y dinámica modificación post-traducciona que modula variados caminos de señalización celular. La identificación de los residuos fosforilados implica procesos muy laboriosos y a veces está limitada por la disponibilidad y la optimización de las reacciones enzimáticas. Las técnicas que involucran análisis fosfoproteómicos acoplados a espectrometría de masa, permiten analizar fosforilaciones proteicas (Nühse *et al.*, 2004). Para ello, realizamos geles 2D, para luego poder intentar aislar los *spots* correspondientes y realizar los análisis de espectrometría de masa. La técnica de geles en dos dimensiones tiene la ventaja de ser frecuentemente utilizada de manera comparativa y requiere de un método reproducible para determinar la posición relativa de un *spot*. Dado que los geles 2D comerciales son altamente reproducibles, el pI de una proteína puede ser estimado por su posición de enfoque a lo largo del gradiente lineal de pH en el gel. Es por esto que mediante el uso de técnicas proteómicas es posible entender aquellos procesos biológicos que ocurren en el grano de polen.

LePRK2 es una proteína de membrana y a pesar que la proteómica es una estrategia factible para el análisis de proteínas de membrana (Barbier-Brygoo *et al.*, 2001), realizar el proteoma de proteínas de membrana ha sido un desafío, por la complejidad de dicho análisis. Primero, porque las proteínas de membrana son normalmente las menores contribuyentes dentro del conjunto de proteínas celulares y segundo, porque son difíciles de obtenerlas en solución para lograr un buen ingreso al gel de primera dimensión. Mientras que las proteínas más abundantes están presentes en niveles de  $10^5$  a  $10^7$  moléculas por célula, se han descrito proteínas que están expresadas en la célula en niveles del orden de 10 a 100 moléculas por célula (Rolland *et al.*, 2006). Este rango tan amplio de expresión impide la clara visualización de proteínas de bajo nivel de expresión tales como las regulatorias, algunas proteínas de membrana y las altamente hidrofóbicas que a veces escapan al análisis proteómico debido a su baja abundancia y su limitada solubilidad en agua (Santoni *et al.*, 2000; Rolland *et al.*, 2006).

Frente a lo anteriormente descrito, para llevar a cabo un análisis proteómico de 2D es importante aumentar la representatividad de las fracciones de proteínas de membrana. Algunos métodos basados en la extracción diferencial de proteínas por solventes orgánicos, sales y detergentes han sido desarrolladas para el análisis proteómico de

proteínas de membrana (Ferro *et al.*, 2003; Brugière *et al.*, 2004; Friso *et al.*, 2004; Marmagne *et al.*, 2004; Peltier *et al.*, 2004). Por ejemplo, extracciones con metanol/cloroformo de proteínas de membranas elimina a las proteínas periféricas, del mismo modo que los contaminantes solubles de fracciones de membranas. Al comparar este método con la utilización de diferentes detergentes para solubilizar, la extracción con metanol/cloroformo pareció ser el mejor método que combina enriquecimiento de proteínas altamente hidrofóbicas y la eliminación extensiva de proteínas hidrofílicas (Ferro *et al.*, 2000). Este fue el método utilizado en esta tesis a veces combinado con otros pasos de purificación, tales como la utilización de *buffer* SDS 1X y posterior calentamiento a 80°C, para obtener el extracto proteico de polen que contenga a LePRK2.

Una solución para aumentar los niveles de LePRK2 es obtener plantas transgénicas de tomate sobreexpresantes de LePRK2. En el laboratorio se está trabajando en ese sentido.

Análisis bioquímicos y fisiológicos revelaron que el polen maduro contiene proteínas presintetizadas y mARNs necesarios para llevar adelante los procesos de hidratación, de reconocimiento celular entre el polen y el estigma, la posterior germinación y el establecimiento de la polaridad del tubo polínico (Dai *et al.*, 2006 a y b). Dai *et al.*, 2006, realizaron un análisis diferencial de proteínas de polen maduro y germinado en arroz (*Oryza sativa*) y detectaron mediante geles 2D, 66 *spots* específicos de estadio del desarrollo del polen y 120 *spots* con un cambio en el nivel de expresión de los perfiles proteicos de polen maduro y germinado. Estas últimas están implicadas en metabolismos energéticos, de carbohidratos, de pared y de citoesqueleto, necesarios para el crecimiento del tubo polínico. Para eso, el polen maduro posee proteínas relacionadas con la traducción proteica, necesarias para el posterior crecimiento del tubo. Por otro lado, los autores observaron que distintas isoformas proteicas en polen de arroz poseían diferente patrón de expresión durante el pasaje de polen maduro a germinado. Los autores han demostrado que la glicosilación y fosforilación están implicadas en generar alguna de estas isoformas.

En esta tesis, para estudiar los sitios de fosforilación de LePRK2 *in vivo*, hemos trabajado con polen maduro debido a la disponibilidad del mismo y a que se ha observado que el patrón de LePRK2 no varió cualitativamente comparando fracciones de polen maduro y germinado (Figuras 36 y 37). Por otro lado, tal como mencionamos

en resultados, el patrón proteico de polen maduro teñido con CB no difiere del de polen germinado.

A pesar de haber logrado obtener espectros de buena calidad a partir de los *spots* picados, ninguno correspondió al de LePRK2. Esto podría deberse a:

- 1) La poca abundancia de esta proteína en la muestra.
- 2) En alguno de los *spots* secuenciados pueden coexistir dos o más proteínas, alguna más abundante que LePRK2 y “aplastar” los picos de espectrometría correspondientes a LePRK2.
- 3) Las diferentes isoformas de LePRK2 se encontraron bajo el nivel de detección de la tinción de CB y de plata.

### Sistema de LePRKs

En el camino de señalización durante la germinación del grano de polen, el complejo proteico LePRKs tendría la capacidad de percibir diversas señales provenientes del pistilo. Nuestro modelo predice que la unión de STIL a LePRK1 y/o LePRK2 conduciría a la disociación del complejo LePRKs y a la desfosforilación de LePRK2, resultando en la estimulación del crecimiento del tubo polínico.

Por otro lado, las señales recibidas por los tubos polínicos durante la germinación *in vivo* a través del tracto transmisor del estilo, podrían alterar el estado de fosforilación de LePRK2. Es decir, que el tubo polínico en crecimiento se encontraría con todos los requerimientos nutricionales y señales brindadas por los ligandos correspondientes. Este encuentro desembocaría en cambios bioquímicos en el tubo polínico, en la transducción de señales intracelulares y la modificación de algún proceso relacionado al crecimiento o a la orientación del tubo polínico hasta alcanzar el ovario (Lord., 2003). Observamos que este proceso de crecimiento del tubo polínico está relacionado con el estado de fosforilación de LePRK2.

A pesar que la expresión de LePRK2 aumenta en función del tiempo de germinación, ensayos de fosforilación *in vitro* con muestras de polen germinado a diferentes tiempos no parecen mostrar una mayor cantidad de LePRK2 marcada (resultados no mostrados). Esto sugiere que sólo una pequeña población de LePRK2 estaría “capacitada” de ser fosforilada. La población de LePRK2 “capacitada” podría tener alguna relación con la cantidad de LePRK1 asociada a ella dentro del complejo

LePRKs en polen maduro y en polen germinado (Wengier *et al.*, 2003). Por otra parte, sabemos que la expresión de LePRK1 se mantiene constante durante el paso de polen maduro a germinado. El papel de LePRK1 en este proceso podría ser estudiado aumentando su expresión y verificando el estado de fosforilación de LePRK2 y el crecimiento del tubo de su sobreexpresante. Lamentablemente, las plantas transgénicas que sobreexpresan LePRK1 (K1OX) no fueron capaces de germinar (datos no mostrados; trabajo realizado por los Dres. Weihua Tang y Diego Wengier), por lo que se deberán idear estrategias alternativas para la modulación de la expresión de LePRK1 en polen.

Por otro lado, se ha visto que la planta transgénica K2AS (antisentido para LePRK2) tiene disminuida la velocidad de crecimiento del tubo polínico y que K1OX, como describimos anteriormente inhibe por completo la germinación del polen. Por lo tanto, una hipótesis es que menores relaciones LePRK1/LePRK2 correlacionan con una tasa de crecimiento mayor; a medida que la relación aumenta, la tasa de germinación y crecimiento disminuye. De acuerdo a esta hipótesis, mientras que el efecto de LePRK2 es estimulador sobre el crecimiento del tubo polínico, LePRK1 tendría un efecto inhibitorio sobre la germinación.

En ensayos de fosforilación en polen *in vitro*, nunca hemos logrado fosforilar a LePRK1. Es intrigante cómo LePRK1, un receptor al que aún no se ha detectado su actividad fosforilante *in vivo* es 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 éstas unen el ligando y se activan, interactuando con los efectores intracelulares. También pueden actuar como andamiaje para la formación de complejos multiproteicos (Castells *et al.*, 2007). Esta última información plantea una posibilidad muy interesante: LePRK1 podría actuar a través de otras proteínas modulando la fisiología del tubo polínico.

Sin embargo, puede suceder que la ausencia de fosforilación de LePRK1 sea el resultado de no haber encontrado las condiciones para producir esta reacción. En el laboratorio se determinarán cuántas son las isoformas de LePRK1 en polen maduro o germinado a través de geles 2D, para determinar si la fosforilación de LePRK1 ocurre *in vivo*.

Tanto el efecto inhibitorio de LePRK1 como el estimulador de LePRK2 actuarían en simultáneo, regulando finamente la germinación y el normal crecimiento del tubo polínico. Consideramos que en el caso de bajas intensidades de expresión de LePRK2-eGFP, ésta no sería suficiente para que el efecto estimulador de LePRK2 sobrepase al inhibitorio de LePRK1. Pensando esta hipótesis en el contexto de la mutante de sitios de fosforilación de LePRK2 en el motivo I, podríamos pensar que la fosforilación de los residuos del mismo puede en realidad inhibir la interacción con LePRK1.

No hemos podido observar diferencias en geles 2D en donde fracciones de proteínas microsomales de polen de tomate fueron tratadas o no con STIL y luego sometidas a *western blot* con el anticuerpo anti-LePRK2. Es decir, que los cambios de isoformas de LePRK2 dado por la presencia de STIL podría observarse en cambio de intensidad en *spots* del “collar de perlas”.

Por otra parte, la expresión diferencial de LePRK1 y LePRK2 y su asociación a un complejo de alto peso molecular, 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 STIL o por nuevos componentes citoplasmáticos, resultando en una red de complejos y cascadas transduccionales distintas que regularían el crecimiento del tubo polínico.

Haciendo la salvedad que se tratan de dos ensayos en donde se comparan distintas condiciones experimentales, la cantidad de STIL necesaria para dar una respuesta fisiológica de alargamiento del tubo polínico de tomate es mucho mayor que aquella necesaria para ver desfosforilación de LePRK2 en fracción de proteínas microsomales de polen maduro de tomate (Zhang *et al.*, 2008). Es por esto que para lograr ver un cambio de señal en el *western blot*, necesitaríamos usar más cantidad de STIL capaz de desfosforilar las especies ácidas del WB y analizar de qué manera esto modificaría la permanencia de LePRK2 en el complejo.

### **Cascada de señalización de LePRK2**

De acuerdo a nuestro modelo presentado en la introducción, la actividad del complejo de LePRKs ocurriría a través de LeKPP, una proteína perteneciente a la

familia de RopGEFs de plantas, regulando la actividad de ROP en el tubo polínico (Figura 9). Kaothien *et al.*, 2005, han demostrado por ensayos de *pull-down* que KPP interactúa con los dominios citoplasmáticos tanto de LePRK1 como de LePRK2. También se ha probado por ensayos de co-inmunoprecipitación con fracción de membrana de polen de tomate germinado, que KPP interactúa sólo con LePRK2. Por otra parte, KPP se encontraría fosforilada, ya que dos isoformas fueron detectadas en geles bidimensionales (Kaothien *et al.*, 2005). Este último dato fue corroborado a partir de diferentes algoritmos computacionales, los que predijeron la existencia de sitios de fosforilación en KPP. Hasta el momento no hemos podido fosforilar a KPP en ensayos *in vitro* y desconocemos si esta fosforilación ocurre a través de LePRK2. El estudio del patrón de fosforilación de KPP en plantas antisentido de LePRK2 (K2AS) y K2OX (planta sobreexpresante de LePRK2, línea aún no generada) 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 ROP en polen de tomate (Wengier *et al.*, 2003). En otro trabajo se demostró, analizando en polen de Arabidopsis AtRopGEF12 y AtPRK2a, ortólogos de KPP y LePRK2 respectivamente, que la fosforilación de una serina en el dominio carboxilo-terminal de AtRopGEF12, liberaría a ésta de la inhibición producida por dicho dominio, promoviendo el crecimiento isotrópico del tubo polínico (Zhang *et al.*, 2007). También se demostró que la interacción entre AtRopGEF12 y AtPRK2a ocurre a través del dominio carboxilo-terminal de AtRopGEF12 y que esta interacción es menor cuando AtPRK2 se encuentra mutada en una lisina indispensable para la actividad quinasa (K-366R) (Zhang *et al.*, 2007). 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 (Zhang *et al.*, 2007) y probablemente también en aquellas donde se han descrito proteínas ortólogas a LePRK1 y LePRK2 (Kim *et al.*, 2002).

Aún no hemos determinado cuál de las rutas reguladas por ROP es la afectada por STIL. Debemos determinar en el futuro si la presencia de STIL 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 concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelulares. 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 STIL.

### **Conclusión final**

Finalmente podemos decir que 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, es prioritario identificar cuáles son los sitios fosforilados *in vivo* en LePRK2, KPP y en LePRK1 (si es que existen). Dicha identificación nos permitirá estudiar bioquímicamente el funcionamiento del complejo LePRK. Para llevar a cabo experimentos que apunten a la resolución de estos interrogantes, es importante la expresión transitoria de versiones mutadas de LePRK1 o KPP asociadas a eGFP que emulen el estado constitutivamente activado o desactivado con el fin de asociar las diferentes modificaciones a la localización y funcionamiento del complejo multiproteico *in vivo*.

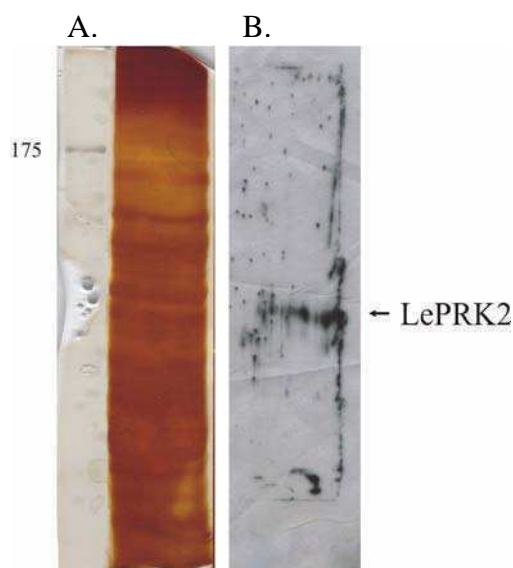
### **Perspectivas**

Todo lo anteriormente descrito sobre el estudio de mutantes de fosforilación de LePRK2, indica que el dominio yuxtamembrana es importante en la regulación de fosforilaciones proteicas de receptores quinasas. En el caso de LePRK2, sería interesante determinar, a partir de un mutante de delección completa de su dominio yuxtamembrana, si LePRK2 está fosforilada. De esta forma, se podría determinar si todas las isoformas de LePRK2 observadas en geles 2D y correspondientes a fosforilaciones se deben a una combinatoria de fosforilaciones de sitios presentes en este dominio o a fosforilaciones de residuos en otros dominios. Por otro lado, tomando ventaja de esta mutante de delección, podríamos analizar la fisiología del tubo polínico en ensayos de transfección transiente. Hemos visto en levaduras, que el dominio quinasa de LePRK2 fue necesario para la interacción con LePRK1 (resultado de tesis de Licenciatura de Tamara Salem); sin embargo no se han realizado construcciones en las que el dominio yuxtamembrana de LePRK2 esté ausente en simultaneo a la presencia del dominio quinasa.



En forma complementaria al análisis proteómico realizado en esta tesis, habría que estudiar a distintos tiempos de germinación del tubo polínico, si existe algún cambio en el patrón del collar de isoformas fosforiladas.

Con respecto a la identificación de los sitios de fosforilación de LePRK2 en colaboración con el Dr. Scott Peck de la Universidad de Missouri-Columbia, USA, estamos realizando un enriquecimiento de péptidos fosforilados de LePRK2, a través de la utilización de una columna comercial que une fosfatos (IMAC (*Immobilized Metal-ion Affinity Chromatography*) y  $\text{TiO}_2$  (*Titanium dioxide*)) seguida de por un análisis por espectrometría de masa (van Bentem *et al.*, 2007). Para ello corrimos en un gel de una dimensión fracciones de proteínas microsomales de polen maduro de tomate y escindimos la banda teñida con plata que comigró con la banda de LePRK2 revelada por *western blot* (Figura 51).



**Fig. 51: Gel de una dimensión de fracción de proteínas microsomales de polen maduro de tomate.**

(A) Se muestra una de las 3 calles sembradas en un gel de poliacrilamida de 10%, con 200  $\mu\text{g}$  de  $\text{P}_{100}$  y teñidas con nitrato de plata. (B) *Western blot* de una calle contigua del gel conteniendo 150  $\mu\text{g}$  de  $\text{P}_{100}$  utilizando anticuerpo anti-LePRK2.

La profundización del estudio de los sitios de fosforilación de LePRK2, permitiría hallar mecanismos de regulación de LePRK2 responsables del crecimiento polarizado del tubo polínico. Además, esta información nos dará herramientas para la búsqueda de sitios de fosforilación en otras familias taxonómicas de plantas. Finalmente, podremos analizar si esta proteína quinasa está involucrada en caminos diferentes a los

relacionados a la interacción polen-pistilo, estableciendo una nueva estrategia general de las plantas para la transducción de señales.

**BIBLIOGRAFIA**

\*Bailey, T.L; Williams, N; Misleh, C and Li, W.W.. *MEME: discovering and analyzing DNA and protein sequence motifs*. Nucleic Acid Res, 2006. 34: p. W369-373.

\*Baluska, F; Salaj, J; Mathur, J; Braun, M; Jasper, F; Samaj, J; Chua, N.H; Barlow, P.W; Volkmann, D. *Root hair formation: F-actin-dependent tip growth is initiated by local assembly of profilin-supported F-actin meshworks accumulated within expansin-enriched bulges*. Dev Biol, 2000. 227(2): p. 618-632.

\*Barbier-Brygoo, H; Gaymard, F; Rolland, N; Joyard, J. *Strategies to identify transport systems in plants*. Trends Plant Sci, 2001. 6 (12): p. 577-585.

\*van Bentem, S.F; Hirt, H. *Using phosphoproteomics to reveal signalling dynamics in plants*. Trends Plant Science, 2007. 12 (9): p. 404-411.

\*Bewley, J., Hampel, F., McCormick, S; Zambryski, P. *Reproductive Development*. Chapter 19. Biochemistry & Molecular Biology Plants, edited by Buchanan, Gruissem, Jones. First edition, 2000. p. 988-1043.

\*Bloch, D; Lavy, M; Efrat, Y; Efroni, I; Bracha-Drori, K; Abu-Abied, M; Sadot, E; Yalovsky, S. *Ectopic expresion of an activated RAC in Arabidopsis disrupts membrana cycling*. Mol Biol Cell, 2005. 16 (4): p. 1913-1927.

\*Blom, N., Sicheritz-Pontén, T., Gupta, R., Gammeltoft, S., and Brunak, S. *Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence*. Proteomics, 2004. 4 (6): p. 1633-1649.

\*Blom, N; Gammeltoft, S; Brunak, S. *Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites*. J Mol Biol, 1999. 294 (5): p. 1351-1362.

\*Bloom, J and Pagano, M. *To be or not to be ubiquitinated?* Cell Cycle, 2004. 3 (2): p. 138-140.

\*a) Boavida, L.C; Becker, J.D and Feijo, J.A. *The making of gamets in higher plants*. Int J Dev Biol, 2005. 49 (5-6): p. 595-614.

\*b) Boavida, L.C; Vieira, A.M; Becker, J.D; Feijó J.A. *Gametophyte interaction and sexual reproduction: how plants make a zygote*. Int J Dev Biol, 2005. 49 (5-6): p. 615-632.

\*Boureaux, A; Vignal, E; Faure, S; Fort, P. *Evolution of the Rho family of ras-like GTPases in eukaryotes*. Mol Biol Evol, 2007. 24 (1): p. 203-216.

\*Braun, M and Wasteneys, G.O. *Distribution and dynamics of the cytoskeleton in graviresponding protonemata and rhizoids of characean algae: exclusion of microtubules and a convergence of actin filaments in the apex suggest an actin-mediated gravitropism*. Planta,1998. 205(1): p. 39-50.

- \*Brinkworth, R.I, Breinl R.A, Kobe, B. *Structural basis and prediction of substrate specificity in protein serine/threonine kinases*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. 100 (1): p. 74-79.
- \*Brugière, S; Kowalski, S; Ferro, M; Seigneurin-Berny, D; Miras, S; Salvi, D; Ravanel, S; d'Hérin, P; Garin, J; Bourguignon, J; Joyard, J; Rolland, N. *The hydrophobic proteome of mitochondrial membranes from Arabidopsis cell suspensions*. Phytochemistry, 2004. 65 (12): p. 1693-1707.
- \*Bushart, T.J and Roux, S.J. *Conserved features of germination and polarized cell growth: a few insights from a pollen-fern spore comparison*. Ann Bot (Lond), 2007. 99 (1): p. 9-17.
- \*Camacho, L and Malhó, R. *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.
- \*Campanoni, P and Blatt, M.R. *Membrane trafficking and polar growth in root hairs and pollen tubes*. J Exp Bot, 2007. 58 (1): p. 65-74.
- \*Cárdenas, L; Lovy-Wheeler, A; Wilsen, K.L; Hepler, P.K. *Actin polymerization promotes the reversal of streaming in the apex of pollen tubes*. Cell Motil Cytoskeleton, 2005. 61 (2): p. 112-127.
- \*Castells, E and Casacuberta, J.M. *Signalling through kinase-defective domains: the prevalence of atypical receptor-like kinases in plants*. J Exp Bot, 2007. 58 (13): p. 3503-3511.
- \*Chebli, Y and Geitmann, A. *Mechanical Principles Governing Pollen Tube Growth*. Functional Plant Science and Biotechnology, 2007. 1 (2): p. 232-245.
- \*Chen, T; Teng, N; Wu, X; Wang, Y; Tang, W; Samaj, J; Baluska, F; Lin, J. *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.
- \*Chen, C.Y., Cheung, A.Y and Wu H.M. *Actin-Depolymerizing Factor Mediates Rac/Rop GTPase-Regulated Pollen Tube Growth*. Plant Cell, 2003. 15 (1): p. 237-249.
- \*Chen, C.Y; Wong, E.I; Vidali, L; Estavillo, A; Hepler, P.K; Wu, H.M; Cheung, A.Y. *The regulation of actin organization by actin-depolymerizing factor in elongating pollen tubes*. Plant Cell, 2002. 14 (9): p. 2175-2190.
- \*Cheung, A.Y and Wu, H.M. *Structural and functional compartmentalization in pollen tubes*. J Exp Bot, 2007. 58 (1): p. 75-82.
- \*Cheung, A.Y and Wu, H.M. *Overexpression of an Arabidopsis Formin Stimulates Supernumerary Actin Cable Formation from Pollen Tube Cell Membrane*. Plant Cell, 2004. 16 (1): p. 257-269.

- \*Cheung, A.Y; Chen, C.Y; Tao, L.Z; Andreyeva, T; Twell, D; Wu, H.M. *Regulation of pollen tube growth by Rac-like GTPases*. J Exp Bot, 2003. 54 (380): p. 73-81.
- \*Chinchilla D, Zipfel C, Robatzek S, Kemmerling B, Nürnberger T, Jones JD, Felix G, Boller T. *A flagellin-induced complex of the receptor FLS2 and BAK1 initiates plant defence*. Nature, 2007. 448 (7152): p. 497-500.
- \*Cockcroft, S. *Signalling roles of mammalian phospholipase D1 and D2*. Cell Mol Life Sci, 2001. 58 (11): p. 1674-1687.
- \*Cole, R.A and Fowler, J.E. *Polarized growth: maintaining focus on the tip*. Curr Opin Plant Biol, 2006. 9 (6): p. 579-588.
- \*Coligan, J. E. Current Protocols in Protein Science. 1996. Wiley, Brooklyn, NY, USA.
- \*a) Dai, S; Li, L; Chen, T; Chong, K; Xue, Y; Wang, T. *Proteomic analyses of Oryza sativa mature pollen reveal novel proteins associated with pollen germination and tube growth*. Proteomics, 2006. 6 (8): p. 2504-2529.
- \*b) Dai, S; Chen, T; Chong, K; Xue, Y; Liu, S; Wang, T. *Proteomics identification of differentially expressed proteins associated with pollen germination and tube growth reveals characteristics of germinated Oryza sativa pollen*. Mol Cell Proteomics, 2006. 6 (2): p. 207-230.
- \*D'Ambrosio, C; Arena, S; Fulcoli, G; Scheinfeld, M.H; Zhou, D; D'Adamio, L; Scaloni, A. *Hyperphosphorylation of JNK-interacting protein 1, a protein associated with Alzheimer disease*. Mol Cell Proteomics, 2006. 5(1): p. 97-113.
- \*de Graaf, B.H; Cheung, A.Y; Andreyeva, T; Levasseur, K; Kieliszewski, M; Wu, H.M. *Rab11 GTPase-regulated membrane trafficking is crucial for tip-focused pollen tube growth in tobacco*. Plant Cell, 2005. 17 (9): p. 2564-2579.
- \*Dong, J; Kim, S.T and Lord, E.M. *Plantacyanin plays a role in reproduction in Arabidopsis*. Plant Physiol, 2005. 138 (2): p. 778-789.
- \*Doughty, J; Dixon, S; Hiscock, S.J; Willis, A.C; Parkin, I.A; Dickinson, H.G. *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. 1333-1347.
- \*Dowd, P.E; Coursol, S; Skirpan, A.L; Kao, T.H; Gilroy, S. *Petunia phospholipase C1 is involved in pollen tube growth*. Plant Cell, 2006. 18 (6): p. 1438-1453.
- \*Ferro, M; Salvi, D; Brugière, S; Miras, S; Kowalski, S; Louwagie, M; Garin, J; Joyard, J; Rolland, N. *Integral membrane proteins of the chloroplast envelope: Identification and subcellular localization of new transporters*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. 99 (17): p. 11487-11492.

- \*Ferro, M; Seigneurin-Berny, D; Rolland, N; Chapel, A; Salvi, D; Garin, J; Joyard, J. *Organic solvent extraction as a versatile procedure to identify hydrophobic chloroplast membrane proteins*. Electrophoresis, 2000. 21 (16): p. 3517-3526.
- \*Feijó, J.A; Sainhas, J; Hackett, G.R; Kunkel, J.G; Hepler, P.K. *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. 483-496.
- Franklin-Tong, V.E. *Signaling and the Modulation of Pollen Tube Growth*. Plant Cell, 1999. 11 (4): p. 727-738.
- \*Frietsch, S; Wang, Y.F; Sladek, C; Poulsen, L.R; Romanowsky, S.M; Schroeder, J.I; Harper, J.F. *A cyclic nucleotide-gated channel is essential for polarized tip growth of pollen*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. 104 (36): p. 14531-14536.
- \*Friso, G; Giacomelli, L; Ytterberg, A.J; Peltier, J.B; Rudella, A; Sun, Q; van Wijk, K.J. *In-dept analysis of the thylakoid membrane proteome of Arabidopsis thaliana chloroplasts: new proteins, new functions, and a plastid proteome database*. Plant Cell, 2004. 16 (2): p. 478-499.
- \*Frith, M.C; Saunders, N.F; Kobe, B and Bailey, T.L. *Discovering Sequence Motifs with Arbitrary Insertions and Deletions*. PLoS Comput Biol, 2008. 4 (4): e1000071.
- \*a) Fu, Y; Wu, G and Yang, Z. *Rop GTPase-dependent dynamics of tip-localized F-actin controls tip growth in pollen tubes*. J Cell Biol, 2001. 152 (5): p. 1019-1032.
- \*b) Fu, Y and Yang, Z. *Rop GTPase: a master switch of cell polarity development in plants*. Trends Plant Sci, 2001. 6 (12): p. 545-547.
- \*Gadsby, D.C; Nairn, A.C. *Control of CFTR channel gating by phosphorylation and nucleotide hydrolysis*. Physiol Rev, 1999. 79 (1 Suppl): p. S77-107.
- \*Geldner, N; Anders, N; Wolters, H; Keicher, J; Kornberger, W; Muller, P; Delbarre, A; Ueda, T; Nakano, A; Jürgens, G. *The Arabidopsis GNOM ARF-GEF mediates endosomal recycling, auxin transport, and auxin-dependent plant growth*. Cell, 2003. 112 (2): p. 219-230.
- \*Gibbon, B.C; Kovar, D.R; Staiger, C.J. *Latrunculin B has different effects on pollen germination and tube growth*. Plant Cell, 1999. 11 (12): p. 2349-2363.
- \*Giranton, J.L; Dumas, C; Cock, J.M; Gaude, T. *The integral membrana S-locus receptor kinase of Brassica has serine/threonine kinase activity in membranous environment and spontaneously forms oligomers in planta*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. 97 (7): p. 3759-3764.
- \*Goldberg, R.B; Beals, T.P and Sanders P.M. *Anther development: basic principles and practical applications*. Plant Cell, 1993. 5 (10): p. 1217-1229.

- \*Goldman, M.H; Goldberg, R.B and Mariani, C. *Female sterile tobacco plants are produced by stigma-specific cell ablation*. *Embo J*, 1994. 13 (13): p. 2976-2984.
- \*Gong, F.C; Giddings, T.H; Meehl, J.B; Staehelin, L.A; Galbraith, D.W. *Z-membranes: artificial organelles for overexpressing recombinant integral membrane proteins*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. 93 (5): p. 2219-2223.
- \*Govek, E.E; Newey, S.E and Van Aelst, L. *The role of the Rho GTPases in neuronal development*. *Genes Dev*, 2005. 19 (1): p. 1-49.
- \*Gu, Y; Li, S; Lord, E.M and Yang, Z. *Members of a novel Class of Arabidopsis Rho guanine nucleotide exchange factors control Rho GTPase-dependent polar growth*. *Plant Cell*, 2006. 18 (2): p. 366-381.
- \*Gu, Y; Fu, Y; Dowd, P; Li, S; Vernoud, V; Gilroy, S and Yang, Z. *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. 127-138.
- \*Gu, Y; Wang, Z; Yang, Z. *ROP/RAC GTPase: an old new master regulator for plant signaling*. *Curr Opin Plant Biol*, 2004. 7 (5): p. 527-536.
- \*Gu, Y; Vernoud, V; Fu, Y; Yang, Z. *ROP GTPase regulation of pollen tube growth through the dynamics of tip-localized F-actin*. *J Exp Bot*, 2003. 54 (380): p. 93-101.
- \*Guillén, G; Valdés-López, V; Noguez, R; Olivares, J; Rodríguez-Zapata, L.C; Pérez, H; Vidali, L; Villanueva, M.A; Sánchez, F. *Profilin in Phaseolus vulgaris is encoded by two genes (only one expressed in root nodules) but multiple isoforms are generated in vivo by phosphorylation on tyrosine residues*. *Plant J*, 1999. 19 (5): p. 497-508.
- \*Guyon, V.N; Astwood, J.D; Garner, E.C; Dunker, A.K; Taylor, L.P. *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.
- \*Hanks, S.K and Hunter, T. *The eukaryotic protein kinase superfamily: Kinase (catalytic) domain structure and classification*. *FASEB J*, 1995. 9 (8): p. 576-596.
- \*Hanger, D.P; Betts, J.C; Loviny, T.L; Backstock, W.P; Anderton, B.H. *New phosphorylation sites identified in hyperphosphorylated tau (paired helical filament) from Alzheimer's disease brain using nanoelectrospray mass spectrometry*. *J Neurochem*, 1998. 71 (6): p. 2465-2476.
- \*Haubrick, L.L and Assmann, S.M. *Brassinosteroids and plant function: some clues, more puzzles*. *Plant Cell Environ*, 2006. 29 (3): p. 446-457.
- \*Haugen, M.H; Flatmark, K; Mikalsen, S.O; Malandsmo, G.M. *The metastasis-associated protein S100A4 exists in several charged variants suggesting the presence of posttranslational modifications*. *BMC Cancer*, 2008. 8:172.

\*He, K; Gou, X; Yuan, T; Lin, H; Asami, T; Yoshida, S; Russell, S.D; Li, J. *BAK1 and BKK1 regulate brassinosteroid-dependent growth and brassinosteroid-independent cell-death pathways*. *Curr Biol*, 2007. 17 (13): p. 1109-1115.

\*Heath, I.B; Gupta, G and Bai, S. *Plasma Membrane-Adjacent Actin Filaments, but Not Microtubules, Are Essential for both Polarization and Hyphal Tip Morphogenesis in Saprolegnia ferax and Neurospora crassa*. *Fungal Genetics and Biology*, 2000. 30 (1): p. 45-62.

\*Hecht, V; Vielle-Calzada, J.P; Hartog, M.V; Schmidt, E.D; Boutilier, K; Grossniklaus, U; de Vries, S.C. *The Arabidopsis SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE 1 gene is expressed in developing ovules and embryos and enhances embryogenic competence in culture*. *Plant Physiol*, 2001. 127 (3): p. 803-816.

\*Heese, A; Hann, D.R; Gimenez-Ibanez, S; Jones A.M; He, K; Li, J; Schroeder, J.I; Peck, S.C; Rathjen, J.P. *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. 12217-12222.

\*Hepler, P.K; Vidali, L and Cheung, A.Y. *Polarized cell growth in higher plants*. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2001. 17: p. 159-187.

\*Higashiyama, T; Kuroiwa, H and Kuroiwa T. *Pollen-tube guidance: beacons from the female gametophyte*. *Curr Opin Plant Biol*, 2003. 6 (1): p. 36-41.

\*Holdaway-Clarke, T.L and Hepler, P.K. *Control of pollen tube growth: role of ion gradients and fluxes*. *New Phytologist*, 2003. 159 (3): p. 539-563.

\*Hubbard, S.R. *The Juxtamembrane Region of EGFR Takes Center Stage*. *Cell*, 2009. 137 (7): p. 1181-1183.

\*Hubbard, S.R. *Juxtamembrane autoinhibition in receptor tyrosine kinases*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2004. 5 (6): p. 464-471.

\*Hunter, T. *Signaling-2000 and beyond*. *Cell*, 2000. 100 (1): p. 113-127.

\*Hwang, J.U; Vernoud, V; Szumlanski, A; Nielsen, E; Yang, Z. *A tip-localized RhoGAP controls cell polarity by globally inhibiting Rho GTPase at the cell apex*. *Curr Biol*, 2008. 18 (24): p. 1907-1916.

\*Hwang, J.U; Gu, Y; Lee, Y.J; Yang, Z. *Oscillatory ROP GTPase activation leads the oscillatory polarized growth of pollen tubes*. *Mol Biol Cell*, 2005. 16 (11): p. 5385-5399.

\*Itoh, T and Takenawa, T. *Regulation of endocytosis by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and ENTH proteins*. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2004. 282: p. 31-47.

\*Jeong, S; Trotochaud, A.E and Clark, S.E. *The Arabidopsis CLAVATA2 Gene Encodes a Receptor-like Protein Required for the Stability of the CLAVATA1 Receptor-like Kinase*. *Plant Cell*, 1999. 11 (10): p. 1925-1934.



- \*Johnson, K.L and Ingram, G.C. *Sending the right signals: regulating receptor kinase activity*. *Curr Opin Plant Biol*, 2005. 8 (6): p. 648-656.
- \*Kang, J.S; Liu, C; Derynck, R. *New regulatory mechanisms of TGF-beta receptor function*. *Trends Cell Biol*, 2009. 19 (8): p. 385-394.
- \*Kaothien, P; Ok, S.H; Shuai, B; Wengier, D; Cotter, R; Kelley, D; Kiriakopolos, S; Muschietti, 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. 42 (4): p. 492-503.
- \*Karlova, R; Boeren, S; van Dongen, W; Kwaaitaal, M; Aker, J; Vervoort, J and de Vries, S. *Identification of in vitro phosphorylation sites in the Arabidopsis thaliana somatic embryogenesis receptor-like kinases*. *Proteomics*, 2009. 9 (2): p. 368-379.
- \*Kaufmann, H; Bailey, J.E; Fussenegger, M. *Use of antibodies for detection of phosphorylated proteins separated by two-dimensional gel electrophoresis*. *Proteomics*, 2001. 1 (2): p. 194-199.
- \*Kim, S.T; Zhang, K; Dong, J; Lord E.M. *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. 142 (4): p. 1397-1411.
- \*Kim, H.U; Cotter, R; Johnson, S; Senda, M; Dodds, P; Kulikauska, R; Tang, W; Ezcurra, I; Herzmark, P and McCormick, S. *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.
- \*Kim, S; Mollet, J.C; Dong, J; Zhang, K; Park, S.Y; Lord, E.M. *Chemocyanin, a small basic protein from the lily stigma, induces pollen tube chemotropism*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. 100 (26): p. 16125-16130.
- \*a) Klahre, U; Becker, C; Schmitt, A.C; Kost, B. *Nt-RhoGDI2 regulates Rac/Rop signaling and polar cell growth in tobacco pollen tubes*. *Plant J*, 2006. 46 (6): p. 1018-1031.
- \*b) Klahre, U and Post, B. *Tobacco RhoGTPase ACTIVATING PROTEIN1 spatially restricts signaling of RAC/Rop to the apex of pollen tubes*. *Plant Cell*, 2006. 18 (11): p. 3033-3046.
- \*Krichevsky, A; Kozlovsky, S.V; Tian, G.W; Chen, M.H; Zaltsman, A; Citovsky, V. *How pollen tubes grow*. *Dev Biol*, 2007. 303 (2): p. 405-420.
- \*Kost, B; Lemichez, E; Spielhofer, P; Hong, Y; Toliaas, K; Carpenter, C; Chua, N.H. *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. 317-330.

- \*Kost, B; Spielhofer, P; Chua, N.H. *A GFP-mouse talin fusion protein labels plant actin filaments in vivo and visualizes the actin cytoskeleton in growing pollen tubes.* Plant J, 1998. 16 (3): p. 393-401.
- \*Krause, C.D; Mei, E; Xie, J; Jia, Y; Bopp, M.A; Hochstrasser, R.M and Pestka, S. *Seeing the light: preassembly and ligand-induced changes of the interferon gamma receptor complex in cells.* Mol Cell Proteomics, 2002. 1 (10): p. 805-815.
- \*Larsen, M.R; Sørensen, G.L; Fey, S.J; Larsen, P.M; Roepstorff, P. *Phosphoproteomics: evaluation of the use of enzymatic de-phosphorylation and differential mass spectrometric peptide mass mapping for site specific phosphorylation assignment in proteins separated by gel electrophoresis.* Proteomics, 2001. 1 (2): p. 223-238.
- \*Lee, Y.J; Szumlanski, A; Nielsen, E and Yang, Z. *Rho-GTPase-dependent filamentous actin dynamics coordinate vesicle targeting and exocytosis during tip growth.* J Cell Biol, 2008. 181 (7): p. 1155-1168.
- \*Lee, H.S; Karunanandaa, B; McCubbin, A; Gilroy, S and Kao, T.H. *PRK1, a receptor-like kinase of Petunia inflata, is essential for postmeiotic development of pollen.* Plant J, 1996. 9 (5): p. 613-624.
- \*Li, H; Lin, Y; Heath, R.M; Zhu, M.X and Yang, Z. *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. 1731-1742.
- \*Li, J and Chory, J. *A putative leucine-rich repeat receptor kinase involved in brassinosteroid signal transduction.* Cell, 1997. 90 (5): p. 929-938.
- \*Li, S; Gu, Y; Yan, A; Lord; E and Yang, Z. *RIP1 (ROP interactive Partner 1)/ICR1 Marks Pollen Germination Sites and May Act in the ROP1 Pathway in the Control of Polarized Pollen Growth.* Molecular Plant, 2008. 1 (6): p. 1021-1035.
- \*Li, Y; Zee, S.Y; Liu, Y.M; Huang, B.Q and Yen L.F. *Circular F-actin bundles and a G-actin gradient in pollen and pollen tubes of Lilium davidii.* Planta, 2001. 213(5): p. 722-730.
- \*Lin, Y; Wang, Y; Zhu, JK; Yang, Z. *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.
- \*Lisboa, S; Scherer, G.E and Quader, H. *Localized endocytosis in tobacco pollen tubes: visualisation and dynamics of membrane retrieval by a fluorescent phospholipid.* Plant Cell Rep, 2008. 27 (1): p. 21-28.
- \*Lord, E.M. *Adhesion and guidance in compatible pollination.* J Exp Bot, 2003. 54 (380): p. 47-54.

\*Lord, E.M and Mollet, J.C. *Plant cell adhesion: A bioassay facilitates discovery of the first pectin biosynthetic gene*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. 99 (25): p. 15843-15845.

\*Lovy-Wheeler, A; Cárdenas, L; Kunkel, J.G; Hepler, P.K. *Differential organelle movement on the actin cytoskeleton in lily pollen tubes*. Cell Motil Cytoskeleton, 2007. 64 (3): p. 217-232.

\*Lush, M.W; Spurck, T and Joosten, R. *Pollen tube guidance by the pistil of a solanaceous plant*. Annals of Botany, 2000. 85 (Suppl A): p. 39-47.

\*Marmagne, A; Rouet, M.A; Ferro, M; Rolland, N; Alcon, C; Garin, J; Joyard, J; Barbier-Brygoo, H; Ephritikhine, G. *Identification of new intrinsic proteins in Arabidopsis plasma membrane proteome*. Mol Cell Proteomics, 2004. 3 (7): p. 675-691.

\*Matsubayashi, Y; Yang, H and Sakagami, Y. *Peptide signals and their receptors in higher plants*. Trends Plant Sci, 2001. 6 (12): p. 573-577.

24-Malhó, R; Liu, Q; Monteiro, D; Rato, C; Camacho, L; Dinis, A. *Signalling pathways in pollen germination and tube growth*. Protoplasma, 2006. 228 (1-3): p. 21-30.

\*Mayfield, J.A and Preuss, D. *Rapid initiation of Arabidopsis pollination requires the oleosin-domain protein GRP17*. Nat Cell Biol, 2000. 2 (2): p. 128-130.

\*Mayfield, J.A; Fiebig, A; Johnstone, S.E; and Preuss, D. *Gene Families from the Arabidopsis thaliana Pollen Coat Proteome*. Science, 2001. 292 (5526): p. 2482-2485.

\*McCormick, S. *Control of male Gametophyte Development*. Plant Cell, 2004. 16 Suppl: p. S142-153.

\*McCormick, S. *Male Gametophyte Development*. Plant Cell, 1993. 5 (10): p. 1265-1275.

\*McDermott, M; Wakelam, M.J; Morris, A.J. *Phospholipase D*. Biochem Cell Biol, 2004. 82 (1): p. 225-253.

\*Mills, P.B; Mills, K; Johnson, A.W; Clayton, P.T; Winchester, B.G. *Analysis by matrix assisted laser desorption/ionisation-time of flight mass spectrometry of the post-translational modifications of alpha 1-antitrypsin isoforms separated by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis*. Proteomics, 2001. 1(6): p. 778-786.

\*Miranda-Saavedra, D and Barton, G.J. *Classification and functional annotation of eukaryotic protein kinases*. Proteins, 2007. 68 (4): p. 893-914.

\*Miyahara, A; Hirani, T.A; Oakes, M; Kereszt, A; Kobe, B; Djordjevic, M.A; Gesshoff, P.M. *Soybean Nodule Autoregulation Receptor Kinase Phosphorylates Two Kinase-associated Protein Phosphatases in Vitro*. J Biol Chem, 2008. 283 (37): p. 25381-25391.

- \*a) Monteiro, D; Liu, Q; Lisboa, S; Scherer, G.E; Quader, H; Malhó, R. *Phosphoinositides and phosphatidic acid regulate pollen tube growth and reorientation through modulation of  $[Ca^{2+}]_c$  and membrane secretion*. J Exp Bot, 2005. 56 (416): p. 1665-1674.
- \*b) Monteiro, D; Castanho Coelho, P; Rodrigues, C; Camacho, L; Quader, H; Malhó, R. *Modulation of endocytosis in pollen tube growth by phosphoinositides and phospholipids*. Protoplasma, 2005. 226 (1-2): p. 31-38.
- \*Morillo, S.A and Tax, F.E. *Functional analysis of receptor-like kinases in monocots and dicots*. Curr Opin Plant Biol, 2006. 9 (5): p. 460-469.
- \*Mouline, K; Véry, A.A; Gaymard, F; Boucherez, J; Pilot, G; Devic, M; Bouchez, D; Thibaud, J.B; Sentenac, H. *Pollen tube development and competitive ability are impaired by disruption of a Shaker  $K^{(+)}$  channel in Arabidopsis*. Genes Dev, 2002. 16 (3): p. 339-350.
- \*Mouradov, A; Cremer, F and Coupland, G. *Control of flowering time: interacting pathway as a basis for diversity*. Plant Cell, 2002. 14 Suppl: p.S111-130.
- \*Moutinho, A; Hussey, P.J; Trewavas, A.J; Malhó, R. *cAMP acts as a second messenger in pollen tube growth and reorientation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. 98 (18): p. 10481-10486.
- \*Mu, J.H; Lee, H.S; Kao, T.H. *Characterization of a pollen-expressed receptor-like kinase gene of Petunia inflata and the activity of its encoded kinase*. Plant Cell, 1994. 6 (5): p. 709-721.
- \*Muschiatti, J; Eyal, Y and McCormick, S. *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. 319-330.
- \*Muschiatti, J; Dircks, L; Vancannet, G and McCormick, S. *LAT52 protein is essential for tomato pollen development: pollen expressing antisense LAT52 RNA hydrates and germinates abnormally and cannot achieve fertilization*. Plant J, 1994. 6 (3): p. 321-338.
- \*Myers, C; Romanowsky, S.M; Barron, Y.D; Garg, S; Azuse, C.L; Curran, A; Davis, R.M; Hatton, J; Harmon, A.C; Harper, J.F. *Calcium-dependent protein kinases regulate polarized tip growth in pollen tubes*. Plant J, 2009. 59 (4): p. 528-539.
- \*Nühse, T.S; Stensballe, A; Jensen, O.N; Peck, S.C. *Phosphoproteomics of the Arabidopsis Plasma Membrane and a New Phosphorylation Site Database*. Plant Cell, 2004. 16 (9): p. 2394-2405.
- \*Oh, M.H; Wang, X; Kota, U; Goshe, M.B; Clouse, S.D and Huber S.C. *Tyrosine phosphorylation of the BRI1 receptor kinase emerges as a component of brassinosteroid signaling in Arabidopsis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. 106 (2): p. 658-663.

- \*Pan, Y.Y; Wang, X; Ma, L.G; Sun, D.Y. *Characterization of phosphatidylinositol-specific phospholipase C (PI-PLC) from Lilium daviddi pollen*. Plant Cell Physiol, 2005. 46 (10): p. 1657-1665.
- \*Park, S.Y and Lord, E.M. *Expression studies of SCA in lily and confirmation of its role in pollen tube adhesion*. Plant Mol Biol, 2003. 51 (2): p. 183-189.
- \*Park, S.Y; Jauh, G.Y; Mollet, J.C; Eckard, K.J; Nothnagel, E.A; Walling, L.L; Lord, E.M. *A lipid transfer-like protein is necessary for lily pollen tube adhesion to an in vitro stylar matrix*. Plant Cell, 2000. 12 (1): p. 151-164.
- \*Parton, R.M; Fischer-Parton, S; Trewavas, A.J; Watahiki, M.K. *Pollen tubes exhibit regular periodic membrane trafficking events in the absence of apical extension*. J Cell Sci, 2003. 116 (Pt 13): p. 2707-2719.
- \*Parton, R.M; Fischer-Parton, S; Watahiki, M.K; Trewavas, A.J. *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. 2685-2695.
- \*Pawson, T. *Specificity in signal transduction: from phosphotyrosine-SH2 domain interactions to complex cellular systems*. Cell, 2004. 116 (2): p. 191-203.
- \*Peltier, J.B; Ytterberg, A.J; Sun, Q; Van Wijk, K.J. *New functions of the thylakoid membrane proteome of Arabidopsis thaliana revealed by a simple, fast, and versatile fractionation strategy*. J Biol Chem, 2004. 279 (47): p. 49367-49383.
- \*Qu, H.Y; Shang, Z.L; Zhang, S.L; Liu, L.M; Wu, J.Y. *Identification of hyperpolarization-activated calcium channels in apical pollen tubes of Pyrus pyrifolia*. New Phytol, 2007. 174 (3): p. 524-536.
- \*Rato, C; Monteiro, D; Hepler, P.K; Malhó, R. *Calmodulin activity and cAMP signalling modulate growth and apical secretion in pollen tubes*. Plant J, 2004. 38 (6): p. 887-897.
- \*Red Brewer, M; Choi, S.H; Alvarado, D; Moravcevic, K; Pozzi, A; Lemmon, M.A and Carpenter, G. *The juxtamembrane region of the EGF receptor functions as an activation domain*. Mol Cell, 2009. 34 (6): p. 641-651.
- \*Ren, H and Y. Xiang, *The function of actin-binding proteins in pollen tube growth*. Protoplasma, 2007. 230 (3-4): p. 171-182.
- \*Ridley, A.J. *Rho GTPases and actin dynamics in membrane protrusions and vesicle trafficking*. Trends Cell Biol, 2006. 16 (10): p. 522-529.
- \*Rolland, N; Ferro, M; Ephritikhine, G; Marmagne, A; Ramus, C; Brugiere, S; Salvi, D; Seigneurin-Berny, D; Bourguignon, J; Barbier-Brygoo; Joyard, J and Garin, J. *A versatile method for deciphering plant membrane proteomes*. J Exp Bot, 2006. 57 (7): p. 1579-1589.

- \*Rossignol, M. Proteomic analysis of phosphorylated proteins. *Curr Opin in Plant Biol*, 2006. 9 (5): p. 538-543.
- \*Roth, M.G. *Phosphoinositides in constitutive membrane traffic*. *Physiol Rev*, 2004. 84 (3): p. 699-730.
- \*Rudrabhatla, P; Reddy, M.M; Rajasekharan, R. *Genome-wide analysis and experimentation of plant serine/threonine/tyrosine-specific protein kinases*. *Plant Mol Biol*, 2006. 60 (2): p. 293-319.
- \*Samaj, J; Müller, J; Beck, M; Böhm, N and Menzel, D. *Vesicular trafficking, cytoskeleton and signalling in root hairs and pollen tubes*. *Trends Plant Sci*, 2006. 11 (12): p. 594-600.
- \*Samaj, J; Baluska, F; Voigt, B; Schlicht, M; Volkmann, D; Menzel, D. *Endocytosis, actin cytoskeleton, and signaling*. *Plant Physiol*, 2004. 135 (3): p. 1150-1161.
- \*Sanchez, A.M; Bosch, M; Bots, M; Nieuwland, J; Feron, R; Mariani, C; Sanchez, A.M. *Pistil factors controlling pollination*. *Plant Cell*, 2004. 16 Suppl: p. S98-106.
- \*Santoni, V; Molloy, M; Rabilloud, T. *Membrane proteins and proteomics: un amour impossible?* *Electrophoresis*, 2000. 21 (6): p. 1054-1070.
- \*Schiøtt, M; Romanowsky, S.M; Baekgaard, L; Jakobsen, M.K; Palmgren, M.G; Harper, J.F. *A plant plasma membrane  $Ca^{2+}$  pump is required for normal pollen tube growth and fertilization*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. 101 (25): p. 9502-9507.
- \*Schneitz, K. *The molecular and genetic control of ovule development*. *Curr Opin Plant Biol*, 1999. 2 (1): p. 13-17.
- \*Shah, K; Vervoort, J; de Vries, S.C. *Role of threonine in the Arabidopsis thaliana somatic embryogenesis receptor kinase 1 activation loop in phosphorylation*. *J Biol Chem*, 2001. 276 (44): p. 41263-41269.
- \*Sharma, V.K; Ramirez, J and Fletcher, J.C. *The Arabidopsis CLV3-like (CLE) genes are expressed in diverse tissues and encode secreted proteins*. *Plant Mol Biol*, 2003. 51 (3): p. 415-425.
- \*Sheikh, M.S and Huang, Y. *Death receptor activation complexes: it takes two to activate TNF receptor 1*. *Cell Cycle*, 2003. 2 (6): p. 550-552.
- \*Shichrur, K; Yalovsky, S. *Turning ON the switch-RhoGEFs in plants*. *Trends Plant Sci*, 2006. 11 (2): p. 57-59.
- \*Shiu, S.H and A.B. Bleecker, *Plant receptor-like kinase gene family: diversity, function, and signaling*. *Sci STKE*, 2001. 2001(113): p. RE22.

- \*Song, X.F; Yang, C.Y; Liu, J; Yang, W.C. *RPA, a class II ARFGAP protein, activates ARF1 and U5 and plays a role in root hair development in Arabidopsis*. Plant physiol, 2006. 141 (3): p. 966-976.
- \*Sousa, E; Post, B and Malhó, R. *Arabidopsis Phospahtidylinositol-4-Monophosphate 5-Kinase 4 regulates pollen tube growth and polarity by modulating membrane recycling*. Plant Cell, 2008. 20 (11): p. 3050-3064.
- \*Sugiyama, N; Nakagami, H; Mochida, K; Daudi, A; Tomita, M; Shirasu, K; Ishihama, Y. *Large-scale phosphorylation mapping reveals the extent of tyrosine phosphorylation in Arabidopsis*. Mol Syst Biol, 2008. 4: 193.
- \*Takai, Y; Sasaki, T; Matozaki, T. *Small GTP-binding proteins*. Physiol Rev, 2001. 81 (1): p. 153-208.
- \*Tang, W; Kim, T.W; Oses-Prieto, J.A; Sun, Y; Deng, Z; Zhu, S; Wang, R; Burlingame, A.L; Wang, Z.Y. *BSKs mediate signal transduction from the receptor kinase BRI1 in Arabidopsis*. Science, 2008. 321 (5888): p. 557-560.
- \*Tang, W; Kelly, D; Ezcurra, I; Cotter, R and McCormick, S. *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. 343-353.
- \*Tang, W; Ezcurra, I; Muschietti, J and McCormick, S. *A cysteine-rich extracellular protein, LAT52, interacts with the extracellular domain of the pollen receptor kinase LePRK2*. Plant Cell, 2002. 14 (9): p. 2277-2287.
- \*Takamaya, S and Isogai, A. *Self-incompatibility in plants*. Annu Rev Plant Biol, 2005. 56: p. 467-89.
- \*Takayama, S; Shiba, H; Iwano, M; Asano, K; Hara, M; Che, F.S; Watanabe, M; Hinata, K; Isogai, A. *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. 3765-3770.
- \*Taylor L.P. *Pollen germination and tube growth*. Annual Review of Plant Physiol and Plant Molecular Biology, 1997. 48: p. 461-491.
- \*Tesis doctoral Diego Wengier, 2008.
- \*Tesis de licenciatura Tamara Salem, 2004.
- \*Tichtinsky, G; Vanoosthuysse, V; Cock, J.M and Gaude, T. *Making inroads into plant receptor kinase signalling pathways*. Trends Plant Sci, 2003. 8 (5): p. 231-237.
- \*Trotochaud, A.E; Hao, T; Wu, G; Yang, Z; Clark, S.E. *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.

- \*Ubersax, J.A and Ferrell, J.E Jr. *Mechanisms of specificity in protein phosphorylation*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. 8 (7): p. 530-541.
- \*Ubersax, J.A; Woodbury, E.L; Quang, P.N; Paraz, M; Blethrow, J.D; Shah, K; Shokat, K.M and Morgan, D.O. *Targets of the cyclin-dependent kinase Cdk1*. Nature, 2003. 425 (6960): p. 859-864.
- \*van Leeuwen, W; Okrész, L; Bögre, L and Munnik, T. *Learning the lipid language of plant signalling*. Trends Plant Sci, 2004. 9 (8): p. 378-384.
- \*Vernoud, V; Horton, A.C; Yang, Z; Nielsen, E. *Analysis of the small GTPase gene superfamily of Arabidopsis*. Plant Physiol, 2003. 131 (3): p. 1191-1208.
- \*Vidali, L; Hepler, P.K. *Actin and pollen tube growth*. Protoplasma, 2001. 215 (1-4): p. 64-76.
- \*Vincent, P; Chua, M; Nogue, F; Fairbrother, A; Mekeel, H; Xu, Y; Allen, N; Bibikova, T.N; Gilroy, S and Bankaitis, V.A. *A Sec14p-nodulin domain phosphatidylinositol transfer protein polarizes membrane growth of Arabidopsis thaliana root hairs*. J Cell Biol, 2005. 168 (5): p. 801-812.
- \*Wajant, H. *The Fas Signaling Pathway: More Than a Paradigm*. Science, 2002. 296 (5573): p. 1635-1636.
- \*Wang, B.C; Wang, H.X; Feng, J.X; Meng, D.Z; Qu, L.J; Zhu, Y.X. *Post-translational modifications, but not transcriptional regulation, of major chloroplast RNA-binding proteins are related to Arabidopsis seedling development*. Proteomics, 2006. 6 (8): p. 2555-2563.
- \*Wang, Q; Kong, L; Hao, H; Wang, X; Lin, J; Samaj, J; Baluska, F. *Effects of brefeldin A on pollen germination and tube growth. Antagonistic effects on endocytosis and secretion*. Plant Physiol, 2005. 139 (4): p. 1692-1703.
- \*Wang, X and Chory, J. *Brassinosteroids regulate dissociation of BKII, a negative regulator of BRII signaling, from the plasma membrana*. Science, 2006. 313 (5790): p. 1118-1122.
- Wang, X. *Regulatory functions of phospholipase D and phosphatidic acid in plant growth, development, and stress responses*. Plant Physiol, 2005. 39 (2): p. 566-573.
- \*Wang, X; Goshe, M.B; Soderblom, E.J; Phinney, B.S; Kuchar, J.A; Li, J; Asami, T; Yoshida, S; Huber, S.C and Clouse S.D. *Identification and Functional Analysis of in Vivo Phosphorylation Sites of the Arabidopsis BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE1 Receptor Kinase*. Plant Cell, 2005. 17 (6): p. 1685-1703.
- \*Wang, X; Wang, C; Sang, Y; Zheng, L; Qin, C. *Determining functions of multiple phospholipase Ds in stress response of Arabidopsis*. Biochem Soc Trans, 2000. 28 (6): p. 813-816.



- \*Wendland, J. *Comparison of morphogenetic network of filamentous fungi and yeast*. Fungal Genet Biol, 2001. 34 (2): p. 63-82.
- \*Wengier, D; Valsecchi, I; Cabanas, M.L; Tang, WH; McCormick, S and Muschietti, J. *The receptor kinases LePRK1 and LePRK2 associate in pollen and when expressed in yeast, but dissociate in the presence of style extract*. Natl Acad Sci U S A, 2003. 100 (11): p. 6860-6865.
- \*Wheeler, M.J; Franklin-Tong, V.E and Franklin, F.C.H. *The molecular and genetic basis of pollen-pistil interactions*. New Phytologist, 2001. 151 (3): p. 565-584.
- \*Wieser, R; Wrana, J.L; Massague, J. *GS domain mutations that constitutively activate T beta R-I, the downstream signaling component in the TGF-beta receptor complex*. EMBO J, 1995. 14 (10): p. 2199-2208.
- \*Wu, G; Gu, Y; Li, S and Yang, Z. *A Genome-wide analysis of Arabidopsis Rop-interactive CRIB motif-containing proteins that act as Rop GTPase targets*. Plant Cell, 2001. 13 (12): p. 2841-2856.
- \*Wu, H.M; Wong, E; Ogdahl, J; Cheung, AY. *A pollen tube growth-promoting arabinogalactan protein from nicotiana glauca is similar to the tobacco TTS protein*. Plant J, 2000. 22 (2): p. 165-176.
- \*Wu, G; Li, H and Yang, Z. *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. 1625-1636.
- \*Xu, W.H; Wang, Y.S; Liu G.Z; Chen, X; Tinjuangjun, P; Pi, L.Y and Song W.Y. *The autophosphorylated Ser686, Thr688, and Ser689 residues in the intracellular juxtamembrane domain of XA21 are implicated in stability control of rice receptor-like kinase*. Plant J, 2006. 45 (5): p. 740-751.
- \*Xue, Y; Zhou, F; Zhu, M; Ahmed, K; Chen, G; Yao, X. *GPS: a comprehensive www server for phosphorylation sites prediction*. Nucleic Acids Res, 2005. 33: p. W184-7.
- \*Yang, Z and Fu, Y. *ROP/RAC GTPase signaling*. Curr Opin Plant Biol, 2007. 10 (5): p. 490-494.
- \*Yang, Z. *Small GTPases: versatile signaling switches in plants*. Plant Cell, 2002. 14 Suppl: S375-88.
- \*Yoshida, S and Parniske, M. *Regulation of plant symbiosis receptor kinase through serine and threonine Phosphorylation*. J Biol Chem, 2005. 280 (10): p. 9203-9209.
- \*Yoo, S.D; Cho, Y.H; Tena, G, Xiong, Y; Sheen J. *Dual control of nuclear EIN3 by bifurcate MAPK cascades in C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> signalling*. Nature, 2008. 451 (7180): 789-795.

- \*Yoon, G.M; Dowd, P.E; Gilroy, S; McCubbin, A.G. *Calcium-dependent protein kinase isoforms in petunia have distinct functions in pollen tube growth, including regulating polarity*. Plant Cell, 2006. 18 (4): p. 867-878.
- \*Zhang, D; Wengier, D; Shuai, B; Gui, C.P; Muschietti, J; McCormick, S; Tang, W.H. *The pollen receptor kinase LePRK2 mediates growth-promoting signals and positively regulates pollen germination and tube growth*. Plant Physiol, 2008. 148 (3): p. 1368-1379.
- \*Zhang, Y; McCormick, S. *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. 18830-18835.
- \*Zheng Z.L and Yang, Z. *The Rop GTPase: an emerging signaling switch in plants*. Plant Mol Biol, 2000. 44 (1): p. 1-9.
- \*Zi, H; Xiang, Y; Li, M; Wang, T and Ren, H. *Reversible protein tyrosine phosphorylation affects pollen germination and pollen tube growth via the actin cytoskeleton*. Protoplasma, 2007. 230 (3-4): p. 183-191.
- \*Zonia, L and Munnik, T. *Uncovering hidden treasures in pollen tube growth mechanics*. Trends Plant Sci, 2009. 14 (6): p. 318-327.
- \*Zonia, L and Munnik, T. *Vesicle trafficking dynamics and visualization of zones of exocytosis and endocytosis in tobacco pollen tubes*. J Exp Bot, 2008. 59 (4): p. 861-873.
- \*Zonia, L; Müller, M; Munnik, T. *Hydrodynamics and cell volume oscillations in the pollen tube apical region are integral components of the biomechanics of Nicotiana tabacum pollen tube growth*. Cell Biochem Biophys, 2006. 46 (3): p. 209-232.
- \*Zonia, L; Cordeiro, S; Tupý, J; Feijó, J.A. *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. 2233-2249.