



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**

**INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA**

**Distribución subcelular y caracterización fisiológica de la  
acuaporina *McPIP1;4* de *Mesembryanthemum crystallinum***

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS  
P R E S E N T A :

Q.A. ERIC EDMUNDO HERNÁNDEZ DOMÍNGUEZ

TUTOR: DRA. ROSARIO VERA ESTRELLA

CUERNAVACA, MORELOS,



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a la Dra. Rosario Vera Estrella por su confianza, apoyo, su valiosa amistad y por todos los conocimientos y enseñanzas para la realización de este trabajo.

También quiero agradecer a Julio por compartir sus conocimientos y su apoyo durante este tiempo, a la Dra. Bronwyn y al Dr. Omar, así como a todos los compañeros del laboratorio por sus comentarios y sugerencias para mejorar este trabajo y a Lilian por su ayuda.

Finalmente agradezco a Maribel, Gloria, Jalil y Leticia por toda su ayuda.

## **DEDICATORIA**

Le doy gracias a Dios por permitirme conocer la vida y su creación.

Esta tesis se la dedico a mis padres Patricia y Francisco a mi hermano Ivan y a mi abuelita Leonor y les agradezco todo el cariño y apoyo que me brindan.

También esta tesis se la dedico a todos mis amigos y con mucho cariño a Mary Cris y Mariana por su amistad.

## ÍNDICE GENERAL

<b>1. Resumen</b> .....	5
<b>2. Introducción</b> .....	7
2.1 Las acuaporinas: identificación y clasificación.....	7
2.2 Estructura de las acuaporinas.....	11
2.3 Regulación por fosforilación.....	13
2.4 Regulación por heterotetramerización .....	15
2.5 Regulación por pH y Ca <sup>2+</sup> .....	16
2.6 Regulación por tráfico vesicular.....	17
<b>3. Antecedentes</b> .....	19
<b>4. Justificación</b> .....	20
<b>5. Hipótesis</b> .....	22
<b>6. Objetivos</b> .....	22
6.1 General .....	22
6.2 Particulares.....	22
<b>7. Materiales y métodos</b> .....	23
7.1 Material biológico y condiciones de crecimiento .....	23
7.2 Aislamiento y purificación de membranas .....	23
7.3 Preparación del DNA y la transcripción del RNA complementario.....	24
7.4 Expresión en ovocitos .....	24
7.5 Transporte de [ <sup>14</sup> C]- glicerol en ovocitos .....	25
7.6 Ensayos de fosforilación en ovocitos .....	25
7.7 Cuantificación de proteína .....	26
7.8 SDS-PAGE e inmunodetección de proteínas .....	26
7.9 Extracción de proteína de membrana de ovocito .....	27
7.10 Preparación de protoplastos de <i>M. crystallinum</i> .....	27
7.11 Fusiones de GFP con <i>McPIP1;4</i> .....	28
7.12 Microscopia confocal.....	28
<b>8. Resultados</b> .....	29
8.1 Caracterización fisiológica de <i>McPIP1;4</i> .....	29
8.1.1 Permeabilidad al agua de <i>McPIP1;4</i> en ovocitos de <i>X. laevis</i> .....	29
8.1.2 Permeabilidad de la acuaporina <i>McPIP1;4</i> a diferentes solutos .....	33
8.1.3 Co-inyección de <i>McPIP1;4</i> con otras acuaporinas de <i>M. crystallinum</i> .....	35
8.2 Localización subcelular de la acuaporina <i>McPIP1;4</i> .....	36
8.3 Cambios en la expresión de <i>McPIP1;4</i> por estrés osmótico o salino.....	42
8.4 Fosforilación.....	42
8.5 Identificación <i>in silico</i> de posibles modificaciones post-traduccionales para <i>McPIP1;4</i> .....	44
<b>9. Discusión</b> .....	47
9.1 Propiedades de transporte al agua de <i>McPIP1;4</i> .....	47
9.2 Localización subcelular de <i>McPIP1;4</i> .....	51
9.3 Cambio en la expresión de <i>McPIP1;4</i> por efecto del estrés osmótico o salino .....	52
9.4 Efecto de la fosforilación .....	53
9.5 Identificación <i>in silico</i> de posibles modificaciones post-traduccionales para <i>McPIP1;4</i> .....	54
<b>10 Conclusiones</b> .....	57
<b>11 Perspectivas</b> .....	58
<b>12 Referencias</b> .....	59

## 1. Resumen

*Mesembryanthemum crystallinum* es una planta halófila que desarrolló estrategias diferentes para crecer en suelos salinos y semi-desérticos (Adams *et al.*, 1992). Uno de estos mecanismos, consiste en controlar el flujo de agua para compensar los cambios en la osmolaridad tanto del citoplasma como de todos los organelos, lo que ocurre por la regulación de la expresión y la actividad de los canales de agua ó acuaporinas (AQPs). Las AQPs son proteínas intrínsecas de membrana que permiten y regulan el paso de agua y/o otros solutos a través de las membranas. En las plantas, las AQPs pertenecen a una gran familia génica de hasta 36 miembros, de la mayoría de los cuales se desconoce su distribución subcelular y su función. Aunque, las evidencias experimentales sugieren que estas proteínas están sujetas a mecanismos de regulación muy complejos y variados (Tyerman *et al.*, 1999 y 2002; Johansson *et al.*, 2000; Javot y Maurel, 2002; Maurel *et al.*, 2002., Chaumont *et al.*, 2005; Vera-Estrella *et al.*, 2004). Por ello, nuestro interés se orientó a determinar la localización subcelular, la función y a entender como las modificaciones post-traduccionales podrían afectar a la AQP *McPIP1;4* de *M. crystallinum*. En este trabajo mediante el uso de ovocitos de *Xenopus laevis*, un sistema de expresión heterólogo en el que se expresó *McPIP1;4*, se muestra que esta AQP presenta una baja permeabilidad al H<sub>2</sub>O, la cual es independiente de la concentración de cRNA inyectado en los ovocitos y del tiempo de incubación (12, 24 ,36 h). Sin embargo, cuando se co-expresaron *McPIP1;4* y *McPIP1;2* o *McPIP1;4* con *McPIP2;1* aumentó la permeabilidad al H<sub>2</sub>O. Utilizando ensayos de toma de urea y glicerol radiactivos, se detectó que *McPIP1;4* presenta permeabilidad al glicerol pero no transporta urea. Mediante el uso de gradientes de sacarosa y de microscopia confocal se demostró que *McPIP1;4* se localiza en compartimientos pre-vacuolares (CPV). En condiciones de salinidad aumentan los niveles de proteína de *McPIP1;4* y disminuyen en

presencia de manitol, lo que sugiere que *McPIP1;4* se regula diferencialmente por estos tipos de estrés. Además, mediante un análisis bioinformático se identificaron dos posibles modificaciones post-traduccionales que pueden desempeñar un papel importante en la regulación y/o localización de la *McPIP1;4*. Estas modificaciones son: la sumoilación y la modificación por  $\beta$ -N-acetilglucosamina (O-GlcNac). Finalmente, con ayuda de 8-Br-cAMP (un activador de la fosforilación) y ácido okadaíco (un inhibidor de fosfatasas) se determinó el efecto de la fosforilación en la permeabilidad de *McPIP1;4*.

## 2. Introducción

La salinidad y el estrés osmótico están considerados como los factores más importantes que afectan el crecimiento de las plantas. Se ha observado que para que las plantas puedan mantener su crecimiento en condiciones de alta salinidad, necesitan aumentar o reducir la expresión de un gran número de proteínas que permiten secuestrar el  $\text{Na}^+$  dentro de la vacuola y así mantener bajos los niveles citoplasmáticos de  $\text{Na}^+$ . *M. crystallinum* es una halófita que desarrolló diferentes estrategias que le permiten llevar a cabo un ajuste osmótico (equilibrio en el volumen del citoplasma y disipación de los gradientes en el potencial de agua dentro de la célula), para crecer en suelos semi-desérticos o que contienen una gran cantidad de sal. Esto lo logra mediante la síntesis de solutos compatibles en el citoplasma y en los organelos como azúcares (sacarosa), polialcoholes (glicerol, pinitol) y aminoácidos (prolina) (Vernon y Bohnert, 1992; Adams *et al.*, 1992), la exclusión y/o inclusión de sales (exclusión de  $\text{Na}^+$  de las células y compartimentación en vacuolas y células especializadas) y el control en el flujo de agua mediante la regulación de los canales de agua o acuaporinas (AQPs).

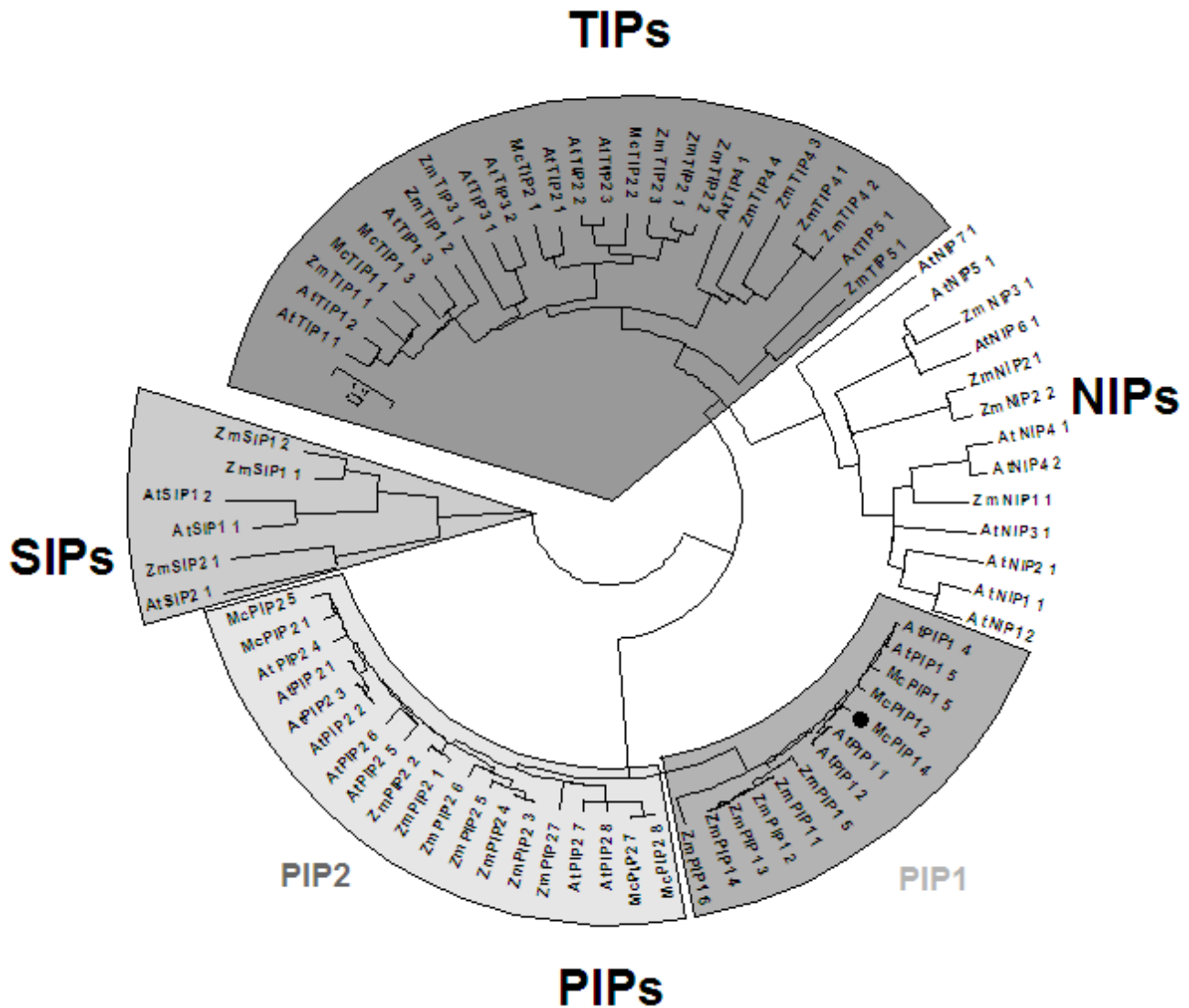
### 2.1 Las acuaporinas: identificación y clasificación

Con el descubrimiento de una proteína integral de membrana de 28 kD aislada de eritrocitos y células del riñón, se demostró presencia de los canales de agua o AQPs (Denker *et al.*, 1988; Smith y Agre, 1991). Estas proteínas están presentes en todos los organismos y son las encargadas del transporte de agua. Debido a que presentan homología se han agrupado en una familia altamente conservada y muy extensa de proteínas intrínsecas de membrana (MIP por su siglas del inglés "Membrane Intrinsic Proteins"), las cuales presentan una masa molecular estimada entre 26 y 32 kD, seis dominios transmembranales y dos motivos NPA (asparagina prolina alanina) formando el poro (Jung *et al.*, 1994b).



En animales se han clonado 12 genes que codifican para AQPs (Agre, 2006), en plantas se han identificado un gran número de genes; por ejemplo, en el genoma de *Arabidopsis thaliana* se han encontrado 35 genes (Johanson *et al.*, 2001; Quigley *et al.*, 2002), 31 genes en *Zea mays* (maíz) (Chaumont *et al.*, 2001), 33 en *Oriza sativa* (arroz) (Sakurai *et al.*, 2005) y 14 en *M. crystallinum* (Vera-Estrella *et al.*, 2000). Con base en sus secuencia, las AQPs de plantas se han clasificado en 4 subfamilias (Figura 1), las proteínas intrínsecas de la membrana plasmática (PIPs), las proteínas intrínsecas del tonoplasto (TIPs), las proteínas relacionadas a la nodulina 26 (NIPs) y las pequeñas proteínas intrínsecas básicas (SIPs) (Chaumont *et al.*, 2001; Johanson y Gustavsson, 2002; Johanson *et al.*, 2001). Sin embargo, algunas de las AQPs clasificadas dentro de estas familias no necesariamente se expresan en la membrana plasmática o el tonoplasto, sino que pueden estar localizadas en las membranas de otros organelos intracelulares (Barkla *et al.*, 1999; Vera-Estrella *et al.*, 2000, 2004).

Por comparación de las secuencias la subfamilia de las PIPs se divide en dos grupos PIP1 y PIP2 (Figura 1). Las proteínas PIP1 se ha sugerido que pueden transportar otras moléculas como glicerol (Biela *et al.*, 1999; Moshelion *et al.*, 2002), urea (Gaspar *et al.*, 2003), CO<sub>2</sub> (Uehlein *et al.*, 2003) y presentan una región N-terminal larga y una C-terminal corta. En contraposición, se ha propuesto que las proteínas PIP2 son altamente permeables al agua, tienen un región N-terminal corta y una C-terminal larga (Chaumont *et al.*, 2000a, 2001; Johansson *et al.*, 2000; Johanson *et al.*, 2001).



**Figura 1. Relación evolutiva de las acuaporinas identificadas en plantas (*Arabidopsis thaliana*, *Zea mays* y *M. crystallinum*).** Árbol filogenético indicando las diferentes subfamilias (La acuaporina McPIP1;4 bajo estudio se resalta con un punto). Proteínas intrínsecas de la membrana plasmática (PIPs), las proteínas intrínsecas del tonoplasto (TIPs), las proteínas relacionadas a la nudulina 26 (NIPs) y las pequeñas proteínas intrínsecas básicas (SIPs).

Las AQP participan en una gran variedad de funciones, tales como la toma de agua en las raíces por el floema y su transporte a las hojas, la apertura y el cierre de los estomas, la homeostasis del citoplasma, el movimiento de las hojas, el desarrollo de las semillas, y en la elongación de las raíces (Maurel *et al.*, 2002; Tyerman *et al.*, 2002), lo cual sugiere que la duplicación génica de las AQPs en plantas ofrece un ventaja para el crecimiento,

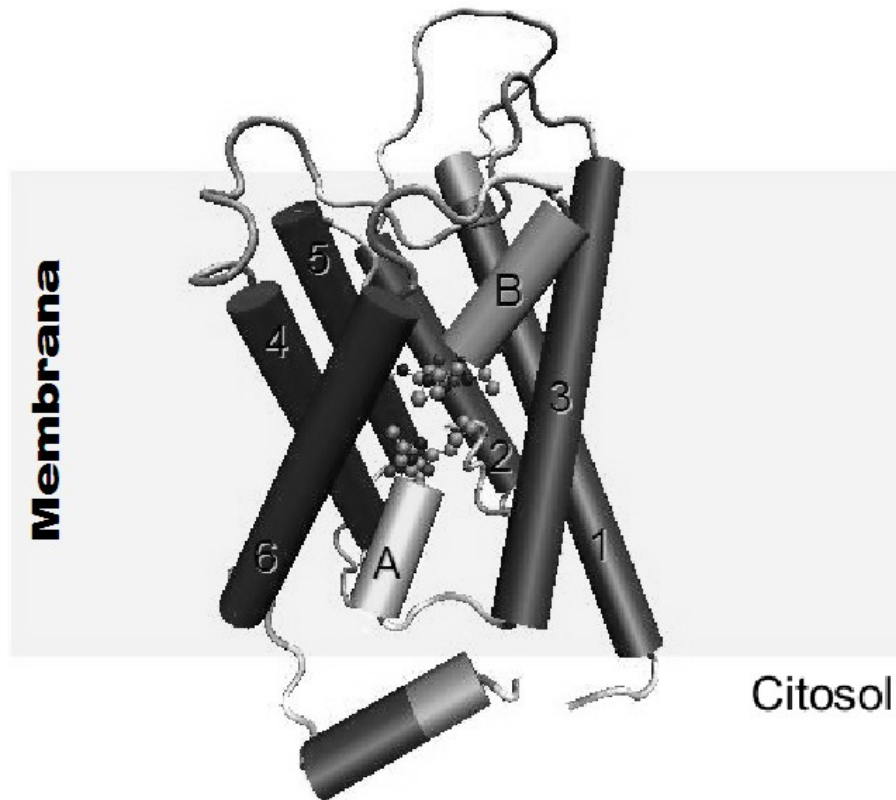
posiblemente como resultado de los diferentes mecanismos de regulación y de la selectividad del transporte de cada una de éstas (Chaumot *et al.*, 2005). Los mecanismos de regulación de estas familias génicas son muy complejos y variados. Entre estos mecanismos se encuentran, la regulación transcripcional, post-traducciona l y el tráfico vesicular, además, estos mecanismos varían entre los miembros de la misma familia (Fujiyoshi *et al.* 2002; Vera-Estrella *et al.*, 2004).

Como un ejemplo de la importancia de las AQP y su diversidad, se han estudiado los patrones de expresión de los transcritos de las AQP y se han detectado en todos los tejidos estudiados, pudiendo ser abundantes o estar presentes en pequeñas cantidades, algunos pueden ser tejido específicos o estar regulados por factores ambientales como sequía, temperatura, o salinidad (Yamaguchi-Shinozaki *et al.*, 1992; Jones y Mullet., 1995; Yamada *et al.*, 1995; Maurel, 1997; Johansson *et al.*, 1998; Kirch *et al.*, 2000; Vera-Estrella *et al.*, 2000, 2004). La inducción de los transcritos de AQP durante el estrés osmótico se ha reportado en diferentes tejidos y especies vegetales: en plántulas y partes aéreas de *A. thaliana* (Yamaguchi-shinozaki *et al.*, 1992; Weig *et al.*, 1997; Pih *et al.*, 1999), partes aéreas de chícharo, (Guerrero *et al.*, 1990) tallos de tomate (Fray *et al.*, 1994), anteras e inflorescencias de coliflor (Ruiter *et al.*, 1997; Barrieu *et al.*, 1999), raíces y partes aéreas de arroz (Liu *et al.*, 1994 ), hojas de girasol (Sarda, *et al.*, 1997) y de la planta de resurrección (Mariaux *et al.*, 1998). En contraste con estos resultados, se ha observado que el estrés osmótico causa una disminución de la expresión de los mRNAs de AQP en hojas, raíces y tallos de *Nicotiana glauca* (Smart *et al.*, 2001), raíces de girasol (Sarda, *et al.*, 1999) y en raíces y hojas de *M. crystallinum* (Yamada *et al.*, 1995). Sin embargo, pocos trabajos se han enfocado en el estudio de la regulación de expresión de las AQP por estrés osmótico a nivel de proteína. Durante el estrés salino, la cantidad de la proteína McTIP1; 2 se reduce en el

tonoplasto de las células de las hojas, mientras que ocurre un incremento en la raíz. En contraste, no se observa incrementos en la cantidad de *McPIP1;2* en ningún tejido de la planta (Kirch *et al.*, 2000; Vera-Estrella *et al.*, 2000, 2004).

## 2.2 Estructura de las acuaporinas

Con la resolución a nivel atómico de AQP0, AQP1 y la proteína facilitadora de glicerol (GlpF) (Fu *et al.*, 2000; Murata *et al.*, 2000; Sui *et al.*, 2001; Gonen *et al.*, 2004) se ha elucidado la estructura general de las AQPs. Estas contienen seis segmentos  $\alpha$ -hélices transmembranales y tanto las regiones C-terminal como la N-terminal están orientadas al citosol. El lazo citosólico entre la segunda y la tercera hélice transmembranal (Lazo B) y el lazo extra-citosólico entre el quinto y sexto dominio transmembranal (lazo E), forman un par de medias hélices hidrofóbicas que se introducen en la membrana por lados opuestos. Cada uno de estos lazos contienen el motivo Asn-Pro-Ala (NPA), y los dos residuos de asparaginas son importantes para la formación del poro y la selectividad del filtro (Figura 2). Las acuaporinas se encuentran como tetrámeros, y cada uno de los monómeros forma un canal de agua independiente. El análisis de la estructura molecular de dos AQPs de plantas, de frijol (*Phaseolus vulgaris*) *PvTIP3;1* ( $\alpha$ -TIP) y de hoja espinaca (*Spinacia oleracea*) *SoPIP2;1* (PM28A), confirmaron la conformación típica de tetrámero encontrada en animales y bacterias (Daniels *et al.*, 1999; Fotiadis *et al.*, 2001; Karlsson *et al.*, 2003). Además, evidencias experimentales sugieren que algunas AQPs de plantas pueden ser permeables a  $\text{NH}_3^+$  y  $\text{NH}_4$  (Niemiety y Tyerman, 2000; Jahn *et al.*, 2004) Boro (Takano *et al.*, 2006)  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Henzler y Steudle, 2000; Bienert *et al.* 2007) y pequeños solutos (Hertel y Steudle, 1997; Schutz y Tyerman, 1997).



**Figura 2. Topología de una acuaporina dentro de la membrana.** La acuaporina consiste de 6 hélices transmembranales (1-6) y 2 medias hélices (A-B) que incluyen los motivos NPA repetidos (representados en forma de esferas). La región N-terminal y C- Terminal se encuentran orientadas del lado del citosol (Fu *et al.*, 2000; Murata *et al.*, 2000; Sui *et al.*, 2001; Gonen *et al.*, 2004; Törnroth-Horsefield *et al.*, 2006)

La selectividad de la AQP1 y GlpF se debe a dos filtros dentro del poro; el primero está formado por los motivos conservados NPA que actúan como un filtro selectivo electrostático y de tamaño que impide la conducción de protones, y el segundo formado por una región que reduce el tamaño del poro (el filtro aromático/arginina [ar/R]) involucrado en la interrupción de los puentes de hidrógeno (de Groot y Grubmuller, 2001; Sui *et al.*, 2001; de Groot *et al.*, 2003). Con la ayuda de las estructuras cristalográficas de las AQPs de animales se han elaborado modelos que muestran la posible estructura del poro de las AQPs de *A. thaliana*. Los datos indican que las AQPs de plantas tienen una estructura similar a la de mamíferos, pero se observan diferencias en la apertura del poro, indicando que la formación de puentes de hidrógeno y las anfifilicidad del poro puede resultar en una selectividad diferencial del canal por los substratos (Wallace y Roberts, 2004). Con la obtención de la estructura cristalográfica para la primera AQP de plantas SoPIP2;1, se confirmó la estructura en forma de tetrámero para estas proteínas (Törnroth-Horsefield *et al.*, 2006).

### 2.3 Regulación por fosforilación

Los primeros datos de regulación de las AQPs por fosforilación tanto *in vivo* como *in vitro* en plantas han sido reportados para las AQP de las semillas de frijol, PvTIP3;1 ( Ser7), de hojas de espinaca, SoPIP2;1 y de raíces de soya (*Glycine max*), Nodulina 26 (Ser262) (Weaver *et al.*, 1991; Weaver y Roberts, 1992; Johnson y Chrispeels, 1992; Miao *et al.*, 1992). Cabe mencionar que todos estos sitios de fosforilación se encontraron en residuos de serina dentro de las regiones amino o carboxilo terminal y evidencias experimentales sugieren que estas fosforilaciones se deben a una proteína cinasa dependiente de calcio asociada a la membrana. Gracias a estos trabajos iniciales se ha confirmado que la regulación por fosforilación de las AQPs puede ser controlada por el estado de desarrollo y/o por factores ambientales. Además de la fosforilación de las serinas en la región N-terminal o C-terminal, una serina localizada en el lazo citoplasmático cerca del primer motivo NPA puede ser fosforilada. Esta serina está conservada en todas las PIPs y en varias TIPs de plantas y puede estar dentro de la secuencia consenso Arg/Xaa-Lys-Xaa-Ser-Xaa-Xaa-Arg que es reconocida por varias proteínas cinasas, incluyendo las proteínas cinasas dependientes de calcio (Johansson *et al.*, 2000). Un cambio del residuo de serina por alanina en las AQPs de espinaca, SoPIP2;1 o de frijol, PvTIP3;1 resulta en una pérdida de actividad cuando las proteínas se expresan en ovocitos (Maurel *et al.*, 1995; Johansson *et al.*, 1998). Lo anterior sugiere que el alto grado de conservación de esta serina tiene una función estructural y reguladora importante, desafortunadamente la fosforilación de este residuo no se ha observado en experimentos de fosforilación *in vivo* o *in vitro*.

La expresión heteróloga de las AQPs en ovocitos de *Xenopus laevis* es un sistema muy conveniente para conocer la función y la regulación de estas proteínas (Preston *et al.*,

1992; Maurel *et al.*, 1993). Por ejemplo, la actividad de *PvTIP3;1* en *X. laevis* se incrementa por la adición de un agonista del cAMP que estimula a la proteína cinasa A (PKA) (Maurel *et al.*, 1995) y que permite tener un estado fosforilado de la proteína en el ovocito. De manera similar, las actividades de *SoPIP2;1* y de la nodulina 26 incrementan cuando el ovocito es incubado en presencia de un inhibidor de fosfatasa (ácido okadaico) (Johansson *et al.*, 1998; Guenther *et al.*, 2003).

Experimentos realizados *in vivo* demuestran la importancia que tiene la fosforilación en regular la actividad de algunas AQP. Por ejemplo, durante el desarrollo de la semilla de frijol un incremento en la actividad de *PvTIP3;1* ( $\alpha$ -TIP) correlaciona con un aumento de la forma fosforilada (Johnson y Chrispeels, 1992). Además, para la Nodulina 26 en el simbiosoma, la fosforilación se incrementa por estrés con sal o por sequía, sugiriendo que la fosforilación tiene un función importante en la regulación osmótica del citosol (Guenther *et al.*, 2003). Recientemente se reportó que en tulipán (*Tulipa gesneriana*) la fosforilación puede regular la actividad de una AQP y controlar la apertura de los pétalos a 20°C y el cierre a 5°C, respectivamente (Azad *et al.*, 2004).

Con la resolución de la estructura tridimensional para la primera AQP de plantas *SoPIP2:1* (Törnroth-Horssefield. *et al.*, 2006), se tiene una idea más clara de como la fosforilación puede ser el mecanismo general que regulan los cambios conformacionales de la proteína, los cuales afectan el cierre y la apertura del canal de la mayoría de las PIPs. En este estudio se reportó la estructura cristalográfica de la AQP en su conformación cerrada a 2.1 Å de resolución y en su conformación abierta a 3.9Å. En la conformación cerrada el lazo D de la *SoPIP2:1* se pliega por debajo de la estructura y tapa el poro. La Leu97 conservada en todas las PIPs desempeña un papel fundamental insertándose dentro de la cavidad cerca de la entrada del canal y con la histidina 99, la valina 104, y la leucina108 del lazo D, crea

una barrera hidrofóbica que tapa el poro. En la estructura abierta de la SoPIP2:1 las serinas 115 y 274 se encuentran fosforiladas permitiendo que el lazo D extendido se separe hasta una distancia de 16Å, permitiendo el flujo de las moléculas de H<sub>2</sub>O a través del canal.

## 2.4 Regulación por heterotetramerización

La actividad de las AQPs se puede afectar por el estado de oligomerización de la proteína. Las AQPs se encuentran generalmente como tetrámeros, tanto *in vitro* como *in vivo*; sin embargo, estas proteínas son funcionales como monómeros. La tetramerización involucra la interacción de las  $\alpha$ -hélices de los monómeros vecinos y de los lazos extramembranales, que pueden contribuir a la estabilidad del tetrámero (Murata *et al.*, 2000).

La co-expresión de la AQP de maíz ZmPIP1;2 y de diferentes miembros de las ZmPIP2 en ovocitos de *X. laevis*, demostraron un efecto cooperativo positivo en la actividad como resultado de una posible heterodimerización (Fetter *et al.*, 2004). La interacción de ZmPIP1;2 con ZmPIP2s y su heterodimerización se demostró por cromatografía de afinidad (Fetter *et al.*, 2004). Con el diseño de una mutante ZmPIP1;1LE a partir de ZmPIP1;1, para formar una proteína quimérica se concluyó que: a) la introducción de una mutación de un residuo hidrofóbico grande V261I puede forzar a la semi-hélice E (HE) dentro del vestíbulo del poro, y b) la formación de pares iónicos o una fuerte interacción con el solvente por la sustitución de Q250R y H251D permite cerrar la estructura del lazo. Los cambios en lazo E pueden afectar a la estructura del lazo HE que contiene el segundo motivo NPA y así cambiar la actividad del canal ó afectar a la estructura de la hélice 6 con un cambio en el estado de holigomerización de la proteína. Otro estudio con proteínas quiméricas en el que se intercambié el lazo E de la proteína GlpF y el de la AQP<sub>cic</sub> (AQP de *Cicadella spp*) indicaron que existe un cambio en su estado de holigomerización o en su estabilidad tetrámerica, que afectan su ensamble en la membrana plasmática (Duchesne *et al.*, 2002).



## 2.5 Regulación por pH y Ca<sup>2+</sup>

La regulación de la permeabilidad por efecto del Ca<sup>2+</sup> y/o concentración de protones (pH) se reportó para las AQPs de mamíferos AQP0, AQP3 y AQP6 y para las PIPs de plantas (Yasui *et al.*, 1999; Zeuthen y Klaerke, 1999; Nemeth-Cahalan y Hall, 2000; Gerbeau *et al.*, 2002; Tournaire-Roux *et al.*, 2003; Nemeth-Cahalan *et al.*, 2004). La permeabilidad de la membrana plasmática de células en suspensión o de raíz de *A. thaliana* se reduce en presencia de Ca<sup>2+</sup> y/o bajo pH (Gerbeau *et al.*, 2002; Tournaire-Roux *et al.*, 2003). Cuando se estudió la permeabilidad de las AQPs AtPIP2;1, AtPIP2;2, AtPIP2;3 y AtPIP1;2 en ovocitos de *X. laevis*, se observó una disminución de la permeabilidad por un cambio del pH citosólico de 7 a 6, y se comprobó que el principal residuo responsable de la regulación del flujo de agua para estas AQPs es la histidina 197 localizada en el lazo D, ya que una sustitución de la histidina 197 por un residuo de alanina reduce el efecto por la acidificación del citosol. Bajo condiciones de acidosis del citosol la histidina 197 y otros residuos de histidinas expuestos de la AQP AtPIP2;2, pueden existir en su forma protonada. En particular, la histidina 103 que está muy conservada, tiene una función importante dentro del poro (Sui *et al.*, 2001; Tajkhorshid *et al.*, 2002) y además la histidina 197 y la histidina 264 tienen un alto grado de conservación dentro de las PIPs de plantas y pueden estar desempeñando una función importante en estas isoformas.

Por simulación de la dinámica molecular se sabe que la AtPIP2;2 se encuentra en una conformación abierta cuando la histidina 197 está en su forma no protonada, mientras que la conformación cerrada se presenta cuando dicha histidina se encuentra protonada y el lazo D se dobla sobre el canal (Chaumont *et al.*, 2005). Lo anterior permite que los aminoácidos ácidos de la región N-terminal puedan interactuar con los residuos básicos lisina 190,

arginina 191, arginina 194, y la forma protonada de la His197 de lazo D de AtPIP2:2, y de esta manera estabilizar la conformación cerrada del canal (Chaumont *et al.*, 2005).

Recientemente, se propuso un mecanismo alternativo para explicar la regulación dependiente de pH de AQP0 de mamíferos (Nemeth-Cahalan *et al.*, 2004). En estos la regulación de la AQP0 por el pH es dependiente de una histidina en lazo A, sugiriendo que la carga de esta histidina puede reorganizar las moléculas de agua dentro del poro como una manera de restringir el paso del agua por el canal. Datos más recientes para la AQP0 indican que la regulación por  $\text{Ca}^{2+}$  y pH pueden ser separadas (Nemeth-Cahalan *et al.*, 2004), ya que el pH es dependiente de la histidina en el lazo A y la regulación por  $\text{Ca}^{2+}$  involucra la unión de calmodulina al dominio C-terminal de la proteína. La unión de un  $\text{Ca}^{2+}$  en el C-terminal vía calmodulina puede reorganizar las moléculas de agua en el poro de manera que disminuye el flujo de agua por el canal (Nemeth-Cahalan *et al.*, 2004).

## 2.6 Regulación por tráfico vesicular

Las AQPs de plantas se localizan en diferentes membranas celulares (Fortin *et al.*, 1987; Morrison *et al.*, 1988; Daniels *et al.*, 1994; Kammerloher *et al.*, 1994; Robinson *et al.*, 1996; Fleurat-Lessard *et al.*, 1997; Chaumont *et al.*, 1998, 2000b; Barkla *et al.*, 1999; Barrieu *et al.*, 1999; Cutler *et al.*, 2000; Kirch *et al.*, 2000; Reisen *et al.*, 2003; Vera-Estrella *et al.*, 2004).

La distribución subcelular de algunas AQPs parece ser más compleja que la simple localización en la membrana plasmática o en el tonoplasto. Las PIPs de *A. thaliana* pueden encontrarse en los plasmalemasomas<sup>1</sup> y pueden facilitar el intercambio de agua entre el apoplasto y la vacuola (Robinson *et al.*, 1996). Las AQPs de maíz *ZmPIP1:2* y *ZmPIP2:5* fusionadas a GFP, se detectaron en la membrana plasmática, pero también en membranas

---

<sup>1</sup> Vesículas de membrana plasmática

intracelulares y en la membrana perinuclear, localización que posiblemente corresponde a un estado del transporte de las PIP en la ruta de secreción (Chaumont *et al.*, 2000b). Experimentos realizados en protoplastos de maíz indicaron que el coeficiente de permeabilidad (Pf) se modifica durante un cambio hipo-osmótico. Esta dinámica de comportamiento del Pf es interpretada como un reflejo en el tráfico de la AQP y/o su actividad (Moshelion *et al.*, 2004). La localización de las AQPs de *M. crystallinum* también revelan un complejo patrón de distribución (Kirch *et al.*, 2000; Vera-Estrella *et al.*, 2004). McPIP1;4 no se localizó en la membrana plasmática, sino en fracciones correspondientes al tonoplasto y fracciones más ligeras. Finalmente, un cuidadoso análisis de la localización de las AQPs en el tonoplasto identificó tres tipos de vacuolas en las plantas, que pueden ser distinguidas por el tipo de TIP(s) presente en la membrana (Paris *et al.*, 1996; Jauh *et al.*, 1999).

La inducción de estrés osmótico por manitol resulta en un incremento en la cantidad de McTIP1;2 en fracciones del tonoplasto y en un cambio en su distribución a otras membranas. La aparición de una isoforma de McTIP1;2 sugiere a la glicosilación como un mecanismo que puede requerirse para la relocalización membranal (Vera-Estrella *et al.*, 2004). La glicosilación es importante por dictar la ruta y la inserción a la membrana de un número de proteínas y las formas glicosiladas de las AQPs de animales AQP1 y AQP2 se conocen (Smith *et al.*, 1994; Baumgarten *et al.*, 1998). La glicosilación a la AQP2 le permite salir del complejo de Golgi para dirigirse a la membrana plasmática (Hendriks *et al.*, 2004).

### 3. Antecedentes

Utilizando anticuerpos policlonales monoespecíficos para *McPIP1;4* se realizaron experimentos de inmunolocalización en cortes longitudinales de raíz y tallo de *M. crystallinum*. Los resultados indicaron que la proteína *McPIP1;4* se expresa de manera importante en la epidermis de las raíces jóvenes, incluyendo los pelos radicales, y en menor grado en las células corticales. La señal se incrementa hacia el centro en la capas de células más interiores de la corteza y en la endodermis. Por otra parte, en raíces maduras la expresión de *McPIP1;4* es confinada a distintas áreas que coinciden con las células asociadas al floema. En los tallos se produce una fuerte señal en las células acompañantes del floema y en los elementos cribosos (Kirch *et al.*, 2000).

Utilizando gradientes discontinuos de sacarosa se encontró que *McPIP1;4* se localiza en las fracciones que contienen el tonoplasto y que esta proteína tiene una masa molecular aparente de 41 kD (Barkla *et al.*, 1999). Además, en el laboratorio se demostró que esta AQP se regula diferencialmente por el estrés osmótico y salino, ya que cuando las células en suspensión (obtenidas de callos generados a partir de hojas de 6 semanas con un óptimo crecimiento en presencia de 200mM de sal, Vera-Estrella *et al.*, 1999) o plantas de *M. crystallinum* son sometidas a estos estrés, la expresión a nivel de proteína de esta AQP se disminuye con el estrés osmótico y aumenta con el estrés salino (Vera-Estrella *et al.*, 2000)

En el laboratorio se realizaron una serie de experimentos preliminares para estudiar tanto la función, como la localización sub-celular de *McPIP1;4*. Mediante el uso de la expresión heteróloga de *McPIP1;4* en ovocitos de *X. laevis*, se mostró que esta AQP presenta una baja permeabilidad al agua cuando se compara con los ovocitos inyectados con *McTIP1;2* y *AfTIP1;1*, las cuales son altamente permeables al agua (Vera-Estrella *et al.*, 2000). Además, se observó que el ovocito inyectado con *McPIP1;4* demora entre 30 y 35

segundos posterior al estímulo para iniciar el cambio de volumen, lo cual podría indicar que el ovocito requiere regular la actividad de esta AQP por medio de un mecanismo post-traducciona (Vera Estrella, datos no publicados).

#### 4. Justificación

La función, distribución, y regulación de las AQPs es un aspecto importante en la fisiología general de las plantas. Con base en nuestros resultados preliminares, proponemos que las AQPs se expresan en compartimentos celulares, como, la mitocondria, posiblemente el ER y el aparato de Golgi, así como en compartimentos prevacuolares y otros tipos de vesículas. Existe la posibilidad de que estas AQPs se localicen en compartimentos involucrados en la biogénesis de vacuolas y el tráfico vesicular, por lo que es imprescindible determinar su localización y regulación *in vivo* para entender de forma clara como se llevan a cabo el transporte en los compartimentos celulares y el tráfico vesicular en las plantas en general. Así mismo, es importante demostrar cuales son los mecanismos que la célula utiliza para regular y controlar los cambios osmóticos que las plantas sufren durante los diferentes cambios ambientales que afectan a las plantas durante su ciclo de vida. En este proyecto, mediante el uso de *Mesembryanthemum crystallinum* (halófito), nos proponemos demostrar que la expresión diferencial de *McPIP1;4* en compartimentos celulares es uno de los factores responsables de la tolerancia de esta planta a la salinidad y el estrés hídrico. Otro aspecto importante que se abordará en este proyecto, es determinar con detalle la función de *McPIP1;4*, ya que proponemos estudiar los mecanismos de transporte de estas proteínas, utilizando un sistema de expresión heteróloga, inyectando RNA de *McPIP1;4* en ovocitos de *X. laevis*. Por este medio, intentamos determinar los sustratos para esta AQP midiendo la permeabilidad a glicerol y urea, para así definir el papel fisiológico de esta AQP en las plantas. En general, los estudios que se proponen realizar en el presente proyecto son esenciales para asignar el papel fisiológico que la *McPIP1;4* realiza en la tolerancia al estrés osmótico y salino, como un aspecto importante en la Fisiología Vegetal y la Biología Celular.

Con esta información, complementada con la disponible sobre la regulación de las

AQP por cambios post-traduccionales, pensamos contribuir en el entendimiento de cómo la AQP McPIP1;4 de *M. crystallinum* es sujeta a cambios post-traduccionales que controlan su actividad. Además, demostraremos su localización subcelular utilizando técnicas de microscopia confocal y de gradientes de sacarosa, para inferir si los cambios post-traduccionales que esta proteína sufre pueden regular su localización subcelular.

## 5. Hipótesis

*McPIP1;4* modifica su expresión por estrés salino y osmótico localizándose en compartimentos diferentes a la membrana plasmática y el tonoplasto, y donde funcionará como un canal permeable a solutos y agua.

## 6. Objetivos

### 6.1 General

Conocer la función y la localización subcelular de *McPIP1;4*, así como su regulación por modificaciones post-traduccionales y por estrés salino y osmótico.

### 6.2 Particulares

- Determinar las propiedades de permeabilidad al agua y solutos pequeños neutros de *McPIP1;4* en ovocitos de *X. laevis*.
- Conocer el efecto de *McPIP1;4* sobre la permeabilidad en presencia de inhibidores o activadores de la fosforilación en ovocitos de *X. laevis*.
- Identificar mediante análisis bioinformático las posibles modificaciones post-traduccionales que regulan tanto la función como localización de *McPIP1;4*.
- Determinar la localización subcelular de *McPIP1;4* en protoplastos de células en suspensión de *M. crystallinum*.
- Determinar los patrones de expresión de *McPIP1;4* bajo condiciones de salinidad y estrés osmótico, mediante inmunocitocalización en células en suspensión de *M. crystallinum*.



## 7. Materiales y métodos

### 7.1 Material biológico y condiciones de crecimiento

Las células en suspensión de *M. crystallinum* se aislaron como se describe en Vera-Estrella *et al.*, (1999). Las células se utilizaron cinco días después de su transferencia a medio fresco MS (Murashige y Skoog, 1962), suplementado con 200 mM NaCl ó 200 mM de manitol.

### 7.2 Aislamiento y purificación de membranas

Las membranas se aíslan de células en suspensión de *M. crystallinum* por métodos convencionales de centrifugación (Vera-Estrella, *et al.*, 2004, 1999, 2000). El medio de homogeneización consiste en 50 mM HEPES/KOH pH 6.5, 10%(w/v), 0.1 mM PMSF, 1 mM DTT, 5 mM EDTA. La homogeneización se realiza en una licuadora comercial con perlas de vidrio de 0.1 mm, las células homogeneizadas se filtran a través de cuatro capas de gasa y se centrifugan a 10000 xg (20 min a 4°C). El sobrenadante se centrifuga a 80000 xg (50 min a 4°C) para obtener la fracción microsomal. Las fracciones microsomales se colocan en gradientes continuos (5% a 46% [w/v] sacarosa) o discontinuos de sacarosa (para aislar los compartimentos prevacuolares) que consisten en una capa de 4.5 mL de sacarosa al 16 % [w/v], sobre 6 mL de sacarosa 24% [w/v], sobre un colchón de 6.6 mL de sacarosa al 40% [w/v], y finalmente sobre 3 mL de sacarosa al 54% [w/v] . Los gradientes se centrifugan a 100000 xg (3h utilizando el rotor SW 28 y la ultracentrífuga L-8 M Beckman). Cuando se aisló el tonoplasto, se colectó en un gradiente discontinuo de sacarosa en la interfase 0/16 % de sacarosa, mientras que la membrana plasmática se colecta en la interfase 32/38 % (Vera-Estrella *et al.*, 1999). Las bandas del gradiente discontinuo se colectan en fracciones de 1 mL y se congelan en N<sub>2</sub> líquido para después almacenarlas a -80°C. Posteriormente se determina la concentración de proteína para realizar la electroforesis y la inmunodetección de McPIP1;4

### 7.3 Preparación del DNA y la transcripción del RNA complementario

Los estudios de la permeabilidad al agua y solutos de las diferentes MIPs se realizaron empleando el sistema de expresión heteróloga en ovocitos de *X. laevis*. Actualmente se cuenta con las clonas de *McPip1;4*, *McPip2;1* y *McTip1;2* en el vector de expresión para ovocitos pGEM-HE (Vera-Estrella *et al.*, 2004). Este vector contiene las regiones T7 de la RNA polymerase (pGEM-HE) o la T3 de la RNA polimerase (XβG-ev2), y los 5'- y 3'-UTR (regiones no traducidas) del gene. β-globulina de *X. laevis* para mejorar la expresión. El DNA del plásmido se purifica por precipitación con polietilenglicol, y se lineariza digiriendo con *PstI* (pGEM-HE) o *XbaI* (XβG-ev2), que cortan abajo del inserto. El DNA linearizado se extrae con fenol-cloroformo, se precipita con etanol y se resuspende en agua libre de RNAasas. El RNA complementario (cRNA) se sintetiza *in vitro* utilizando el sistema ImCAP<sup>(TM)</sup> mRNA Capping (Stratagene, CA) y se cuantifica por espectroscopia a 260nm.

### 7.4 Expresión en ovocitos

Los ovocitos de rana inyectados con 25 ng (1ng/nl) de cRNA se utilizan 36 horas después de la inyección. La permeabilidad osmótica de los ovocitos se mide por medio de ensayos de hinchamiento al exponerlos a cambios de una solución iso-osmótica de Barth's (10 mM HEPES-NaOH, pH 7.4, 88 mM NaCl, 1 mM KCl, 2.4 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0.33 mM Ca[NO<sub>3</sub>]<sub>2</sub>, 0.41 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.82 mM MgSO<sub>4</sub>, 200 mOsmoles/kg) a una hipo-osmótica Barth's (40 mOsmoles/kg). El hinchamiento de los ovocitos se mide con una cámara de vídeo de color Hitachi KP-D50 (Hitachi Denshi, Ltd., EUA) montada en un microscopio Nikon Eclipse TE 300. Las imágenes se capturan y digitalizan utilizando el programa Image-Pro Plus (Versión 4.0, Media Cybernetics Silver Spring, MD, EUA). El coeficiente de permeabilidad osmótica (Pf, cm/s) se calcula con la relación:

$$P_f = \frac{V_0(d[V/V_0]/dt)}{SV_w(osm_i - osm_o)}$$

donde,  $V_0$  es el volumen inicial del ovocito a tiempo cero calculado para cada ovocito,  $V/V_0$  es la relación de volumen,  $V_w$  es el volumen molar parcial del agua ( $18 \text{ cm}^3/\text{mol}$ ),  $S$  es la superficie del área calculada para cada ovocito,  $osm_i$  es la osmolaridad adentro del ovocito y  $osm_o$  es la osmolaridad externa del medio.

### 7.5 Transporte de [ $^{14}\text{C}$ ]- glicerol en ovocitos

Para medir el transporte de [ $^{14}\text{C}$ ]- glicerol en los ovocitos inyectados con el cRNA de *McPIP1;4* y control negativo (ovocitos inyectados con 25 nl de agua), un lote de 5 ovocitos de cada condición se incuban por 10 minutos en 1 mL de una solución conteniendo 10 mM HEPES-NaOH, pH 7.4, 200 mM glicerol, 30 $\mu\text{Ci}$  [ $^{14}\text{C}$ ]- glicerol, 2 mM KCl, 0.6 mM  $\text{CaCl}_2$ ; pasado el tiempo de incubación los ovocitos se lavan con una solución 200 mM de glicerol no radiactivo con la ayuda de un equipo de filtración (Millipore, EUA). Los ovocitos se pusieron en líquido de centelleo toda la noche con 2% de dodecil sulfato de sodio (SDS) para romper las membranas y se contó la radiactividad en un contador de centelleo (Beckman LS 6000IC)

### 7.6 Ensayos de fosforilación en ovocitos

Para realizar los ensayos de fosforilación se incubaron los ovocitos inyectados con el cRNA de *McPIP1;4* y los ovocitos control, con alguno de los siguientes compuestos: ácido okadaíco (5  $\mu\text{M}$ ), 8-bromo 3',5'-monofosfato de adenosina (8-BrcAMP 40  $\mu\text{M}$ ), los cuales son permeables a la membrana de los ovocitos y se agregaron a la solución isotónica de Barth's incubándose por 30 minutos a temperatura ambiente La permeabilidad osmótica de los ovocitos se midió por medio de ensayos de hinchamiento al exponer los ovocitos al cambio osmótico con una solución hipo-osmótica Barth's (40 mOsmoles/kg).

## 7.7 Cuantificación de proteína

Para medir la concentración de proteína en las fracciones y los diferentes organelos citoplasmáticos se utilizó el método modificado de Bradford (1976), el cual consiste en solubilizar las fracciones membranales con 0.5% (v/v) de Triton X100 por 5 minutos antes de agregarle el reactivo (Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent).

## 7.8 SDS-PAGE e inmunodetección de proteínas

Para remover los lípidos de las vesículas aisladas las muestras se trataron con una mezcla 1:1 de etanol-acetona en una relación 1/50. Las muestras se incuban a  $-30^{\circ}\text{C}$  por 2 horas, e inmediatamente se centrifugaron a 12000 xg durante 20 min. El sobrenadante se desechó, la pastilla se somete a un flujo lento de aire para evaporar la mezcla de solventes. Las proteínas contenidas en la pastilla se resuspenden en 2.5% de buffer de muestra Laemmli (1970). La electroforesis en geles al 12% de acrilamida se llevó a cabo a 200 V por 45 min. Después de esto los geles se transfieren a las membranas de nitrocelulosa a un voltaje constante de 100 V por 1:15 h. Después de la transferencia las membranas se bloquean con 5% de leche sin grasa por 1h y se ponen en contacto con el anticuerpo primario toda la noche. Posteriormente se lavan las membranas con buffer TBS (25 mM Tris-HCl, 137 mM NaCl) para eliminar las reacciones inespecíficas del anticuerpo primario y se incuban con el anticuerpo secundario por 2 hr en TBS. Los complejos antígeno-anticuerpo se detectan utilizando un paquete de quimioluminiscencia (Amersham ECL™ Western Blotting Detection Reagents) y una placa de autoradiografía por 4 min. Los anticuerpos utilizados se generaron mediante péptidos sintéticos de una parte de la secuencia de amino ácidos del segundo dominio extracelular de *McPIP1;4* de *M. crystallinum* (Kirch *et al.*, 2000), la concentración a la que se emplea el anticuerpo es de 1:500 v/v en TBS

## 7.9 Extracción de proteína de membrana de ovocito

Diez ovocitos se homogenizan en 200  $\mu$ l de un buffer que contiene 10 mM  $K_2H_2PO_4$  /pH7.6, 5 mM EDTA y 150  $\mu$ g/ml (17.1 $\mu$ M) de PMSF. El homogenizado se centrifuga a 1100 xg por 5min a 4°C para remover las proteínas de la yema. Posteriormente, el sobrenadante se vuelve a centrifugar a 14000 xg por 30min a 4°C. La pastilla obtenida contiene las proteínas de la membrana, la cual se resuspende en 50-100  $\mu$ L del mismo buffer. Después la proteína se cuantifica por el método modificado de Bradford (1976), se precipita y se remueven los lípidos tratando las muestras con una mezcla fría de 1:1 etanol-acetona. Las muestras se mantienen a -30°C por 2 h e inmediatamente se centrifugan a 12000 xg durante 20 min. El sobrenadante se desecha y la pastilla se seca. Las proteínas contenidas en la pastilla se resuspenden en 2.5% de buffer de muestra Laemmli.

## 7.10 Preparación de protoplastos de *M. crystallinum*

Los protoplastos de *M. crystallinum*, se aislaron por métodos enzimáticos, utilizando celulosa y pectoliasa como se ha descrito anteriormente (Miedema *et al.*, 2000). Las células en suspensión se colectaron a través de papel filtro en un embudo Bunsen para eliminar el medio de cultivo. Las células se digirieron con una solución enzimática que contiene 400 mM sorbitol, 0.5 mM  $CaCl_2$ , 25 mM MES, 0.5%(w/v) BSA, 2%(w/v) celulosa, 0.5%(w/v) pectoliasa pH 5.5 (ajustado con KOH). Se coloca el material biológico en el medio de digestión y las células se digirieron por 2 h a 30°C en la oscuridad. Se filtró la solución a través de una malla de 25  $\mu$ m (miracloth) y se centrifugó a 800 rpm por 5 min a 4°C. La solución se descartó para volver a suspender los protoplastos en medio de lavado (400 mM sorbitol, 0.2 mM  $CaCl_2$ , 15 mM TRIS/MES pH 5.5), los protoplastos se centrifugaron por otros 5 min a 800 xg a 4°C. Se removió el sobrenadante y los protoplastos se resuspendieron en 1 ml de suspensión con un volumen igual de 50% percol, arriba de esta suspensión se colocaron 2-3

mL de medio de lavado y se centrifugaron por 10 min a 1200 xg (4°C). Los protoplastos purificados se removieron de la interfase y se resuspendieron en un 50 ml de solución de lavado. Se centrifugaron por otros 5 min a 800 xg (4°C) y se volvieron a resuspender en el medio de ensayo que se requiera para futura experimentación.

### **7.11 Fusiones de GFP con *McPIP1;4***

La regiones codificantes de *McPIP1;4* de *M. crystallinum* se ampliaron apartir de una librería de cDNA de *M. crystallinum* mediante los siguientes oligonucleotidos: para *McPIP1;4* (5'-TTT TGG ATC CAT GGA GGG GAA GGA AGA GG-3' y 5'-TTT TGA GCT CTT CAC TTG GAT TTG AAT GGA ATT G-3') introduciendo los sitios BamHI-SacI inmediatamente después del codón de finalización. Los fragmentos de PCR se cortaron con las enzimas de restricción adecuadas para el inserto y se ligaron en el vector pRZ238 que contiene la GFP. Se transformaron las células competentes BL21 de *Escherichia coli* con la ligación y se seleccionaron los positivos en medio con ampicilina (100 µg/mL).

### **7.12 Microscopia confocal**

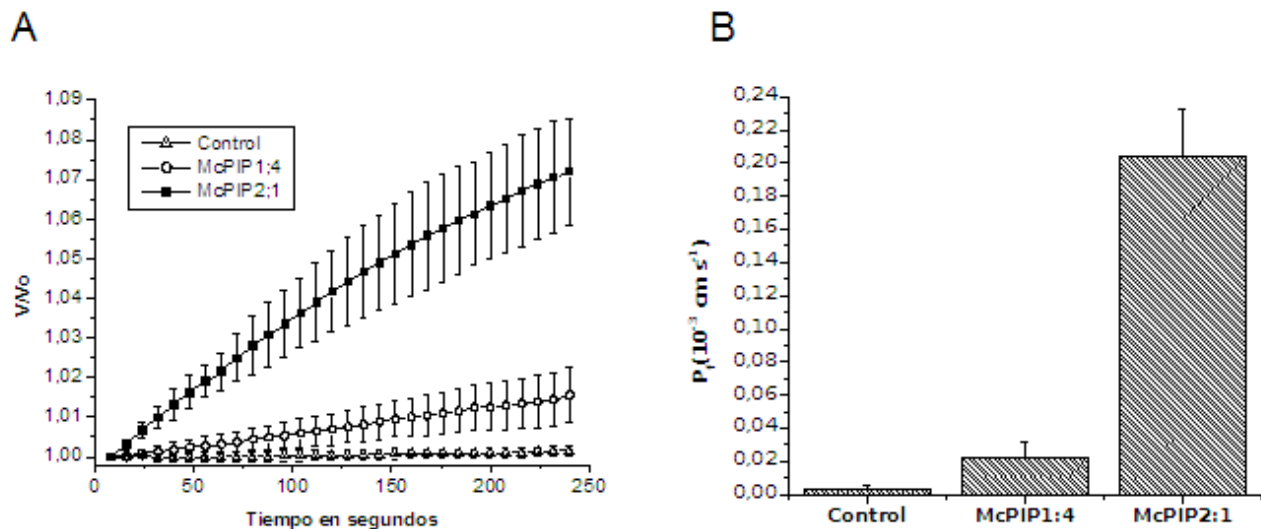
La fluorescencia de protoplastos se analizó mediante el uso de un microscopio confocal y otro de epi-fluorescencia. Un microscopio confocal acoplado con un microscopio invertido se utilizó para analizar las imágenes de los protoplastos con diferentes objetivos. Se utilizaron diferentes filtros (488nm verde y 565nm rojo) para poder llevar a cabo la detección de la construcción de *McTIP1;4*-GFP y los anticuerpos primarios en contra de Pep12, *AtTIP2;1*, *McHKT1* y un anticuerpo secundario fluorescente (Alexa fluor 565; rojo).

## 8. Resultados

### 8.1 Caracterización fisiológica de *McPIP1;4*

#### 8.1.1 Permeabilidad al agua de *McPIP1;4* en ovocitos de *X. laevis*

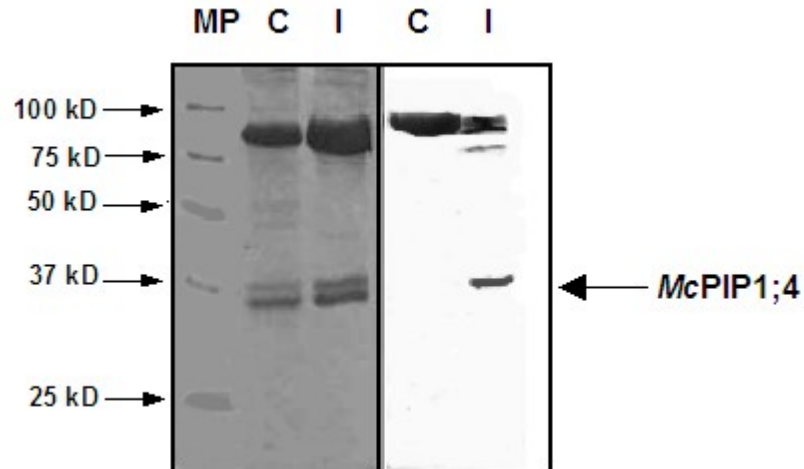
Para caracterizar fisiológicamente la acuaporina *McPIP1;4* de *M. crystallinum*, ésta se expresó en ovocitos de *Xenopus laevis*, un sistema muy conveniente que permite hacer mediciones de transporte de manera sencilla, evitando complicados métodos de purificación. Además, permite estudiar de manera individual a *McPIP1;4*. El transporte de agua a través de la acuaporina *McPIP1;4* se estudió cuantificando la permeabilidad en respuesta a la disminución de la presión osmótica después de intercambiar una solución de 200 mOsmoles/kg por otra de 40 mOsmoles/kg. La respuesta al cambio de presión osmótica del ovocito se detectó utilizando una cámara de video conectada a una computadora y un microscopio invertido, observándose que la velocidad de hinchamiento fue mayor de los ovocitos inyectados con *McPIP1;4*, seguida por los que expresaron *McPIP1;4* y, lenta para los controles negativos inyectados con agua libre de RNAsas (Figura 3A). Con base en las velocidades de hinchamiento y el gradiente osmótico impuesto (de 200 mOsmoles/Kg a 40 mOsmoles/Kg) se calculó el coeficiente de permeabilidades osmóticas ( $P_f$ ) de las membranas de los ovocitos expresando a *McPIP1;4* y *McPIP2;1*, y se compararon con los valores de  $P_f$  calculados para los ovocitos inyectados con agua (Figura 3B). Los ovocitos inyectados con *McPIP1;4* tuvieron un  $P_f$  de  $0.022 \times 10^{-3} \text{ cm s}^{-1}$ , aproximadamente 6 veces mayor que la de los ovocitos inyectados con agua, pero casi 9 veces menor al  $P_f$  calculado para los ovocitos que expresaron a *McPIP2;1*,  $0.2038 \times 10^{-3} \text{ cm s}^{-1}$  (Figura 3B). Estos resultados indican que *McPIP1;4* presenta una aparente menor permeabilidad al agua, baja actividad en las condiciones exploradas y/o bajos niveles de expresión comparada a *McPIP2;1*.



**Figura 3. Cambio en el volumen relativo e incremento en la permeabilidad al agua de *McPIP1;4* y *McPIP2;1* expresadas en ovocitos de *Xenopus laevis*.** (A) Cambio en el volumen relativo ( $V/V_0$ ) de los ovocitos inyectados con agua libre de RNAsas (control), con *McPIP1;4* o *McPIP2;1*. La mediciones se registraron por intervalos 8 segundos por 4 min. (B) valores del coeficiente de permeabilidad ( $P_f$ ) obtenidos de los ovocitos inyectados con agua libre de RNAsas (control) *McPIP1;4* o *McPIP2;1*. Los valores se calcularon como la velocidad inicial del hinchamiento de los ovocitos como se describe en los métodos. Los ovocitos se inyectaron con 50 ng de cRNA, o 50 nl de agua libre de RNAsas (control). Los valores representan la media  $\pm$  DS ( $n=10$ ).

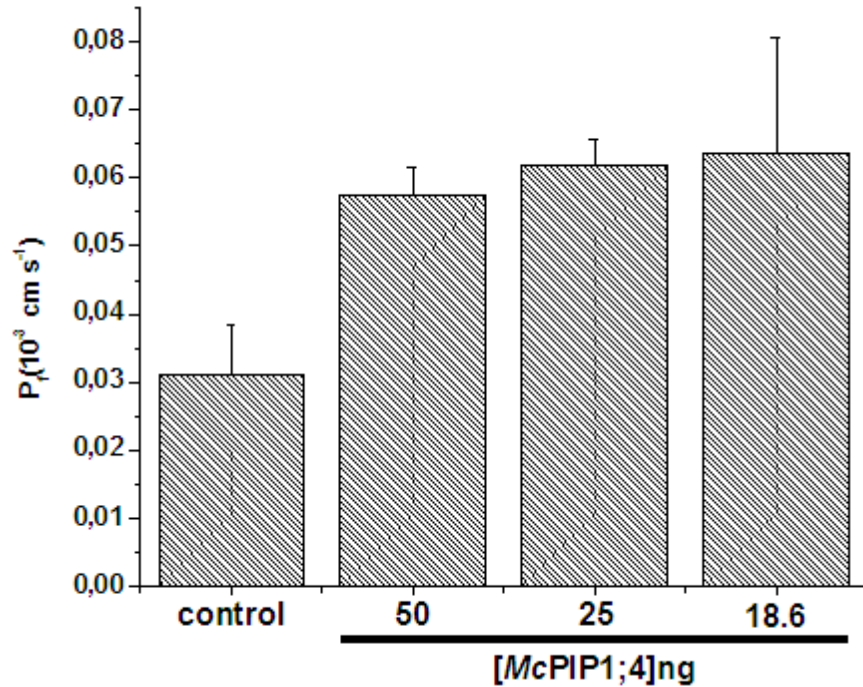
Para confirmar la expresión de *McPIP1;4* en los ovocitos de *Xenopus* se aislaron proteínas de membranas (fracción microsomal) de ovocitos inyectados con 50 ng de *McPIP1;4* cRNA y de los ovocitos inyectados con 50 nl de H<sub>2</sub>O (control). De las proteínas aisladas por electroforesis y por inmunodetección, se detectó la presencia de *McPIP1;4* en la fracción membranal de los ovocitos. El anticuerpo detectó una proteína en las membranas de los ovocitos inyectados con *McPIP1;4* cRNA que no se observó en los ovocitos control (H<sub>2</sub>O), confirmando la presencia de *McPIP1;4* en la membrana de los ovocitos inyectados con el cRNA de *McPIP1;4* (Figura 4). Curiosamente este mismo experimento fallaba en detectar la presencia de *McPIP2;1*, con una mayor permeabilidad por agua (Figura 3) y solo se detectaba cuando se aumentaba la cantidad de proteína cargada en el gel (Amezcuá-Romero y Vera-Estrella datos no publicados).





**Figura 4. Identificación de *McPIP1;4* en ovocitos de *X. laevis*.** Panel izquierdo, proteína de membranas separada por electroforesis de SDS-PAGE y teñida con rojo de Ponceau (ver materiales y métodos); panel derecho, análisis por western-blot usando un anticuerpo policlonal (1:500v/v) dirigidos contra *McPIP1;4*. (C) Ovocitos inyectados con agua o, (I) inyectados con 50 ng de *McPIP1;4* cRNA

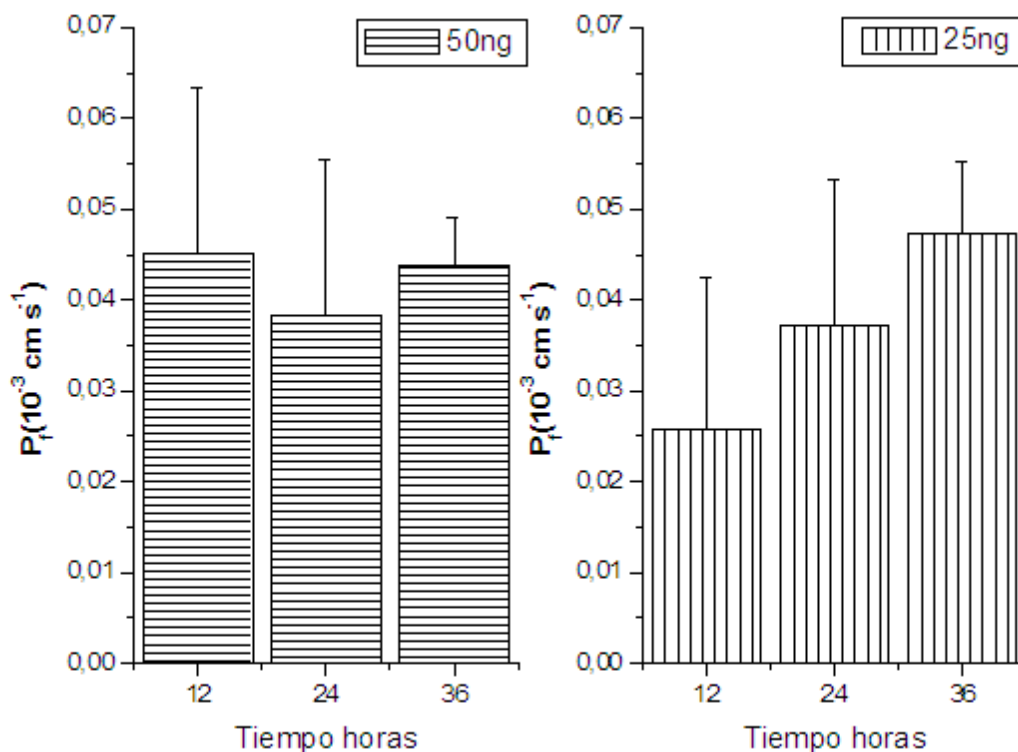
Con el propósito de conocer si el transporte de agua mediado por *McPIP1;4* es dependiente de la concentración de cRNA inyectado y si la baja permeabilidad observada con respecto a *McPIP2;1* (Figura 3), podría ser modificada cambiando las concentraciones de cRNA en los ovocitos, se midió la permeabilidad usando diferentes concentraciones de cRNA inyectada en los ovocitos (Figura 5).



**Figura 5. Permeabilidad al agua de la acuaporina *McPIP1;4* expresada en ovocitos de *X. laevis* inyectados con diferentes concentración cRNA.** Las diferentes cantidades inyectadas de cRNA se indican en cada una de las barras. Los valores representan la media  $\pm$  DS (n=10).

Estos datos indican que *McPIP1;4* no cambia su permeabilidad y que ésta es independiente de las concentraciones exploradas de cRNA inyectado (Figura 5).

Ya que no se observó un aumento en la permeabilidad variando la concentración de cRNA inyectado, se investigó si el tiempo afectaba la permeabilidad en ovocitos expresando *McPIP1;4*. Para ello se inyectaron ovocitos de *X. laevis* usando dos diferentes concentraciones y la permeabilidad se cuantificó a las 12, 24 y 36 horas después (Figura 6).



**Figura 6. Cambio en la permeabilidad al agua de la acuaporina *McPIP1;4* expresada en ovocitos de *X. laevis* por efecto del tiempo.** Los ovocitos se inyectaron con 50 y 25 ng de cRNA y las mediciones de inchamiento de los ovocitos se realizaron después de 12, 24 y 36 horas. Los valores representan la media  $\pm$  DS (n=10).

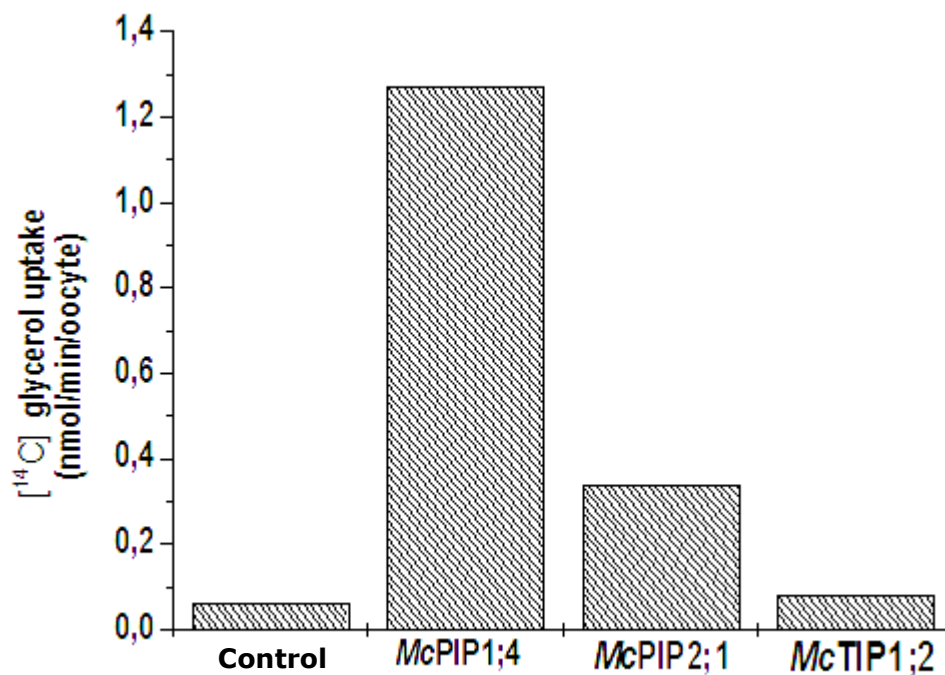
Nuestro análisis muestra que el tiempo no representa una variable determinante en la permeabilidad de *McPIP1;4* en los ovocitos (Figura 6). La baja permeabilidad al agua de *McPIP1;4* sugeriría la posibilidad de que *McPIP1;4* fuera capaz de transportar otros compuestos como glicerol o urea.

### 8.1.2 Permeabilidad de la acuaporina *McPIP1;4* a diferentes solutos

Se sabe que algunas acuaporinas pueden transportar un gran variedad de compuestos diferentes como: glicerol (Biela *et al.*, 1999; Moshelion *et al.*, 2002), urea (Gaspar *et al.*, 2003),  $\text{CO}_2$  (Uehlein *et al.*, 2003), ácido silícico (Feng Ma *et al.*, 2006), ácido bórico (Takano *et al.*, 2006) y  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Bienert *et al.*, 2007). Con el propósito de conocer si las

AQPs *McPIP1;4*, *McPIP2;1* y *McTIP1;2* eran capaces de transportar glicerol o urea, se realizó un ensayo de transporte de [<sup>14</sup>C]-glicerol y [<sup>14</sup>C]-Urea en los ovocitos de *Xenopus*. Un lote de cinco ovocitos se incubó por separado con uno de los compuestos marcados, después se pusieron en líquido de centelleo toda la noche con 2% de dodecil sulfato de sodio y se determinó la incorporación de la radiactividad en un contador de centelleo.

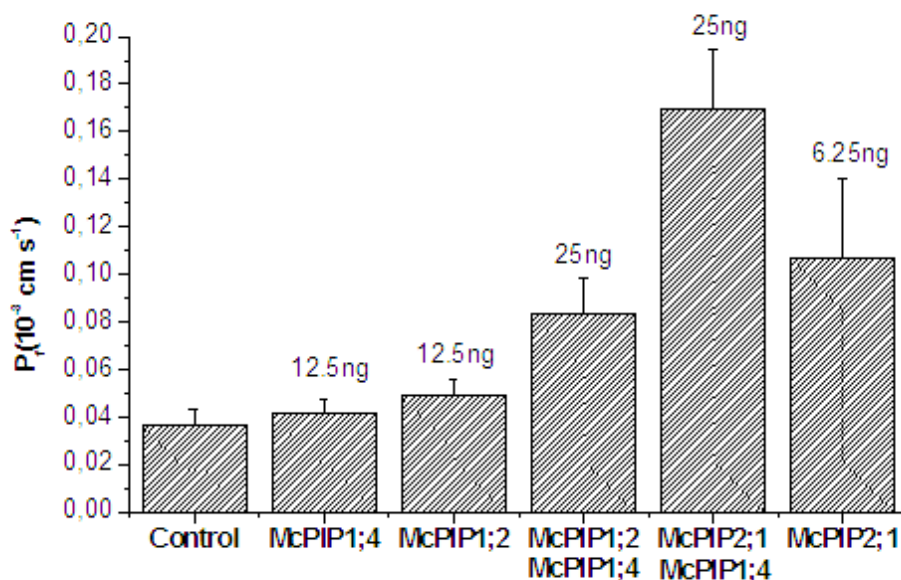
Los resultados mostraron que la acuaporina *McPIP1;4* permitió el paso de [<sup>14</sup>C]-glicerol a una velocidad tres veces mayor que *McPIP2;1*. La AQP *McTIP1;2* transporta [<sup>14</sup>C]-glicerol muy ineficientemente. *McPIP1;4* permitió el paso de [<sup>14</sup>C]-glicerol (Figura 7). Este mismo experimento pero utilizando [<sup>14</sup>C]-urea no mostró diferencias en la incorporación de la marca en los ovocitos expresando *McPIP1;4* y los control (inyectados con solo H<sub>2</sub>O) indicando que *McPIP1;4* no transporta este soluto.



**Figura 7. Permeabilidad al [<sup>14</sup>C]-glicerol de *McPIP1;4*, *McTIP1;2* y *McPIP2;1* expresadas en ovocitos de *X. laevis*.** Los valores de la incorporación de glicerol se calcularon en base a la cantidad de glicerol radiactivo que se incorporó en el ovocito. Los ovocitos se inyectaron con 50 ng de cRNA, o agua libre de RNAasas (control).

### 8.1.3 Co-inyección de *McPIP1;4* con otras acuaporinas de *M. crystallinum*

Para determinar si *McPIP1;4* interactúa con otras acuaporinas (AQP) se midió la permeabilidad en ovocitos co-inyectados con cRNAs que codifican para otras AQP de *M. crystallinum* (Figura 8). De acuerdo con los resultados anteriores *McPIP1;4* al igual que *McPIP1;2* tienen una baja permeabilidad por agua comparadas con *McPIP2;1* que es una acuaporina con una alta permeabilidad por H<sub>2</sub>O. Sin embargo, la co-inyección de *McPIP1;4* con *McPIP1;2* o con *McPIP2;1* tuvo como resultado un aumento en la permeabilidad, permitiendo un mejor transporte de agua en los ovocitos de *X. laevis*.



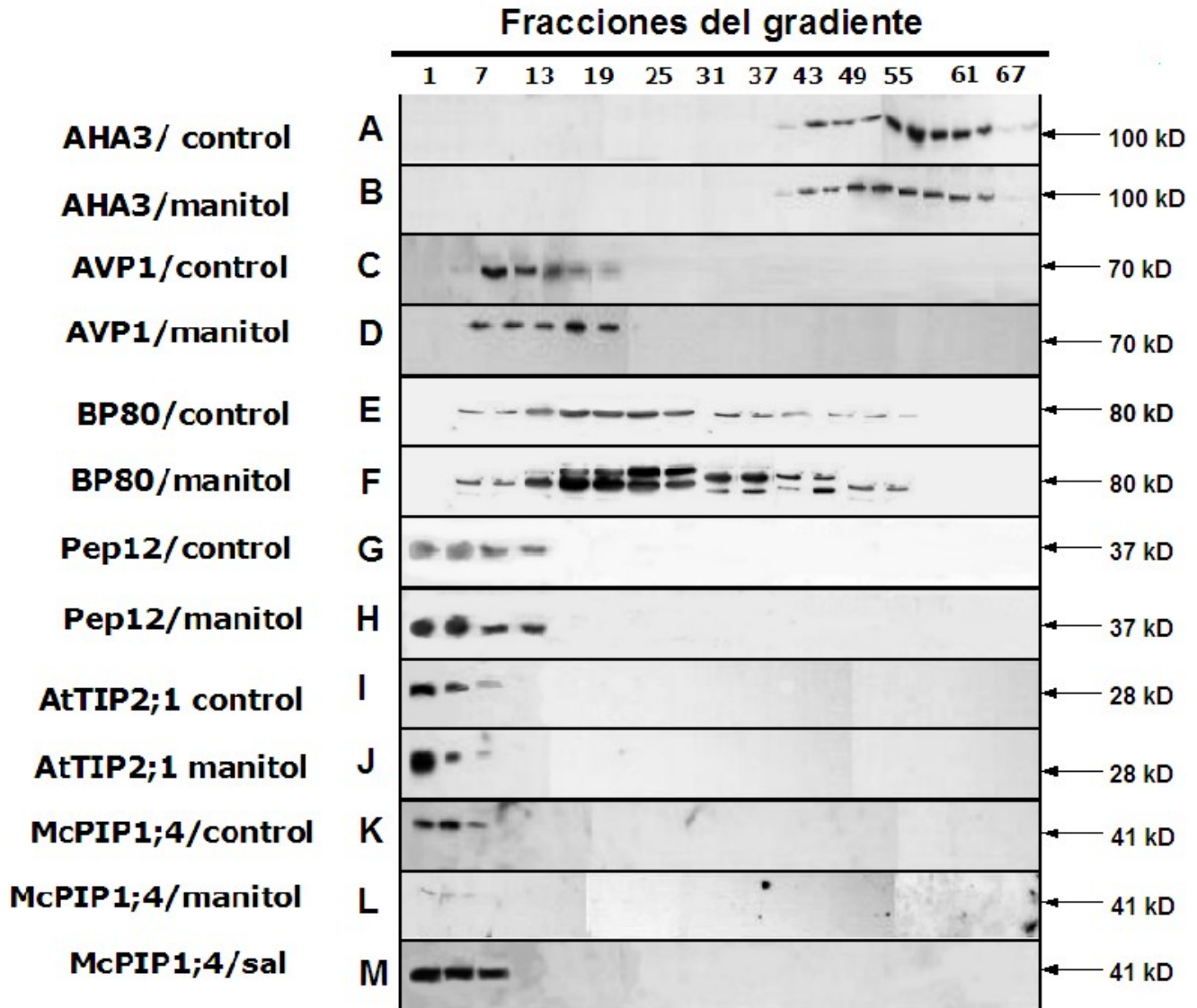
**Figura 8. Efecto de la co-inyección de distintas AQP de *M. crystallinum* en el transporte de agua en ovocitos de *X. laevis*.** Se midió la permeabilidad en ovocitos inyectados con agua (control) o con mRNA de *McPIP1;4* y/o *McPIP1;2*, *McPIP2;1*. Las diferentes cantidades inyectadas de mRNA se indican en cada una de las barras. Para las co-inyectadas *McPIP1;2-McPIP1;4* se utilizaron 12.5ng de mRNA de cada una para un total de 25ng y para *McPIP2;1-McPIP1;4* se emplearon 6.25ng de *McPIP2;1* y 18.75ng de *McPIP1;4* para tener una relación 1:3 del cRNA inyectado. Los valores representan la media  $\pm$  DS (n=10).

### 8.2 Localización subcelular de la acuaporina *McPIP1;4*

La localización subcelular de *McPIP1;4* se determinó utilizando: gradientes continuos

de sacarosa para separar la fracción microsomal en vesículas de membrana, anticuerpos contra proteínas residentes de las diferentes membranas celulares y, microscópica confocal. Los resultados obtenidos sugieren que *McPIP1;4* está localizada en compartimentos prevacuolares, ya que co-sedimentan en las mismas fracciones que los marcadores *Pep12* y *AfTIP2;1*. Los cuales han sido reportados como residentes de estos compartimentos (Figura 9).

Para localizar *McPIP1;4* en los gradientes continuos se usaron anticuerpos específicos contra proteínas marcadoras y su identificación se realizó mediante un ensayo tipo "Western blot". Los resultados muestran que la membrana plasmática se encuentra en fracciones de alta densidad 43-61, que dan una fuerte señal con el anticuerpo contra la P-ATPasa (AHA3). En fracciones de densidad intermedia se detectó una señal para BP80, un receptor que se mueve entre los compartimentos prevacuolares, el aparato de Golgi y el ER. La señal más fuerte se encontró en las fracciones 13-25 disminuyendo hacia las zonas de más alta y baja densidad. La pirofosfatasa vacuolar (AVP1) se localizó en las fracciones 7-19, fracciones que también contienen a BP80. El t-SNARE (*Pep12*) de los compartimentos prevacuolares y *McPIP1;4* se localizaron en las fracciones de baja densidad 1-7. Estos resultados sugieren que *McPIP1;4* es una AQP que se localiza en compartimientos prevacuolares.



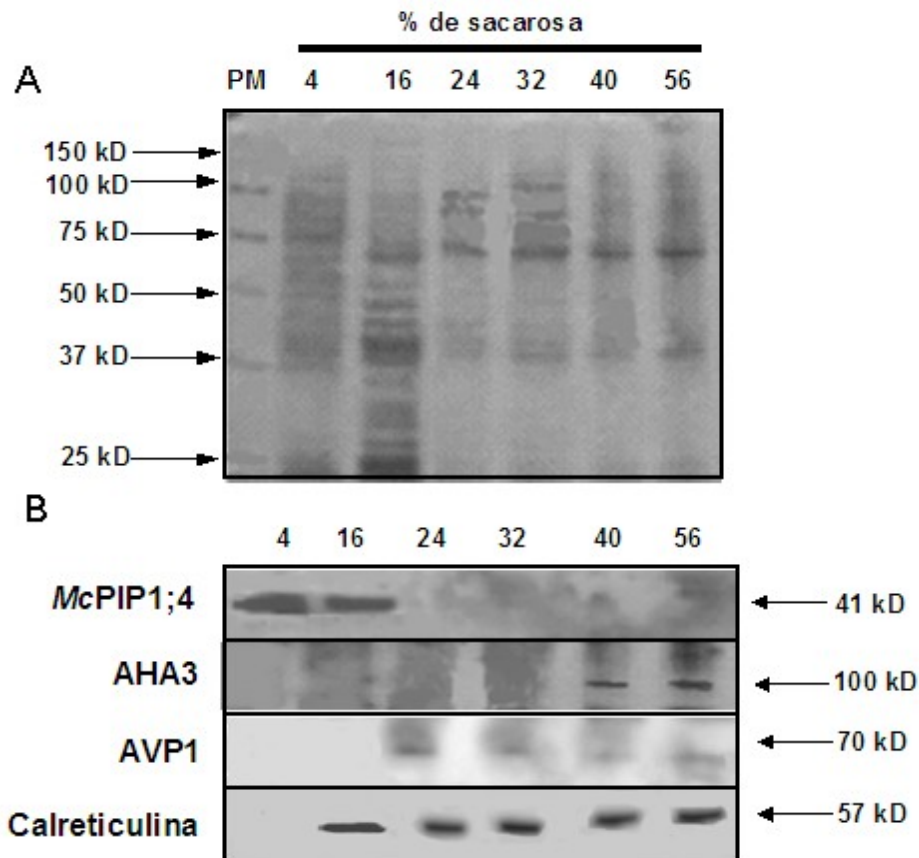
**Figura 9. Expresión de *McPIP1;4* y localización de marcadores enzimáticos bajo estrés osmótico y/o salino.** Análisis tipo “Western blot” de fracciones microsomales de células en suspensión de *M. crystallinum*. Detección inmunológica de (arriba hacia abajo), P-ATPasa (AHA3), V-PPase (AVP1), BP80, Pep12, y *McPIP1;4*, en células control ó tratadas con manitol ó sal.

Uno de nuestros objetivos fue confirmar la localización de *McPIP1;4* como una proteína residente de los compartimentos pre-vacuolares (CPV), ya que por experimentos preliminares en el laboratorio se tenían indicios de que *McPIP1;4* no era una proteína de membrana plasmática. Para corroborar lo anterior, se realizaron gradientes discontinuos de sacarosa utilizando fracciones microsomales de células en suspensión de *M. crystallinum* y

se obtuvo una fracción enriquecida en CPV que fue confirmada por inmunodetección con anticuerpos contra *McPIP1;4*.

Como se muestra en la Figura 10, *McPIP1;4* sólo está presente en las fracciones 1 y 2 correspondientes a las concentraciones 4% y 16% de sacarosa. Sin embargo, la banda de proteína de 4% de sacarosa es mucho más intensa en comparación con la de 16%, indicando que *McPIP1;4* es más abundante en la fracción de 4%. Estos resultados junto con los experimentos previos de localización utilizando gradientes continuos de sacarosa, muestran que *McPIP1;4* es de compartimento prevacuolares y que utilizando gradientes discontinuos de sacarosa es posible obtener una fracción enriquecida en estos compartimentos (Fracción 1, 4% de sacarosa). Utilizando un anticuerpo contra la ATPasa de membrana plasmática, se realizó la inmunodetección para identificar las fracciones ricas en membrana plasmática. Se detectó una banda en las fracciones correspondientes al 40 y 56% (Figura 10, carril 6 y 7). Una banda correspondiente a la pirofosfatasa vacuolar (AVP1) se detectó en la fracción 4 (24% de sacarosa) y en menor grado en las fracciones mas pesadas del gradiente (Figura 10 carriles 4 al 7). La proteína calreticulina se utilizó como marcador de retículo endoplasmático y su presencia se observó en las fracciones 3 a 7 que corresponden al 24% 32% 40% y 56% de sacarosa, respectivamente.

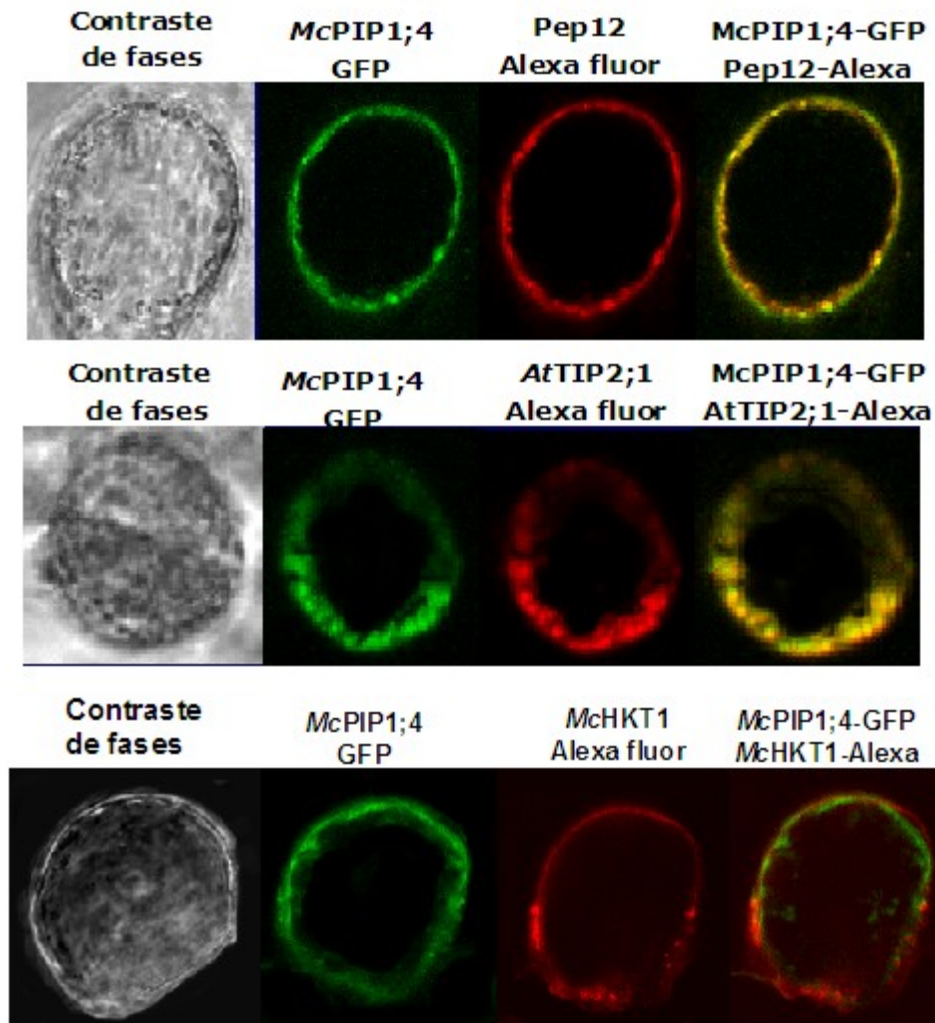




**Figura 10. *McPIP1;4* se localiza en compartimentos prevacuolares de células en suspensión de *M. crystallinum*.** (A) Patrón de proteína en las diferentes fracciones obtenidas del gradiente discontinuo de sacarosa teñidas con rojo de Ponceus, marcadores de peso molecular (PM). (B) Inmunodetección de *McPIP1;4*, marcadores de la membrana plasmática (AHA3, P-ATPasa); del tonoplasto (PPase; AVP1) y de retículo endoplasmático (calreticulina).

Otra manera de determinar la localización de *McPIP1;4* como una proteína de CPV fue realizando microscopia confocal. Para ello, se utilizaron protoplastos a partir de células en suspensión de *M. crystallinum* que expresan *McPIP1;4* fusionada a la proteína verde fluorescente (GFP) (Fig. 11 fluorescencia verde). Además, se inmunodetectó en estas a Pep12, una proteína residente de CPV (Fig. 11 marcaje rojo). Los resultados indican que *McPIP1;4* co-localiza con Pep12, lo que sugiere que *McPIP1;4* se localiza en organelos cercanos a la periferia de la célula (Fig. 11, doble marcaje amarillo). Para corroborar estas observaciones, se realizó un experimento similar en el cual se utilizó un marcador (alexa fluor) que reconoce a AtTIP2;1, esta acuaporina se ha reportado que esta localizada en

compartimentos prevacuolares. Así como lo observado con Pep12 la localización de AtTIP2;1 es similar a la distribución de McPIP1;4. Además, para comprobar que esta membrana no corresponde a la membrana plasmática, se realizaron co-localizaciones de McPIP1;4:GFP con el transportador de cationes McHKT1 de *M. crystallinum*, que se localiza en la membrana plasmática (Su et al., 2003). Como se observa en la Figura 11 (panel inferior) estas dos proteínas no co-localizan ya que se distingue claramente la fluorescencia roja (McHKT1) y la verde (McPIP1;4). Estos experimentos y los obtenidos utilizando los gradientes de sacarosa apuntan a que McPIP1;4 se localiza en los compartimentos prevacuolares (Figuras 9,10 y 11). Las pequeñas zonas marcadas con McPIP1;4:GFP que no co-localizan con Pep12 o con AtTIP2;1 podrían ser el resultado del transporte de McPIP1;4 dependiente de GFP (Jin et al., 2001).



**Figura 11. Inmunofluorescencia de protoplastos aislados de células en suspensión de *M. crystallinum*.** Las células en suspensión se crecieron por 5 días en medio fresco y posteriormente se aislaron los protoplastos por métodos enzimáticos, y se transformaron con la construcción de *McTIP1;4*-GFP (488; verde). El doble-marcaje de los protoplastos se realizó incubándolos con Triton X-100 y los anticuerpos primarios en contra de Pep12, *AtTIP2;1*, *McHKT1* y un anticuerpo secundario fluorescente (Alexa fluor 565; rojo). En las imágenes sobrepuestas (*McPIP1;4*-GFP; Pep12-Alexa, *AtTIP2;1*-Alexa, o *McHKT1*-alexa) la co-localización de ambas proteínas se visualiza de color amarillo. Las fotografías son representativas de al menos cuatro experimentos independientes con 5 repeticiones por experimento.

### 8.3 Cambios en la expresión de *McPIP1;4* por estrés osmótico o salino

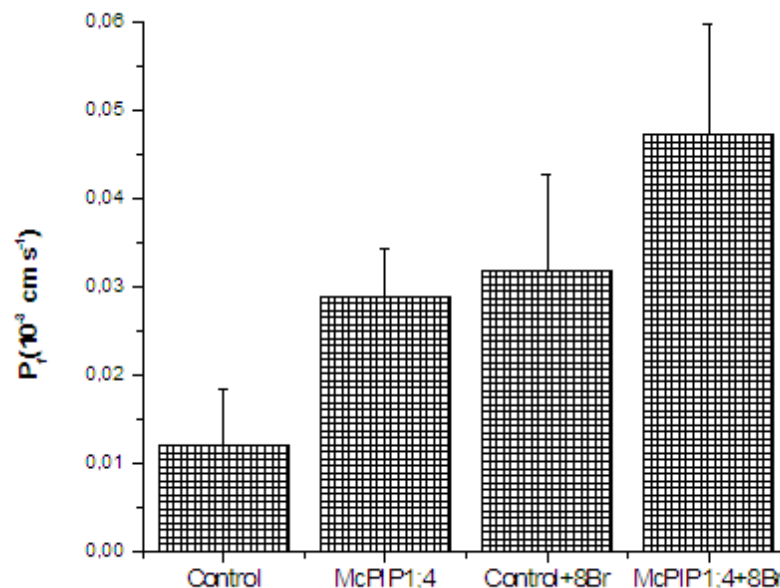
Para conocer como el estrés osmótico o salino afectan la acumulación de *McPIP1;4* se realizaron gradientes continuos de sacarosa con células en suspensión de *M. crystallinum* tratadas con 200 mM de NaCl ó 200 mM de manitol o células sin tratamiento (control) y con anticuerpos específicos contra *McPIP1;4* se realizó una inmunodetección. Se observa en la Figura 9 (paneles K-M) que las células tratadas con manitol presentan claramente una disminución en los niveles de proteína comparados con el control, mientras que para las células tratadas con NaCl se aprecia un aumento en la expresión de *McPIP1;4* con respecto al control, indicando que las células pueden diferenciar entre el estrés osmótico y el estrés salino y responder de manera particular a cada uno de ellos.

### 8.4 Fosforilación

La fosforilación y la defosforilación de las proteínas es considerado un mecanismo de regulación importante por el cual la actividad de las enzimas y receptores moleculares se altera dentro de la célula en respuesta a una variedad de estímulos externos (Komina *et al.*, 2002). El cierre de la AQP *SoPIP2;1* de membrana plasmática de espinaca se efectúa por la defosforilación de dos residuos de serina: la S115, localizada en lazo B, y la S274 de la región C-terminal (Johansson *et al.*, 1998; Törnroth-Horsefield *et al.*, 2006). Para otras acuaporinas como *PvTIP3;1*, la actividad se incrementa en presencia de un agonista del cAMP que estimula la PKA (Maurel *et al.*, 1995). De manera similar, la AQP *Nod26* aumenta su actividad en presencia de ácido okadaíco, un inhibidor de fosfatasa (Guenther *et al.*, 2003) Estos experimentos demuestran que la fosforilación de las AQPs de plantas puede modular la actividad del canal de agua. Así, es de gran interés probar si la adición de compuestos que promuevan la fosforilación o que inactivan a las fosfatasa, son capaces de modificar la permeabilidad de *McPIP1;4*.

El significado funcional de la fosforilación de *McPIP1;4* en los ovocitos de *X. laevis* se investigó usando los siguientes compuestos: ácido okadaíco, un inhibidor de fosfatasa capaz de traspasar la membrana del ovocito y, un análogo del cAMP, el 8-bromo 3',5'-monofosfato de adenosina (8-Br-cAMP), un compuesto permeable a la membrana que activa a la PKA.

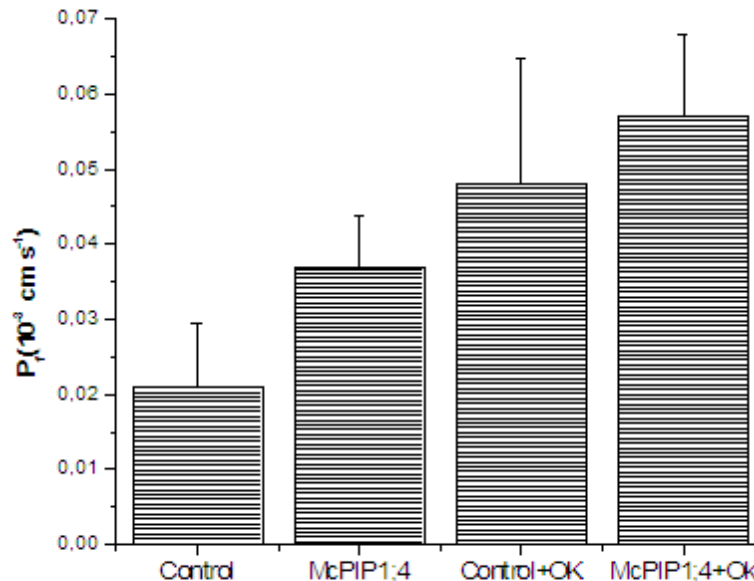
El tratamiento con 8-Br-cAMP provocó un aumento en la permeabilidad de los ovocitos con H<sub>2</sub>O (control), así como en los que expresaban *McPIP1;4*; sin embargo, este aumento en la permeabilidad no refleja un cambio significativo entre los ovocitos control y los inyectados con *McPIP1;4* (Figura 12), indicando que el aumento en la permeabilidad por el activador de PKA es una respuesta general de los ovocitos independiente de la expresión de *McPIP1;4*.



**Figura 12 Efecto del 8-Br-cAMP en la permeabilidad de los ovocitos expresando a *McPIP1;4*.** Los ovocitos inyectados con *McPIP1;4* y con H<sub>2</sub>O se incubaron con 8Br-cAMP a una concentración 40  $\mu\text{M}$  por un periodo de 30 minutos a temperatura ambiente. Los valores representan la media  $\pm$  DE (n=10).

De manera similar a la aplicación de 8-Br-cAMP, los datos usando ácido okadaíco

tampoco repercutió en cambios en la permeabilidad entre los ovocitos control y los que expresaban *McPIP1;4* (Figura 13), sugiriendo que *McPIP1;4* es una acuaporina que no se fosforila en este sistema de expresión heterólogo.



**Figura 13 Permeabilidad al agua de *McPIP1;4* después de incubar con ácido okadaíco.** Los ovocitos expresando *McPIP1;4* se incubaron por 30 minutos a temperatura ambiente con ácido okadaíco a una concentración 5 $\mu$ M. Los valores representan la media  $\pm$  DE (n=10).

### 8.5 Identificación *in silico* de posibles modificaciones post-traduccionales para *McPIP1;4*

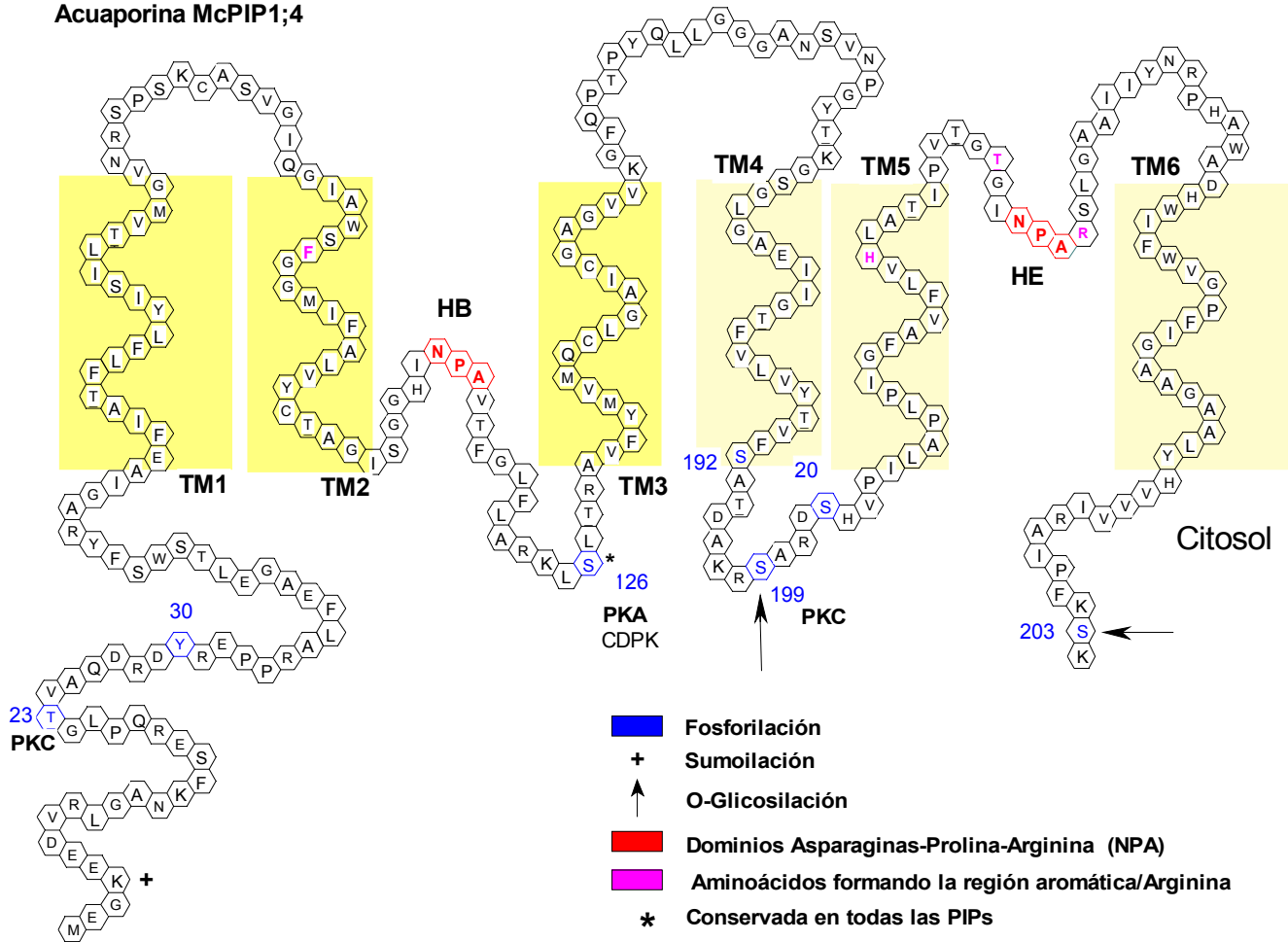
La fosforilación es una modificación post-traducciona que se reconoce por estar presente en las AQP (Maurel *et al.*, 1995; Guenther *et al.*, 2000; Törnroth *et al.*, 2006); sin embargo, es poca la información que se tiene de otras modificaciones post-traduccionales y de como éstas participan en la regulación y localización de las PIP1. Con el uso de herramientas bioinformáticas se encontraron algunos aminoácidos de la acuaporina *McPIP1;4* que pueden ser el blanco de algún tipo de modificación post-traducciona, los datos se resumen en la Tabla 1.

**Tabla 1 Posibles modificaciones post-traduccionales en McPIP1;4**

Programa	Modificación post-traducciona	Aminoácidos	Referencia
NetPhos 2.0	Fosforilación	S126, S192, S199, S203	Blom <i>et al.</i> , (1999).
NetPhosK 1.0	Cinasa que actúa fosforilando	T23-PCK, S126-PKA	Blom <i>et al.</i> , (2004).
Disphos 1.3	Fosforilación	T23, Y30, S203,	Diella <i>et al.</i> , (2004)
YinOYang 1.2 Prediction	O- $\beta$ -GlcNac glicosilación	S199, S282	Gupta y Brunaic (2002)
SUMOSP 0.1	Sumoilación	K4	Xue <i>et al.</i> , (2006).

La Figura 14 muestra el modelo topológico de *McPIP1;4* diseñado a partir de los perfiles de hidropatía generados *in silico* de la secuencia de aminoácidos, además, se observan los sitios putativos de modificación post-traducciona y su orientación.

**Acuaporina McPIP1;4**



**Figura 14. Modelo topológico para la acuaporina McPIP1;4.** La figura muestra las 6 hélices transmembranales (TM1-TM6) dentro de la membrana (rectángulos amarillos) y las dos medias hélices con los dominios NPA (HB y HE) que forman el poro. La región N-terminal y C-terminal se orientan hacia el citosol. PKA (proteína cinasa A) PKC (proteína cinasa C) CDPK (cinasa dependiente de calcio).



## 9. Discusión

### 9.1 Propiedades de transporte al agua de *McPIP1;4*

El H<sub>2</sub>O es la molécula más importante para los seres vivos y su eficiente regulación es esencial para el mantenimiento de los procesos biológicos. Las acuaporinas son una familia de canales integrales de membrana que facilitan el transporte de agua y de pequeñas moléculas como glicerol, urea o compuestos volátiles como CO<sub>2</sub> o NH<sub>3</sub> (Nakhoul et al. 1998, 2001, Biela *et al.*, 1999; Uehlein *et al.*, 2003). Debido a que se les ha involucrado en enfermedades en humanos y su relación con un gran número de procesos fisiológicos en las plantas, han recibido gran atención y su estudio se ha incrementado significativamente entre la comunidad científica. Las AQPs en las plantas están agrupadas en una familia de hasta 38 genes, la cual se ha dividido en 4 grupos fundamentales; las TIPS (proteínas intrínsecas del tonoplasto), las SIPs (pequeñas proteínas intrínsecas), las NIPs (proteínas parecidas a la nodulina 26) y las PIPs (proteínas intrínsecas de la membrana plasmática). A las PIPs a su vez se les ha agrupado en dos subfamilias, las PIP1 y PIP2, que entre otras características difieren en su capacidad de transporte; las PIP1 presentan una baja permeabilidad al agua y pueden transportar glicerol y las PIP2 son altamente permeables al agua y se desconoce su capacidad de transportar glicerol.

Este trabajo se enfocó en la caracterización fisiológica y la localización subcelular de *McPIP1;4* de *Mesembryanthemum crystallinum*. La proteína *McPIP1;4* se regula diferencialmente por la salinidad y la sequía, expresándose en la epidermis de la raíz así como de la parte aérea de la planta. Ésto sugiere que su función en las células vegetales debe ser muy importante para regular los procesos de adaptación de *M. crystallinum* a la sequía y la salinidad (Vera-Estrella *et al.*, 2000, 2004).

Con el propósito de conocer las propiedades de permeabilidad de *McPIP1;4*, un miembro de la subfamilia de las PIP1, se realizó la caracterización de sus propiedades de transporte al agua y otros solutos usando un sistema de expresión heteróloga en ovocitos de *X. laevis*. Los resultados mostraron a *McPIP1;4* como una AQP de baja permeabilidad por agua (Figura 3). Estos resultados y los datos preliminares del laboratorio, en donde se observó una baja permeabilidad, pero que de manera adicional se veía un retraso en el inicio del transporte de agua por *McPIP1;4*, sugerían que *McPIP1;4* podría estar siendo regulada por alguna modificación post-traducciona l o que existía un bajo nivel de la proteína en la membrana plasmática de los ovocitos. Para confirmar la segunda hipótesis, se extrajo proteína de los ovocitos inyectados con cRNA de *McPIP1;4* y se realizó la inmunodetección con anticuerpos específicos (Figura 4). Este resultado confirmó la expresión de *McPIP1;4* en ovocitos de *X. laevis*, los cuales a pesar de expresar esta proteína, mostraron una baja permeabilidad al agua (Figura 3). Además, al inyectar los ovocitos con diferentes cantidades de cRNA de *McPIP1;4*, y midiendo la actividad de esta proteína a diferentes tiempos de expresión, los ovocitos no mostraron cambios en los valores de permeabilidad (Figura 5 y 6). Por lo anterior, se concluye que la baja permeabilidad al agua registrada en los ovocitos que expresan *McPIP1;4* no se debe a una baja cantidad de la proteína expresada, sino a una baja capacidad para transportar agua. De tal manera se decidió estudiar su capacidad de transportar solutos pequeños, como glicerol o urea. Para ello, se realizaron experimentos de toma de glicerol y urea radioactivos en los ovocitos inyectados con *McPIP1;4*. Como se observa en la Figura 7, los ovocitos inyectados con *McPIP1;4* transportaron glicerol al interior de los ovocitos, a diferencia de *McTIP1;2* que no lo hicieron y de *McPIP2;1* que tiene una permeabilidad muy baja para el glicerol (Figura 7). El mecanismo por el cual estas proteínas transportan agua y glicerol se puede explicar de la siguiente manera: existen dos regiones altamente conservadas dentro del canal de las AQPs que sirven como filtros que excluyen el

paso de solutos de mayor tamaño que el agua y de moléculas cargadas, incluyendo protones; una región de constricción formada por los dominios NPA (Asparagina Prolina Alanina) localizados en el centro del canal formando el poro y una segunda barrera conocida como la región aromática/arginina (ar/R) (Fu *et al.*, 2000; Sui *et al.*, 2001; Thomas *et al.*, 2002; Wallace y Roberts, 2004). Las PIP1 y las PIP2 no solo tienen regiones ar/R idénticas, sino también conservan identidad con respecto a otros residuos que limitan el poro. Estas observaciones sugieren que las dos clases de PIPs deberían tener velocidades similares de transporte y de selectividad por agua y otros compuestos; sin embargo, existe una disparidad en la velocidad y selectividad de transporte asociado con las dos subfamilias. Por ejemplo, la AQP de tabaco *NtAQP1* (de la subfamilia PIP1) transporta glicerol cuando se expresa en ovocitos de *X. laevis* (Biela *et al.*, 1999); mientras que la AQP de maíz *ZmPIP1;2* no transporta glicerol, colina, etanol, aminoácidos ni urea (Chaumont *et al.*, 2000a). Sin embargo, *ZmPIP1;5* sí transporta urea (Gaspar *et al.*, 2003). Además de la permeabilidad a glicerol, *NtAQP1* transporta CO<sub>2</sub> (Uehlein *et al.*, 2003), por lo que es posible que *McPIP1;4* pueda transportar éste y otros compuestos. Futuros análisis funcionales y estructurales de estas proteínas son necesarios para saber si las regiones fuera del poro exhiben un cambio conformacional en los filtros y en la selectividad de las PIPs (Wallace y Roberts, 2004). Asimismo, la obtención de la estructura tridimensional de un miembro de la subfamilia de las PIP1 podría ayudar a resolver las diferencias en la permeabilidad y/o selectividad mostradas por diferentes miembros de la familia y ayudaría a identificar otros compuestos que pueden ser transportados por las mismas.

Otra mecanismo de regulación que podría estar ocurriendo es la heterodimerización entre diferentes PIPs. La interacción podrían estar ocurriendo en la planta con lo que las AQPs tendrían la capacidad de ser más permeables al agua que a solutos. Para probar esta posibilidad, se co-expresaron en ovocitos *McPIP1;4* con *McPIP1;2* o *McPIP2;1*. La co-

expresión de *McPIP1;4* con *McPIP1;2* o *McPIP2;1* provoca un incremento en la permeabilidad al agua (Figura 8). Sugiriendo una interacción entre *McPIP1;4* y *McPIP1;2* o entre *McPIP1;4* y *McPIP2;1*, lo cual podría proporcionar una mejor estabilidad y/o ensamblaje que resulte en un aumento en la permeabilidad por agua. Este efecto positivo en la permeabilidad se puede atribuir a la formación de heterotetrámeros entre *McPIP1;4* y *McPIP1;2* o *McPIP1;4* y *McPIP2;1* de manera semejante y como se demostró para la acuaporina *ZmPIP1;2* de maíz (Fetter *et al.*, 2004). La heterodimerización de diferentes subunidades es conocida por ocurrir en otros transportadores, incluyendo los de sacarosa y canales iónicos (Dreyer *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 1999; Veenhoff *et al.*, 2001). Adicionalmente, Yamada y colaboradores (1995) utilizando hibridación *in situ* para demostrar que el transcrito de *McPIP1;2* se encuentra sólo en raíces, mientras que los RNAs para *McPIP1;4* y *McPIP2;1* se detectaron ambos en raíz y hojas, sugiriendo que estas AQPs pueden encontrarse en el mismo tejido. Esto puede tener importancia fisiológica si pensamos en la heterotetramerización y en el efecto cooperativo positivo de los diferentes monómero cuando se encuentran en el mismo tejido. Sin embargo, en experimentos usando vesículas purificadas de membrana plasmática de betabel, se demostró que dos PIPs pertenecientes a las subfamilias PIP1 y PIP2 tienen propiedades bioquímicas y topológicas diferentes y sólo forman homodímeros. (Barone *et al.*, 1998). Por otra parte, la acuaporina de maíz *ZmPIP1;2* (una acuaporina no funcional) cuando se co-expresa con *ZmPIP2;1*, *ZmPIP2;4* o *ZmPIP2;5* resulta en un incremento en los valores de permeabilidad al agua, que son dependiente de la concentración de *ZmPIP1;2* (Fetter *et al.*, 2004). Así, estos resultados proporcionan información preliminar que será necesario ampliar con experimentos de inmunoprecipitación y/o co-inyecciones de las diferentes acuaporinas fusionadas a distintas proteínas fluorescente, para conocer las interacciones de las PIPs y su oligomerización en las células de planta, que ayuden a elucidar su importancia fisiológica y sus mecanismos de regulación.

## **9.2 Localización subcelular de *McPIP1;4***

Con los resultados de fraccionamiento celular y de inmunolocalización por microscopia confocal utilizando como marcador Pep12, un t-SNARE que reside en los compartimentos prevacuolares (CPV) (Conceicao *et al.*, 1997) y AtTIP2;1, que se localiza en vesículas parecidas a los CPV, se demostró que *McPIP1;4* reside en los CPV. Estos resultados fueron corroborados en fracciones enriquecidas en CPV, donde se inmunodetectó a *McPIP1;4* (Figuras 9, 10 y 11). El hecho de que *McPIP1;4* se encuentre localizada en los CPV es interesante porque se sabe que los CPV son compartimentos intermediarios en el transporte vesicular entre los endosomas tardíos y la vacuola, o entre la red *trans*-Golgi y la vacuola (Tse *et al.*, 2004). Los CPVs podrían estar participando no sólo en el mantenimiento y la regulación del transporte vesicular, sino también de los cambios por efecto del estrés salino, osmótico o de otro tipo. Debido a que *McPIP1;4* reside en estos compartimentos, un cambio en la expresión o en la regulación de *McPIP1;4* podría afectar indirectamente funciones vacuolares como: el mantenimiento del turgor celular, el almacenamiento de iones y de sales inorgánicas, y en la movilización de aminoácidos. Esta es una posibilidad que merece ser investigada en el futuro. La presencia de AQPs en los diferentes compartimentos intracelulares puede ser uno de los mecanismos que las células utilizan para mantener la homeostasis celular en general y especialmente bajo condiciones que modifican el estado hídrico de las células, incluyendo estrés salino, estrés osmótico y de temperatura, es por esto que la localización de *McPIP1;4* en CPVs es un dato importante, ya que sugiere la posible participación de esta AQP en la adaptación de las células al estrés.

## **9.3 Cambio en la expresión de *McPIP1;4* por efecto del estrés osmótico o salino**

Las acuaporinas en las plantas facilitan la toma de agua del suelo y regulan su transporte en respuesta al estrés ambiental. En *M. crystallinum*, una halófito que ha desarrollado diferentes estrategias para poder crecer en suelos salinos y semi-desérticos

(Adams *et al.*, 1992), se han identificado un total de 14 transcritos codificando diferentes miembros de la familia de las AQPs (Kirch *et al.*, 2000). No obstante, es poca la información que se tiene a nivel de proteína de las AQPs cuando la planta se encuentra en condiciones de estrés. Con el uso de anticuerpos específicos se investigó la acumulación de *McPIP1;4*, en células en suspensión que responden de manera similar a la planta completa (Vera-Estrella, *et al.*, 1999, 2000) en respuesta a tratamientos con 200 mM NaCl ó 200 mM manitol. Los resultados muestran por un lado: que la sal provoca un aumento de *McPIP1;4* por efecto del estrés, pero con una disminución por manitol, lo cual indica, que las células responden y distinguen de manera diferencial el estrés osmótico del estrés salino. Lo anterior sugiere que existen diversos mecanismos que regulan la expresión de *McPIP1;4* los cuales pueden estar operando en distintas vías y a diferentes niveles de regulación. Una mayor acumulación de *McPIP1;4* en las células tratadas con sal, podría deberse al aumento en la transcripción; sin embargo, Yamada y colaboradores (1995) encontraron los mismos niveles de mRNA de *McPIP1;4* en raíces y hojas control y sometidas al estrés. Esta discrepancia se puede explicar por el aumento en los niveles de la proteína *McPIP1;4* debida a la síntesis *de novo* provocada por el estrés. El tratamiento con manitol que conlleva a una disminución de la proteína *McPIP1;4*, podría indicar que existe una degradación de la misma por mecanismos de proteólisis aún no caracterizados, pero que podrían involucrar a la ubiquitilación de manera similar a lo observado para AQP2, que se degrada por un mecanismo de proteólisis dependiente de ubiquitilación (Kamsteeg *et al.*, 2006).

#### **9.4 Efecto de la fosforilación**

Por medio de análisis *in silico* se encontraron sitios probables de fosforilación para *McPIP1;4* (Tabla1). Los algoritmos detectaron que la serina 126, que se encuentra en el lazo B entre la hélice 2 y 3 del lado citosólico y que está conservada en todas las AQPs de

plantas, podía estar siendo fosforilada por una PKA en los ovocitos, Se tiene información de que sitios consenso de fosforilación de algunas proteínas cinasas de animales pueden estar reconociendo sitios de proteínas vegetales (Pearson y Kemp, 1991). La fosforilación también podría estar dirigida por una proteína cinasa dependiente de calcio (CDPK) en la planta, ya que se reconoce que un gran número de estímulos, incluyendo ácido abscísico (ABA), sequía, estrés hiper-osmótico o hipo-osmótico, choque térmico, estrés iónico, frío y factores de nodulación, provocan fluctuaciones en los niveles de  $Ca^{2+}$  citosólico (Senders *et al.*, 2002). Recientemente, una CDPK que responde a estrés salino y osmótico se aisló de *M. crystallinum* (Chehab *et al.*, 2004). Además a la serina 126, otras serinas Ser192, Ser199 y Ser203 son propuestas por los programas computacionales como sitios probables de fosforilación en McPIP1;4. Estos datos son importantes, para la acuaporina SoPIP2;1 dos sitios en las posiciones S115 y S274 se fosforilan y su fosforilación es necesaria para que se pueda dar un cambio de la permeabilidad, demostrando que SoPIP2;1 puede ser modulada por fosforilación (Johansson *et al.*, 1996; 1998) y que este proceso es un mecanismo de regulación de la permeabilidad al agua de las membranas biológicas.

Con el propósito de investigar la posible fosforilación de la AQP McPIP1;4 se observó el efecto sobre el transporte de agua midiendo la permeabilidad en ovocitos incubados con 8-Br-cAMP un análogo del cAMP que es permeable a la membrana y que activa a la PKA, o con ácido okadaíco, un inhibidor de fosfatasa utilizado para mantener a la acuaporina nodulina 26 en su forma fosforilada, que provocan un aumento en la permeabilidad de los ovocitos (Guenther *et al.*, 2003). Las Figuras 12 y 13 muestran los resultados en los valores de permeabilidad medidos en los ovocitos tratados con 8-Br-cAMP o ácido okadaíco. Como se observa no se encontraron diferencias entre los ovocitos inyectados con McPIP1;4 y los inyectados con H<sub>2</sub>O (control), sugiriendo que la acuaporina McPIP1;4 después de los tratamientos con ácido okadaíco o 8-Br-cAMP podía encontrarse en su forma no fosforilada,

otra posibilidad es la necesidad de múltiples fosforilaciones de la proteína para provocar un cambio en el transporte del agua. Finalmente, la dependencia de la fosforilación de concentraciones sub-micromolares de  $\text{Ca}^{2+}$ , de manera semejante a lo reportado para la acuaporina SoPIP2;1 de espinaca (Johansson et al 1996), también podrían estar influyendo sobre la capacidad de permeabilidad al agua de McPIP1;4 involucrando a una CDPK, regulada por fosforilación.

### **9.5 Identificación *in silico* de posibles modificaciones post-traduccionales para McPIP1;4**

La secuencia de aminoácidos para la AQP McPIP1;4 y su comparación con otras AQPs que se sabe pueden ser fosforiladas permitió identificar sitios probables de fosforilación. Estos datos de inmediato sugirieron que también la O-GlcNac puede ser un mecanismo de regulación post-traducciona, ya que las modificaciones debidas O-GlcNac son tan abundantes y dinámicas como las fosforilaciones. Se propone que la fosforilación y las modificaciones por O-GlcNac son reciprocas, ocurriendo en el mismo o adyacente grupo hidroxilo (Kelly *et al.*, 1993; Chou *et al.*, 1995). Además, todas las proteínas identificadas a ser modificadas por O-GlcNac también pueden ser fosforiladas. Sin embargo, la interrelación entre las modificaciones por Ser/Tre O-GlcNac y la fosforilación son complejas, y es probable que todas las posibles combinaciones se presenten en los eucariontes.

La adición o remoción específica de estas dos modificaciones pos-traduccionales pueden permitir una modulación fina de la función de las proteínas permitiendo coordinar la actividad celular y la respuesta a señales extracelulares en tiempo y espacio, probablemente a través de una acción concertada de estas modificaciones post-traduccionales (Comer y Hart 2000).

Recientemente se descubrió una familia de polipéptidos distinto a la ubiquitinas (Ubs)



llamadas pequeñas proteínas relacionadas a la ubiquitina (SUMO; también conocidas como sentrininas, Smt3, Ulp y PIC1) que son reconocidas como una modificación post-traducciona (Vierstra y Callis, 1999; Melchior, 2000; Hay, 2001; Kim *et al.*, 2002). Estas proteínas con aproximadamente 100 aminoácidos comparten solo un 8-15% de identidad con las Ubs pero su estructura globular es similar con una región C-terminal flexible conteniendo una glicina necesaria para la unión (Bayer *et al.*, 1998). Como las Ubs, las SUMO son sintetizadas como una forma inactiva que requieren procesamiento por proteasas específicas para exponer la glicina que forma el enlace: Las SUMO requieren a las proteínas E1, E2, y E3 para la conjugación, de manera similar a la ubiquitilación, pero las SUMO tienen una función distinta a la proteólisis (Vierstra y Callis, 1999; Melchior, 2000; Hay, 2001; Kim *et al.*, 2002).

Aunque muchas proteínas son modificadas por sólo una SUMO, en otras se puede formar un polímero por concatenación de una lisina específica de cada SUMO de manera semejante a la Ub (Tatham *et al.*, 2001). El análisis de mutantes y la identificación de las proteínas que están involucradas, ha permitido identificar las posibles funciones que pueden estar realizando las SUMO en las interacciones proteína-proteína, en la localización celular o en la inhibición de la ubiquitilación (Vierstra y Callis, 1999; Melchior, 2000; Hay, 2001; Kim, *et al.*, 2002). Por comparación de secuencias de varias proteínas receptoras de las SUMO se han identificado las secuencias del motivo de unión  $\Psi$ KXE, donde  $\Psi$  es un aminoácido hidrofóbico, K es una lisina, donde la SUMO se conjuga, X es cualquier aminoácido y E es un ácido glutámico (Melchior, 2000).

En las plantas, poco se sabe de la sumoilación o de la naturaleza de las proteínas que son blanco de las SUMO. En estudios preliminares, se identificó una familia de genes de *A. thaliana* que codifican proteínas muy similares a las SUMOs presentes en animales (Vierstra, y Callis, 1999). Experimentos de inmunodetección con anticuerpos anti-SUMO1 detectaron una gran variedad de proteínas sumolizadas en varias especies de plantas. Recientemente

se sugirió que la conjugación tipo SUMO tiene una función importante en la respuesta de defensa a patógenos (Hanania *et al.*, 1999)

La Sumoilación como un mecanismo de regulación post-traducciona l tiene poco tiempo de haberse descubierto, por lo que es poco el conocimiento generado en este momento de como esta modificación está participando en los procesos celulares. Sin embargo, ya se han identificado motivos consenso en las proteínas que son sujeto de esta modificación, y *McPIP1;4* tiene este motivo en la región N-terminal y este sería el primer reporte para una AQP que puede ser sumoilada, por lo que su reconocimiento como un posible mecanismo de regulación para esta *McPIP1;4* será de gran interés.

## 10 Conclusiones

- La acuaporina *McPIP1;4* de *M. crystallinum* expresada en ovocitos de *Xenopus* presentó una pobre actividad de respuesta a la prueba de hinchamiento de ovocitos indicando baja permeabilidad al agua.
- Diferentes concentraciones de cRNA inyectado en los ovocitos, así como la medición de la permeabilidad a diferentes tiempo de incubación no mostraron cambio significativos en los niveles de respuesta a cambios de volumen mediados por *McPIP1;4*.
- La expresión conjunta en los ovocitos de *McPIP1;4* con *McPIP1;2* y *McPIP1;4* con *McPIP2;1* provocó un aumento en la permeabilidad por agua. Esto sugiere una posible heteroligomerización como se ha reportado para otros miembros de esta familia de proteínas. Sin embargo, no se descarta que el incremento a la respuesta en estos experimentos sean efectos aditivos.
- *McPIP1;4* es una acuaporina que puede transportar glicerol.
- La permeabilidad al agua de *McPIP1;4* no aumenta en los ovocitos incubados con ácido okadaíco o 8-Br-cAMP.
- En células en suspensión de *M. crystallinum* la AQP *McPIP1;4* cambia su patrón de acumulación de manera diferencial en respuesta al estrés salino (aumenta) y al estrés osmótico (disminuye).
- En protoplastos de *M. crystallinum* obtenidos de células en suspensión la AQP *McPIP1;4* se localiza en compartimentos prevacuolares.

## 11 Perspectivas

Para comprender mejor la función que la acuaporina *McPIP1;4* esta realizando en la planta sera necesario trasladar los experimentos de transporte realizados en los ovocitos de *Xenopus* a las células de *M. crystallinum* en suspensión o la planta completa. Además, es importante investigar la posibilidad de que *McPIP1;4* tenga una función fisiológica a niveles de presión osmótica por arriba de los usados en los ensayos de permeabilidad debido al carácter halófito de *M. crystallinum*. Este carácter sugiere también la posibilidad de que *McPIP1;4* pueda ser capaz de transportar  $\text{Na}^+$  y en este caso otra estrategia que *M. crystallinum* este utilizando para eliminar este ion tóxico es mediante la compartimentalización en los compartimentos prevacuolares (CPVs) o en la vacuola mediante un mecanismo de transporte dependiente de CPVs. Recientemente se ha observado que el canal central de las acuaporinas formado a partir de las cuatro subunidades del tetrámero permite el paso de iones (Yu *et al.*, 2006). La resolución de la estructura tridimensional para *McPIP1;4* ayudaría a comprender su función fisiológica en *M. crystallinum* y aportaría datos importantes sobre la familia de las PIP1. Sin embargo, no es fácil la tarea de una caracterización mas completa de *McPIP1;4* apegada a respetar las funciones fisiológicas naturales de la planta ya que existen 13 distintas acuaporinas que enmascaran las función y la regulación de *McPIP1;4*. También, es necesario continuar con la caracterización de las modificaciones post-traduccionales de *McPIP1;4* ya que al realizar los análisis *in silico* se determinó que son muy variadas y pueden ser muy complejas. Además, es importante conocer si cada una de estas modificaciones post-traduccionales propuestas por este análisis funcionan *in vivo* y están siendo controladas por los niveles de salinidad y sequía a las cuales es sometida *M. crystallinum*. Con el propósito de conocer cuales son los mecanismo que regulan la entrada y salida de agua en los compartimentos celulares.

## 12 Referencias

- Adams, P., Thomas, J.C., Vernon, D.M., Bohnert, H.J., Jensen, R.G. (1992). Distinct cellular and organismic responses to salt stress. *Plant Cell Physiol.* **33**: 1215-1223.
- Agre, P. (2006) The aquaporin water channels. *Proceeding of the American Thoracic Society* **3**:5-13.
- Azad, A.K., Sawa, Y., Ishikawa, T., Shibata, H. (2004) Phosphorylation of plasma membrane aquaporin regulates temperature-dependent opening of tulip petals. *Plant Cell Physiol.* **45**: 608–617.
- Barkla, B.J., Vera-Estrella, R., Pantoja, O., Kirch, H.H., Bohnert, H.J. (1999) Aquaporin localization – how valid are the TIP and PIP labels? *Trends Plant Sci.* **4**: 86–88.
- Barone, L.M., Mu, H.H., Shih, C.J., Kashlan, K.B., Wasserman, B.P. (1998) Distinct biochemical and topological properties of the 31- and 27-kilodalton plasma membrane intrinsic protein subgroups from red beet. *Plant Physiol.* **118**:315-22.
- Barrieu, F., Marty-Mazars, D., Thomas, D., Chaumont, F., Charbonnier, M., Marty, F. (1999) Desiccation and osmotic stress increase the abundance of mRNA of the tonoplast aquaporin BobTIP26-1 in cauliflower cells. *Planta* **209**: 77–86.
- Baumgarten, R., Van De Pol, M.H., Wetzels, J.F., Van Os, C.H., Deen, P.M. (1998) Glycosylation is not essential for vasopressin-dependent routing of aquaporin-2 in transfected Madin-Darby canine kidney cells. *J Am Soc Nephrol.* **9**: 1553–1555.
- Bayer, P., Arndt, A., Metzger, S., Mahajan, R., Melchior, F., Jaenicke, R., Becker, J. (1998) Structure determination of the small ubiquitin-related modifier SUMO-1. *J Mol Biol.* **280**: 275-286.
- Biela, A., Grote, K., Otto, B., Hoth, S., Hedrich, R., Kaldenhoff, R. (1999) The *Nicotiana tabacum* plasma membrane aquaporin NtAQP1 is mercury-insensitive and permeable for glycerol. *Plant J.* **18**: 565–570
- Bienert, G.P., Moller, A.L., Kristiansen, K.A., Schulz, A., Moller, I.M., Schjoerring, J.K., Jahn, T.P. (2007) Specific aquaporins facilitate the diffusion of hydrogen peroxide across membranes. *J Biol Chem.* **282**:1183-92.

- Blom, N., Gammeltoft, S., Brunak, (1999). Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *S. Journal Molecular Biology*. **294**:1351-1362.
- Blom, N., Sicheritz-Ponten, T., Gupta, R., Gammeltoft, S., Brunak, S. (2004). Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence. *Proteomics*. **4**:1633-1649.
- Bradford, M.M., (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal biochem*. **72**:248-254.
- Chaumont, F., Barrieu, F., Herman, E.M., Chrispeels, M.J. (1998) Characterization of a maize tonoplast aquaporin expressed in zones of cell division and elongation. *Plant Physiol*. **117**: 1143–1152.
- Chaumont, F., Van Wilder, V., Fetter, K., Barrieu, F., Chrispeels, M.J. (2000a) Characterization of plasma membrane MIP proteins in maize. In *Molecular Biology and Physiology of Water and Solute Transport* (Hohmann, S. and Nielsen, S., eds). Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York pp. 269–274.
- Chaumont, F., Barrieu, F., Jung, R., Chrispeels, M.J. (2000b) Plasma membrane intrinsic proteins from maize cluster in two sequence subgroups with differential aquaporin activity. *Plant Physiol*. **122**: 1025–1034.
- Chaumont, F., Barrieu, F., Wojcik, E., Chrispeels, M.J., Jung, R. (2001) Aquaporins constitute a large and highly divergent protein family in maize. *Plant Physiol*. **125**: 1206–1215.
- Chaumont, F., Moshelion, M., Daniels M. J., (2005) Regulation of plant aquaporin activity. *Biol Cell* **97**: 749–764.
- Chehab, E.W., Patharkar, O.R., Hegeman, A.D., Taybi, T., Cushman, J.C. (2004) Autophosphorylation and subcellular localization dynamics of a salt- and water deficit-induced calcium-dependent protein kinase from *Mesembryanthemum crystallinum*. *Plant Physiol* **135**:1430–1446.
- Chou, T.-Y., Dang, C. V., Hart, G. W. (1995) Glycosylation of the c-Myc transactivation domain. *Proc Natl Acad Sci USA*. **92**: 4417–442.1
- Conceicao, A.D.S., Merty-Mazars, D., Bassham D.C., sanderfoot A.A., Marty F., Raikhel N.V. (1997)

The syntaxin homolog atPEP12p resides on a late pos-Golgi compartment in plants. *Plant Cell* **9**: 571-582.

Comer, F.I., Hart, G.W. (2000) O-Glycosylation of nuclear and cytosolic proteins. Dynamic interplay between O-GlcNAc and O-phosphate. *J Biol Chem.* **275**:29179-29182.

Cutler, S.R., Ehrhardt, D.W., Griffiths, J.S., Somerville, C.R. (2000) Random GFP:cDNA fusions enable visualization of subcellular structures in cells of *Arabidopsis* at a high frequency. *Proc Natl Acad Sci USA.* **97**: 3718–3723.

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

Daniels, M.J., Chrispeels, M.J., Yeager, M. (1999) Projection structure of a plant vacuole membrane aquaporin by electron cryo-crystallography. *J Mol Biol.* **294**: 1337–1349.

de Groot, B.L., Grubmuller, H. (2001) Water permeation across biological membranes: mechanism and dynamics of aquaporin-1 and GlpF. *Science* **294**: 2353–2357.

de Groot, B.L., Frigato, T., Helms, V., Grubmuller, H. (2003) The mechanism of proton exclusion in the aquaporin-1 water channel. *J Mol Biol.* **333**: 279–293.

Denker, B.M., Smith, B.L., Kuhajda F.P., Agre P. , (1988) Identification, purification, and partial characterization of a novel 28,000 integral membrane protein from erythrocytes and renal tubules . *Biol Chem.* **263**: 15634-15642.

Diella, F., Cameron, S., Gemund, C., Linding, R., Via, A., Kuster, B., Sicheritz-Ponten, T, Blom, N., Gibson, T.J. (2004) Phospho. ELM: a database of experimentally verified phosphorylation sites in eukaryotic proteins. *BMC Bioinformatics.* **22**: 5-79.

Duchesne, L., Pellerin, I., Delamarche, C., Deschamps, S., Lagree, V.,Froger, A., Bonnec, G., Thomas, D., Hubert, J.F. (2002) Role of C-terminal domain and transmembrane helices 5 and 6 in function and quaternary structure of major intrinsic proteins: analysis of aquaporin/glycerol facilitator chimeric proteins. *J Biol Chem* **277**: 20598–20604.

Dreyer, I., Antunes, S., Hoshi, T., Muller-Rober, B., Palme, K., Pongs, O., Reintanz, B., and Hedrich,

- R. (1997). Plant K<sup>+</sup> channel -subunits assemble indiscriminately. *Biophys. J.* **72**: 2143–2150.
- Feng, M., J., Tamai, K., Yamaji, N., Mitani, N., Konishi S., Katsuhara, M., Ishiguro, M., Murata, Y., Yano, M., (2006). Silicon is beneficial to plant growth and helps plants to overcome abiotic and biotic stresses by preventing lodging (falling over) and increasing resistance to pests and diseases, as well as oth. *Nature* **440**: 688-691.
- Fetter, K., Van Wilder, V., Moshelion, M., Chaumont, F. (2004) Interactions between plasma membrane aquaporins modulate their water channel activity. *Plant Cell* **16**: 215–228
- Fleurat-Lessard, P., Frangne, N., Maeshima, M., Ratajczak, R., Bonnemain, J.L., Martinoia, E. (1997) Increased expression of vacuolar aquaporin and H<sup>+</sup>-ATPase related to motor cell function in *Mimosa pudica* L. *Plant Physiol.* **114**: 827–834.
- Fotiadis, D., Jenó, P., Mini, T., Wirtz, S., Mülle, S.A., Fraysse, L., Kjellbom, P., Engel, A. (2001) Structural characterization of two aquaporins isolated from native spinach leaf plasma membranes. *J Biol Chem.* **276**: 1707–1714.
- Fortin, M.G., Morrison, N.A., Verma, D.P. (1987) Nodulin-26, a peribacteroid membrane nodulin is expressed independently of the development of the peribacteroid compartment. *Nucleic Acids Res.* **15**: 813–824.
- Fray, R.G., Wallace, A., Grierson, D., Lycett, G.W. 1994. Nucleotide sequence and expression of a ripening and water stress-related cDNA from tomato with homology to the MIP class of membrane channel proteins. *Plant Mol Biol*, **24**: 539-543.
- Fu, D., Libson, A., Miercke, L.J., Weitzman, C., Nollert, P., Krucinski, J., Stroud, R.M. (2000) Structure of a glycerolconducting channel and the basis for its selectivity. *Science* **290**: 481–486.
- Fujiyoshi, Y., Mitsuoka, K., de Groot, B.L., Philippsen, A, Grubmüller, H., Agre, P., Engel, A. (2002) Structure and function of water channels. *Curr Opin Struct Biol.* **12**:509-515.
- Gaspar, M., Bousser, A., Sissoeff, I., Roche, O., Hoarau, J., Mahe, A. (2003) Cloning and characterization of ZmPIP1-5b, an aquaporin transporting water and urea. *Plant Sci.* **165**: 21–31.
- Gerbeau, P., Amodeo, G., Henzler, T., Santoni, V., Ripoché, P., Maurel, C. (2002) The water



permeability of *Arabidopsis* plasma membrane is regulated by divalent cations and pH. *Plant J.* **30**: 71–81.

Gonen, T., Sliz, P., Kistler, J., Cheng, Y., Walz, T. (2004) Aquaporin-0 membrane junctions reveal the structure of a closed water pore. *Nature* **429**: 193–197.

Guenther, J.F., Roberts, D.M. (2000) Water-selective and multifunctional aquaporins from *Lotus japonicus* nodules. *Planta* **210**: 741–748.

Guenther, J.F., Chanmanivone, N., Galetovic, M.P., Wallace, I.S., Cobb, J.A., Roberts, D.M. (2003) Phosphorylation of soybean nodulin 26 on serine-262 enhances water permeability and is regulated developmentally and by osmotic signals. *Plant Cell* **15**: 981–991.

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

Gupta, R., Brunak, S., (2002) Prediction of glycosylation across the human proteome and the correlation to protein function. *Pacific Symposium on Biocomputing* **7**: 310-322.

Hanania, U., Furman-Matarasso, N., Ron, M., and Avni, A. (1999) *Plant J.* **19**: 533-541.

Hay, R.T. (2001) Protein modification by SUMO. *Trends Biochem Sci.* **26**:332-333.

Hendriks, G., Koudijs, M., van Balkom, B.W., Oorschot, V., Klumperman, J., Deen, P.M., van der Sluijs, P. (2004) Glycosylation is important for cell surface expression of the water channel aquaporin-2 but is not essential for tetramerization in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem.* **279**: 2975–2983.

Henzler, T., Steudle, E. (2000) Transport and metabolic degradation of hydrogen peroxide in *Chara corallina*: model calculations and measurements with the pressure probe suggest transport of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> across water channels. *J Exp Bot.* **51**: 2053–2066.

Hertel, A., Steudle, E. (1997) The function of water channels in *Chara*: the temperature dependence of water and solute flows provides evidence for composite membrane transport and for a slippage of small organic solutes across water channels. *Planta* **202**: 324–335.

Jauh, G.Y, Phillips, T.E., Rogers, J.C. (1999) Tonoplast intrinsic protein isoforms as markers for

vacuolar functions *Plant Cell*. **11**:1867-82.

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

Jahn, T.P., Moller, A.L., Zeuthen, T., Holm, L.M., Klaerke, D.A., Mohsin, B., Kuhlbrandt, W., Schjoerring, J.K. (2004) Aquaporin homologues in plants and mammals transport ammonia. *FEBS Lett.* **574**: 31–36.

Jin, J.B., Kim Y.A., Kim, S.J., Lee, S.H., Kim, D.H., Cheong, G.W., Hwang, I. (2001) A new dynamin-like protein, ADL6, is involved in trafficking from the trans-Golgi network to the central vacuole in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **13**:1511–1526

Johanson, U., Gustavsson, S. (2002) A New Subfamily of Major Intrinsic Proteins in Plants *Mol Biol Evol.* **19**:456-461.

Johanson, U., Karlsson, M., Johansson, I., Gustavsson, S., Sjövall, S., Fraysse, L., Weig, A.R., Kjellbom, P. (2001) The complete set of genes encoding major intrinsic proteins in *Arabidopsis* provides a framework for a new nomenclature for major intrinsic proteins in plants. *Plant Physiol.* **126**: 1358–1369.

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

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

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

Johnson, K.D., Chrispeels, M.J. (1992) Tonoplast-bound protein-kinase phosphorylates tonoplast intrinsic protein. *Plant Physiol.* **100**: 1787–1795.

Jones, J.T., Mullet, J.E. (1995) Developmental expression of a turgor-responsive gene that encodes an intrinsic membrane protein. *Plant Mol Biol.* **28**:983-96.

Jung, J. S., Preston, G. M., Smith, B. L., Guggino, W. B., Agre, P. (1994b) Molecular structure of the

- water channel through aquaporin CHIP The hourglass model. *J Biol Chem.* **269**:14648–14654.
- Kammerloher, W., Fischer, U., Piechottka, G.P., Schaffner, A.R. (1994) Water channels in the plant plasma membrane cloned by immunoselection from a mammalian expression system. *Plant J.* **6**: 187–199.
- Karlsson, M., Fotiadis, D., Sjövall, S., Johansson, I., Hedfalk, K., Engel, A., Kjellbom, P. (2003) Reconstitution of water channel function of an aquaporin overexpressed and purified from *Pichia pastoris*. *FEBS Lett.* **537**: 68–72.
- Kelly, W. G., Dahmus, M. E., and Hart, G. W. (1993) RNA polymerase II is a glycoprotein. Modification of the COOH-terminal domain by O-GlcNAc. *J Biol Chem* **268**:10416–10424.
- Kim, K.I., Baek, S.H., Chung, C.H., (2002) Versatile protein tag, SUMO: its enzymology and biological function. *J Cell Physiol.* **191**:257-268.
- Kirch, H.H., Vera-Estrella, R., Gollack, D., Quigley, F., Michalowski, C.B., Barkla, B.J., Bohnert, H.J. (2000) Expression of water channel proteins in *Mesembryanthemum crystallinum*. *Plant Physiol.* **123**: 111–124.
- Komina, Z.V., Karlov, V.A., (2002) In vivo and in vitro phosphorylation of membrane and soluble forms of soybean nodule sucrose synthase. *Plant Physiol.* **129**:1664-1673.
- Kamsteeg, E.J., Hendriks, G., Boone, M., Konings, B.M., Oorschot, V., van der Sluijs, P., Klumperman J., Deen M. T. (2006) Short-chain ubiquitination mediates the regulated endocytosis of the aquaporin-2 water channel. *PNAS* **103**:18344–18349
- Laemmli, U.K., (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680–685
- Liu, Q., Umeda, M., Uchimiya, H., (1994) Isolation and expression analysis of two rice genes encoding the major intrinsic protein. *Plant Mol Biol.* **26**:2003-2007.
- Mariaux, J.B., Bockel, C., Salamini, F., Bartels, D (1998) Desiccation- and abscisic acid-responsive genes encoding major intrinsic proteins (MIPs) from the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. *Plant Mol Biol.* **38**:1089-99.
- Maurel, C. Aquaporins and water permeability of plant membranes. (1997) *Annu Rev Plant Physiol*

Plant Mol Biol. **48**: 399–429.

- Maurel, C., Reizer, J., Schroeder, J.I., Chrispeels, M.J. (1993) The vacuolar membrane protein  $\gamma$ -TIP creates water specific channels in *Xenopus* oocytes. EMBO J. **12**: 2241–2247.
- Maurel, C., Kado, R.T., Guern, J., Chrispeels, M.J. (1995) Phosphorylation regulates the water channel activity of the seed-specific aquaporin  $\alpha$ -TIP. EMBO J. **14**: 3028–3035.
- Maurel, C., Javot, H., Lauvergeat, V., Gerbeau, P., Tournaire, C., Santoni, V., Heyes, J. (2002) Molecular physiology of aquaporins in plants. Int Rev Cytol. **215**: 105–148.
- Melchior, F. (2000) SUMO-nonclassical ubiquitin. Annu Rev Cell Dev Biol. **16**:591-626.
- Miao, G.H., Hong, Z., Verma, D.P.S. (1992) Topology and phosphorylation of soybean nodulin-26, an intrinsic protein of The peribacteroid membrane. J Cell Biol. **118**: 481–490.
- Miedema, H., Romano, L.A., and Assmann S.M. (2000) Kinetic analysis of the K<sup>+</sup> -selective outward rectifier in Arabidopsis mesophyll cells. Plant Cell Physiol. **41**:209-217.
- Morrison, N.A., Bisseling, T., Verma, D.P. (1988) Development and differentiation of the root nodule. Involvement of plant and bacterial genes. Dev Biol. **5**: 405–425.
- Moshelion, M., Becker, D., Biela, A., Uehlein, N., Hedrich, R., Otto, B., Levi, H., Moran, N., Kaldenhoff, R. (2002) Plasma membrane aquaporins in the motor cells of *Samanea saman*: diurnal and circadian regulation. Plant Cell **14**: 727–739.
- Moshelion, M., Moran, N., Chaumont, F. (2004) Dynamic changes in the osmotic water permeability of protoplast plasma membrane. Plant Physiol. **135**: 2301–2317.
- Murata, K., Mitsuoka, K., Hirai, T., Walz, T., Agre, P., Heymann, J.B., Engel, A., Fujiyoshi, Y. (2000) Structural determinants of water permeation through aquaporin-1. Nature **407**: 599–605.
- Murashige, T., Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tabaco tissue culture. Physiol Plant. **15**:473-497.
- Nakhoul, N.L., Davis, B.A., Romero, M.F., Boron, W.F.. (1998) Effect of expressing the water channel aquaporin-1 on the CO<sub>2</sub> permeability of *Xenopus* oocytes. Am J Physiol. **274**:543-548.
- Nakhoul, N.L., Hering-Smith, K.S., Abdounour-Nakhoul, S.M., Hamm, L.L. (2001) Transport of NH<sub>3</sub>/NH in oocytes expressing aquaporin-1. Am J Physiol Renal Physiol. **281**:255-263.

- Nemeth-Cahalan, K.L., Hall, J.E. (2000) pH and calcium regulate the water permeability of aquaporin 0. *J Biol Chem.* **275**: 6777–6782.
- Nemeth-Cahalan, K.L., Kalman, K., Hall, J.E. (2004) Molecular basis of pH and Ca<sup>2+</sup> regulation of aquaporin water permeability. *J Gen Physiol.* **123**: 573–580.
- Niemietz, C.M., Tyerman, S.D. (2000) Channel-mediated permeation of ammonia gas through the peribacteroid membrane of soybean nodules. *FEBS Lett.* **465**: 110–114.
- Paris, N., Stanley, C.M., Jones, R.L., Rogers, J.C. (1996) Plant cells contain two functionally distinct vacuolar compartments. *Cell* **85**: 563–572.
- Pearson, R.B., Kemp, B.E.. (1991) Protein kinase phosphorylation site sequences and consensus specificity motifs: tabulations. *Methods Enzymol.* **200**: 62-81.
- Pih, K.T., Kabilan, V., Lim, J.H., Kang, S.G., Piao, H.L., Jin, J.B., Hwang, I. (1999) Characterization of two new channel protein genes in *Arabidopsis* *Mol Cells* 9: 84–90.
- Podell, S., Gribskov, M. (2004). Predicting N-terminal myristoylation sites in plant proteins. *BMC Genomics* 5:37.
- Preston, G.M., Carroll, T.P., Guggino, W.B., Agre, P. (1992) Appearance of water channels in *Xenopus* oocytes expressing red cell CHIP28 protein. *Science* **256**: 385–387.
- Quigley, F., Rosenberg, J.M., Shachar-Hill, Y., Bohnert, H.J. (2002) From genome to function: the *Arabidopsis* aquaporins. *Genome Biology* 3 R0001.1 17pp.
- Reisen, D., Loborgne-Castel, N., Ozalp, C., Chaumont, F., Marty, F. (2003) Expression of a cauliflower tonoplast aquaporin tagged with GFP in tobacco suspension cells correlates with an increase in cell size. *Plant Mol Biol.* **52**: 387–400.
- Robinson, D.G., Sieber, H., Kammerloher, W., Schaffner, A.R. (1996) PIP1 aquaporins are concentrated in plasmalemmasomes of *Arabidopsis thaliana* mesophyll. *Plant Physiol.* **111**: 645–649.
- Ruiter, R.K, van Eldik, G.J., van Herpen, M.A., Schrauer, A.M., Wullems, J.G., (1997) Expression in anthers of two genes encoding *Brassica oleracea* transmembrane channel proteins. *Plant Mol Biol.* **34**: 163–168.

- Sakurai, J., Ishikawa, F., Yamaguchi, T., Uemura, M., Maeshima, M. (2005) Identification of 33 rice aquaporin genes and analysis of their expression and function. *Plant Cell Physiol.* **46**:1568-77.
- Sarda, X., Tusch, D., Ferrare, K., Legrand, E., Dupuis, J.M., Casse-Delbart, F., Lamaze, T. (1997) Two TIP-like genes encoding aquaporins are expressed in sunflower guard cells. *Plant J.* **12**:1103-11.
- Sarda, X., Tusch, D., Ferrare, K., Cellier, F., Alcon, C., Dupuis, J.M., Casse, F., Lamaze, T. (1999) Characterization of closely related delta-TIP genes encoding aquaporins which are differentially expressed in sunflower roots upon water deprivation through exposure to air. *Plant Mol Biol.* **40**:179-91.
- Schutz, K., Tyerman, S.D. (1997) Water channels in *Chara corallina*. *J. Exp. Bot.* **48**: 1511–1518.
- Sanders, D., Pelloux, J., Brownlee, C., Harper, J.F. (2002) Calcium at the crossroads of signalling. *The Plant Cell* **14**: 401-417.
- Siefritz, F., Tyree, M.T., Lovisolo, C., Schubert, A., Kaldenhoff, R. (2002) PIP1 plasma membrane aquaporins in tobacco: from cellular effects to function in plants. *Plant Cell* **14**: 869–876.
- Smart, L.B., Moskal, W.A., Cameron, K.D., Bennett, A.B. (2001) MIP genes are down-regulated under drought stress in *Nicotiana glauca*. *Plant Cell Physiol.* **42**:686-693.
- Smith, B.L., Preston, G.M., Spring, F.A., Anstee, D.J., Agre, P. (1994) Human red cell aquaporin CHIP. I. Molecular characterization of ABH and Colton blood group antigens. *J Clin Invest.* **94**: 1043–1049.
- Smith, B. L., Agre, P. (1991) Erythrocyte Mr 28,000 transmembrane protein exists as a multisubunit oligomer similar to channel proteins. *J Biol Chem.* **266**: 6407–6415.
- Su, H., Balderas, E., Vera-Estrella, R., Gollack, D., Quigley, F., Zhao, C., Pantoja, O., Bohnert, H.J., (2003) Expression of the cation transporter MchKT1 in a halophyte. *Plant Mol Biol.* **52**:967-980.
- Sui, H., Han, B.G., Lee, J.K., Walian, P., Jap, B.K. (2001) Structural basis of water-specific transport through the AQP1 water channel. *Nature* **414**: 872–878.
- Tajkhorshid, E., Nollert, P., Jensen, M.O., Miercke, L.J., O'Connell, J., Stroud, R.M., Schulten, K.

- (2002) Control of the selectivity of the aquaporin water channel family by global orientational tuning. *Science* **296**: 525–530.
- Takano, J., Wada, M., Ludewig, U., Schaaf, G., von Wieren, N., Fujiwara, T., (2006) The Arabidopsis major intrinsic protein NIP5;1 is essential for efficient boron uptake and plant development under boron limitation. *Plant Cell* **18**:1498-509.
- Tatham, M.H., Jaffray, E., Vaughan, O.A., Desterro, J.M., Botting, C.H., Naismith, J.H., Hay, R.T. (2001) Polymeric chains of SUMO-2 and SUMO-3 are conjugated to protein substrates by SAE1/SAE2 and Ubc9. *J Biol Chem.* **276**:35368-35374.
- Thomas, D., Bron, P., Ranchy, G., Duchesne, L., Cavalier, A., Rolland, J.P., Raguenes-Nicol C., Hubert, J.F., Haase, W., Delamarche, C. (2002) Aquaglyceroporins, one channel for two molecules. *Biochim Biophys Acta* **1555**. 181–186.
- Tournaire-Roux, C., Sutka, M., Javot, H., Gout, E., Gerbeau, P., Luu, D.T., Bligny, R., Maurel, C. (2003) Cytosolic pH regulates root water transport during anoxic stress through gating of aquaporins. *Nature* **425**: 393–397.
- Törnroth-Horsefield, S., Wang, Y., Hedfalk, K., Johanson, U., Karlsson, M., Tajkhorshid, E., Neutze, R., Kjellbom, P. (2006) Structural mechanism of plant aquaporin gating. *Nature* **439**: 688-694.
- Tse, Y.C., Mo, B., Hillmer, S., Zhao, M., Lo, S.W., Robinson, D.G., and Jiang, L. (2004). Identification of multivesicular bodies as prevacuolar compartments in *Nicotiana tabacum* BY-2 cells. *Plant Cell* **16**: 672–693
- Tyerman, S.D., Bohnert, H.J., Maurel, C., Steudle, E., Smith, J.A.C. (1999) Plant aquaporins: their molecular biology, biophysics and significance for plant water relations. *J Exp Bot.* **50**: 1055–1071.
- Tyerman, S.D., Niemietz, C.M., Bramley, H. (2002) Plant aquaporins: multifunctional water and solute channels with expanding roles. *Plant Cell Environ.* **25**: 173–194.
- Uehlein, N., Lovisolo, C., Siefritz, F., Kaldenhoff, R. (2003) The tobacco aquaporin NtAQP1 is a membrane CO<sub>2</sub> pore with physiological functions. *Nature* **425**: 734–737.

- Veenhoff, L.M., Heuberger, E.H., and Poolman, B. (2001). The lactose transport protein is a cooperative dimer with two sugar translocation pathways. *EMBO J.* **20**: 3056–3062.
- Vera-Estrella, R., Barkla, B.J., Bohnert, H.J., Pantoja, O. (1999). Salt stress in *Mesembryanthemum crystallinum* L. Cell suspensions activates adaptive mechanisms similar to those observed whole plant. *Planta.* **207**:426-35
- Vera-Estrella, R, Barkla, B.J., Gallardo-Amarillas, C., Bohnert, H.J., Pantoja, O. (2000) Aquaporin regulation under salt and osmotic stress in the halophyte *Mesembryanthemum crystallinum* (Hohmann, S. and Nielsen, S., eds). Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York pp 339-346.
- Vera-Estrella, R., Barkla, B.J., Bohnert, H.J., Pantoja, O. (2004) Novel regulation of aquaporins during osmotic stress. *Plant Physiol.* **135**: 2318–2329.
- Vernon, D.M., Bohnert, H.J. (1992). A novel methyl transferase induced by osmotic stress in the facultative halophyte *Mesembryanthemum crystallinum*. *EMBO J.* **11**: 2077-2085.
- Vernon, D.M., Ostrem, J.A., Bohnert, H.J. (1993). Stress perception and response in a facultative halophyte: The regulation of salinity-induced genes in *Mesembryanthemum crystallinum*. *Plant Cell Environ.* **16**: 437-444.
- Vierstra, R.D., Callis, J. (1999) Polypeptide tags, ubiquitous modifiers for plant protein regulation. *Plant Mol Biol.* **41**:435-442.
- Wallace, I.S., Roberts, D.M. (2004) Homology modeling of representative subfamilies of *Arabidopsis* major intrinsic proteins. Classification based on the aromatic/arginine selectivity filter. *Plant Physiol.* **135**: 1059–1068.
- Weaver, C.D., Crombie, B., Stacey, G., Roberts, D.M. (1991). Calcium-dependent phosphorylation of symbiosome membrane proteins from nitrogen-fixing soybean nodules: Evidence for phosphorylation of nodulin 26. *Plant Physiol.* **95**, 222–227.
- Weaver, C.D., Roberts, D.M. (1992) Determination of the site of phosphorylation of nodulin-26 by the calcium-dependent protein kinase from soybean nodules. *Biochemistry* **31**: 8954–8959.
- Weig, A., Deswarte, C., Chrispeels, M.J., (1997). The major intrinsic protein family of *Arabidopsis* has



23 members that form three distinct groups with functional aquaporins in each group. *Plant Physiol.* **114**: 1347-1357.

Yamada, S., Katsuhara, M., Kelly, W.B., Michalowski, C.B., Bohnert, H.J. (1995) A family of transcripts encoding water channel proteins: tissue- specific expression in the common ice plant. *Plant Cell* **7**: 1129–1142.

Yamaguchi-Shinozaki K., Koizumi, M., Urao, S., Shinozaki, K., (1992). Molecular cloning and characterization of 9 cDNAs for genes that are responsive to desiccation in *Arabidopsis thaliana*: Sequence analysis of one cDNA that encodes a putative transmembrane channel protein. *Plant Cell Physiol.* **33**: 217-224.

Yasui, M., Hazama, A., Kwon, T.H., Nielsen, S., Guggino, W.B., Agre, P. (1999) Rapid gating and anion permeability of an intracellular aquaporin. *Nature* **402**: 184–187.

Yu, J., Yool, A.J., Schulten, K., and Tajkhorshid E. (2006) Mechanism of Gating and Ion Conductivity of a Possible Tetrameric Pore in Aquaporin-1 Structure. **14**:1411–1423.

Xue, Y., Zhou, F., Fu, C., Xu, Y., Yao. X. (2006). SUMOsp: a web server for sumoylation site prediction *Nucleic Acids Res.* **34**: 254–257.

Zeuthen, T., Klaerke, D.A. (1999) Transport of water and glycerol in aquaporin 3 is gated by H<sup>+</sup>. *J Biol Chem.* **274**: 21631–21636.

Zhang, W.H., Tyerman, S.D. (1999) Inhibition of water channels by HgCl<sub>2</sub> in intact wheat root cells. *Plant Physiol.* **120**: 849-858.