



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Farmacia y Bioquímica

***Estudio de acuaporinas vegetales pertenecientes a la familia
PIP: análisis de las relaciones estructura-función de homo-
tetrámeros y tetrámeros mixtos PIP1-PIP2.***

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área: **CIENCIAS BIOQUÍMICAS**

Autor: Cintia Jozefkowicz

Director Tesis: Prof. Dra. Karina Alleva

Lugar de trabajo: Instituto de Química y Físicoquímica Biológicas "Prof. Alejandro C. Paladini", IQUIFIB UBA-CONICET.

Buenos Aires, 2015.

Resumen

La asociación específica de canales de membrana plasmática de las células vegetales para formar arreglos oligoméricos es un evento biológicamente relevante porque confiere ventajas funcionales a la fisiología celular vegetal. En el caso de las acuaporinas de plantas, se sabe que estas se encuentran como canales oligoméricos en distintas membranas de la célula vegetal y al momento de comenzar este trabajo doctoral se habían reportado evidencias que apoyaban que las acuaporinas vegetales de membrana plasmática (PIP) podrían interactuar para formar oligómeros mixtos mediante la combinación de monómeros del tipo PIP2 y PIP1. Sin embargo, restaba comprender el tipo de oligómero que forman los parálogos PIP1 y PIP2 y el tipo de estequiometría alcanzada al ensamblarse. Asimismo, si bien estaba ampliamente reportada la interacción funcional entre algunas PIP1 y algunas PIP2, no era claro si todas las PIP1 y todas las PIP2 son capaces de interactuar, y se desconocían los determinantes estructurales que resultan claves para la interacción entre ambos subtipos de acuaporinas.

Siendo este el estado de conocimiento sobre las relaciones estructura-función del grupo PIP de acuaporinas vegetales, el trabajo de tesis aquí presentado se centró en investigar la capacidad de las acuaporinas de este grupo para formar arreglos hetero-oligoméricos, determinando su actividad, regulación, localización, e indagando cuáles podrían ser los determinantes estructurales necesarios para que tenga lugar la interacción entre PIP1 y PIP2.

Para lograr este objetivo, se examinaron las propiedades funcionales de 2 acuaporinas de *Beta vulgaris* tipo PIP2 en cuanto a su interacción con PIP1 y se evaluó la formación de distintas especies tetraméricas. Nuestros enfoques experimentales incluyen: i) la medición de la actividad biológica de los tetrámeros en cuanto a su capacidad de transportar agua; ii) el análisis de la localización de PIPs fusionadas a EYFP o ECFP por microscopía de fluorescencia confocal; iii) el diseño y la evaluación funcional de mutantes que permitan estudiar la interacción PIP1-PIP2; iv) la realización de construcciones homo y hetero-diméricas de PIP1 o PIP2; v) el estudio de la regulación de la actividad biológica de los diferentes arreglos tetraméricos por cambios en el pH citosólico; y vi) la realización de estudios bioinformáticos y estructurales de PIPs *in silico*.

Los resultados obtenidos durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral muestran que no es posible generalizar que cualquier miembro del grupo PIP2 es capaz de interactuar con cualquier miembro del grupo PIP1, siendo el primer *loop* extracelular de PIP2 un elemento estructural clave en la interacción entre monómeros en el tetrámero y un posible controlador del fenómeno de hetero-tetramerización. A su vez, hemos podido demostrar que distintos tipos de hetero- tetrámeros PIP1-PIP2 con estequiometrías 2:2, 1:3 y 3:1 son capaces de formarse y alcanzar la membrana plasmática en el sistema de expresión heterólogo de oocitos de *Xenopus*; las evidencias experimentales halladas muestran que el ensamblado de PIP1-PIP2 en hetero- tetrámeros ocurre con estequiometría flexible y dependiente de la expresión relativa de cada uno de los parálogos.

Interesantemente, todas las especies hetero-tetraméricas presentan igual actividad biológica en términos de transporte de agua y respuesta cooperativa a la regulación por pH_{int}. Sin embargo, las propiedades de los

hetero-tetrámeros PIP1-PIP2 difieren de las propiedades halladas para los homo-tetrámeros. Dado que la presencia en membrana plasmática de hetero-tetrámeros vs homo-tetrámeros depende de cantidad de proteínas PIP2 disponibles en relación a la cantidad de proteínas PIP1, y considerando que estos ensamblajes poseen importantes diferencias funcionales, el manejo de la expresión relativa PIP1/PIP2 se torna un mecanismo de regulación del transporte de agua en la célula vegetal. Así, nuestros hallazgos arrojan luz no sólo la estequiometría de los hetero-tetrámeros formados por PIP1-PIP2 y su funcionalidad biológica, cuestiones que estaban pendientes de ser elucidadas en el campo biofísico de las acuaporinas vegetales, sino también sobre la hetero-tetramerización de las PIPs como un nuevo mecanismo de regulación relevante para ajustar el transporte de agua a través de la membrana plasmática de las células vegetales.

Abstract

In the present Thesis we evaluated the capacity of plant aquaporins belonging to the PIP subfamily to assemble as hetero-tetramers. With this aim, we investigated the functional properties of two aquaporins belonging to the PIP2 group regarding their interaction with PIP1. Our results show that it is not correct to generalize that all PIP2 are able to interact with all PIP1, as we proved that the interaction between PIP1 and PIP2 is dependent on specific pairs of PIP1 and PIP2 proteins. We identify the first extracellular loop of PIP2 as a key structural element in the interaction between monomers in the tetramer and also as a possible controller of the hetero-tetramerization phenomenon.

We also probed that the hetero-tetramerization between PIP1-PIP2 do not have a stoichiometric constrain and depends on the relative quantities of PIP1 and PIP2 monomers which are co-expressed in the cell. Moreover, hetero-tetramers with all the possible stiochiometries present equal biological activity in terms of water transport and pH intracellular regulation, being these functional properties different from the ones observed for homo-tetramers.

In summary, this work shed light on the hetero-tetramerization of PIP channels as a new relevant mechanism to adjust plasma membrane water transport of plant cells.

¡Gracias!

A la Universidad de Buenos Aires por permitirme formarme y desempeñarme como docente.

Al CONICET por brindarme los medios para que pueda trabajar haciendo lo que me gusta.

A Karina por guiarme, enseñarme y en especial por contagiarme tu entusiasmo
y pasión por la ciencia y la docencia.

A Gabriela por haberme dado la oportunidad de trabajar en tu laboratorio.

A mis compañeros: Mecha, Jorge, Moira, Flor, Esteban, Mile, Agustina y Romi.

A Vicky por tu amistad y por las charlas, sobre todo en los momentos difíciles.

A mis compañeros de Biomembranas por acompañarme en mis primeros pasos.

A Gaby y Nico por su generosidad, por su constante apoyo a mi trabajo
y por permitirme participar del suyo.

A los Luises por guiarme en los experimentos con los geles, compartir sus conocimientos
y por alentarme siempre hacia adelante.

A Lía y Lorena por su ayuda en las mediciones y el análisis de las imágenes de microscopía.

A Patrick por abrirme las puertas de su laboratorio, por enseñarme tantas cosas en poco tiempo
y por su confianza.

A la cátedra de Física por recibirme y acompañarme en éste último tiempo.

A Gerardo por su invaluable contribución artística.

A mamá y a Mali por todo, pero sobre todo por su amor incondicional.

A Juan por el día a día y por siempre creer en mí.

A Jorge, siempre, porque tu amor fue fundamental.

ÍNDICE DE FIGURAS	9
ABREVIATURAS	13
INTRODUCCIÓN GENERAL	14
ACUAPORINAS, FILOGENIA	14
ACUAPORINAS, ESTRUCTURA	19
ACUAPORINAS, ACTIVIDAD BIOLÓGICA	23
REGULACIÓN POR MODIFICACIONES CO- Y POST-TRADUCCIONALES	26
REGULACIÓN DE LA APERTURA Y CIERRE DE LAS PIP (GATING)	27
REGULACIÓN POR RELOCALIZACIÓN (TRAFFICKING)	29
ACUAPORINAS VEGETALES, PIP	30
PIP, COMO CANALES MULTIMÉRICOS	32
OBJETIVOS	34
MATERIALES Y MÉTODOS	35
1. ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS NUCLEOTÍDICAS Y PROTEICAS	35
1.1 ESTUDIOS FILOGENÉTICOS	35
1.2 ALINEAMIENTOS MÚLTIPLES DE LAS SECUENCIAS PROTEICAS	35
1.3 ESTUDIOS BIOINFORMÁTICOS PARA EL ANÁLISIS DE LA CO-EVOLUCIÓN ENTRE AMINOÁCIDOS	36
2. CLONADOS	37
2.1 CONSTRUCCIÓN DE PROTEÍNAS QUIMERAS PIP	37
2.1.1 Generación de los fragmentos a clonar para la construcción de proteínas PIP fusionadas a proteínas fluorescentes y para la construcción de dímeros de acuaporinas PIP	37
2.1.2 Purificación de los fragmentos a clonar y restricción	39
2.1.3 Ligación de los fragmentos en los vectores correspondientes	40
2.2 CONSTRUCCIÓN DE MUTANTES DE BVPIP2;1	40
2.3 TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS PARA AMPLIFICACIÓN Y AISLAMIENTO DEL ADN	41
2.4 TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS CON EL VECTOR PT7ST PARA EXPRESIÓN EN OOCITOS ..	41
3. EXPRESIÓN DE ACUAPORINAS EN OOCITOS DE XENOPUS LAEVIS	42
3.1 SINTESIS IN VITRO DE ARNC	42
3.1.1 Linealizado del ADN plasmídico	42
3.1.2 Purificación del ADN	42
3.1.3 Síntesis de ARNc	43
3.1.4 Purificación del ARNc	44
3.2 CUANTIFICACIÓN Y CONTROL DE CALIDAD DEL ARNC	44
3.3 PREPARACIÓN DE OOCITOS DE XENOPUS LAEVIS E INYECCIÓN DE ARNC	45
3.3.1 Mantenimiento de los <i>Xenopus laevis</i>	45
3.3.2 Obtención de los oocitos	46
3.3.3 Inyección de ARNc en oocitos	46

4. ESTUDIOS FUNCIONALES POR EXPRESIÓN DE ACUAPORINAS EN OOCITOS DE <i>XENOPUS LAEVIS</i>	46
4.1 MEDICIONES DE PERMEABILIDAD OSMÓTICA DE AGUA.....	47
4.2 MEDICIONES DE PERMEABILIDAD OSMÓTICA DE AGUA: EFECTO DE LA CO-EXPRESIÓN DE ACUAPORINAS.....	47
4.3 MEDICIONES DE PERMEABILIDAD OSMÓTICA DE AGUA: EFECTO DEL PH _{INT}	48
4.3.1 Medición del pH intracelular en oocitos	49
4.4 MEDICIONES DE PERMEABILIDAD OSMÓTICA DE AGUA: EFECTO DE LA N-GLICOSILACIÓN DE PIPS EN OOCITOS DE <i>XENOPUS</i>	50
4.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	50
5. DETECCIÓN DE BVPIPS EN MEMBRANA	51
5.1 AISLAMIENTO DE MEMBRANAS DE OOCITOS DE <i>XENOPUS</i>	51
5.2 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS.....	52
5.3 IMMUNODETECCIÓN DE BVPIPS	52
5.4 DETECCIÓN DE BVPIPS POR FLUORESCENCIA EN GEL	53
6. LOCALIZACIÓN CELULAR DE BVPIPS EN OOCITOS DE <i>XENOPUS</i>.....	54
6.1 ADQUISICIÓN DE IMÁGENES DE FLUORESCENCIA EN MICROSCOPIO CONFOCAL	54
6.2. ANÁLISIS DE LAS IMÁGENES DE FLUORESCENCIA OBTENIDAS EN EL MICROSCOPIO CONFOCAL..	55
7. ESTUDIOS ESTRUCTURALES DE BVPIP2;1	55
7.1 MODELADO POR HOMOLOGÍA.....	55
7.2 ESTUDIOS DE SIMULACIÓN POR DINÁMICA MOLECULAR (MDS).....	56
CAPITULO 1	57
ANÁLISIS DE LA FUNCIONALIDAD DE BVPIP2;1 Y DE LOS DETERMINANTES ESTRUCTURALES QUE MEDIAN LA INTERACCIÓN PIP1-PIP2.	57
INTRODUCCIÓN	58
OBJETIVOS	61
RESULTADOS	62
ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE BVPIPS.....	62
ANÁLISIS TOPOLÓGICO DE BVPIP2;1	64
ANÁLISIS FUNCIONAL DE BVPIP2;1	65
REGULACIÓN DE LA APERTURA Y CIERRE BVPIP2;1 POR ACIDIFICACIÓN INTRACELULAR.....	68
ESTUDIO DE LA LOCALIZACIÓN CELULAR DE BVPIPS	70
DIFERENCIAS EN EL LOOP A DE BVPIP2.....	75
REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE MUTANTES DE BVPIP2;1 POR ACIDIFICACIÓN INTRACELULAR.....	78
LOCALIZACIÓN CELULAR DE MUTANTES DE BVPIP2;1.....	80
ANÁLISIS ESTRUCTURAL DE BVPIPS	82
ANÁLISIS ESTRUCTURAL DE MUTANTES DE BVPIP2;1	89
CONCLUSIONES	91
CAPITULO 2	93
ESTUDIO DE LA ESTEQUIOMETRÍA DE HETERO-TETRÁMEROS MIXTOS.....	93
PIP1-PIP2.....	93

INTRODUCCIÓN	94
OBJETIVOS	96
RESULTADOS	97
EVALUACIÓN DE LAS ESTRATEGIAS EXPERIMENTALES PARA EL ESTUDIO DE LA FORMACIÓN DE DISTINTAS ESPECIES TETRAMÉRICAS DE PROTEÍNAS PIP	97
CONTROL DE LA ACTIVIDAD DE DÍMEROS DE PROTEÍNAS PIP	98
ESTUDIO DE LAS CARACTERISTICAS FUNCIONALES DE HETERO-TETRÁMEROS PIP2-PIP1 CON ESTEQUIOMETRÍA 2:2.....	100
ANÁLISIS DE LA REGULACIÓN POR ACIDIFICACIÓN INTRACELULAR DE LA ACTIVIDAD DE HETERO- TERÁMEROS PIP2-PIP1 CON ESTEQUIOMETRÍA 2:2	102
ANÁLISIS FUNCIONAL DE LA ACTIVIDAD DE HETERO-TETRÁMEROS CON ESTEQUIOMETRÍAS 1:3 Y 3:1.....	104
ESTUDIO DE LA LOCALIZACIÓN DE HETERO-TETRÁMEROS CON ESTEQUIOMETRÍAS 1:3 Y 3:1	107
ESTUDIO DE LA COOPERATIVIDAD EN LA RESPUESTA AL PHINT ÁCIDO POR CO-INYECCIÓN DEL HETERO- DÍMERO CON MONÓMEROS PIP EN DISTINTAS RELACIONES DE MASAS.....	111
ANÁLISIS DE LA CO-EVOLUCIÓN ENTRE AMINOÁCIDOS EN LAS DISTINTAS FAMILIAS DE ACUAPORINAS VEGETALES.....	116
CONCLUSIONES	118
DISCUSIÓN	119
INTERACCIÓN PIP1-PIP2: ROL DEL LOOP A	120
¿HETERO-TETRÁMEROS O HETERO-OLIGÓMEROS?	121
LA EXPRESIÓN DE MONÓMEROS PIP COMO CONDICIONANTE DE LA FORMACIÓN DE DISTINTAS ESPECIES TETRAMÉRICAS	122
RELEVANCIA FUNCIONAL DE LA EXISTENCIA DE TETRÁMEROS CON ESTEQUIOMETRÍAS VARIABLES	123
- A NIVEL DE LA LOCALIZACIÓN DE LAS PIPS (<i>TRAFFICKING</i>).....	123
- A NIVEL DEL TRANSPORTE DE AGUA Y SELECTIVIDAD A SUSTRATOS DE PIPS.....	124
- A NIVEL DE LA APERTURA Y CIERRE DEL CANAL (<i>GATING</i>).....	125
CONSIDERACIONES FINALES	126
MODELO	128
BIBLIOGRAFÍA	130

Índice de Figuras

<i>Figura 1: Representación gráfica de la distribución de la superfamilia MIP a través de especies.</i>	16
<i>Figura 2: Análisis filogenético de AQPs de Arabidopsis y arroz.....</i>	17
<i>Figura 3: Evolución de la superfamilia MIP en plantas y animales vertebrados.....</i>	18
<i>Figura 4: Análisis del constrain evolutivo en AQP de plantas.....</i>	19
<i>Figura 5: Representación esquemática de un monómero de aquaporina.....</i>	20
<i>Figura 6: Estructura cuaternaria de una aquaporina vegetal.....</i>	21
<i>Figura 7: Estructura del poro de SoPIP2;1 en conformación abierta y cerrada.....</i>	28
<i>Figura 8: Mecanismo de apertura y cierre (gating) de PIP2.....</i>	29
<i>Figura 9: Superposición de las estructuras tridimensionales de proteínas PIP2 y PIP1.....</i>	32
<i>Figura 10: Resultados de permeabilidad al agua de membranas de oocitos de Xenopus que co-expresan proteínas PIP1 y PIP2; esto puede ser consecuencia de la formación de hetero-oligómeros u hetero-terámeros.....</i>	33
<i>Figura 11: Plásmido pT7ST para expresión en oocitos.....</i>	42
<i>Figura 12: Permeabilidad osmótica (Pf) de membranas de oocitos inyectados con el ARNc de BvPIP2;2, BvPIP1;1, y BvPIP2;1 sin y con cola de poli A.....</i>	44
<i>Figura 13: Electroforesis en gel de agarosa del ARNc sintetizado in vitro.....</i>	45
<i>Figura 14: Protocolos de extracción para la obtención de membranas de oocitos de Xenopus ...</i>	52
<i>Figura 15: Imágenes confocales obtenidas con distintos marcadores en la zona de los gránulos corticales del polo vegetal de oocitos de Xenopus.....</i>	54
<i>Figura 16: Patrón de expresión de BvPIP2;2, BvPIP2;1 y BvPIP1;1 en distintos órganos y tejidos de Beta vulgaris.....</i>	59
<i>Figura 17: Árbol filogenético de proteínas PIP1.....</i>	62
<i>Figura 18: Árbol filogenético de proteínas PIP2.....</i>	63
<i>Figura 19: Análisis de la topología de membrana de la proteína BvPIP2;1.....</i>	64
<i>Figura 20: Representación esquemática de una acuaporina tipo PIP2.....</i>	65
<i>Figura 21: Permeabilidad osmótica (Pf) de membranas de oocitos de Xenopus inyectados con distintas masas de ARNc de BvPIP2;1.....</i>	66
<i>Figura 22: Permeabilidad osmótica (Pf) de membranas de oocitos que co-expresan BvPIP2;1 y BvPIP1;1.....</i>	67
<i>Figura 23: Permeabilidad osmótica (Pf) de membranas de oocitos co-inyectados con el ARNc de BvPIP2;1 y BvPIP1;1 o co-inyectados con el ARNc de BvPIP2;2 y BvPIP1;1.....</i>	68
<i>Figura 24: Permeabilidad osmótica (Pf) de membranas de oocitos que expresan BvPIPs solas o co-expresan distintas BvPIPs a pH intracelular 6.3 y 7.0.....</i>	69
<i>Figura 25: Curva dosis respuesta de Pf en función del pH intracelular para oocitos que expresan BvPIP2;1 o co-expresan BvPIP2;1 y BvPIP1;1.....</i>	70
<i>Figura 26: Permeabilidad osmótica (Pf) de membranas de oocitos inyectados con el ARNc de BvPIP fusionadas a proteínas fluorescentes.....</i>	71
<i>Figura 27: Imágenes confocales de oocitos de X. laevis que expresan BvPIP1;1-ECFP y BvPIP2;2-EYFP.....</i>	72
<i>Figura 28: Imágenes confocales de oocitos de X. laevis que co-expresan BvPIP1;1-ECFP y BvPIP2;2 o co-expresan BvPIP1;1-ECFP y BvPIP2;1.....</i>	73

Figura 29: Perfiles de intensidad de fluorescencia normalizados.....	74
Figura 30: Secuencia consenso correspondiente a los loop A de proteínas PIP2	75
Figura 31: Representación esquemática de una acuaporina PIP2 mostrando los residuos conservados presentes en el loop A de PIP2 de distintas especies cuya interacción funcional con PIP1 fue reportada	76
Figura 32: Permeabilidad osmótica (Pf) de membranas de oocitos inyectados con el ARNc de BvPIP2;1 wild type (WT) y mutantes.....	77
Figura 33: Permeabilidad osmótica (Pf) de oocitos que co-expresan las mutantes de BvPIP2;1 (N64H/E65Q o N64I/E65Q) y BvPIP1;1	78
Figura 34: Inhibición de la permeabilidad osmótica de la membrana de oocitos que expresan la mutante de BvPIP2;1 N64I/E65Q sola o co-expresan la mutante con BvPIP1;1 por acidificación citosólica	79
Figura 35: Curva dosis-respuesta de Pf en función del pH _{int} de la proteína mutante BvPIP2;1 N64I/E65Q expresada sola y co-expresada con BvPIP1;1.....	80
Figura 36: Localización de BvPIP1;1-ECFP al ser co-expresada junto con la acuaporina mutante BvPIP2;1N64I/E65Q en oocitos de <i>Xenopus</i>	81
Figura 37: Permeabilidad osmótica de la membrana de oocitos co-expresados con las acuaporinas mutantes BvPIP2;1 N64I/E65Q o BvPIP2;1 N64H/E65Q y BvPIP1;1-ECFP	82
Figura 38: Estructura tridimensional de un monómero de BvPIP2;1	83
Figura 39: Impacto de la N-glicosilación sobre la funcionalidad de BvPIP2;1 y su capacidad de interacción con BvPIP1;1.....	84
Figura 40: Fluctuación cuadrática media (RMSF) de los residuos de cada uno de los loop A de BvPIP2;1	85
Figura 41: Gráficos de Ramachandran de los residuos que corresponden al loop A de BvPIP2;1. 86	
Figura 42: Superposición de imágenes de la dinámica molecular de los loop A de cada uno de los monómeros en el tetrámero de BvPIP2;1 durante 30 ns de simulación.....	87
Figura 43: Análisis de la formación de puentes disulfuro entre Cys de los loop A de los monómeros en el homo-tetrámero de BvPIP2;1	88
Figura 44: Cargas electrostráticas del loop A de BvPIP2;1 wild type, BvPIP2;1 mutantes y otras PIP2 capaces de interaccionar con PIP1.....	89
Figura 45: Fluctuación cuadrática media (RMSF) de los residuos de cada uno de los loops A de la proteína mutante BvPIP2;1 N64I/E65Q.	90
Figura 46: Representación esquemática de las posibles configuraciones tetraméricas generadas por la inyección de ARNc del hetero-dímero, BvPIP1;1, BvPIP2;2 o por la co-inyección de distintas combinaciones de ARNc.	97
Figura 47: Permeabilidad osmótica (Pf) de las membranas de oocitos que fueron inyectados con distintas masas de ARNc de monómeros de PIP2 y homo-dímeros PIP2-PIP2	98
Figura 48: Permeabilidad osmótica (Pf) de las membranas de oocitos que fueron inyectados con distintas masas de ARNc codificante para hetero-dímeros PIP2-PIP1 y hetero-dímeros PIP1-PIP2	99
Figura 49: Valores de permeabilidad al agua (Pf) de membranas de oocitos que expresan BvPIP (solas y en combinación) en comparación con la Pf de membranas de oocitos que solo expresan el hetero-dímero.....	101

<i>Figura 50: Dependencia de la Pf con el pH_{int} de oocitos que co-expresan PIP1 y PIP2, o que expresan únicamente el hetero-dímero PIP2-PIP1 o el monómero de PIP2</i>	<i>103</i>
<i>Figura 51: Permeabilidad osmótica al agua de membranas de oocitos que co-expresan el heterodímero y monómeros de PIP2 o PIP1</i>	<i>104</i>
<i>Figura 52: Pf en función del pH_{int} para oocitos co-inyectados con el ARNc de PIP1 o PIP2 y el hetero- dímero en una relación de masa 1:1.....</i>	<i>106</i>
<i>Figura 53: Permeabilidad osmótica (Pf) de membranas de oocitos co-inyectados con el ARNc del hetero- dímero y PIP1 o PIP2 fusionadas a proteínas fluorescentes.....</i>	<i>107</i>
<i>Figura 54: Localización de PIP1-ECFP y PIP2-EYFP por co-expresión con el heterodímero PIP2-PI.....</i>	<i>108</i>
<i>Figura 55: Electroforesis en gel de membranas de oocitos que expresan oligómeros PIP y posterior revelado por fluorescencia</i>	<i>110</i>
<i>Figura 56: Dependencia de la Pf con la acidificación intracelular de oocitos que expresan el hetero- dímero y monómeros de PIP1 en diferentes relaciones de masa.....</i>	<i>112</i>
<i>Figura 57: Dependencia de la Pf con la acidificación intracelular de oocitos que expresan el hetero- dímero y monómeros de PIP2 en diferentes relaciones de masa.....</i>	<i>114</i>

Figura 58: Análisis de co-evolución de las subfamilias de acuaporinas vegetales TIP, NIP, SIP y PIP. 117

Figura 59: Modelo propuesto

.....12
8

Índice de Tablas

<i>Tabla 1: AQP con estructura resuelta</i>	<i>22</i>
<i>Tabla 2: Expresión funcional y selectividad a sustratos estudiada para algunas acuaporinas de plantas seleccionadas como representativas de su grupo.....</i>	<i>24</i>
<i>Tabla 3. Vectores.</i>	<i>37</i>
<i>Tabla 4. Primers.....</i>	<i>38</i>
<i>Tabla 5. Detalle de clonados.....</i>	<i>38</i>
<i>Tabla 6: Oligonucleotidos sintetizados para la obtención de mutantes de BvPIP2;1</i>	<i>40</i>
<i>Tabla 7: Enzimas de restricción utilizadas para la digestión de los ADNc plasmídico</i>	<i>42</i>

Abreviaturas

AQP	acuaporina
ARNm	ácido ribonucleico mensajero
BSA	seroalbúmina bovina
DMSO	dimetilsulfóxido
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etildiamino N, N, N ^{''} , N ^{''} -tetraacético
EGTA	ácido etilenglicol-bis (□ aminoetileter) N, N, N ^{''} , N ^{''} -tetraacético
ER	enzima de restricción
GlpF	transportador de glicerol bacteriano
MDS	simulación de dinámica molecular
MES	ácido 2 (N-morfilo) etano sulfónico
MIP	proteínas intínsecas de membrana
OAP	arreglos ortogonales de proteínas
pH _{int}	pH intracelular
P _f	coeficiente de permeabilidad osmótica
PIP	acuaporina vegetal intrínseca de membrana plasmática
PMSF	fluoruro de fenilmetilsulfonilo
RE	retículo endoplásmico
RMSF	fluctuación cuadrática media
SDS	dodecil sulfato sódico
SNARE	<i>Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor Attachment Receptor</i>
TMR-Dextrano	tetra-metil-rodamina
dextrano Tris	hidroximetilaminometano
VMP	vesícula de membrana plasmática

Aclaraciones

Algunos términos utilizados en esta Tesis han sido expresados en idioma inglés. Esta excepción fue utilizada para aquellos términos que pueden ver reducida su significación al ser traducidos al castellano. En todos los casos de este tipo, el término en cuestión ha sido distinguido mediante el uso de caracteres en itálica (por ejemplo, *loop*).

Parte de esta Tesis Doctoral se realizó en el Instituto de Biodiversidad y Biología Experimental y Aplicada (IBBEA), CONICET-UBA, en la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires.

Acuaporinas, filogenia.

Durante los años „80s, se identificó en diversos organismos una nueva familia de proteínas, denominada MIP (por el inglés, *Major Intrinsic Proteins*) cuyos miembros presentaban una alta identidad de secuencia aunque sus funciones no estaban claras (Pao et al., 1991). Las primeras proteínas que formaron parte de esta familia fueron: la llamada *Major Intrinsic Protein* (denominada *MIP* en primer lugar) encontrada entre las uniones celulares de las células del cristalino bovino (Gorin et al., 1984), la Nodulina-26 de la membrana peribacterodial de los nódulos de raíces (Sandal y Marcker 1988), el facilitador de glicerol llamado GLpF de *Escherichia coli* (Muramatsu y Mizuno, 1989), una proteína intrínseca de tonoplasto (llamada *TIP*) en semillas (Johnson et al., 1990), una proteína llamada *Big Brain* aislada de *Drosophila* (Rao, et al., 1990), y un canal facilitador de glicerol de *Streptomyces coelicolor* (GLY) (Smith y Chater 1988). Todas estas proteínas mostraban un tamaño similar de entre 256 y 281 aminoácidos, y contenían seis pasos transmembrana. Sin embargo, su diferente localización y origen, provocó desconcierto sobre sus funciones, ya que era de esperar que proteínas con funciones similares tuvieran secuencias similares (Alleva et al., 2012).

En 1991, Peter Agre y colaboradores aislaron de diferentes tejidos humanos el ADNc de una proteína que fue denominada originalmente "CHIP28" y mostró tener alta identidad de secuencia con la proteína MIP de las uniones celulares de las células del cristalino bovino (Preston y Agre, 1991). Un experimento crucial demostró que CHIP28 era un canal para el transporte de agua; este canal había sido intensamente buscado por diferentes grupos de biofísicos (entre ellos, Mario Parisi en Argentina). La existencia de este canal podía explicar las grandes permeabilidades que se observaban en ciertas membranas biológicas, como la de los glóbulos rojos (Rich et al., 1968; Paganelli y Solomon, 1957) y la de la piel de las ranas (Dainty and House, 1966). La permeabilidad al agua de estas membranas no era compatible con el modelo de pasaje de agua por difusión pasiva a través de la bicapa lipídica, dada la baja energía de activación ($E_a < 5$ Kcal/mol) y la inhibición reversible de dicha permeabilidad mediada por compuestos mercuriales (Paganelli y Solomon, 1957; Macey, 1984). Agre y colaboradores ensayaron la permeabilidad osmótica de membranas que expresaban la proteína CHIP28 (ahora nombrada AQP1), por síntesis *in vitro* del ARNc que codificaba para la misma y su posterior inyección en oocitos de *Xenopus laevis*. Los oocitos que expresaban CHIP28 fueron sometidos a un gradiente hipo-osmótico, y su cambio de volumen permitió corroborar la alta capacidad para el transporte de agua de esta proteína (Preston et al., 1992; Agre et al., 1993). Este descubrimiento le valió el Premio Nobel de Química en 2003 a Peter Agre (compartido con Roderick MacKinnon, por sus estudios estructurales sobre los canales de potasio).

Más tarde, por posterior identificación de otras proteínas aisladas de plantas y mamíferos, con similar capacidad para transportar agua, se acuñó el término de "acuaporinas" (AQP) para este grupo de canales (Preston y Agre, 1991). Así, la proteína CHIP28 fue renombrada AQP1, y el prototipo original MIP de las uniones celulares de las células del cristalino bovino, fue llamado AQP0. Sin embargo, aún hoy, los términos MIP y AQP se utilizan como sinónimos.

Actualmente se acepta que las acuaporinas son una familia de proteínas integrales de membrana que facilitan el transporte de agua y, en algunos casos, de solutos pequeños no cargados (glicerol, urea, amonio, metaloides e incluso gases, como dióxido de carbono, entre otros); sin embargo, la principal característica de los miembros de esta familia es que son parte de un árbol evolutivo de proteínas que facilitan el transporte de agua como característica ancestral (Soto et al., 2012). El tiempo en el que se consideraba a las AQP como simples canales de agua quedó en el pasado, y hoy en día cada vez más reportes apuntan a que las AQP son canales multifunción. Estas proteínas se encuentran en distintos reinos de la vida: Protozoa, Plantae, Fungi, Animalia, Bacteria y Archea (Zardoya, 2005; Campbell et al., 2008), e incluso en virus (Gazzarrini et al., 2006) (Figura 1), lo que sugiere la existencia de una presión de selección positiva para estas proteínas.

Las acuaporinas han sido ampliamente estudiadas en plantas y mamíferos, pero es en plantas donde se encuentra la mayor cantidad de isoformas distintas. El número total de acuaporinas en plantas es mucho mayor que el hallado en otros reinos: se encontraron 35 genes en el genoma de *Arabidopsis* (Johanson et al., 2001), 33 en el de arroz (Sakurai et al., 2005) y 36 en el de maíz (Chaumont et al., 2001a), comparado con 4 y 13 genes encontrados en levaduras y animales, respectivamente (Pettersson et al., 2005; Verkman, 2005). Algunos autores plantean que la diversidad de isoformas hallada en las plantas podría estar en relación con la necesidad de éstas de responder apropiadamente a cambios ambientales constantes (Hachez et al., 2006).

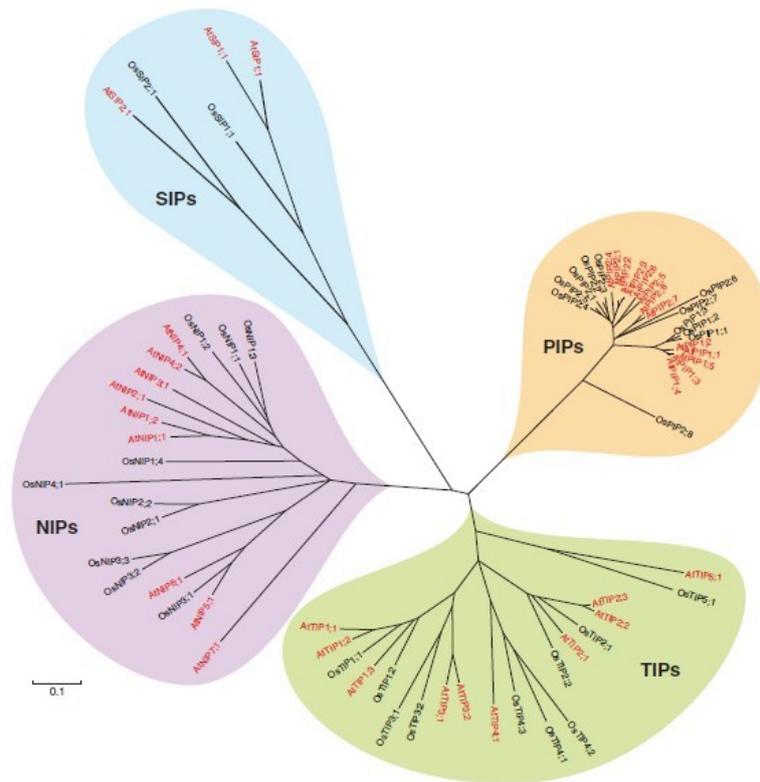


Figura 2: Análisis filogenético de AQPs de *Arabidopsis* y arroz.

Se muestra la relación entre AQP de *Arabidopsis* (en rojo) y arroz (en negro) pertenecientes a las subfamilias PIP (por *plasma membrane intrinsic protein*), TIP (por *tonoplast intrinsic protein*), NIP (por *nodulin 26-like intrinsic protein*) y SIP (por *small neutral intrinsic protein*). El largo de la rama es proporcional a divergencia de secuencia de esa proteína con respecto a los otros miembros de la familia. La escala de distancia representa la distancia evolutiva, expresada como número de sustituciones por aminácido. Tomado de Maurel et al., 2015.

Tanto la clasificación aquí mencionada, que aún se mantiene en la literatura, como otros reportes que incluyen en su análisis proteínas con una identidad de secuencia aminoacídica menor al 15%, muestran incongruencia entre los árboles filogenéticos de los genes de AQP de plantas y de los organismos (Zardoya and Villalba, 2001; Zardoya, 2005). En un estudio evolutivo reciente, donde sólo fueron analizadas acuaporinas con una identidad aminoacídica mayor al 25% y se usaron secuencias bien caracterizadas de plantas y vertebrados, se logró por primera vez congruencia entre los árboles filogenéticos de AQPs y de organismos (Soto et al., 2012). Este tipo de análisis permitió definir *clusters* de genes ortólogos entre AQP de vertebrados y de plantas con flor; de esta forma, la posible función de AQP individuales puede ser predicha teniendo en cuenta la función de su correspondiente gen ortólogo en *Arabidopsis thaliana* y *Homo sapiens*. Además, por medio de este análisis se reveló que cada subfamilia de AQP de plantas estaba relacionada con una subfamilia de AQP de animales, mostrando un patrón de transferencia vertical que predice la presencia de al menos 4 grandes familias de acuaporinas en el ancestro eucariota (A-D), a partir de las cuales derivaron las 4 subfamilias de AQP de plantas (*PIP-like*, *TIP-like*, *NIP-like*, *SIP-like*) y animales (*AQP1-like*, *AQP8-like*, *AQP3-like*, *AQP11-like*) (Figura 3).

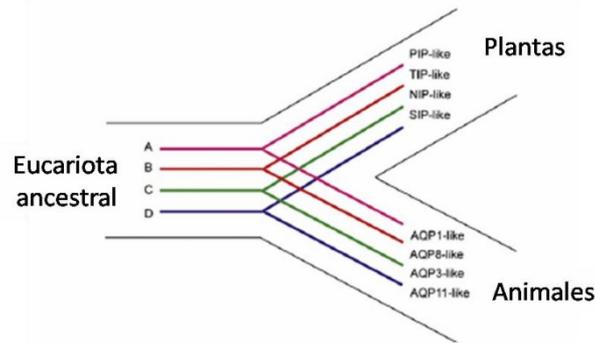


Figura 3: Evolución de la superfamilia MIP en plantas y animales vertebrados.

En este esquema se describe un hipotético organismo eucariota ancestral que portaba al menos 4 genes de AQP de distintas subfamilias: uno dio origen a las PIPs y AQP1, otro dio origen a las TIPs y AQP8, un tercero dio origen a las NIPs y AQP3, y un cuarto dio origen a las SIPs y AQP11. Así quedan definidos cuatro *clusters* de genes ortólogos entre AQP animales y de plantas que tienen un mismo gen ancestral y por lo tanto comparten una función ancestral común. Tomado de Soto et al. (2012).

Por otro lado, Soto y colaboradores identificaron 19 *clusters* de genes ortólogos entre acuaporinas presentes en plantas con flor: 3 tipo PIP, 7 tipo TIP, 6 tipo NIP y 3 tipo SIP (Soto et al., 2012). Si se compara el porcentaje de identidad aminoacídica entre los *clusters* más estudiados de AQP en plantas mono y dicotiledóneas como un estimador de su tasa evolutiva, se encuentra que entre los tres *clusters* de PIP (PIPCLI correspondientes al grupo de proteínas tipo PIP1, y PIPCLII y PIPCLIII correspondientes al grupo de proteínas tipo PIP2) y entre TIPCLII, TIPCLIV, TIPCLV y NIPCLV existe una baja tasa de evolución, sugiriendo que entre estos *clusters* existe un *constrain* evolutivo mayor en comparación con el de otras subfamilias (Figura 4). En particular, se destaca la alta identidad aminoacídica que presentan los grupos PIP1 y PIP2. Para explicar la posible razón de esta alta identidad aminoacídica, Zardoya y Villalba propusieron que los grupos PIP1 y PIP2 emergieron recientemente (Zardoya and Villalba, 2001). Sin embargo, está bien establecido que las subfamilias PIP1 y PIP2 se separaron mucho antes de la divergencia de las plantas en monocotiledóneas y dicotiledóneas, y, en forma opuesta a lo propuesto por Zardoya y Villalba, recientemente se encontraron proteínas representantes de los grupos PIP1 y PIP2 de la subfamilia PIP en el musgo *Physcomitrella patens* (Anderberg et al., 2012). Usando otra aproximación, Soto y colaboradores proponen que este alto *constrain* evolutivo podría deberse a un *constrain* funcional (Soto et al., 2012). Este *constrain* funcional es sustentado por reportes que muestran que existe una interacción física y funcional entre distintos miembros de esta subfamilia (ver sección *PIP, como canales multiméricos*, página 32).

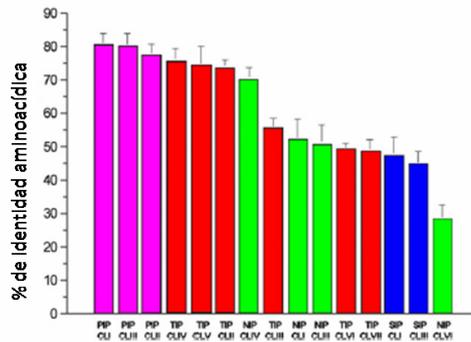


Figura 4: Análisis del *constrain* evolutivo en AQP de plantas.

Para estimar el *constrain* evolutivo, se compara el porcentaje de identidad de aminoácidos entre plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas entre grupos de genes ortólogos. Los valores representan media \pm SD. En violeta se indican los resultados de la subfamilia PIP, en rojo los resultados correspondientes a la subfamilia TIP, en verde los resultados de la subfamilia NIP, y en azul los resultados de la subfamilia SIP. Tomado de Soto et al. (2012).

Acuaporinas, estructura.

Con respecto a su estructura, todas las acuaporinas parecen compartir las siguientes características: (i) son proteínas transmembrana, (ii) tienen seis hélices alfa transmembrana, con los extremos N- y C-terminales localizados en el citosol, (iii) poseen dos mitades duplicadas, cada una de las cuales incluye un tándem de aminoácidos Asparagina (N) - Prolina (P) – Alanina (A) altamente conservados -conocidos como *motivo NPA* (Jung et al., 1994)-, y (iv) se organizan como tetrámeros (Verbavatz et al., 1993; Murata et al., 2000; Hedfalk et al., 2006) (Figura 5). Una característica común de todos los genes AQP es que se dividen en dos mitades muy similares orientadas en direcciones opuestas, cada una con 3 dominios transmembrana y orientadas 180° una respecto de la otra, como repeticiones en tándem. Esta repetición en tándem está conservada en todas las acuaporinas y probablemente refleje el origen evolutivo de las mismas: esta simetría podría deberse a una duplicación interna de un gen ancestral anterior a la diversificación de la familia (Zardoya and Villalba, 2001

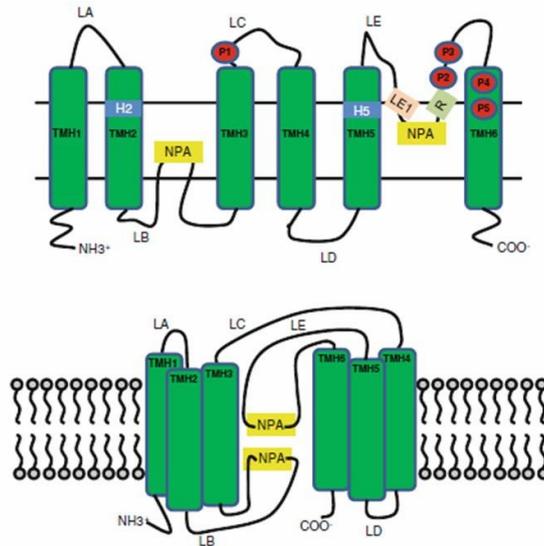


Figura 5: Representación esquemática de un monómero de aquaporina.

Se muestran los seis pasos transmembrana (TMH1-TMH6), conectados por tres *loops* extracelulares (LA, LC, LE) y dos *loops* intracelulares (LB, LD). Se muestran los residuos conservados del primer filtro de selectividad (motivos NPA) que se encuentran en las hélices cortas de los *loops* B y E; estos *loops*, al plegarse hacia el interior de la membrana plasmática, forman el poro del canal. También se muestran los cuatro residuos correspondientes al segundo filtro de selectividad (constricción ar/R): H2, H5, LE1 y R, y las posiciones de los residuos del motivo P1-P5, compuesto por 5 aminoácidos localizados en los *loops* extracelulares LC y LE, y en el dominio el transmembrana 6 (TMH6). Tomado de Perez Di Giorgio et al., 2014.

En la Figura 5 se muestran esquemáticamente los motivos NPA, que presentan un gran nivel de conservación en la secuencia primaria y que desempeñarían un papel crítico en la selectividad de estos canales a distintos solutos por carga y tamaño (Wallace and Roberts, 2004). Un segundo filtro de selectividad, conocido como la constricción aromático-arginina (ar/R), está compuesto por cuatro residuos, dos en las hélices TMH2 y TMH5 (denominadas H2 y H5, respectivamente), y dos en el *loop* E (LE1 y R). Esta constricción constituye la sección más estrecha del poro y se sugiere que los aminoácidos implicados son determinantes para la especificidad a sustrato de las AQP (Perez Di Giorgio et al., 2014); mientras que en las acuaporinas clásicas (acuaporinas que actúan principalmente como canales que permiten el paso de agua) el ancho de este poro es de 3 Å –es decir, apenas un poco más grande que el diámetro de la molécula (2.8 Å)-, en las acuagliceroporinas (acuaporinas que actúan principalmente como transportadores de glicerol) es de 3.4 Å (Gonen and Walz, 2006). Este motivo se localiza en la parte extracelular de la entrada del poro, justo por encima de los dos motivos NPA (Figura 6). A pesar de que las dimensiones del poro de algunas acuagliceroporinas permitirían el potencial paso de protones a través de la membrana, casi todas las acuaporinas son altamente selectivas para impedir el pasaje de estos iones, y se observó que tanto los motivos NPA como la constricción ar/R estarían implicados en el mecanismo de exclusión de protones del poro (Murata et al., 2000; Beitz et al., 2006). También se ha propuesto que la constricción ar/R se relaciona con la unión, por enlaces tipo puente de hidrógeno, a moléculas no cargadas tales

como agua y glicerol (Wallace and Roberts, 2004). Actualmente se tiene una descripción detallada a nivel molecular del modo en que el agua y los solutos se transportan a través de las acuaporinas, en gran parte debido a los estudios estructurales realizados en GlpF (acuaporina bacteriana que transporta agua y glicerol) y AQP1 (acuaporina 1 de mamíferos) (Maurel et al., 1994; Agre et al., 1999). El poro formado por AQP1 permite el paso de 3×10^9 moléculas de agua por monómero por segundo (Murata et al., 2000), siendo esta una de las AQP con mayor permeabilidad al agua. Por otro lado, la discriminación entre AQP permeables a moléculas de agua (AQP) o a moléculas de glicerol (acuagliceroporinas, nombradas como GlpF), parece estar dado por el motivo P1-P5, compuesto por 5 aminoácidos localizados en los *loops* extracelulares LC y LE, y en el dominio el transmembrana 6 (TMH6) (Froger et al., 1998) (Figura 5).

Con respecto a su estructura cuaternaria, se sabe que al igual que muchas otras proteínas transmembrana con topología alfa-hélice, las acuaporinas se ensamblan formando tetrámeros (Figura 6), pero se diferencian de otros canales multiméricos en cuanto a conformación del poro. En la mayoría de los canales multiméricos, los monómeros en conjunto conforman el poro del canal en el centro, como es el caso de los canales de potasio KcsA o el receptor de acetilcolina (Uysal et al., 2011; Miyazawa et al., 2003). Por el contrario, en el caso de las acuaporinas, cada monómero funciona como un poro independiente (Verbavatz et al., 1993; Preston et al., 1993; Shi et al., 1994).

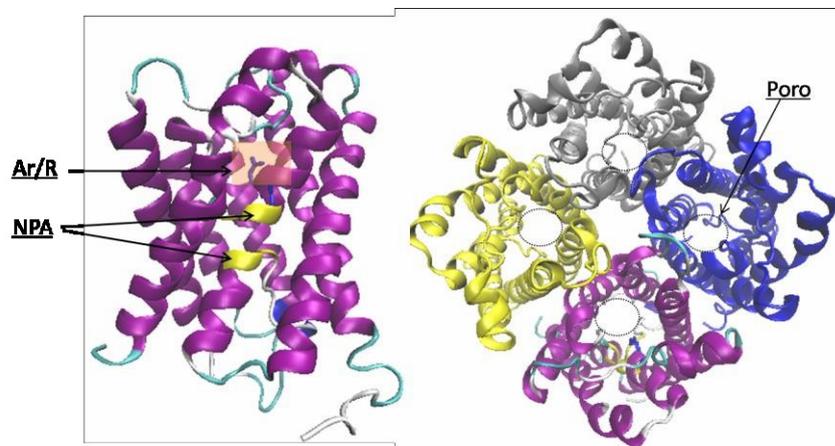


Figura 6: Estructura cuaternaria de una acuaporina vegetal.

- (A) Vista lateral de un monómero de SoPIP2;1 donde se indican la región ar/R (en naranja) y los motivos NPA (en amarillo). También se indica en *licorice* el residuo de Arginina 225 (azul) que forma parte de la constricción ar/R en SoPIP2;1. (B) Vista superior del tetrámero de SoPIP2;1 donde se indican cada uno de los monómeros con un color distinto: cadena A (violeta), B (amarillo), C (azul) y D (gris), y el poro por donde se transporta el agua (y los solutos) en cada monómero. Generamos la imagen con el programa VMD 1.9.2 utilizando las coordenadas del PDB 2B5F, correspondiente a la estructura cristalográfica de SoPIP2;1 en conformación abierta.

El arreglo tetramérico de las acuaporinas fue observado por primera vez por microscopía crioelectrónica de cristales bidimensionales de PvTIP3;1 (Daniels et al., 1999) y de SoPIP2;1 (Fotiadis et al., 2001; Kukulski et al., 2005). Más tarde, la estructura cuaternaria fue confirmada

por cristalografía de rayos X a partir de cristales tridimensionales de SoPIP2;1 con mayor resolución (Hedfalk et al., 2006), tanto en estructura abierta como cerrada, lo que permitió un esclarecimiento sobre los mecanismos de apertura y cierre (*gating*) de estos canales. En los últimos años, se ha logrado resolver la estructura cristalográfica de distintas variantes de 15 proteínas pertenecientes a la superfamilia MIP, todas ellas en forma de homo-tetrámeros (Tabla 1). Si bien hoy día se sabe que todas las acuaporinas se ensamblan como tetrámeros en las membranas biológicas, por mucho tiempo se asumió que las acuagliceroporinas eran activas como monómeros (Duchesne et al., 2001). En estudios recientes, se confirmó que las acuagliceroporinas también oligomerizan en forma tetramérica, pero las interacciones monómero-monómero entre subunidades son más débiles que las observadas para las acuaporinas clásicas, como AQP1 (Galka et al., 2008).

En el caso de las acuaporinas vegetales, se cuenta únicamente con la estructura resuelta de una PIP2 homo-tetramérica de espinaca (SoPIP2;1 de *Spinacia oleracea*) en distintas conformaciones: i- abierta (2B5F.PDB) (Törnroth-Horsefield et al., 2005); ii- cerrada unida a Cd^{2+} (1Z98.PDB) (Törnroth-Horsefield et al., 2005); iii-mutante S115E cerrada (3CLL.PDB) (Nyblom et al., 2009); iv- doble mutante S115E/S274E cerrada (3CN5.PDB) (Nyblom et al., 2009); v- mutante S274 cerrada unida a Cd^{2+} (3CN6.PDB) (Nyblom et al., 2009); vi- cerrada a pH interno ~ 6 unida a Hg^{2+} (4IA4.PDB) (Frick et al., 2013a); y, vii- cerrada unida a Hg^{2+} , Cd^{2+} y beta-octilglucosidasa (4JC6.PDB) (Frick et al., 2013b).

Tabla 1: AQP con estructura resuelta.

PROTEINA y ORGANISMO	RESOLUCIÓN (Å)	PDB ID
AQP0 <i>Bos taurus</i>	2.24	1YMG, 2B6P, 2C32
AQP0 <i>Ovis aries</i>	3.00	1SOR, 2B6O, 3M9I
AQP1 <i>Bos taurus</i>	2.20	1J4N
AQP1 <i>Homo sapiens</i>	3.80	1FQY, 1H6I, 1IH5
AQP2 <i>Homo sapiens</i>	2.75	4NEF
AQP4 <i>Homo sapiens</i>	1.80	3GD8
AQP4 <i>Rattus norvegicus</i>	3.20	2ZZ9, 2D57
AQP5 <i>Homo sapiens</i>	2.00	3D9S, 3NE2
AQPM <i>A. fulgidus</i>	3.00	3NE2
AQPM <i>M. marburgensis</i>	1.68	2EVU, 2F2B
AQPZ <i>A. tumefaciens</i>	2.01	3LLQ
AQPZ <i>E. coli</i>	2.50	1RC2, 2O9D, 2O9E, 2O9F, 2O9G,
GlpF <i>E. coli</i>	2.20	1LDA, 1LDI, 1LDF, 1FX8
SoPIP2;1 <i>Spinacia oleracea</i>	2.10	1Z98, 2B5F, 3CLL, 3CN5, 3CN6,
Aquagliceroporina de <i>P. Falciparum</i>	2.05	3C02

Todas las estructuras resueltas hasta la fecha corresponden a homo-tetrámeros, sin embargo algunos reportes apuntan a que la hetero-tetramerización también sería común entre distintos miembros de esta familia. En el caso de las AQP animales, la hetero-tetramerización fue reportada para AQP1 (Jung et al., 1994) y AQP2 (Sohara et al., 2006), entre proteínas mutantes y proteínas *wild-type*. También AQP4 es capaz de formar hetero-tetrámeros entre sus isoformas AQP4-M1 y AQP4-M23, que corresponden a dos variantes de splicing de AQP4, una comenzando en la Met-1 y la otra, más corta, comenzado en la Met-23 (Lu et al., 1996). Estas dos isoformas son capaces de formar hetero-tetrámeros (Neely et al., 1999) y también pueden formar arreglos de proteínas de mayor tamaño en las membranas biológicas, llamados arreglos ortogonales de proteínas o OAPs (por su sigla en inglés, *Orthogonal Arrays of Particles*) (Rash et al., 1998; Sorbo et al., 2008; Rossi et al., 2012). Resulta interesante que homo-tetrámeros de M23, pero no de M1, se encuentran en el centro de los OAPs (Jin et al., 2011). Esta localización polarizada de homo-tetrámeros y hetero-tetrámeros de AQP4 en los OAPs no se debería únicamente al impedimento estérico de la porción N-terminal de AQP4-M1, sino que características específicas de la secuencia aminoacídica primaria de la porción N-terminal condicionarían el ensamblaje (Hiroaki et al., 2006).

En el caso de las AQP vegetales, la formación de arreglos multiméricos fue demostrada por primera vez entre distintos parálogos de PIPs y TIPs en oocitos de *Xenopus* y levaduras, respectivamente (Fetter et al., 2004; Murozuka et al., 2013). Sin embargo, se desconocía, hasta el momento de realizar los experimentos presentados en esta Tesis, el tipo de arreglos multiméricos que se forman. En el caso de las PIPs, se ha reportado que PIP1 y PIP2 son parálogos capaces de interactuar, y esta interacción física y funcional fue probada no solo en el sistema de expresión de oocitos, sino también en levaduras y protoplastos, lo que indicaría una tendencia intrínseca de estas proteínas a interactuar, independientemente del contexto celular o el organismo en el que se encuentren co-expresadas (Zelazny et al., 2009; Otto et al., 2010; Bienert et al., 2012; Jozefkowicz et al., 2013; Yaneff et al., 2014).

Acuaporinas, actividad biológica.

Teniendo en cuenta la clasificación propuesta por Soto y colaboradores, las acuaporinas del grupo A (*AQP1-like* y *PIP-like*) compartirían la característica ancestral de ser transportadores de agua y dióxido de carbono (Chaumont et al., 2001; Uehlein et al., 2008), y más tarde habrían adquirido la capacidad de transportar otros solutos, tales como glicerol y peróxido de hidrógeno (Biela et al., 1999; Dynowski et al., 2008; Bienert et al., 2014).

Las acuaporinas del grupo B (*AQP8-like* y *TIP-like*) presentan como característica ancestral la capacidad de transportar agua y urea (Gerbeau et al., 1999). Las TIPs pueden además transportar amonio (Jahn et al., 2004). Muchos miembros de este grupo también muestran la capacidad de transportar glicerol (Gerbeau et al., 1999); sin embargo, el significado fisiológico

de este transporte en plantas, en particular durante la tolerancia a stress osmótico, todavía no está resuelto (Maurel et al., 2015).

Todas las acuaporinas del grupo C (AQP3-*like* y NIP-*like*) pertenecen al grupo de las acuagliceroporinas, ya que presentan la capacidad de transportar agua y glicerol; sin embargo, el glicerol no parece ser una característica ancestral de este grupo. En cambio, el transporte de metaloides sí parece ser una característica ancestral de este grupo, ya que tanto las NIPs, como AQP7 y AQP9, demostraron ser capaces de transportar arsenito (revisado en Pérez di Giorgio et al., 2014). Cada vez son más los reportes que muestran que las NIPs cumplen un rol importante en el transporte de nutrientes minerales, tales como metales beneficiosos (B, Si, Se) o tóxicos (As, Sb), y en cambio, son muy pobres transportadores de agua (Ma et al., 2006; Mitani-Ueno et al., 2011; Pommerrenig et al., 2015; Bienert et al., 2008; Zhao et al., 2010). Por otro lado, las NIPs también parecen ser buenos transportadores de solutos orgánicos pequeños (tales como formamida y ácido láctico) (Wallace and Roberts, 2004; Choi and Roberts, 2007).

Por último, las acuaporinas del grupo D (AQP11-*like* y SIP-*like*) constituyen el grupo más diverso de AQPs. Aunque las SIPs muestran un poro conformacionalmente similar al resto de las AQPs, se ha observado que son pobres transportadores de agua. Algunas AQPs de este grupo muestran un motivo inusual NPC (presentes por ejemplo en AQP11 y AtSIP1;2) o NPT (presentes por ejemplo en AQP12 y AtSIP1;1) en el *loop* B (en lugar del clásico motivo NPA), lo que podría explicar las diferencias funcionales halladas, mientras que el motivo NPA del *loop* E se encuentra conservado. Además los miembros de este grupo presentan un motivo N-terminal más corto, y mostraron ser capaces de transportar únicamente agua (y no otros solutos) al ser expresadas en sistemas heterólogos (Maeshima and Ishikawa, 2008).

Los oocitos de *Xenopus* se han convertido en el sistema de elección heterólogo para evaluar la actividad biológica de acuaporinas. Fue este sistema de expresión el que permitió establecer de forma definitiva que las acuaporinas tienen actividad de canales de agua (Preston et al., 1992; Agre et al., 1993). Por supuesto, también se han utilizado otros sistemas de expresión heterólogos para estudiar la selectividad de las acuaporinas, incluyendo levaduras, bacterias, y la expresión heteróloga y posterior purificación y reconstitución en liposomas (Tabla 2).

Tabla 2: Expresión funcional y selectividad a sustratos estudiada para algunas acuaporinas de plantas seleccionadas como representativas de su grupo.

Sub familia	isoforma	sustrato	Sistema de expresión	Ensayo de transporte	Referencias
PIP	AtPIP2;1	Agua	Proteoliposomas	Cambio de volumen	Verdoucq et al., 2008
	ZmPIP2;5	H ₂ O ₂	Levaduras	Ensayos de toxicidad	Bienert et al., 2014

	BvPIP2;2	Agua	Oocitos de <i>Xenopus</i>	Cambio de volumen	Bellati et al., 2010
	NtAQP1	CO ₂	Oocitos de <i>Xenopus</i> y levaduras	Cambio de pH intracelular	Uehlein et al., 2003; Otto et al.,
	ZmPIP1	Ácido bórico	Oocitos de <i>Xenopus</i>	Espectroscopia de masas con plasma acoplado (ICP-MS)	Dordas et al., 2000
	NtAQP1	Glicerol	Oocitos de <i>Xenopus</i>	Marcación isotópica	Biela et al., 1999
TIP	AtTIP1;1	Agua	Oocitos de <i>Xenopus</i>	Cambio de volumen	Gerbeau et al., 1999
	NtTIPa	Urea	Oocitos de <i>Xenopus</i>	Marcación isotópica	Gerbeau et al., 1999
	NtTIPa	Glicerol	Oocitos de <i>Xenopus</i>	Marcación isotópica	Gerbeau et al., 1999
	AtTIP1;2	H ₂ O ₂	Levaduras	Fluorescencia intracelular	Bienert et al., 2007
	TaTIP2	NH ₃	Levaduras	Cambio de pH extracelular	Jahn et al., 2004
	ZmTIP1;1	H ₂ O ₂	Levaduras	Ensayos de toxicidad	Bárzana et al., 2014
NIP	AtNIP5;1	B(OH) ₃	Oocitos de <i>Xenopus</i>	Concentración intracelular	Takano et al., 2006
	OsNIP2;1	Si(OH) ₄	Oocitos de <i>Xenopus</i>	Marcación isotópica	Ma et al., 2006
	AtNIP5;1	As(OH) ₃	Oocitos de <i>Xenopus</i>	Concentración intracelular	Mitani-Ueno et al., 2011
	BjNOD26	Agua	Proteoliposomas	Cambio de volumen	Hwang et al., 2010

	BjNOD26	NH ₃	Proteoliposomas	Cambio de pH intracelular	Hwang et al., 2010
SIP	VvSIP1	Agua	Levaduras y proteoliposomas	Cambio de volumen	Noronha et al., 2014

Es interesante notar que mientras los ensayos funcionales de selectividad a sustratos se han limitado a unas pocas isoformas de AQP representativas (algunas de las cuales se muestran en la Tabla 2), el modelado por homología se ha utilizado para explorar en un sentido más amplio la selectividad al transporte de las acuaporinas vegetales, con especial atención en el filtro de selectividad Ar/R (X) (Wallace y Roberts, 2004; Bansal y Sankararamakrishnan, 2007). Los estudios *in silico* junto con el análisis de alineamientos múltiples y los resultados de ensayos de mutagénesis, permitieron encontrar algunos residuos claves para la selectividad a sustratos. Por ejemplo, en el caso de las PIP2 de cebada, un residuo de Isoleucina ubicado en el *loop* E (y con alto grado de conservación en otras especies), parece ser un factor clave para el transporte de dióxido de carbono mediado por estas proteínas, pero no afecta su capacidad de transportar agua (Mori et al., 2014).

Regulación por modificaciones co- y post-traduccionales.

Las acuaporinas vegetales son reguladas principalmente por fosforilación, pero también por metilación, deaminación, acetilación, ubiquitinilación y glicosilación (Verdoucq et al., 2008; Vera-Estrella et al., 2004; Santoni et al., 2006; Casado-Vela et al., 2010; di Pietro et al., 2013). Se ha demostrado mediante estudios *in vitro* e *in vivo*, utilizando anticuerpos específicos anti-péptidos fosforilados de AQP y espectroscopía de masa, que varios residuos de Serina se encuentran fosforilados *in vivo* en el N- y en el C-terminal de PIP1 y PIP2 (revisado en Li et al., 2014). Diferentes cambios ambientales inducen la fosforilación de las acuaporinas vegetales, como ser la sequía, el estrés salino u oxidativo; éstas proteínas muestran un motivo de fosforilación conservado en el *loop* B y múltiples (hasta tres) sitios de fosforilación interdependientes en el C-terminal (Johansson et al., 1996, 1998; Nuhse, 2004; Van Wilder et al., 2008; Prak et al., 2008). Este es el caso por ejemplo de la proteína de semillas de arveja PvTIP3;1 (en la Ser-7), de la acuaporina de espinaca SoPIP2;1 (en las Ser-274 y Ser-277), de la acuaporina del nódulo fijador de nitrógeno GmNOD26 (en la Ser-262) y de varias acuaporinas PIP2 de *Arabidopsis* (Weaver and Roberts, 1992; Miao et al., 1992; Johnson and Chrispeels, 1992; Johansson et al., 1996; Daniels and Yeager, 2005; Prak et al., 2008). Se realizaron ensayos de expresión heteróloga en oocitos de *Xenopus* para estudiar el rol de la fosforilación sobre la actividad de acuaporinas individuales y se observó que la actividad de las acuaporinas PvTIP3;1, GmNOD26 y SoPIP2;1 se incrementa en presencia de agonistas de AMPc o de

inhibidores de fosfatasa, respectivamente, a través de un mecanismo de gatillado del canal (Maurel et al., 1995; Johansson et al., 1998; Guenther et al., 2003). Estos estudios realizados con proteínas mutantes de AQPs permitieron encontrar los residuos de serina fosforilados que participan de este mecanismo de regulación. Por ejemplo, la mutación de un residuo de Serina conservado en el *loop* B de todas las PIPs reduce la *P_f* de las membranas que expresan las proteínas mutantes en un 50% en comparación con las proteínas *wild-type* (Maurel et al., 1995; Johansson et al., 1998). A su vez, la determinación de la estructura de la acuaporina SoPIP2;1 en conformación abierta y cerrada, y los estudios de dinámica molecular, permitieron comprender el rol que cumplen las serinas fosforiladas en el mecanismo de gatillado del canal (Hedfalk et al., 2006; Törnroth-Horsefield et al., 2005). Este mecanismo se describe en detalle en la sección *Regulación de la apertura y cierre de las PIP (gating)*, página 27. Respecto de los otros mecanismos de regulación, fue reportado que la ubiquitinación de la proteína AtPIP2;1 de *Arabidopsis* actuaría como una señal de degradación en retículo endoplasmático (RE) (Lee y Kwon, 2009). Por otro lado, la primera evidencia de metilación en acuaporinas se encontró en esta misma proteína AtPIP2;1 (Santoni et al., 2006).

Uno de los mecanismos de regulación menos estudiado ha sido la glicosilación. En AQP animales, se vio que tanto para AQP1 como para AQP2 la glicosilación es importante para el direccionamiento e inserción de estos canales en la membrana plasmática (Baumgarten et al., 1998; van Hoek et al., 1995), y en el caso de AQP2 este mecanismo de regulación post-trasduccional es también importante para la salida del canal del aparato de Golgi y su correcta llegada a membrana plasmática (Hendriks et al., 2004).

Si bien la mayoría de las AQP de plantas no muestran un estado glicosilado, este tipo de modificación ha sido observado para GmNOD26 (Miao et al., 1992) y McTIP2;1 (Vera-Estrella et al., 2004). En este último caso, la glicosilación parece ser necesaria para la re-localización subcelular del canal, desde el tonoplasto hacia vesículas intracelulares, bajo un estímulo de estrés osmótico. También se ha propuesto que la N-glicosilación podría ser necesaria para la redistribución de AQPs en respuesta a niveles variables de solutos (Hove and Bhave, 2011). En el caso de las PIPs, no se han encontrado ninguna AQP glicosilada en forma nativa a la fecha, y se desconoce si la glicosilación cumple algún rol en la localización o funcionalidad del canal.

Regulación de la apertura y cierre de las PIP (*gating*).

Cuando se descubrieron las acuaporinas se asumió que éstas eran canales constitutivamente abiertos capaces de transportar agua siempre que haya un gradiente osmótico. Sin embargo, los estudios de regulación de la permeabilidad de las AQP animales AQP3, AQP6 y AQP0 realizados a principios de los años '90, mostraron que estas acuaporinas son sensibles a pH. Por ejemplo, la AQP3 mostró ser permeable a glicerol y agua a pH 7.0, pero se cierra a pH extracelular menor a 6.0 (Zeuthen and Klaerke, 1999). En contraste, se reportó que la AQP6

solo se abre si el pH extracelular es mayor a 5.5 (Yasui et al., 1999; Hazama et al., 2002). En el caso de las AQP vegetales, se descubrió que la permeabilidad al agua de vesículas de membrana plasmática aisladas de *Arabidopsis thaliana* o *Beta vulgaris* se inhibían por pH ácido intracelular (pero no extracelular) o por presencia de cationes divalentes (Gerbeau et al., 2002; Alleva et al., 2006). Más adelante, se demostró que acuaporinas vegetales aisladas y expresadas individualmente en el sistema de expresión heterólogo de oocitos de *Xenopus*, estaban sometidas a regulación por pH citosólico (Tournaire-Roux et al., 2003). En este trabajo se demostró por mutagénesis, que una histidina altamente conservada en todas las PIP (His-199) localizada en el *loop* D (de localización intracelular), tendría un rol clave en este mecanismo. Una vez resuelta la estructura cristalina de SoPIP2;1, se propuso un mecanismo por el cual las PIP2 no estarían constitutivamente abiertas sino que pueden encontrarse tanto en su estado abierto como cerrado (Törnroth-Horsefield et al., 2005) (Figura 7). Más aún, mediante experimentos de dinámica molecular se ha podido estudiar la fluctuación que sufre este canal entre el estado abierto y cerrado por cambios en el estado de protonación (Khandelia et al., 2009).

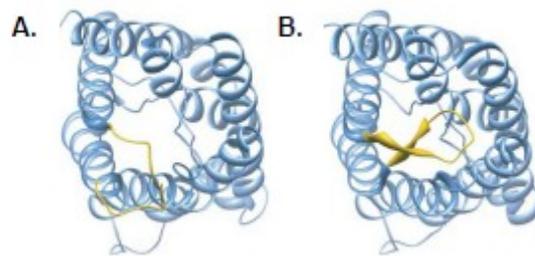


Figura 7: Estructura del poro de SoPIP2;1 en conformación abierta y cerrada.

- (A) Vista superior de un monómero de SoPIP2;1 desde el lado citoplasmático en conformación abierta, mostrando el *loop* D desplazado del poro del canal. (B) En la conformación cerrada se observa al *loop* D ocluyendo el poro del canal e impidiendo el pasaje de agua. Tomado de Khandelia et al., 2009.

La familia PIP, a la que pertenece SoPIP2;1, presenta una gran diferencia estructural respecto a las AQP animales, el *loop* D citoplasmático es 4-7 aminoácidos más largo, lo que le permitiría plegarse sobre el canal y ocluir el poro desde el lado intracelular, por medio de interacciones electrostáticas y puentes de hidrógeno (Figura 7) (Khandelia et al., 2009). Además de esta regulación por pH intracelular (pH_{int}), otros de los mecanismos rápidos de regulación son la mencionada fosforilación y la unión a cationes divalentes. En este último caso, se ha demostrado que la permeabilidad al agua de vesículas de membrana plasmática de *Arabidopsis thaliana* y *Beta vulgaris* disminuye fuertemente en presencia de Ca^{2+} (Gerbeau et al., 2002; Alleva et al., 2006) y en menor proporción frente a otros cationes como Cd^{2+} y Mn^{2+} (Törnroth-Horsefield et al., 2005; Sjövall-Larsen et al., 2006).

En conclusión, tanto la protonación, como la fosforilación y la unión de cationes afectan directamente a la conformación de la proteína, lo que a su vez impacta en su actividad biológica, provocando un gatillado rápido y reversible de los canales de agua (revisado en Maurel et al., 2008). Como se describe en la Figura 8, en la conformación cerrada, el *loop* D citosólico, y en particular la Leu-197 ocluyen el poro del canal. Esta conformación se estabiliza por medio de interacciones electrostáticas y puentes de hidrógeno que ocurren ante la protonación de una histidina conservada del *loop* D y la unión de cationes divalentes al N-terminal de la proteína. Cuando la Ser-115 se fosforila, se rompe esta red de interacciones que mantiene anclado el *loop* D al N-terminal de la proteína, lo que resulta en la apertura del canal. Debido a que el gatillado descrito para SoPIP2;1 involucra residuos de aminoácidos muy conservados en todas las PIP2, es probable que un mecanismo similar actúe en PIPs provenientes de otras especies (Figura 8).

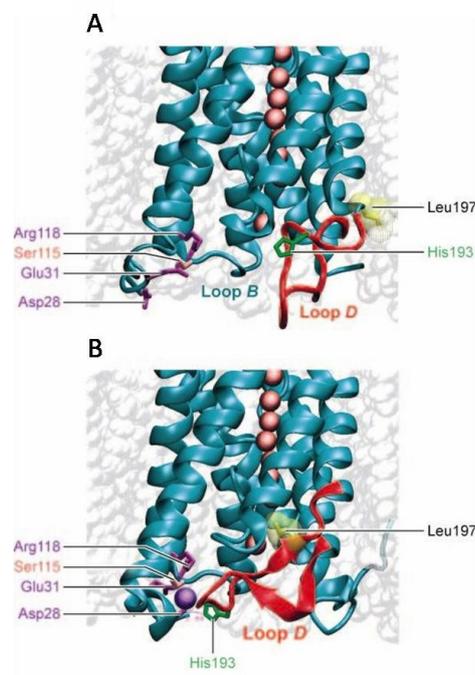


Figura 8: Mecanismo de apertura y cierre (*gating*) de PIP2.

(A-B) Imágenes de simulación que muestran los mecanismos de apertura y cierre de SoPIP2;1, única PIP2 cuya estructura ha sido resuelta en conformación abierta y cerrada hasta la fecha (PDB ID 2B5F y PDB ID 1Z98). Se muestran en forma esquemática las moléculas de agua (en naranja) a través del poro del canal. La His-193 (en verde) está conservada en el *loop* D de todas las PIPs. Los aminoácidos relevantes se muestran en representación *licoriceen* distintos colores. En la conformación abierta (A), la His193 no se encuentra protonada y, por tanto, el *loop* D se encuentra lejos del *loop* citoplasmático B. Por el contrario, la protonación del residuo His-193 (B) permite la interacción con el residuo Asp-28 del N-terminal (en violeta). Esto a su vez conduce un cambio conformacional del *loop* D y lleva a la oclusión del poro por desplazamiento de la cadena lateral hidrófoba del residuo de Leu-197 (en amarillo). La unión de cationes divalentes como el Cd^{2+} o el Ca^{2+} (B; representados como una esfera violeta) podrían también implicar la interacción con un residuo de Asp-28 y un residuo ácido adyacente (Glu-31). Esto llevaría a una estabilización del *loop* D en la conformación cerrada, a través de una red de enlaces de puentes de hidrógeno y de interacciones hidrostáticas, que también involucrarían al residuo de Arg-118. En este modelo, la fosforilación del *loop* B en el residuo de Ser-115 (en naranja), interrumpiría

esta red de interacciones y desestabilizaría al *loop D* para permitir la apertura del canal. Tomado de Maurel et al., 2008.

Regulación por relocalización (*trafficking*).

Dentro de los mecanismos de regulación a corto plazo de las acuaporinas, no sólo se incluyen los mecanismos de apertura y cierre de sus canales, sino también el direccionamiento de las proteínas a diferentes membranas celulares. En este sentido, AQP2 es un ejemplo de este mecanismo de regulación estricta dentro del grupo de acuaporinas animales. AQP2 exhibe una translocación desde el espacio intracelular, en vesículas, a la membrana apical de las células del conducto colector, luego de la unión de la hormona ADH al receptor V2 (Hayashi et al., 1996), lo que permite un ajuste fino de la homeostasis en las células renales. Los eventos posteriores a la unión de la hormona a su receptor implican la fosforilación de AQP2 y la posterior translocación y fusión de las vesículas que contienen este canal con la membrana celular apical. Además se ha propuesto que una vez que AQP2 se encuentra en la membrana plasmática cumple un rol crítico en el incremento del calcio intracelular, lo que actúa como señal de activación rápida de los mecanismos de regulación de volumen celular ante un gradiente hipotónico (Galizia et al., 2008).

Entre las acuaporinas vegetales, el tráfico a membrana plasmática también es un punto crítico para la regulación del transporte de agua, siendo este mecanismo estudiado principalmente en PIPs. Se han descrito varias vías endocíticas capaces de influir en la redistribución de las PIPs a nivel celular. Por ejemplo, en plantas de *Arabidopsis*, el estrés salino induce un cambio en el estado de fosforilación de AtPIP2;1 y su internalización fuera de la membrana plasmática (Prak et al., 2008), lo que a su vez se correlaciona con una disminución de la permeabilidad al agua de la membrana plasmática (Boursiac et al., 2005). Por otro lado, en condiciones de estrés salino o cuando existe acumulación celular de H₂O₂, la endocitosis y exocitosis de AtPIP2;1 desde y hacia la membrana plasmática se incrementa significativamente (Luu et al., 2012; Martiniere et al., 2012; Wudick et al., 2015). Estos datos demuestran que las PIPs son constitutivamente sometidas a endocitosis y exocitosis. La endocitosis dependiente de clatrina es hasta el momento la principal vía endocítica descrita para las PIP2 (Dhonukshe et al., 2007). La interacción con SNAREs (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor*, en inglés) influye en el *trafficking* a membrana plasmática y en la re-localización subcelular de las PIPs (Hachez et al., 2013; Chevalier, 2015). Por ejemplo, la llegada a membrana plasmática de ZmPIP2;5 requiere de la proteína SNARE ZmSYP121 (Besserer et al., 2012). Estos mecanismos complejos y altamente regulados otorgarían plasticidad en el control de la actividad de los canales de agua en respuesta a los rápidos cambios ambientales.

Acuaporinas vegetales, PIP.

Tradicionalmente se designó a las PIPs como aquellas acuaporinas que se ubican en la membrana plasmática de las células vegetales, sin embargo, existe evidencia sólida sobre localizaciones alternativas de estos canales. Estas acuaporinas han sido encontradas no solo en membrana plasmática, sino también en RE y aparato de Golgi (Besserer et al., 2012; Li et al., 2011; Luu et al., 2012). Asimismo las evidencias indican que de los cinco grupos de AQP tradicionalmente descritos en plantas, no solo las PIP, sino también las NIP y las XIP se localizarían preferentemente en la membrana plasmática (Bienert et al., 2011). Por lo tanto, teniendo en cuenta la permeabilidad a solutos de estos grupos (Tabla 2), las PIP parecen tener un papel fundamental para controlar el transporte de agua a través de las membranas plasmáticas, mientras que las NIP y XIP parecieran ser fundamentalmente transportadores de solutos y metales a través de las membranas, y muy pobres transportadores de agua.

Como se mencionó en el apartado *Acuaporinas, filogenia*, las PIPs se encuentran organizadas filogenéticamente en dos grupos, PIP1 y PIP2. Sin embargo, se ha reportado que el ancestro común de las plantas mono y dicotiledóneas podría tener tres tipos de PIPs que originaran tres clusters, en lugar de dos: i- PIPCLI, que se correspondería con el clásico grupo PIP1, ii- PIPCLII y iii- PIPCLIII, siendo estos dos últimos grupos los que tradicionalmente se nombran como grupo PIP2 (Soto et al., 2012). Si se comparan las PIP2, en tanto PIPCLII y PIPCLIII, puede observarse que existen entre estos grupos diferencias estructurales. Si bien aún no ha sido esclarecido cómo estas diferencias estructurales impactarían en lo funcional, se han reportado diferencias funcionales entre PIPs expresadas en sistemas heterólogos que podrían ser propias de cada *cluster*.

Más allá de la organización filogenética, hay importantes diferencias funcionales entre las acuaporinas de tipo PIP2 en comparación con las PIP1 cuando son expresadas en sistemas heterólogos. Las PIP2 se encuentran en la membrana plasmática como homo-tetrámeros y confieren alta permeabilidad al agua a la membrana en la que se expresan, en contraste con lo observado para PIP1 (Törnroth-Horsefield et al., 2005; Li et al., 2011; Fetter et al., 2004; Bellati et al., 2010). La falta de actividad detectable para varias PIP1 al ser expresadas en oocitos de *Xenopus*, llevó a algunos investigadores a pensar, en un principio, que se trataba de acuaporinas inactivas o con baja capacidad para el transporte de agua (Daniels et al., 1994; Yamada et al., 1995; Weig et al., 1997; Johansson et al., 1998; Biela et al., 1999; Chaumont et al., 2000; Marin-Olivier et al., 2000; Moshelion et al., 2002). Sin embargo, más tarde fue demostrado que esta aparente inactividad, se debía a la incapacidad de algunos miembros de este grupo de proteínas de formar homo-tetrámeros capaces de llegar a la membrana plasmática, debido a que son retenidos intracelularmente (Zelazny et al., 2007, 2009; Jozefkowicz et al., 2013; Yaneff et al., 2014). Actualmente existen evidencias que muestran que algunas PIP1 solo son capaces de trasladarse a la membrana plasmática en presencia de una PIP2 (Zelazny et al., 2007; Bellati et al.,

2010; Yaneff et al., 2014). Otras PIP1 parecen translocar a la membrana plasmática por sí solas, pero resultan poco eficientes para el transporte de agua (Tournaire-Roux et al., 2003; Suga and Maeshima, 2004; Wei et al., 2007). Por último, otro grupo de reportes indican que las PIP1 pueden transportar solutos pequeños como urea (Gaspar et al., 2003), dióxido de carbono (Uehlein et al., 2003), glicerol (Biela et al., 1999) y ácido bórico (Dordas et al., 2000). Esta divergencia en los resultados hallados entre PIP1 podría deberse a que dentro de la subfamilia PIP1 habría diferentes miembros con características funcionales propias, aún cuando no se encuentren subgrupos filogenéticamente relacionados que puedan explicar esta diversidad funcional.

Dentro del grupo de las PIP1 que solo son capaces de traslocar a la membrana plasmática en presencia de una PIP2, se ha observado que tanto ZmPIP1;2 de *Zea mays* como FaPIP1;1 de *Fragaria X ananassa* son acuaporinas activas para el transporte de agua si se encuentran co-expresadas con ZmPIP2;5 o FaPIP2;1, respectivamente (Fetter et al., 2004; Yaneff et al., 2014).

A pesar de las diferencias funcionales halladas entre PIP1 y PIP2, esta divergencia no ha podido ser definitivamente explicada en base a sus relaciones estructura-función. Si bien en comparación con las PIP1, las proteínas PIP2 poseen un N-terminal más corto, y un C-terminal y un *loop A* – primer *loop* extracitoplasmático- más largos (Figura 9), no está totalmente elucidado como estas diferencias estructurales y ciertos motivos hallados en estos y otros elementos estructurales, impactarían en lo funcional y en su diferente localización celular.

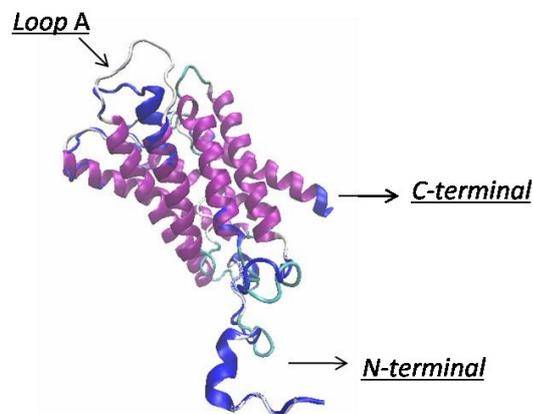


Figura 9: Superposición de las estructuras tridimensionales de proteínas PIP2 y PIP1.

Representación tipo *NewCartoon* de la vista lateral de BvPIP2;2 (en blanco) y BvPIP1;1 (en azul). En violeta se grafican la estructura secundaria tipo alfa-hélice que corresponde a los segmentos transmembrana y en celeste las regiones sin estructura (*random coil*). Los modelados por homología de BvPIP2;2 y de BvPIP1;1 fueron generados con el servidor Phyre2. Generamos la imagen utilizando el programa de visualización VMD 1.9.2, usando las coordenadas de PDB propuestas por el servidor Phyre2. Se indica la posición del *loop A*, y de los N y C-terminales sobre la imagen. Nótese que el *loop A* de BvPIP2;2 es de mayor longitud que el *loop A* de BvPIP1;1.

PIP, como canales multiméricos.

El primer reporte mostrando una interacción entre PIP1 y PIP2 fue publicado en 2004 (Fetter et al., 2004), y abrió un nuevo área de investigación en el ámbito de las acuaporinas vegetales.

En ese primer trabajo, Fetter y colaboradores mostraron que cuando la proteína ZmPIP1;2 era co-expresada con ZmPIP2;1, ZmPIP2;4 o ZmPIP2;5 se producía un aumento de la permeabilidad al agua de los oocitos que co-expresaban PIP1-PIP2, y que ese aumento de P_f era dependiente de la masa de ARNc de ZmPIP1;2 inyectada. Mas aún, estudios de localización por microscopía confocal, mostraron que la presencia de la proteína PIP1 fusionada a GFP (ZmPIP1;2-GFP) en la membrana plasmática era mayor en las células que co-expresaban PIP1-PIP2, respecto de las células que expresaban únicamente ZmPIP1;2. Estudios de interacción física mediante inmunoprecipitación permitieron concluir que la interacción entre ZmPIP1;2 y ZmPIP2;1 ocurre *in vivo* en la raíz y en las células vegetales de maíz, en ausencia de co-expresiones (Fetter et al., 2004).

Estudios posteriores de interacción física por cromatografía de exclusión molecular, BiFC (complementación de la fluorescencia molecular) y electroforesis en gel muestran que PIP1 y PIP2 se localizan lo suficientemente cerca en la membrana plasmática como para formar hetero-oligómeros y/o hetero-tetrámeros (Figura 10-A) (Otto et al., 2010; Zelazny et al., 2007). Mas aún, estudios de interacción funcional que analizan la permeabilidad al agua, mostraron que ante la co- expresión de PIP1 y PIP2 de distintas especies hay un aumento de la permeabilidad osmótica de las membranas (P_f) que las co-expresan, respecto al detectado para la expresión de PIP2 por sí sola (Figura 10-B) (Fetter et al., 2004; Vandeleur et al., 2009; Bots et al., 2005; Alleva et al., 2010; Bellati et al., 2010).

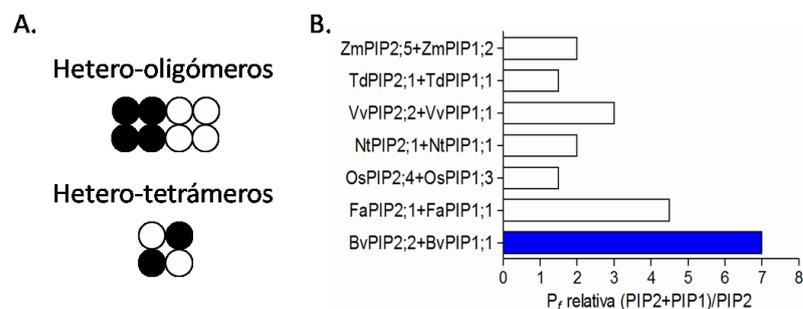


Figura 10: Resultados de permeabilidad al agua de membranas de oocitos de *Xenopus* que co-expresan proteínas PIP1 y PIP2; esto puede ser consecuencia de la formación de hetero-oligómeros u hetero-tetrámeros.

- (A) Posibles configuraciones oligoméricas entre PIP1 y PIP2. Los hetero-oligómeros corresponden a homo-tetrámeros de PIP1 junto a homo-tetrámeros de PIP2; los hetero-tetrámeros corresponden a oligómeros compuestos por monómeros mixtos PIP1-PIP2 en un mismo tetrámero. (B) Incremento relativo de P_f de membranas de oocitos de *Xenopus* que co-expresan proteínas PIP1 y PIP2, respecto al incremento de P_f observado para las membranas de oocitos que expresan PIP2. Se grafican únicamente los resultados de co-expresión de pares de PIP1-PIP2 pertenecientes a distintas especies cuya interacción funcional fue reportada en la bibliografía: ZmPIP2;5 y ZmPIP1;2 de *Zea mays*, TdPIP2;1 y TdPIP1;1 de *Triticum durum*, VvPIP2;2 y VvPIP1;1 de *Vitis vinifera*, NtPIP2;1 y NtPIP1;1 de *Nicotiana tabacum*, OsPIP2;4 y OsPIP1;3 de *Oryza sativa*, FaPIP2;1 y

FaPIP1;1 de *Fragaria x ananassa*, BvPIP2;2 y BvPIP1;1 de *Beta vulgaris*. En algunos casos el aumento de P_f de las membranas que co-expresan ambas PIP es de

4 veces, otras de 3 veces o de 2 veces respecto a la permeabilidad de las membranas que solo expresan PIP2. En azul se muestra el resultado relativo de aumento de P_f observado para la co-expresión de dos proteínas de *Beta vulgaris* con las que se trabajó durante este Tesis Doctoral, BvPIP2;2 y BvPIP1;1. (Bellati et al., 2010; Fetter et al., 2004; Alleva et al., 2010; Ayadi et al., 2011; Vandeleur et al., 2009; Matsumoto et al., 2009).

Al momento de comenzar esta tesis no estaba claro si los canales de PIP se ensamblan en forma de hetero-oligómeros o si forman verdaderos arreglos hetero-tetrámicos, ni se habían realizado estudios completos que den cuenta de la posible estequiometría que adoptan estos arreglos PIP1- PIP2. Asimismo, si bien estaba ampliamente reportada la interacción funcional entre algunas PIP1 y algunas PIP2, se desconocían los determinantes estructurales que resultan claves para la interacción entre ambos subtipos de acuaporinas.

Objetivos

Esta tesis doctoral presenta como **objetivo general** *estudiar a las acuaporinas vegetales de la subfamilia PIP, focalizándonos en sus relaciones estructura-función y desentrañando tanto la composición que presentan determinados arreglos funcionales mixtos entre los monómeros PIP1 y PIP2 como alguno de los elementos estructurales específicos involucrados en dicha interacción.*

Este objetivo general se concreta a través del estudio de acuaporinas de membrana plasmática de *Beta vulgaris*. El trabajo previo de investigación sobre estas acuaporinas ha estado focalizado en evaluar si la co-expresión de PIP1 y PIP2 tenía relevancia funcional y si la tenía, cuál era el efecto de los clásicos reguladores de acuaporinas sobre el mismo. Si bien no hay dudas respecto a que existe interacción física entre algunos pares de proteínas PIP1 y PIP2, hasta la realización de los experimentos que componen esta Tesis Doctoral no había sido elucidado el tipo de interacción que se da entre ambas acuaporinas. Así, la hipótesis de trabajo que condujo los diseños experimentales de esta tesis es que **PIP1 y PIP2 son parálogos cuyas estructuras proteicas particulares determinan su capacidad de ensamblaje, siendo las relaciones estructura-función las que determinan la composición y actividad biológica que presentan determinados arreglos funcionales mixtos.**

Por lo tanto en esta Tesis Doctoral se propuso alcanzar los siguientes **objetivos**:

- Analizar las características estructurales, la funcionalidad y la regulación de BvPIP2;1 en tanto canal de agua, y su capacidad de interaccionar con BvPIP1;1, determinando las características estructurales que condicionan dicha interacción (Capítulo 1);
- Estudiar a las acuaporinas vegetales en tanto canales multiméricos, indagando qué estequiometría presentan los arreglos funcionales PIP1-PIP2, y los mecanismos de regulación que condicionan su funcionalidad (Capítulo 2).

Materiales y métodos

1. Análisis de las secuencias nucleotídicas y proteicas

1. 1 Estudios filogenéticos

La búsqueda de secuencias de acuaporinas fue realizada utilizando como referencia la secuencia de BvPIP2;1 (GenBank: U60148.1, GI: 733214084), aplicando el algoritmo BLASTP. Para dicha búsqueda se utilizaron las bases de datos del NCBI y las secuencias anotadas en GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) seleccionando sólo secuencias de proteínas con alta identidad aminoacídica (> 25%) y utilizando para el cálculo de identidad de secuencia primaria el programa MatGAT v2.02 (Camapnella et al., 2003). Se seleccionaron secuencias proteicas provenientes de las siguientes especies: *Oryza sativa*, *Zea mays*, *Arabidopsis thaliana*, *Vitis vinifera*, *Nicotiana tabacum*, *Ricinus communis*, *Hevea brasiliensis*, *Populus trichocarpa* y *Triticum durum*. Los análisis filogenéticos se realizaron utilizando el software MEGA versión 5.0 (Tamura et al., 2007) y el método de *Neighbour-Joining* (NJ). Las distancias genéticas fueron calculadas utilizando el modelo de corrección de Poisson y fijando la raíz en el punto medio. Este análisis fue desarrollado estableciendo los siguientes parámetros: sustituciones a incluir = todas; *gaps* = *pair wise deletion*; análisis de filogenia = *bootstrap* 500 réplicas.

1. 2 Alineamientos múltiples de las secuencias proteicas

La búsqueda de secuencias de acuaporinas fue realizada de la misma manera que en el caso de los análisis filogenéticos utilizando como referencia la secuencia de BvPIP2;1, pero en este caso se utilizó la base de datos curada SwissProt. Se realizó una selección sobre las secuencias resultado de esa búsqueda, aplicando como criterio de selección que dichas secuencias presenten en el dominio N-terminal el motivo M(S/T)K(E/D) (que corresponde a los motivos identificados para las PIP que pertenecen al *cluster* III por Soto et al., 2012). Con las primeras 10 secuencias que arrojó la búsqueda y cumplieran con el criterio señalado, se realizó un PSI BLAST contra la base de datos Swiss-Prot. El resultado de esta búsqueda arrojó 27 secuencias que posteriormente se alinearon utilizando el programa de alineamiento múltiple Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). Finalmente, el resultado de este alineamiento fue graficado utilizando la técnica de LOGO, con el programa WebLogo (<http://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi>).

El mismo procedimiento fue realizado utilizando como consulta de la búsqueda la secuencia de BvPIP2;2 (GenBank: U60147.1, GI: 253317410), y aplicando como criterio de selección que las secuencias presenten en el dominio N-terminal el motivo (M(AG)KX), que corresponde a los motivos identificados como característicos para las PIP pertenecientes al *cluster* II por Soto et

al., 2012. El resultado final de esta búsqueda arrojó 21 secuencias que fueron alineadas y graficadas con la técnica de LOGO.

1. 3 Estudios bioinformáticos para el análisis de la co-evolución entre aminoácidos

Las secuencias de proteínas de *Arabidopsis thaliana* (AtPIP1;1, AtTIP1;1, AtNIP1;1 y AtSIP1;1) fueron utilizadas como secuencias consulta para buscar en bases de datos genómicas utilizando el programa BLASTP (imponiendo como límite para la búsqueda que la identidad de secuencia aminoacídica sea $\leq 15\%$). Las bases de datos genómicas consultadas fueron: Phytozome (www.phytozome.net), PlantGDB (www.plantgdb.org), NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) y PLAZA (bioinformatics.psb.ugent.be/plaza). Todas las proteínas anotadas en estas bases de datos bajo el dominio PF00230 de Pfam (pfam.xfam.org/family/PF00230) también fueron seleccionadas. Se exploró la presencia de AQPs en treinta genomas vegetales, incluyendo organismos unicelulares (*Volvox carteri*, *Coccomyxa subellipsoidea*, *Ostreococcus lucimarinus* y *Chlamydomonas reinhardtii*) y organismos eucariotas multicelulares (*Glycine max*, *Phaseolus vulgaris*, *Medicago truncatula*, *Lotus japonicus*, *Cucumis sativus*, *Fragaria vesca*, *Prunus persica*, *Malus domestica*, *Ricinus communis*, *Morchella esculenta*, *Populus trichocarpa*, *Linum usitatissimum*, *Arabidopsis thaliana*, *Solanum tuberosum*, *Theobroma cacao*, *Vitis vinifera*, *Paspalum virgatum*, *Scilla italica*, *Zea mays*, *Oryza sativa*, *Brachypodium distachyon*, *Picea abies*, *Picea sitchensis*, *Cryptomeria japonica*, *Selaginella moellendorffii*, y *Physcomitrella patens*). Las AQPs fueron asignadas a diferentes subfamilias (PIP, TIP, NIP y SIP) teniendo en cuenta los motivos descriptos previamente como característicos de cada subfamilia, y a su vez se diferenciaron los grupos PIP1 y PIP2 dentro de la subfamilia PIP (Soto et al., 2012).

Los *constraints* evolutivos fueron evaluados en seis sets de 24 secuencias de proteínas AQP vegetales seleccionadas aleatoriamente para los grupos PIP (incluyendo PIP1 y PIP2), TIP, NIP, SIP, PIP1 y PIP2. Para cada grupo, las secuencias de proteínas fueron alineadas utilizando la aplicación ClustalW en la plataforma Bioedit (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/page2.html>) (Hall, 1999). Se realizó un análisis de co-evolución de secuencias de aminoácidos utilizando el software CAPS (<http://bioinf.gen.tcd.ie/caps/>), y seteando los parámetros estándar recomendados por el programa (Fares and McNally, 2006). Los pares de aminoácidos que co-evolucionan significativamente fueron interpretados como pares de residuos con un coeficiente de correlación $\leq 0,55$. Los grupos de aminoácidos que co-evolucionan se determinaron mediante el uso del software COMAP v1.4.0 (<http://biopp.univ-montp2.fr/manual/html/comap/v1.5.2/>) (Dutheil and Galtier, 2007; Galtier and Dutheil, 2007

2. Clonados

2.1 Construcción de proteínas quimeras PIP

Se realizaron diferentes construcciones de BvPIP fusionadas a proteínas fluorescentes: BvPIP1;1-ECFP y BvPIP2;2-EYFP, y dímeros en tándem forzados de proteínas BvPIP: el hetero-dímero BvPIP2;2-BvPIP1;1, el heterodímero BvPIP1;1-BvPIP2;2 y el homodímero BvPIP2;2-BvPIP2;2. En todos los casos se procedió como se detalla a a continuación:

2.1.1 Generación de los fragmentos a clonar para la construcción de proteínas PIP fusionadas a proteínas fluorescentes y para la construcción de dímeros de acuaporinas PIP

Se detallan los vectores (Tabla 3) y *primers* (Tabla 4) utilizados para la amplificación de cada constructo y la estrategia a seguir en cada caso en la Tabla 5.

Para generar cada construcción se comenzó por realizar una PCR utilizando *primers* para amplificar la región de interés, agregando en ambos extremos sitios de restricción para las enzimas necesarias y 3 bases adicionales (hacia el extremo 5") para mejorar la eficiencia de corte de la enzima de restricción (ER).

Tabla 3. Vectores.

Vectores	Características	Marcador de selección en bacterias
pEYFP-N1	Vector con EYFP para expresión en células de mamífero (Clontech, USA)	Kanamicina
pECFP-N1	Vector con ECFP para expresión en células de mamífero (Clontech, USA)	Kanamicina
pEYFP-N1::BvPIP2;2	Vector conteniendo la secuencia de BvPIP2;2 y la secuencia de EYFP en 3', separados por 19 aminoácidos	Kanamicina
pECFP-N1::pBvPIP1;1	Vector conteniendo la secuencia de BvPIP1;1 y la secuencia de ECFP en 3', separados por 13 aminoácidos	Kanamicina
pGEM-4Z pT7ST	pGEM-4Z modificado para expresión en oocitos de <i>Xenopus</i>	Ampicilina
pGEM-4Z pT7ST::BvPIP1;1	Vector conteniendo la secuencia de BvPIP1;1 para expresión en oocitos de <i>Xenopus</i>	Ampicilina
pGEM-4Z pT7ST:: BvPIP2;1	Vector conteniendo la secuencia de BvPIP2;1 para expresión en oocitos de <i>Xenopus</i>	Ampicilina
pGEM-4Z pT7ST:: BvPIP2;2	Vector conteniendo la secuencia de BvPIP2;2 para expresión en oocitos de <i>Xenopus</i>	Ampicilina
pGEM-4Z pT7ST:: BvPIP2;2-EYFP	Vector conteniendo la secuencia de BvPIP2;2 y la secuencia de EYFP en 3', separados por 19 aminoácidos para expresión en oocitos de <i>Xenopus</i>	Ampicilina
pGEM-4Z pT7ST:: BvPIP1;1-ECFP	Vector conteniendo la secuencia de BvPIP1;1 y la secuencia de ECFP en 3', separados por 13 aminoácidos	Ampicilina
pGEM-4Z pT7ST:: BvPIP1;1-BvPIP2;2	Vector conteniendo la secuencia de BvPIP1;1 unida por un <i>linker</i> de 11 aminoácidos (incluyendo el <i>tag</i> para hemaglutinina, HA) a la secuencia de BvPIP2;2 en 3' para expresión en oocitos de <i>Xenopus</i>	Ampicilina
pGEM-4Z pT7ST:: BvPIP2;2-BvPIP1;1	Vector conteniendo la secuencia de BvPIP2;2 unida por un <i>linker</i> de 19 aminoácidos (incluyendo el <i>tag</i> para hemaglutinina, HA) a la secuencia de BvPIP1;1 en 3' para expresión en oocitos de <i>Xenopus</i>	Ampicilina
	de <i>Xenopus</i>	
pGEM-4Z pT7ST:: BvPIP2;2-BvPIP2;2	Vector conteniendo la secuencia de BvPIP2;2 unida por un <i>linker</i> de 19 aminoácidos (incluyendo el <i>tag</i> para hemaglutinina, HA) a la secuencia de BvPIP2;2 en 3' para expresión en oocitos de <i>Xenopus</i>	Ampicilina
pGEM-4Z pT7ST:: BvPIP1;1-BvPIP1;1	Vector conteniendo la secuencia de BvPIP1;1 unida por un <i>linker</i> de 11 aminoácidos (incluyendo el <i>tag</i> para hemaglutinina, HA) a la secuencia de BvPIP1;1 en 3' para expresión en oocitos de <i>Xenopus</i>	Ampicilina

Tabla 4. *Primers*.

Construceto	DNA Templado	Primer Forward	Primer Reverse	Vector donde queda insertado el construceto
BvPIP2;2-EYFP	pECFP-N1::pBvPIP2;2	Fw BvPIP2;2	EYFP Rev	pGEM-4Z pT7ST
BvPIP1;1-ECFP	pECFP-N1::pBvPIP1;1	Fw BvPIP1;1	ECFP Rev	pGEM-4Z pT7ST
BvPIP1;1- BvPIP2;2	pGEM-4Z pT7ST::BvPIP1;1	Fw BvPIP1;1	BvPIP1;1 Rev-B	pGEM-4Z pT7ST:: BvPIP2;2- BvPIP2;2
BvPIP2;2- BvPIP1;1	pGEM-4Z pT7ST::BvPIP1;1	Fw BvPIP1;1-HA	BvPIP1;1 Rev-A	pGEM-4Z pT7ST:: BvPIP2;2- EYFP
BvPIP2;2- BvPIP2;2	pGEM-4Z pT7ST::BvPIP2;2	FwBvPIP2;2-HA	BvPIP2;2Rev	pGEM-4Z pT7ST:: BvPIP2;2- EYFP

Tabla 5. Detalle de clonados.

Nombre	Secuencia (en orientación 5'-3')	Sitio de corte para ER	Características
Fw BvPIP2;2	GGGAGATCTATGACCAAGGATGTG GAAGCAGITTC	<u>BglII</u>	Tm= 67 GC% = 46 % Largo = 35 nt
BvPIP2;2 Rev	GGACTAGITTAAGCAGAGCTCCTG AAGGATCC	<u>SpeI</u>	Tm= 72 GC% = 50 % Largo = 32 nt
EYFP Rev	GGGACTAGITTTACTGTACAGCTCG TCCATGCC	<u>SpeI</u>	Tm= 72 GC% = 52 % Largo = 33 nt
Fw BvPIP1;1	GGGAGATCTATGGAAGGGAAAGAT GAAGATGTTAGAC	<u>BglII</u>	Tm= 72 GC% = 43 % Largo = 37 nt
BvPIP1;1 Rev	GGACTAGITTACGACTTGGACTTG AATGGAATTGC	<u>SpeI</u>	Tm= 71 GC% = 43 % Largo = 35 nt
BvPIP1;1 Rev-B	GCCCGCGGCGACTTGGACTTGAAT GGAATTGC	<u>SacII</u>	Tm= 77 GC% = 63 % Largo = nt
ECFP Rev	GGGACTAGITTTACTGTACAGCTCG TCCATGCC	<u>SpeI</u>	Tm= 72 GC% = 52 % Largo = 33 nt
Fw BvPIP2;1	GGGAGATCTATGACTAAGGAAGTA AGTGA	<u>BglII</u>	Tm= 62 GC% = 41% Largo = 29 nt
Fw BvPIP1;1-HA	GAGCCGCGGTACCCATACGATGTT CCTGACTATGCGATGGAAGGGAAA G	<u>SacII</u>	Tm= 82 GC% = 55% Largo = 49 nt
Fw BvPIP2;2-HA	GAGCCGCGGTACCCATACGATGTT CCTGACTATGCGATGACCAAGGAT G	<u>SacII</u>	Tm= 82 GC% = 55% Largo = 49 nt

Las reacciones de PCR para los clonados se realizaron utilizando la enzima con actividad *proof-reading* Pfx *Platinum* (Invitrogen). En cada reacción se utilizaron 30-100 ng de ADN como molde, buffer de reacción 2X, MgSO₄ 1 mM, dNTPs 300 μM y 0,3 μM de cada *primer forward* y *reverse*, y 1 unidad de ADN polimersa Pfx *Platinum* (Invitrogen), en 50 μl de volumen de reacción. El ciclado se realizó de la siguiente manera:

	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
Desnaturalización inicial	94	5
Ciclos (35-40)	94	0.5
	Ta	0.5
	68	1 min/Kb
Extensión final	65	5-10

Para el cálculo de la Temperatura de *annealing* (Ta), en todos los casos se calculó la temperatura de *melting* (Tm) de cada *primer* utilizando el sitio <http://www.promega.com/a/apps/biomath/index.html?calc=tm> y se utilizó una Ta 5°C menor que la del *primer* con menor Tm.

2.1.2 Purificación de los fragmentos a clonar y restricción

Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 0.8% para controlar que los productos de PCR presentaran una sola banda y el peso molecular esperado, posteriormente estas bandas se cortaron del gel utilizando bisturí y el fragmento de ADNc se purificó mediante el *kit* comercial *Wizard SV Geland PCR Clean-up system* (Promega). Posteriormente, los productos de PCR purificados y los plásmidos correspondientes (donde se subclonaron dichos productos de PCR) fueron digeridos con las enzimas de restricción correspondientes en función de los *primers* utilizados (Tabla 4), siguiendo el protocolo recomendado para dicha ER (Promega). Los productos de PCR digeridos y el vector linearizado se purifican mediante electroforesis en gel de agarosa 0.8 % y el *kit* comercial *Wizard SV Geland PCR Clean-up system* (Promega).

Para la visualización de todos los geles se utilizó el reactivo GelRed (Biotium) (según instrucciones del fabricante, <https://biotium.com/wp-content/uploads/2013/07/PI-41003.pdf>). La cuantificación de ADN en geles de agarosa se realizó mediante el análisis densitométrico de las bandas, a partir de fotos obtenidas tras exponer el gel con las muestras y el marcador de masa EZ Load (Bio-Rad) en un transiluminador. Para el análisis de densitometría se utilizó el programa Gel-Pro analyzer 3.0 (<http://gel-pro-analyzer.software.informer.com/3.0/>).

2.1.3 Ligación de los fragmentos en los vectores correspondientes

Las reacciones de ligación se realizaron con la enzima T4 ligasa (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante y utilizando entre 20 y 100 ng de vector y diferentes relaciones molares inserto:vector 1:1, 1:3, 1:10 y 1:20. Como control de autoligación se realizó una reacción de ligación colocando vector digerido sin el agregado del producto de PCR. La reacción de ligación se dejó toda la noche (de aquí en mas ON, por *over night*) a 16 °C y fue frenada colocándola 15 min a 55°C.

Luego, se procedió a transformar bacterias termocompetentes (*Escherichia coli* DH5 α) (según se detalla en la siguiente sección 2.3, *Transformación de bacterias para amplificación y aislamiento del ADNc*) con los productos de las ligaciones. La eficiencia de la reacción de ligación fue controlada por comparación entre el número de colonias observado en las placas de autoligación respecto del número de colonias observado en las otras placas.

2.2 Construcción de mutantes de BvPIP2;1

Para realizar las mutaciones sobre BvPIP2;1 se utilizó un kit comercial (*QuikChange II site-directed mutagenesis kit*, Stratagene). Se diseñaron y sintetizaron oligonucleótidos (*primers*) (Eurofins MWG Operon, USA) complementarios a la zona de interés para llevar a cabo las mutaciones deseadas (N64E65/H64Q65 y N64E65/I64Q65) teniendo en cuenta las consideraciones del kit. Los nucleótidos a mutar se indican subrayados en la Tabla 6.

Tabla 6: Oligonucleotidos sintetizados para la obtención de mutantes de BvPIP2;1.

Nombre del primer	Tipo	Secuencia 5'-3'
BvPIP2;1 NE/HQ	Forward	CAGTTGCAACTGTTATTGGTTACAAACATCAA <u>ACTGACCCTTG</u> TGC
BvPIP2;1 NE/HQ	Reverse	GCACAAGGGTCAGTTTGTATGTTTGT <u>AACCAATAACAGTTGCAA</u> CTG
BvPIP2;1 NE/IQ	Forward	CAGTTGCAACTGTTATTGGTTACAAAATTCAA <u>ACTGACCCTTG</u> TGC
BvPIP2;1 NE/IQ	Reverse	GCACAAGGGTCAGTTTGAATTTGT <u>AACCAATAACAGTTGCAA</u> CTG

A partir del plásmido pGEM-4Z pT7ST que contiene la secuencia de BvPIP2;1 y los *primers* (Tabla 6) se realizaron las PCR que generaron “plásmidos mutantes”. El ADN parental fue digerido con la enzima *DpnI* por diferencia en el estado de metilación con el recientemente sintetizado. El vector de ADN que contiene la mutación fue transformado en bacterias termo-competentes *E. coli* DH5 α para su amplificación.

2.3 Transformación de bacterias para amplificación y aislamiento del ADNc

La amplificación de los plásmidos conteniendo el ADNc de los constructos fue realizada utilizando bacterias termocompetentes *Escherichia coli* DH5 α . Para realizar la transformación de las mismas se mezclaron 10 μ l del producto de la ligación con 50 μ l de bacterias termocompetentes. Esta mezcla se deja 30 minutos en hielo, luego se incubó a 42 °C por 1,5 minutos, y rápidamente se la coloca en hielo al menos por 10 minutos. Posteriormente, las bacterias se recuperan agregando 800 μ l de medio SOC (2 % peptona, 0.5 % extracto de levadura, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂-6H₂O, 20 mM glucosa) dejando 1 hora a 37 °C. Luego se siembra en placa de medio LB agar (10 g L⁻¹ extracto de peptona, 5 g L⁻¹ extracto de levadura, and 10 g L⁻¹ NaCl) suplementado

con el antibiótico correspondiente. Se incuban las placas a 37 °C por 16 horas. A partir de colonias aisladas de las placas de transformación se realiza una PCR *colony* con *primers* específicos para corroborar la presencia del inserto de interés. A partir de las colonias positivas se realizan cultivos en medio LB líquido adicionado con el antibiótico correspondiente y se aisló el ADN plasmídico utilizando el *kit Zymo Reserch Plasmid Mini Kit* (Biosystems). Todos los productos de clonado (proteínas de fusión y mutantes) fueron secuenciados al menos dos veces para verificar la fidelidad de las secuencias (3730xl DNA analyzer Macrogen Inc. Seoul, Korea).

2.4 Transformación de bacterias con el vector pT7ST para expresión en oocitos Disponemos (por

trabajos anteriores del grupo) de las construcciones plasmídicas que contienen los genes de diferentes acuaporinas a estudiar: BvPIP1;1, BvPIP2;1 y BvPIP2;2 en el vector de expresión pGEM-4Z T7ST. A su vez se generaron proteínas quimeras de dichas acuaporinas unidas a proteínas fluorescentes (BvPIP2;2-EYFP y BvPIP1;1-ECFP), dímeros de dichas acuaporinas unidos en tándem (BvPIP1;1-BvPIP2;2, BvPIP2;2-BvPIP1;1, BvPIP2;2-BvPIP2;2) y mutantes de BvPIP2;1 (BvPIP2;1 NE/HQ y BvPIP2;1 NE/IQ) (según se detalla en la sección 2.1, *Construcción de proteínas quimeras PIP*) que se subclonaron en el vector de expresión pGEM-4Z T7ST adecuado para expresión en oocitos de *Xenopus*. Dicho vector es una modificación del plásmido comercial pGEM-4Z y presenta las siguientes características: a) proporciona extremos UTR 5' y 3' del gen de β -globina de *Xenopus laevis*, que flanquean cualquier ADNc que se quiere expresar en los oocitos; b) los extremos contienen el sitio de *capping* en el 5' y la señal de poliadenilación en el 3', que le otorgan estabilidad y mayor tasa de traducción al ARNm una vez que se encuentre en el citoplasma del oocito; c) contiene río arriba del gen de la β -globina el promotor del fago T7 y d) contiene el gen que confiere resistencia a la ampicilina (Gorgoni et al., 1995) (Figura 11).

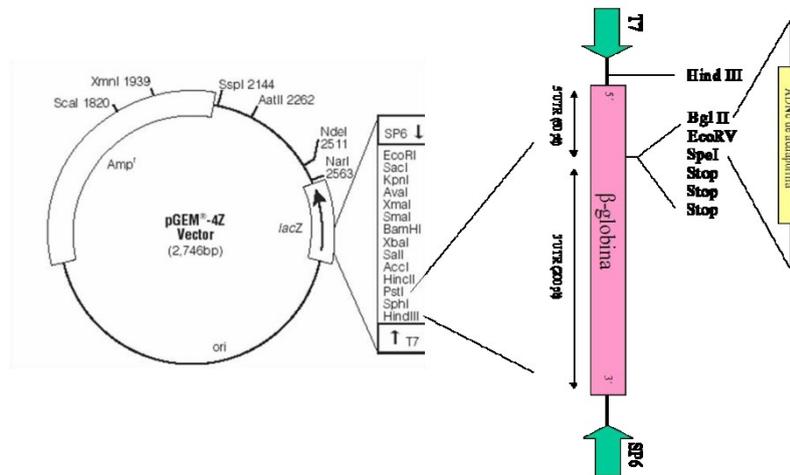


Figura 11: Plásmido pT7ST para expresión en oocitos.
Este plásmido es una modificación del vector pGEM-4Z que contiene el cassette de β -globina de *Xenopus laevis*.

3. Expresión de acuaporinas en oocitos de *Xenopus laevis*

3.1 Síntesis *in vitro* de ARNc

La síntesis de los ARNc de las secuencias de interés consta de cuatro pasos: i- linealizado del ADN plasmídico; ii- purificación del ADN; iii- síntesis de ARNc y iv- purificación del ARNc.

3.1.1 Linealizado del ADN plasmídico

Se digirieron 20 μ g de ADNc plasmídico utilizando una enzima de restricción adecuada. La enzima utilizada en cada caso se detalla en la Tabla 7.

Tabla 7: Enzimas de restricción utilizadas para la digestión de los ADNc plasmídico.

ADNc plasmídico	Enzima de restricción utilizada
BvPIP2;1 y mutantes de BvPIP2;1	<i>EcoRI</i>
BvPIP2;2	<i>PstI, XbaI</i>
BvPIP1;1	<i>PstI, XbaI</i>
Homo-dímero BvPIP2;2- BvPIP2;2	<i>XbaI</i>
Hetero-dímero BvPIP2;2- BvPIP1;1	<i>XbaI</i>
Hetero-dímero BvPIP1;1- BvPIP2;2	<i>XbaI</i>

La digestión se realiza a 37 °C por 5-6 horas. Luego se verifica mediante electroforesis en gel de agarosa 1 % que todo el ADN plasmídico esté correctamente digerido por comparación con un ADN plasmídico sin digerir. La reacción de digestión se finaliza incubando la reacción con el agregado de 50 µg/mL de proteinasa K (serin-proteasa) (Promega) durante 30 min a 37°C.

3.1.2 Purificación del ADN

Para purificar el ADN se agrega a la reacción de linealización agua libre de nucleasas hasta llegar a un volumen final de 200 µl y luego se realizan extracciones de fenol (pH 8):cloroformo (1:1). Se centrifuga a 16000 g por 2 min. A la fase acuosa superior, se agregan 200 µl de cloroformo y se realiza una nueva centrifugación a 16000 g por 2 min. La fase acuosa se transfiere a un tubo limpio y se realiza una precipitación agregando 0.1 volúmenes de acetato de sodio 3 M (pH 5.2) y 2.5 volúmenes de etanol absoluto. Se incuba 30 min a -20 °C y luego se realiza una centrifugación a 16000 g por 10 min. Se descarta el sobrenadante (por aspiración utilizando vacío) y se lava el *pellet* con 500 µl de etanol 70%. Se realiza una nueva centrifugación a 16000 g por 5 min. Se descarta el sobrenadante por aspiración utilizando una trampa de vacío y se deja secar a temperatura ambiente el *pellet*. Finalmente este *pellet* se resuspende en 6 µl de agua libre de nucleasas.

3.1.3 Síntesis de ARNc

La síntesis *in vitro* del ARNc de BvPIP2;2, BvPIP1;1, BvPIP2;2-EYFP, BvPIP1;1-ECFP, y la de los dímeros de acuaporinas unidos en tándem (BvPIP1;1-BvPIP2;2, BvPIP2;2-BvPIP1;1, BvPIP2;2-BvPIP2;2) se realizan utilizando el *kit* comercial mMESSAGEmMACHINE (Ambion); mientras que las síntesis *in vitro* de BvPIP2;1 (y sus mutantes) se realizan usando el *kit* comercial mMESSAGEmMACHINE ULTRA *kit* (Ambion). En ambos casos en la reacción de síntesis se usa la enzima ARN polimerasa del bacteriófago T7, que es capaz de reconocer al promotor T7 presente en el plásmido T7TS. Para la reacción se siguieron las indicaciones del fabricante, combinando agua libre de nucleasas con NTP/CAP, *buffer* de reacción, 1 µg del plásmido que contiene el gen de la acuaporina de interés y 1 U de ARN polimerasa T7, durante 120 min de incubación a 37°C. Estas condiciones son óptimas para conseguir un rendimiento satisfactorio.

En el caso de la síntesis de BvPIP2;1 (y sus mutantes) con el *kit* comercial mMESSAGEmMACHINE ULTRA, existe un paso previo a la purificación, que consiste en la incubación con una polimerasa *E-PAP* que agrega Adeninas extra (100-200 aproximadamente) en el extremo 3' del ARNm, lo que otorga mayor estabilidad al ARNm (Bernstein and Ross 1989, Gallie 1991, Harland and Misher 1989). Además este *kit* realiza un sistema de ARCA *capping* más efectivo que el que venía siendo utilizado para la síntesis del ARNc de otras acuaporinas (Stepinski J et al. 2001; Peng et al. 2002). La sustitución del *capping* tradicional (que consiste en un residuo en 5' de 7-metil-guanosina) por el ARCA consiste en reemplazar dos de los 3 grupos -OH (el más cercano al residuo de 5' 7-metil-guanosina) por un grupo metoxi, lo que permite que la T7 RNA polimerasa inicie la transcripción sólo con el grupo -OH restante, y por lo tanto todos los ARN capeados en 5' son funcionales. Además de garantizar el inicio de la traducción, la adición del

cappeado en 5' es esencial para prevenir la degradación por parte de nucleasas (Krieg y Melton, 1985). Si bien se sabe que la estructura de *capping* en 5' y el agregado de una cola de poliA en 3' actúan sinérgicamente y son importantes para una eficiente traducción de los ARNm en las células eucariontas (Gallie, 1991; Khaleghpour et al., 2001; Sachss y Wahleo, 1993), la causa por la cual algunas proteínas, como BvPIP2;1, requieren de una protección adicional de su ARNm para una correcta expresión en el sistema de expresión de oocitos, no se conoce. Nuestros resultados indican que estos dos pasos (agregado de una cola de poli A y la utilización de un sistema de *capping* más eficiente) son importantes para la correcta expresión de BvPIP2;1 en el oocito de *Xenopus* (Figura 12). Sin embargo, desconocemos qué elementos de la secuencia nucleotídica de BvPIP2;1 son los responsables de esta menor eficiencia en la transcripción en comparación con otras PIP de *Beta vulgaris*. Este resultado fue parte del trabajo desarrollado durante la ejecución de la beca Estímulo que me otorgó la Universidad de Buenos Aires (Res. N°: 6055/2009).

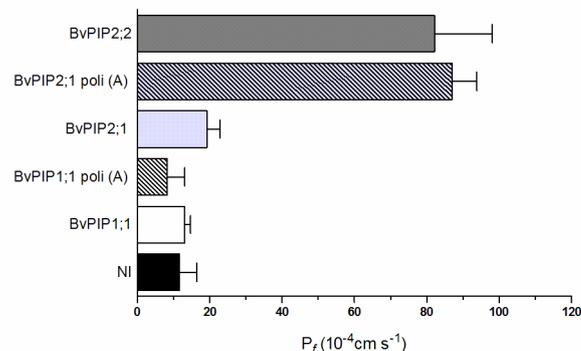


Figura 12: Permeabilidad osmótica (P_f) de membranas de oocitos inyectados con el ARNc de BvPIP2;2, BvPIP1;1, y BvPIP2;1 sin y con cola de poli A.

Se observa que: i- BvPIP2;2 se comporta como un canal de agua activo, ii- la inyección de ARNc de BvPIP1;1 en los oocitos no redundan en un aumento de su permeabilidad osmótica (P_f) independientemente de que se la sintetice con o sin cola de poli A, iii- BvPIP2;1 solo confiere alta permeabilidad al agua a la membrana si los ARNc son sintetizados con una cola de poli A y un sistema de *capping* más eficiente (ARCA *capping* por *Anti-Reverse Cap Analog*, en inglés). El control negativo se realiza con oocitos no inyectados ya que previamente hemos corroborado que no hay diferencias significativas entre la permeabilidad osmótica al agua de éstos respecto a los oocitos inyectados solo con agua.

Una vez finalizado el tiempo de incubación de las reacciones de síntesis de ARNc, estas se frenan incubando el producto de la síntesis con 1 μL TURBO ADNasa (Ambion) a 37 °C durante 15 min.

3.1.4 Purificación del ARNc.

Para la purificación del ARNc sintetizado, al producto de síntesis se le añadieron 115 μl de agua libre de nucleasas y 15 μl de acetato de amonio (5 M). Luego se realizaron dos extracciones con fenol (pH 4): cloroformo (1:1), y finalmente se precipitó incubando con un volumen de isopropanol a -20°C durante 30 minutos y realizando una centrifugación a 14000 g durante 15 minutos a -4 °C. Los productos sintetizados se resuspenden en agua libre de nucleasas a una concentración final de 1

$\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ y se guarda a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. A partir de esta solución *stock* se realizan las diluciones necesarias para obtener la concentración de ARNc que se desea inyectar.

3.2 Cuantificación y control de calidad del ARNc.

Para controlar la calidad del ARNc sintetizado se realizó en todos los casos, previo a la cuantificación, una corrida electroforética en gel de agarosa 1 %. Para la siembra se diluyen las muestras con agua DEPC y se utiliza buffer de siembra conteniendo formamida (para inhibir la actividad de las RNAsas). Esta corrida electroforética permite comprobar que: i- la muestra se sintetizó correctamente y no se degradó durante los pasos de purificación; ii- el ADN templado fue digerido correctamente con el agregado de la enzima ADNasa; y iii- el agregado de la cola de adeninas fue incorporado correctamente (en el caso de la síntesis del ARNc con el *kit* mMESSAGEmMACHINE ULTRA) (Figura 13). Esto último se puede visualizar en un gel como una diferencia de altura dada entre el ARN con agregado de poli A y sin agregado de poli A (Figura 13).

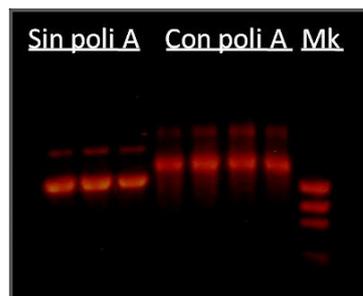


Figura 13: Electroforesis en gel de agarosa del ARNc sintetizado *in vitro*. Posterior a la purificación del ARNc sintetizado, se realiza en todos los casos una electroforesis en gel de agarosa al 1% y se corren las muestras diluidas en agua DEPC con buffer de siembra conteniendo formamida. Para la visualización se utiliza el reactivo GelRed (Biotium). Esto permite controlar que la muestra no se encuentra degradada, que el ADN utilizado como templado fue digerido correctamente (caso contrario se observa ADN en el punto de siembra) y que la adición de las adeninas en 3' por parte de la enzima polimerasa E-PAP se realizó en forma correcta.

La cuantificación de ARNc se realizó mediante espectrofotometría de fluorescencia utilizando el equipo Qubit (ThermoFisher) y el reactivo Ribogreen (ThermoFisher), un reactivo que se une específicamente a los ácidos ribonucleicos. La principal ventaja de este método respecto de la medición de la absorbancia a 260nm/280nm, es que el ADN utilizado como templado y las proteínas que estén en la mezcla no contribuyen a la medición de fluorescencia de la muestra. Además, este método es más selectivo para ARN sobre el ADN doble cadena en el intervalo de 5-100 ng y presenta la ventaja de que se puede realizar una curva de calibración con estándares comerciales.

3.3 Preparación de oocitos de *Xenopus laevis* e inyección de ARNc

3.3.1 Mantenimiento de los *Xenopus laevis*

La fuente de oocitos son hembras adultas de *Xenopus laevis* adquiridas comercialmente (Nasco) y posteriormente mantenidas en un cuarto con temperatura semi controlada y con ciclos luz-oscuridad de 12 horas provisto por tubos fluorescentes manejados por un reloj programado. Cada animal está ubicado en un recipiente de plástico con ranuras de ventilación en la tapa. Los animales se alimentan dos veces por semana y el agua se cambia 40 minutos post-alimentación. El agua utilizada es filtrada utilizando carbón activado y declorada. Cada animal está identificado y se opera a intervalos de al menos cuatro semanas alternando en cada operación el lado izquierdo del derecho.

3.3.2 Obtención de los oocitos

El protocolo para la obtención de oocitos se realiza según Cao y colaboradores (Cao et al., 1992), y todos los procedimientos se realizaron según las normas internacionales para el manejo de animales aprobadas por el CICUAL (Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA). Brevemente, mediante un corte en la parte baja del abdomen del anfibio, se extraen los lóbulos conteniendo oocitos; los lóbulos se colocan en solución ND96 (96 mM NaCl; 2 mM KCl; 1,8 mM CaCl₂; 1 mM MgCl₂; 5 mM HEPES, pH 7.4) y los oocitos se separan con pinzas y son incubados durante 2 h con agitación suave (200 rpm) a 18±2°C en solución ND96 suplementada con 1 U ml⁻¹ colagenasa

(SIGMA), haciendo pasar los oocitos cada 15 minutos por una pipeta pasteur de punta gruesa.

Posteriormente los oocitos son lavados una última vez con solución ND96 conteniendo 1 mg ml⁻¹ de gentamicina (Gibco), y son conservados a 18 °C hasta su empleo experimental en pocillos individuales (de placas de 24 pocillos).

Los oocitos que se seleccionan para su posterior uso son aquellos que estén en estadio de desarrollo V y VI (Lu et al., 1990a; b), descartándose aquellos que presenten: i- un tamaño inferior a 0.8 mm de diámetro; ii- forma alterada (se descartan los deformes o aplastados); y iii- una pigmentación inadecuada (cuando el polo animal no se observa bien oscuro y/o existen machas oscuras en el polo vegetal).

3.3.3 Inyección de ARNc en oocitos

La inyección se realiza con un inyector comercial (Drumond Nanoject, USA) que permite inocular volúmenes fijos de 50 nl. Las pipetas se preparan a partir de capilares (3.5" Drumond #3-000-203-G/X, Drumond Scientific Company) utilizando un estirador de pipetas (microestirador PP-83, Narishigue) calibrado para obtener puntas del grosor adecuado (10 a 40 µm de diámetro). Las microinyecciones se hacen en el polo vegetal de cada uno de los oocitos seleccionados y luego los mismos son conservados en solución de ND96 más gentamicina a 18 ± 2 °C, durante 3 días. Este intervalo de tiempo es el necesario para garantizar una adecuada expresión de las proteínas en estudio, manteniendo la viabilidad de los oocitos.

4. Estudios funcionales por expresión de acuaporinas en oocitos de *Xenopus laevis*

En cada experimento se inyectan entre 20-30 oocitos con el ARNc de las acuaporinas a estudiar, 10-15 oocitos con el ARNc de una acuaporina que se utiliza como control positivo y 10-15 mantenidos como control negativo (sin inyectar). Previamente se validó que los oocitos no inyectados constituyen un adecuado control negativo para los estudios de transporte de agua, ya que no se observan diferencias significativas entre esta condición y los oocitos inyectados con agua (Márquez, María Mercedes, Tesis de Licenciatura en Biología, 2009). En el momento previo a cada experimento, se controlan los oocitos bajo lupa y se eliminan aquellos que presentan cambios visibles en su pigmentación o en su viabilidad.

4.1 Mediciones de permeabilidad osmótica de agua

Para analizar el cambio de volumen y consecuentemente la expresión y actividad de las acuaporinas codificadas por los ARNc inoculados, los oocitos son sometidos a un gradiente osmótico, transfiriéndolos desde solución de ND96 (200 mOsmol Kg⁻¹) a una dilución 1/5 del mismo (40 mOsmol Kg⁻¹). Los cambios de volumen sufridos por el oocito son monitoreados y videocapturados mediante un sistema de video-microscopía compuesto por una cámara de video MC-350 CCD (O'Rite Technology Co., Ltd) conectada a una lupa (Olympus SZ40; Olympus Co., Japan) a través un puerto USB. El sistema permite grabar un video digital eligiendo el formato de mayor calidad (sin compresión, RGB24 24 bit *true color*, 15 fps -cuadros por segundo-) a partir del cual se pueden diseccionar los *frames* que lo componen e individualizar y seleccionar imágenes (en formato BMP) a diferentes intervalos de tiempo utilizando el programa Virtual Dub (<http://www.virtualdub.org>). El tiempo total de captura de todo el video nunca supera los 5 minutos. Las imágenes obtenidas muestran al oocito en un plano bidimensional, por lo tanto se visualiza un área circular y es a partir del análisis de estas áreas que se infieren los volúmenes celulares utilizando un programa comercial (Image Tool *version* 3, <http://ddsdx.uthscsa.edu/dig/itdesc.html>).

El coeficiente de permeabilidad osmótica se calcula a partir de la siguiente ecuación:

$$P_f = \frac{V_0 \left(\frac{dV}{dt} \right)}{S \times V_a \times (\Delta Osm)} \quad (1)$$

donde V_0 es el volumen inicial del oocito ($9 \times 10^{-4} \text{ cm}^3$), S es la superficie medida del oocito ($4.5 \times 10^{-2} \text{ cm}^2$), V_a es el volumen molar parcial del agua ($18 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$) y ΔOsm es la diferencia de osmolaridad entre el interior (considerada como la osmolaridad de la solución en la que fue

mantenido el oocito hasta el momento del experimento, 200 mOsm kg⁻¹) y el exterior del oocito (en estos experimentos usamos la misma solución diluida 5 veces respecto de la solución en la que

fue mantenido el oocito, i.e. 40 mOsm kg^{-1}). Todas las osmolaridades se determinaron utilizando un osmómetro de presión de vapor (5520C; Wescor).

4.2 Mediciones de permeabilidad osmótica de agua: efecto de la co-expresión de acuaporinas

Para la co-expresión de acuaporinas, el procedimiento fue idéntico al llevado a cabo para expresar acuaporinas individuales, pero inyectando una mezcla de los ARNc de las acuaporinas en estudio.

En particular, se emplearon mezclas de diferentes masas de ARNc de las acuaporinas en estudio para evaluar la interacción entre ellas. Por simplicidad en el diseño de las figuras se hace referencia a $2,5 \text{ ng}$ de ARNc inyectado en cada oocito como 1 unidad de masa. Según el par de acuaporinas a ensayar, se analizaron las co-expresiones en distintas relaciones de masa (1:1, 1:2, 1:3, 0.5:2) según se indica en cada experimento.

4.3 Mediciones de permeabilidad osmótica de agua: efecto del pH_{int}

Para estudiar el efecto de pH sobre la permeabilidad al agua se utilizaron diferentes soluciones realizadas tal como se describe en Tournaire-Roux et al., 2003. Las soluciones consisten en fijar la concentración de AcNa en 50 mM , regular la osmolaridad con manitol 1 M (hasta ajustar todas las soluciones a $\text{Osm} \sim 200 \text{ mOsmol Kg}^{-1}$) y el pH con 20 mM de Mes, para intervalos de pH entre 5,8-6,8 o con 20 mM de HEPES, para intervalos de pH entre 7,0-7,4.

La acidificación intracelular producida por la solución de acetato de sodio se debe a que el ácido acético, en equilibrio con el acetato, es capaz de atravesar la membrana plasmática del oocito (Tournaire-Roux et al., 2003). Es en esta condición que el pH interno del oocito se equilibra con el pH de la solución externa y por lo tanto modifica el pH interno. Es necesario tener en cuenta que la gran capacidad *buffer* del citosol (metabólicamente activo) de los oocitos no nos permite asegurar que el valor real de pH alcanzado en el interior del mismo es igual al pH del medio externo. Fue necesario entonces medir el pH interno de los oocitos al incubarlos en soluciones de NaAc a diferentes pHs, como se describe en la sección 4.3.1. *Medición del pH intracelular en oocitos*, página 49.

Los oocitos inyectados con un único ARNc, co-inyectados o no inyectados (control negativo) fueron incubados durante 15 min en soluciones de diferente pH en condiciones iso-osmóticas y luego se aplica el gradiente hipo-osmótico mediante el cambio de medio, pasando de una solución de ND96 $200 \text{ mOsmol Kg}^{-1}$ a la misma solución diluida $1/5$ ($40 \text{ mOsmol Kg}^{-1}$).

Para el cálculo de P_f a partir de los datos experimentales se utilizó la ecuación (1), y luego se ajustó una curva sigmoidea a los datos experimentales, utilizando el método de regresión no lineal en el programa Graph Pad Prism v5.02 y la siguiente ecuación:

$$P_f = P_{f_{min}} + (P_{f_{max}} - P_{f_{min}}) \frac{K_{0.5}^{nH}}{(K_{0.5}^{nH} + [H^+]^{nH})} \quad (2)$$

Donde $P_{f_{max}}$ corresponde a la P_f máxima observada (en el punto de pH_{int} más alcalino de la curva) y $P_{f_{min}}$ a la mínima P_f observada (en el punto de pH más ácido ensayado), nH es un coeficiente empírico relacionado con el ajuste de los datos respecto al comportamiento hiperbólico y $K_{0.5}$ es el valor de la concentración de protones que corresponde a la mitad de la P_f máxima observada.

El parámetro $pH_{0.5}$ se define como $pH_{0.5} = -\log [H^+]$. El coeficiente de Hill n se determina como el valor máximo de la primer derivada del gráfico de Wyman-Hill, como se describió previamente (Holt and Ackers, 2009).

Por otro lado, se calculo el % de inhibición con la siguiente ecuación:

$$Inh(\%) = \left[1 - \frac{(P_{fpH\ 6.3} - P_{fNI})}{(P_{fpH\ 7.0} - P_{fNI})} \right] \times 100 \quad (3)$$

Donde $P_{fpH\ 6.3}$ y $P_{fpH\ 7.0}$ corresponden a las P_f halladas a pH internos 6.3 y 7.0, respectivamente, y p_{fNI} corresponde a la P_f de los oocitos no inyectados (oocitos control).

4.3.1 Medición del pH intracelular en oocitos

La medición del pH intracelular de los oocitos fue puesta a punto por el Dr. Jorge Bellati durante su tesis doctoral utilizando un microscopía de fluorescencia (Bellati et al., 2010). Se utilizó BCECF B-1151 (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) como indicador cualitativo del pH intracelular para calcular los valores de pH finales dentro del oocito. Este indicador fue inyectado en el oocito en cantidad suficiente para alcanzar una concentración dentro del mismo de 100 μM . Luego de la inyección, los oocitos fueron incubados 40 min y colocados en una cámara especial, con el polo vegetal hacia el rayo de luz fluorescente. La cámara fue montada sobre la plataforma de un microscopio Nikon TE-200 invertido de epifluorescencia provisto con objetivo de inmersión Nikon Planfluor $\times 40$ (Nikon). El foco fue establecido en el centro del oocito y la fluorescencia fue de 490 nm y 440 nm para la excitación y a 530 nm para la emisión. La relación de fluorescencia 490/440 nm fue adquirida cada 30 s mediante la utilización de una cámara (Hamamatsu C4742-95, pais) y conectada a una computadora. La captura fue realizada utilizando el programa de adquisición Metafluor (Universal Imaging). Durante los primeros 6 minutos se adquirió la fluorescencia de oocitos colocados en medio control y luego esta solución fue removida por aspiración y reemplazada por las soluciones de diferente pH utilizadas en el ensayo de *swelling*. La fluorescencia del oocito en esta solución de pH fue adquirida durante 20 min. La curva de calibración se realizó por agregado a la cámara vacía de 200 μl de la soluciones de pH conteniendo 13 μM de BCECF. La relación entre la fluorescencia y pH se ajustó con la siguiente ecuación:

$$pH = pK_a + \log\left(\frac{R - R_{min}}{R_{max} - R}\right) \quad (4)$$

donde R es la relación de fluorescencia y Rmin son los máximos y mínimos de la misma (Graber et al. 1986). En todos los casos la fluorescencia basal fue sustraída antes de calcular las relaciones. Así se estableció que la relación entre el pH interno del oocito (pHi) y la solución de pH externo en la que se incubaba (pHe) responde a una relación lineal ($R^2 = 0.9849$) en nuestro rango de interés (pH 5.8 a 7.4), y esta dada por la siguiente ecuación:

$$pH_{int} = 0.4744 \times pH_{ext} + 3.593 \quad (5)$$

Vale aclarar que durante

la tesis doctoral del Dr. Jorge Bellati también se estudió la reversibilidad o estabilidad de las acuaporinas en la membrana plasmática durante la acidificación intracelular. Los resultados mostraron que los oocitos conservan la capacidad de agrandarse y achicarse acompañando los cambios hipo/iso-osmóticos del medio y en función del pH del mismo, lo que nos permite concluir que las acuaporinas permanecen en forma estable en la membrana plasmática cuando los oocitos son incubados en soluciones con pHs alejados del fisiológico (Bellati et al., 2010).

4.4 Mediciones de permeabilidad osmótica de agua: efecto de la N-glicosilación de PIPs en oocitos de *Xenopus*

Para estudiar el efecto de la glicosilación en PIPs se utilizó un protocolo descrito previamente (Schmalzing et al., 1997), basado en la acción del antibiótico tunicamicina como bloqueante de la N-glicosilación de proteínas nacientes en retículo endoplásmico (RE) por inhibición de la N-acetilglucosamina transferasa eucariota, inhibiendo por tanto la transferencia de la N-acetilglucosamina-1-fosfato al dolicol monofosfato (King and Tabiowo, 1981; Mahoney and Duksin, 1979; Duksin and Mahoney, 1982). Se solubilizó la tunicamicina (Sigma) en dimetilsulfóxido (DMSO) en una concentración 10 mg L^{-1} , y luego se realizó una dilución en ND96 para la inyección en los oocitos. Los oocitos fueron inyectados con $40 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ de tunicamicina 24 hs antes de realizar la inyección de el/los ARNc a estudiar y posteriormente mantenidos ON en solución ND96 suplementada con $2 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ de tunicamicina. Como control se utilizaron oocitos inyectados con tunicamicina y luego con agua, en lugar de ARNc. Todas las incubaciones posteriores se realizaron en presencia de tunicamicina. Posteriormente, se evaluó la funcionalidad de la acuaporina expresada o las acuaporinas co-expresadas sometidas a este tratamiento.

4.5 Análisis estadístico

Todos los experimentos se repitieron con al menos tres lotes diferentes de oocitos (provenientes de 3 *Xenopus* diferentes) y 2 síntesis independientes de ARNc. Cumpliendo con esto, todos los experimentos fueron repetidos al menos 3 veces y las figuras que se muestran corresponden a una figura representativa de los resultados observados. Esto se debe a que los diferentes lotes de oocitos, provenientes de diferentes anfibios o en diferentes estaciones del año, presentan permeabilidades osmóticas absolutas que pueden diferir levemente.

En cada experimento se detalla el número de oocitos por tratamiento. Los valores de P_f se muestran como promedios \pm SEM y las diferencias estadísticas se analizaron mediante el test *t* de Student no apareado o ANOVA de un factor seguido de test de Tukey. El análisis estadístico de los resultados fue realizado utilizando el programa Graph Pad Prism v5.02.

5. Detección de BvPIPs en membrana

5.1 Aislamiento de membranas de oocitos de *Xenopus*

Se procedió a la extracción de membranas plasmáticas y totales de oocitos de *Xenopus* que expresen la o las acuaporinas a estudiar. Con este fin se ensayaron dos protocolos: uno que permite la extracción de membranas totales del oocito (membrana plasmática y membranas internas) (Mulders et al., 1997) (Figura 14, protocolo 1), y otro que permite obtener una fracción de membranas enriquecidas en membrana plasmática (con baja contaminación en membranas de RE y mitocondria) (Amezcuá-Romero et al., 2010) (Figura 14, protocolo 2). En ambos casos se realizan todos los pasos de extracción de membranas a 4 °C. En el primer caso, cinco oocitos inyectados con ARNc de la acuaporina de interés son lisados con pipeta en 200 μ L de buffer de lisis HbA (20mM Tris pH 7.4, 5 mM NaH₂PO₄, 5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA pH 8, 80 mM sacarosa) suplementado inmediatamente antes de usar con inhibidores de proteasas (0.02 μ g/mL leupeptina, 0.02 μ g mL⁻¹ pepstatina A y 4 μ M fluoruro de fenilmetilsulfonilo o PMSF). El debris es separado mediante dos centrifugaciones a 200 g durante 15 min a 4°C y las membranas son luego obtenidas por centrifugación del sobrenadante a 16000 g durante 30 min a 4°C. Finalmente se resuspenden las membranas totales en 10 μ L de buffer HbA, y se guardan las muestras a -20 °C. Para la obtención de una fracción de membranas enriquecidas en membrana plasmática, se homogenizan con pipeta 20 oocitos con 500 μ L de una solución que se prepara inmediatamente antes de usar (10 mM K₂HPO₄, 5 mM EGTA pH 8, 5 mM EDTA, 1 mM PMSF). Se realiza una primera centrifugación a baja velocidad (110 g, por 5 minutos a 4°C), se toma el sobrenadante y se centrifuga a 20000 g, durante 30 minutos a 4 °C. Se descarta el sobrenadante por aspiración con pipeta p200 para evitar contaminación del pellet con una capa blanca que se observa en el sobrenadante. Se lava el pellet con 500 μ L de buffer utilizado previamente y se repite esta centrifugación a alta velocidad para la obtención de un sobrenadante traslúcido sin capa blanca y un pellet negro sin borde blanco. Se resuspende el pellet con 40 μ L de buffer fosfato frío suplementado con PMSF y se guardan las muestras a -20 °C.

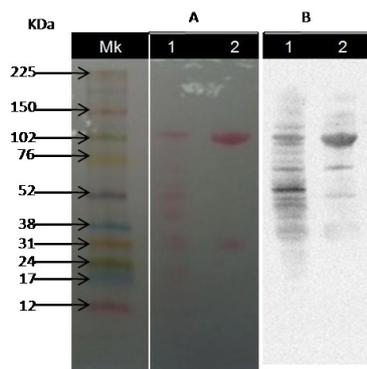


Figura 14: Protocolos de extracción para la obtención de membranas de oocitos de *Xenopus*.

Se inyectaron oocitos de *Xenopus* con 5 ng de ARNc que codifica para la proteína BvPIP2;1. Se realizó la extracción de membranas totales de oocitos (siguiendo el protocolo 1, calle 1 en gel A y B) y la extracción de la fracción de membranas enriquecida en membrana plasmática (siguiendo el protocolo 2, calle 2 en gel A y B). Se cuantificaron las muestras y se sembraron 35 µg de proteínas en las calles de un gel de poliacrilamida 10 % (p/v). En la primer calle se siembran 5 µL de un patrón de peso molecular (*Rainbow full-range molecular weight*, Amersham); el peso molecular de cada banda se indica a la izquierda (en KDa). El gel A corresponde a la tinción de la membrana de nitrocelulosa con rojo Ponceau, y el gel B al revelado utilizando anticuerpos policlonales anti PIP2 (Santoni et al., 2003). Dado el patrón de bandas hallado entre la tinción de proteínas totales con rojo Ponceau y el anticuerpo anti- PIP2 concluimos que dicho anticuerpo presenta reactividad cruzada con varias proteínas endógenas del oocito. Asimismo, el patrón de bandas encontrado para la fracción de membranas aisladas siguiendo el protocolo 1 o siguiendo el protocolo 2 es marcadamente distinto.

5.2 Cuantificación de proteínas

Una vez obtenidas las fracciones de membranas, se realizó la cuantificación de las proteínas según la técnica de Bradford (1976) adaptada a microescala. Brevemente, se realiza una mezcla de reacción en microplacas de Elisa con 10 µL NaOH 1 N, 10 µL de la muestra (en distintas diluciones), y 250 µL de una dilución 1/5 de reactivo de Bradford (Bio-Rad) preparada en el momento. Se realizó en simultáneo una curva de calibración utilizando estándares de sero albumina bovina BSA (Sigma). La absorbancia de cada muestra se determinó por espectrofotometría a 578 nm en un lector de placas (Sensident Scan, Merck).

5.3 Inmunodetección de BvPIPs

Con las fracciones de membranas aisladas se procedió a realizar estudios de *Western Blot*. Se sembraron 30-40 µg de proteínas diluidas en buffer Laemli (sin calentar) en cada calle de geles de poliacrilamida 10% (p/v), para someterlos a un SDS-PAGE. Para seguir la corrida y como marcador de peso molecular se siembra junto con las muestras 5 µL de un patrón de peso molecular (*Rainbow full-range molecular weight*, Amersham) (Figura 14, *Mk*). Los geles fueron preparados en un equipo comercial (Mini-Protean II Cell, Bio-Rad, USA) y la electroforesis se realizó primero a 60 V y luego a 100 V hasta el final de la corrida (aproximadamente 2 horas). Luego de la

electroforesis se realizó la transferencia de proteínas del gel a una membrana de nitrocelulosa (Amersham) en el equipo antes mencionado con amperaje constante= 300 mA por 90 minutos.

Una vez finalizada la transferencia, la membrana se tiñó con una solución de Rojo Ponceau (Sigma) para visualizar las proteínas y comprobar la eficiencia de la transferencia (Figura 14, gel A). La membrana de nitrocelulosa se lavó reiteradamente con agua destilada y se bloquearon los sitios libres de proteína con una solución de PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.4 mM NaH₂PO₄,

4.3 mM Na₂HPO₄, pH 7.4) conteniendo 3% (p/v) BSA y 0.1% (v/v) detergente Tween 20 (PBST más BSA). El bloqueo se realizó con agitación durante 1 h y a temperatura ambiente. Una vez bloqueadas las membranas, fueron incubadas con los anticuerpos específicos primarios diluidos en PBST más BSA en la dilución correspondiente, 1 h a temperatura ambiente y el resto de la noche a 4 °C. Posteriormente se realizaron tres lavados de 15 min cada uno en la solución PBST más BSA y dos lavados más en PBS. La membrana se incubó luego con el anticuerpo secundario anti IgG de conejo conjugado con la peroxidasa de rabanito, dilución 1:25000 (Sigma), durante 1 h a temperatura ambiente. Se realizaron nuevamente lavados en PBST+BSA y PBS. La detección de las proteínas marcadas por los anticuerpos se realizó por quimioluminiscencia utilizando un reactivo comercial con alta sensibilidad (*Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus*, Perkin Elmer, LifeSciences Inc.) utilizando el equipo comercial Fuji LAS-1000plus.

Para la inmuno detección de BvPIPs se utilizaron anticuerpos policlonales anti PIP2 en dilución 1:5000 (de *Arabidopsis thaliana*, Santoni et al., 2003) que fueron gentilmente cedidos por el Dr. M.C. Chrispeels y el Dr. Aroca.

5. 4 Detección de BvPIPs por fluorescencia en gel

Para la detección de BvPIP por fluorescencia en gel se procedió a la extracción de la fracción de membranas enriquecidas en membrana plasmática de oocitos de *Xenopus* que expresan BvPIPs fusionadas a proteínas fluorescentes según el protocolo de Amezcua-Romero (2010), nombrado como protocolo 2 (Sección 5.1, *Aislamiento de membranas de oocitos de Xenopus*). Posteriormente, 35 µL de cada muestra (~50 µg de proteínas) fueron diluidas en buffer de siembra I 5x (87.5 mM Tris pH 7.6, 20 % glicerol, 8.75 mM EDTA, 0.035% azul de bromofenol, 5 % SDS, 50 mM DTT) o buffer de siembra II 5x (87.5 mM Tris pH 7.6, 20 % glicerol, 8.75 mM EDTA, 0.035% azul de bromofenol, 1 % SDS, 10 mM DTT), según Wittig et al., 2007. Se sembraron las muestras en geles Tris-Tricina en gradiente 10-15%. Los buffers anódico y catódico usados presentaron la misma composición (100 mM Tricina, 100 mM Tris y 200 mM Tris, pH 8.9), pero la concentración de SDS fue variada para realizar una electroforesis en condiciones desnaturizantes (0.2 % SDS) o en condiciones más suaves (0.1 % SDS). Los geles se corrieron a 30 V hasta que las muestras ingresaran a las calles, luego a 80 V hasta el *running*, y durante el

running primero a 100 V y luego a 120 V. Los gels se visualizaron por fluorescencia en gel utilizando un equipo para scanear imágenes fluorescentes (Storm 840, Molecular Dynamics).

Los gels en gradiente fueron realizados en colaboración con el Dr. Luis Gonzalez Flecha, del Instituto de Química y Fisicoquímica Biológicas "Prof. Alejandro C. Paladini", UBA-CONICET.

6. Localización celular de BvPIPs en oocitos de *Xenopus*

6.1 Adquisición de imágenes de fluorescencia en microscopio confocal

Como indicador del interior celular se usó tetra-metil-rodamina dextrano (TMR-Dextrano) (10.000 MW; Invitrogen-Molecular Probes), un fluorocromo no específico sin conjugar que permanece en el área de los gránulos corticales por su alto peso molecular y permite distinguir membrana plasmática del interior celular (Figura 15).

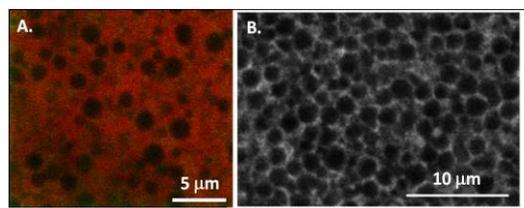


Figura 15: Imágenes confocales obtenidas con distintos marcadores en la zona de los gránulos corticales del polo vegetal de oocitos de *Xenopus*.

Imágenes confocales obtenidas en x-y a $z = 3 \mu\text{m}$, que corresponde al plano en donde se ven mejor enfocados los gránulos corticales (vesículas usadas en la fertilización). Estos gránulos se encuentran tanto en el hemisferio vegetal como animal, próximos a la membrana plasmática (3-10 μm), y tienen dimensiones típicas de 1-2 μm . Además de los gránulos corticales, el RE presenta una estructura muy intrincada de túbulos; algunas zonas oscuras en la imagen pueden corresponder al interior del RE. (A) Oocito microinyectado con el marcador intracelular TMR-Dextrano que empleamos en este trabajo. (B) Oocito microinyectado con una proteína fluorescente de membrana marcadora de RE, ampliamente utilizada en la bibliografía: GFP-KDEL. La imagen (B) fue tomada de Terasaki et al., 2001.

Tres o cuatro días después de la inyección del ARNc a estudiar y 40 minutos antes del registro de las imágenes, los oocitos se inyectan con 50 nl de una solución 33 mM de TMR-Dextrano. Las imágenes de fluorescencia de EYFP o ECFP (fusionadas a las PIP correspondientes) se obtuvieron mediante microscopía láser confocal utilizando un microscopio FluoView1000 confocal de barrido espectral (Olympus Co., Japón), empleando un aceite de inmersión 60X UPlan Sapo y un objetivo NA1.35. Se midió en dos canales línea a línea en forma secuencial para poder separar las contribuciones de cada fluoróforo y se controló la autofluorescencia utilizando oocitos control (no inyectados con las proteínas fluorescentes). La autofluorescencia resultó en todos los casos despreciable respecto a la fluorescencia de los oocitos inyectados con BvPIPs marcadas con proteínas fluorescentes. Los oocitos expresando BvPIP1;1-ECFP e inyectados con TMR-Dextrano, fueron excitados usando un láser de Argón multilínea de 458 nm y 515 nm, respectivamente, y la fluorescencia fue detectada a 475-500 nm y 555-655 nm, respectivamente. Los oocitos expresando BvPIP2;2-EYFP e inyectados con TMR-Dextrano, fueron excitados usando un láser de Argón a

488 nm y un láser He-Ne a 543 nm, respectivamente, y la fluorescencia fue detectada a 500-535 nm y 570-670 nm, respectivamente.

Las imágenes se tomaron siempre en el hemisferio vegetal, ya que a diferencia del hemisferio animal, no posee gránulos de pigmento que pueden interferir con la medición. Se tomaron imágenes en distintos planos y también secuencias de imágenes de barrido a diferentes profundidades del ovocito (es decir a diferentes alturas en dirección al eje óptico). Como referencia se tomo $z = 0 \mu\text{m}$ en el primer plano (más externo) en donde se detecta fluorescencia proveniente del ovocito, con $z > 0$ adentrándose en la célula, utilizando pasos de 0.10-0.25 μm . Las imágenes se tomaron con resolución $800 \times 800 \text{ pix}^2$, tamaño de pixel 26 nm y tiempo por pixel 12.5 us. Se analizaron entre 3-4 oocitos de 7 *Xenopus* diferentes para cada condición.

6. 2. Análisis de las imágenes de fluorescencia obtenidas en el microscopio confocal Los análisis de intensidad de fluorescencia, se calcularon con el programa ImageJ 1.48v (<http://imagej.nih.gov/html>) promediando pixeles consecutivos a lo largo de 10 μm , en la dirección especificada en cada figura.

Para la reconstrucción tridimensional de las imágenes, se colectaron imágenes x-y a distintas profundidades focales con pasos de 100 nm. El stack de imágenes fue deconvolucionado empleando como método de restauración la estimación de máxima verosimilitud y posteriormente las imágenes fueron renderizadas empleando el programa *Huygens Professional* (Scientific Volume Imaging).

Las imágenes de microscopía confocal fueron tomadas en el Centro de Microscopías Avanzadas (CMA) y Departamento de Física, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, de la Universidad de Buenos Aires, y tanto la captura como el análisis de las imágenes se realizaron en colaboración y bajo la supervisión de la Dra. Lía Pietrasanta y la Dra. Lorena Sigaut que pertenecen al CMA.

7. Estudios estructurales de BvPIP2;1

7.1 Modelado por homología

La secuencia en estudio fue enviada al servidor Swiss Model (Arnold et al., 2006) (<http://swissmodel.expasy.org/>) para crear un modelo de BvPIP2;1 (y las mutantes de BvPIP2;1) basado en homología. El molde que resultó ser el más adecuado para construir el modelo fue la cadena A del tetrámero depositado en la entrada PDB 2B5F (en www.pdb.org), el cual corresponde a la estructura cristalizada de la acuaporina SoPIP2;1 en conformación abierta (resolución 3.9 Å) (Törnroth-Horsefield et al., 2005). Se realizó un alineamiento de secuencias con Clustal X y se envió al servidor SIAS (<http://imed.med.ucm.es/Tools/sias.html>), el cual informó una similitud de secuencia de 72,95%. La identidad de secuencia entre BvPIP2;1 y SoPIP2;1 fue de 86,6% y el modelo recuperado se superpuso muy bien sobre la cadena A, especialmente en las regiones con

estructura secundaria tipo hélice alfa. Con el fin de explorar la geometría del homotetrámero, cuatro modelos idénticos se superpusieron sobre cada monómero de la estructura cristalina.

Los modelados por homología de ZmPIP2;5 (número de acceso en UniProtKB/Swiss-Prot: Q9XF58.1), AtPIP2;3 (número de acceso en GenBank: AEC09363) y BvPIP2;2 (número de acceso en GenBank: GQ227846) fueron realizados utilizando el programa Phyre2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>).

Las figuras fueron generadas con VMD 1.9.2 (Visual Molecular Dynamics, University of Illinois); esta herramienta provee una interfaz gráfica para esquematizar la proteína y señalar los residuos de interés en distintos formatos y colores. Para estudiar las cargas electrostáticas y los potenciales de cargas en las proteínas se utilizan el programa PDB2PQR que calcula los potenciales de Poisson-Boltzman (Dolinsky et al., 2004) y el programa APBS (por *Adaptative Poisson-Boltzman Solver*, en inglés) que permite modelar los potenciales electrostáticos utilizando la ecuación de Poisson-Boltzman (Baker et al., 2001), cargados dentro del programa de visualización VMD.

7.2 Estudios de simulación por dinámica molecular (MDS)

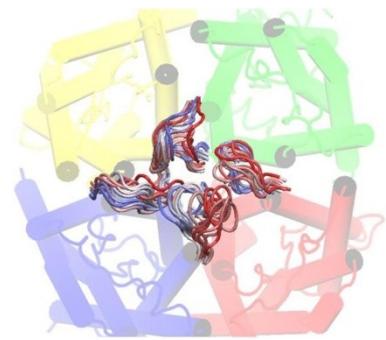
Con el fin de caracterizar la dinámica molecular del *loop* A de PIP2;1, construimos por modelado por homología la topología del homotetrámero de PIP2;1, que fue solvatado totalmente en una caja octaédrica con aguas tipo TIP3P en condiciones periódicas de contorno (PBC).

El MDS se realizó utilizando el software AMBER 11 (Case et al., 2010). El modelo se preparó con un protocolo de 3 pasos. En primer lugar, se corrieron 2.000 pasos de optimización de cadenas aminoacídicas laterales, en segundo lugar se realizó una termalización a 300 K con un termostato Berendsen a volumen constante, y en tercer lugar, se realizaron 50.000 pasos de optimización a la misma temperatura y presión constante de 1 atm. Por último, se realizaron 30 ns de MDS. Se impuso una restricción a los carbonos α de las hélices transmembrana para imitar la bicapa lipídica, que no fue modelada por el costo computacional que esto implica. Este sistema se mantuvo estable a lo largo de toda la dinámica. El mismo procedimiento se llevo a cabo para el análisis de la dinámica molecular de las mutantes de BvPIP2;1 (N64E65/H64Q65 y N64E65/I64Q65), pero en este caso la dinámica se realizó durante 35 ns.

Los experimentos de dinámica molecular fueron realizados en colaboración con el Dr. Pablo Rosi (Instituto de Química y Física de los Materiales, Medio Ambiente y Energía – INQUIMAE- de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, de la Universidad de Buenos Aires.

CAPITULO 1.

Análisis de la funcionalidad de BvPIP2;1 y de los determinantes estructurales que median la interacción PIP1-PIP2.



Introducción

Al comenzar esta Tesis Doctoral se contaba con varios antecedentes acerca de la permeabilidad al agua de las células de la raíz almacenadora de *Beta vulgaris*. Los resultados mostraron que vesículas aisladas de membrana plasmática de estas células exhiben altos valores de permeabilidad osmótica al agua (P_f) e inhibición parcial frente a compuestos mercuriales. Estos datos fueron acompañados por estudios de *Western blot* que revelaron la presencia de acuaporinas del tipo PIP en la membrana plasmática de dichas células (Alleva, tesis doctoral 2007). Posteriormente, se clonaron tres acuaporinas *Beta vulgaris*: BvPIP1;1, BvPIP2;2 y BvPIP2;1 (números de acceso en Genbank: GQ227845, GQ227846, U60148, respectivamente) y se caracterizaron parcialmente dos de ellas: BvPIP2;2 y BvPIP1;1 (Bellati, tesis doctoral 2012). En su conjunto, los estudios de funcionalidad mostraron que:

- la acuaporina BvPIP2;2, pero no BvPIP1;1, presenta alta capacidad para el transporte de agua cuando es expresada en oocitos de *Xenopus* (Bellati et al., 2010);
- el pH intracelular (pH_{int}) ácido, pero no el pH extracelular ácido, es un elemento capaz de bloquear el movimiento de agua a través de las BvPIPs (Alleva et al., 2006);
- la co-expresión de BvPIP1;1 y BvPIP2;2 en oocitos de *Xenopus* ofrece a la membrana plasmática una alta permeabilidad al agua y un $pH_{0.5} \sim 6,7$ (valor de pH que corresponde a la mitad de la P_f máxima observada), mientras que los oocitos que solo expresan PIP2 presentan una permeabilidad moderada y un $pH_{0.5} \sim 6,4$ (Bellati et al., 2010);
- cuando ambas acuaporinas BvPIP1;1 y BvPIP2;2 están co-expresadas en la misma célula, la inhibición de la P_f es total ($\sim 90\%$), mientras que BvPIP2;2 expresada sola muestra un bloqueo parcial ($\sim 70\%$);
- la curva dosis respuesta de permeabilidad osmótica al agua en función de pH para vesículas de membrana plasmática de *Beta vulgaris* sometidas a diferentes pHs es similar y coincide con los resultados obtenidos para la curva dosis respuesta realizada en oocitos que co-expresan BvPIP1;1 y BvPIP2;2 (Alleva et al., 2006; Bellati et al., 2010).

Estos resultados indicaban que BvPIP2;2 es una acuaporina activa para el transporte de agua, capaz de interactuar funcionalmente con BvPIP1;1 y que la apertura y el cierre de las acuaporinas del tipo PIP de *Beta vulgaris* es regulada por acidificación intracelular, siendo diferente la regulación por pH_{int} si se encuentra expresada solo PIP2 en el oocito o si esta acuaporina es co-expresada con PIP1 en la misma célula. Asimismo, dado que las curvas dosis respuesta de P_f en función de pH para la co-expresión de acuaporinas en oocitos y para las vesículas de membrana plasmática de *Beta vulgaris* son similares, la co-expresión de acuaporinas tendría relevancia no solo en el sistema heterólogo elegido para los estudios biofísicos de transporte de agua, sino que daría cuenta de los resultados observados para el comportamiento hidráulico de membranas nativas.

Si bien no conocemos el número exacto de PIPs presentes en la membrana nativa de la raíz almacenadora de *Beta vulgaris*, sabemos que se expresan tanto PIP2 como PIP1 (detectadas con anticuerpos que distinguen entre isoformas pero no entre miembros del mismo grupo), y que las acuaporinas que fueron clonadas para su estudio en sistemas heterólogos de expresión (BvPIP2;1, BvPIP2;2 y BvPIP1;1) se encuentran expresadas en todos los tejidos (Figura 16) (Bellati et al., 2010), pero en particular han sido reportadas como las proteínas más abundantes en la raíz almacenadora de *Beta vulgaris* (Qi et al., 1995; Barone et al., 1998).

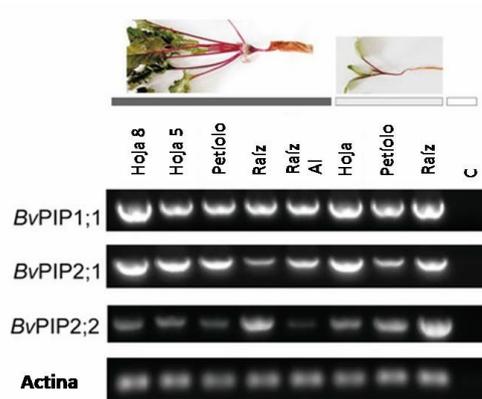


Figura 16: Patrón de expresión de BvPIP2;2, BvPIP2;1 y BvPIP1;1 en distintos órganos y tejidos de *Beta vulgaris*.

Se realizó un experimento de RT-PCR en la variedad Detroit de *Beta vulgaris*, en plantas jóvenes y adultas para identificar los patrones de expresión de las proteínas BvPIP2;2, BvPIP2;1 y BvPIP1;1 en distintos órganos y tejidos. Figura tomada de Bellati et al., 2010.

Al momento de iniciar la presente Tesis Doctoral existían muchas evidencias acerca de la interacción física y funcional entre distintos pares de PIP1 y PIP2; sin embargo, varios reportes mostraban que algunas PIP2 no son capaces de interactuar funcionalmente con PIP1. En este sentido resultó interesante indagar cuáles son las diferencias entre las proteínas pertenecientes al grupo PIP2 que condicionan su funcionalidad y su capacidad de interacción con PIP1. Tampoco estaba claro cuáles son los elementos estructurales de estas proteínas que tienen un rol clave para mediar la interacción con las proteínas del grupo PIP1 y que condicionan su ensamblado hetero-oligomérico u hetero-tetramérico. El contar con dos PIP2 diferentes (BvPIP2;1 y BvPIP2;2), nos brindó la oportunidad de establecer estrategias experimentales para profundizar en el conocimiento de las interacciones proteína-proteína que puedan darse entre acuaporinas tipo PIP tanto molecular como funcionalmente.

En primer lugar, y dado que no había sido caracterizada funcionalmente en forma previa, nos focalizamos en el estudio de BvPIP2;1 en comparación con las acuaporinas BvPIP2;2 y BvPIP1;1 parcialmente caracterizadas de *Beta vulgaris*. Se realizó un estudio filogenético y se procedió a la caracterización funcional de BvPIP2;1 en el clásico sistema de expresión de oocitos de *Xenopus*, evaluando su interacción funcional con acuaporinas del tipo PIP1 y el efecto de moduladores de la

apertura y cierre de PIP2 sobre la actividad del canal. Además se determinó la localización de las acuaporinas de *Beta vulgaris* en estudio. Por otro lado, se evaluaron las diferencias en la estructura primaria de BvPIP2;1 respecto de otras PIP2 que puedan dar cuenta de sus diferencias funcionales, en particular, nos propusimos hallar las diferencias estructurales entre pares de PIP2 y PIP1 que no interaccionan y los que sí lo hacen.

Una vez completa la caracterización de las tres PIP de *Beta vulgaris*, se procedió a estudiar mediante el uso de mutantes de PIP2 los elementos estructurales que mediarían la interacción PIP1- PIP2 en los posibles hetero-oligómeros u hetero-trámeros.

Objetivos

El objetivo general de la primera parte de esta Tesis Doctoral es analizar las características estructurales, la funcionalidad y la regulación de BvPIP2;1 en tanto canal de agua, y su capacidad de interactuar con BvPIP1;1, determinando las características estructurales que condicionan dicha interacción.

Este objetivo general da lugar a varios objetivos específicos que operaron como guía del diseño experimental que se llevó adelante para abordar el problema en cuestión. Se propuso alcanzar los siguientes Objetivos Específicos:

OE1: Estudiar la filogenia de BvPIP2;2, BvPIP2;1 y BvPIP1;1;

OE2: Caracterizar funcionalmente a la acuaporina BvPIP2;1 en el sistema de expresión heterólogo de oocitos de *Xenopus laevis*, evaluando su capacidad de transportar agua y su capacidad de interactuar con BvPIP1;1;

OE3: Evaluar la regulación de la actividad de BvPIP2;1 por pH intracelular ácido;

OE4: Resolver la localización de BvPIP2;2, BvPIP2;1 y BvPIP1;1 cuando son expresadas individualmente o co-expresadas en oocitos de *Xenopus*;

OE5: Analizar las diferencias en la estructura primaria de BvPIP2;1 respecto de otras acuaporinas ya caracterizadas;

OE6: Estudiar los elementos estructurales que median la interacción PIP1-PIP2, evaluando la capacidad de interacción de mutantes funcionales de BvPIP2;1 con BvPIP1;1;

OE7: Estudiar la estructura de BvPIP2;1 mediante modelado por homología y dinámica molecular.

Resultados

Análisis filogenético de BvPIPs

Se realizó un árbol filogenético analizando únicamente a acuaporinas de la subfamilia PIP, provenientes de 32 especies mono y dicotiledóneas, que se dividieron en 3 *clusters*, PIPCLI, PIPCLII y PIPCLIII, como fue reportado previamente en Soto y colaboradores (2012). Estos autores encontraron que a pesar de que se cumplen los requisitos de identidad aminoacídica para agrupar a todas las PIPs en un solo *cluster*, las acuaporinas de este grupo presentan inserciones y deleciones que no permiten un alineamiento correcto entre ellas, y por tanto fueron separadas en tres *clusters* distintos: un único *cluster* donde se agrupan todas las acuaporinas PIP1 y dos *clusters* para las acuaporinas del grupo PIP2.

El resultado del análisis filogenético muestra que las tres acuaporinas de *Beta vulgaris* en estudio pertenecen cada una a un *cluster* diferente: BvPIP1;1 (GenBank: U60149.1, GI: 1402836) corresponde al PIPCLI (Figura 17), y BvPIP2;2 (GenBank: U60147.1, GI: 1402832) y BvPIP2;1 (GenBank: U60148.1, GI: 1402834) corresponden al PIPCLII y PIPCLIII, respectivamente (Figura 18).

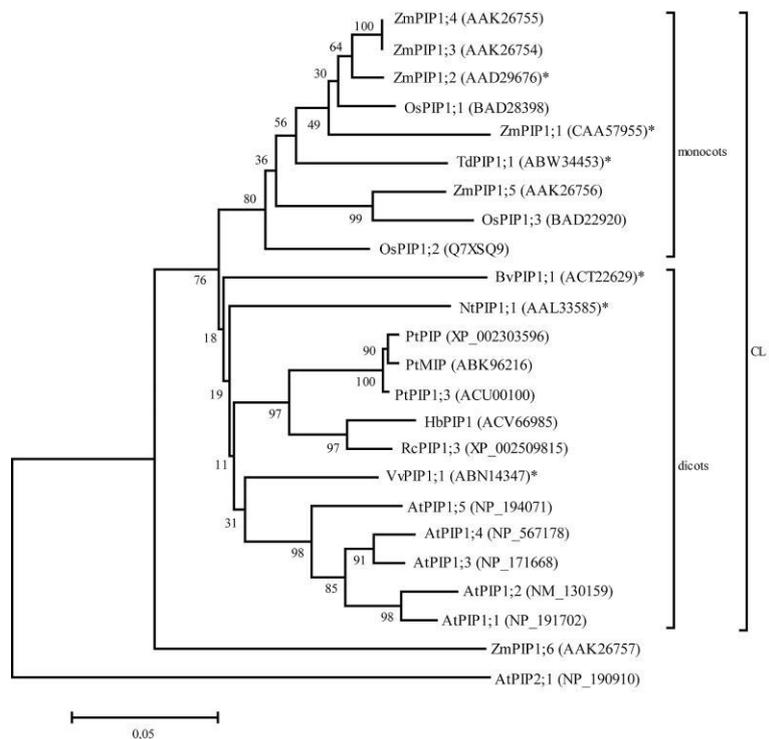


Figura 17: Árbol filogenético de proteínas PIP1.

En la figura se muestra el árbol filogenético construido a partir de taxones de secuencias representativas de proteínas tipo PIP1. Los porcentajes *Bootstrap* se indican en los puntos de ramificación. Se muestra la topología de los árboles obtenidos con el método NJ; los métodos de evolución mínima y los métodos de máxima parsimonia resultaron en árboles idénticos; como *outgroup* se utilizó la secuencia de AtPIP2;1. La secuencia de BvPIP1;1, y de otras PIPCLI cuya interacción funcional con PIPs de los *clusters* PIPCLII y PIPCLIII fue reportada, se identificaron con un asterisco.

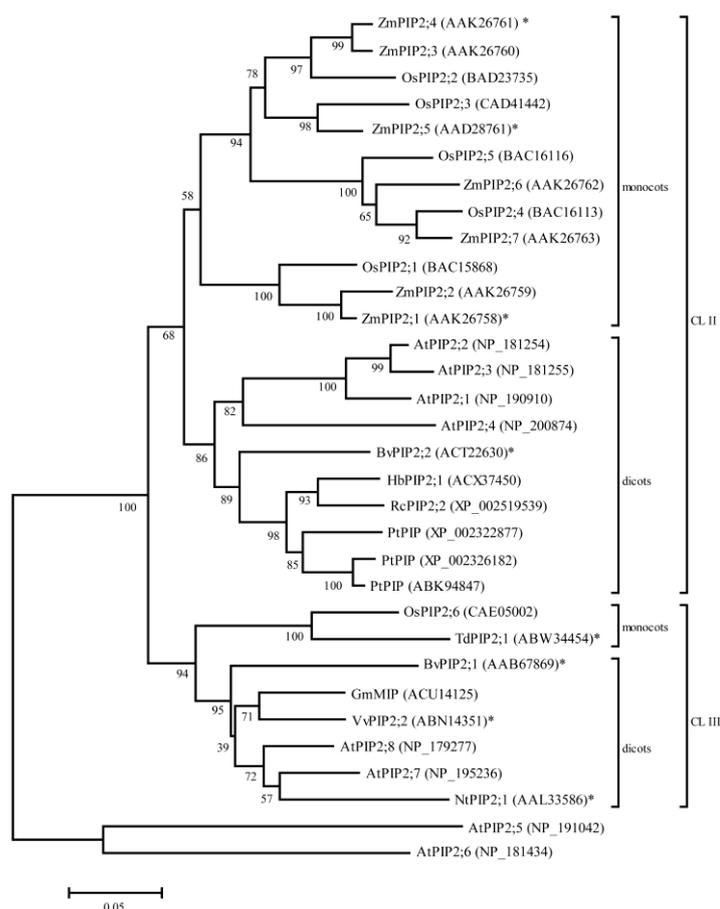


Figura 18: Árbol filogenético de proteínas PIP2.

Se muestran los árboles filogenéticos de PIPCLII y PIPCLIII, y los taxones de las secuencias de proteínas representativas. Los porcentajes *Bootstrap* se indican en los puntos de ramificación. Los grupos de genes ortólogos (CL) se indican a la derecha. Se muestra la topología del árbol obtenido con el método NJ; con los métodos de evolución mínima y los métodos de máxima parsimonia se obtuvieron árboles idénticos. Como *outgroup* se utilizaron las secuencias de AtPIP2;5 y AtPIP2;6. Las secuencias de BvPIP2;1, y de otras PIPCLII y PIPCLIII cuya interacción funcional con otras PIPCLI fue reportada, se identificaron con un asterisco.

BvPIP2;2 pertenece al *cluster* PIPCLII, al igual que varias acuaporinas PIP2 de *Zea mays* (ZmPIP2;1, ZmPIP2;4 y ZmPIP2;5) y de *Oryza sativa* (OsPIP2;1). Todas las acuaporinas estudiadas de este grupo presentan capacidad de transporte de agua e interacción con proteínas pertenecientes al PIPCLI (Luu et al., 2012; Fetter et al., 2004; Zelazny et al., 2009; Bellati et al., 2010). Por su parte, BvPIP1;1 pertenece al CLI al igual que todas las PIP1 caracterizadas hasta el momento. Por otro lado, la acuaporina que queremos caracterizar, BvPIP2;1, pertenece al CLIII, y dentro de las especies dicotiledóneas aparece como ortóloga a otras PIP2 poco caracterizadas funcionalmente, como ser AtPIP2;7, AtPIP2;8 y GmPIP. A diferencia de la mayor parte de las PIP2 de *Arabidopsis thaliana*, AtPIP2;7, no se expresa ni en raíz ni en hoja (Hachez et al., 2006, 2008) y solo existe un estudio funcional que muestra que este canal es capaz de transportar peróxido de hidrógeno

Capítulo 1. Resultados

(Hooijmaijers et al., 2012); en tanto las proteínas AtPIP2;8 y GmPIP no fueron caracterizadas aún. Por último, BvPIP2;1 también aparece como ortóloga de VvPIP2;2 y NtPIP2;1. Ambas PIP2 mostraron ser capaces de transportar agua eficientemente, pero mientras VvPIP2;2 mostró interacción funcional con VvPIP1;1 (Vandeleur et al., 2009), NtPIP2;1 muestra interacción funcional con NtPIP1;1 (Mahdieh et al., 2008) pero no con NtAQP1 (Bots et al., 2005). Por lo tanto, la diferenciación de las PIP2 en dos *clusters* no estaría en relación ni con la capacidad de transportar agua ni con la falta de interacción entre algunas PIP1 y algunas PIP2.

Análisis topológico de BvPIP2;1

Para comenzar la caracterización funcional de BvPIP2;1 realizamos un análisis de la posible topología de membrana de esta proteína con el objetivo de identificar los motivos presentes en su estructura primaria que son comunes a los descriptos para otras AQP de la misma familia. Como se muestra en la Figura 19 esta proteína presenta características estructurales compartidas por todas las acuaporinas: seis pasos transmembrana y dos motivos NPA, ubicados en los *loops* B y E que se insertan en la membrana, y el N- y el C-terminales citoplasmáticos.

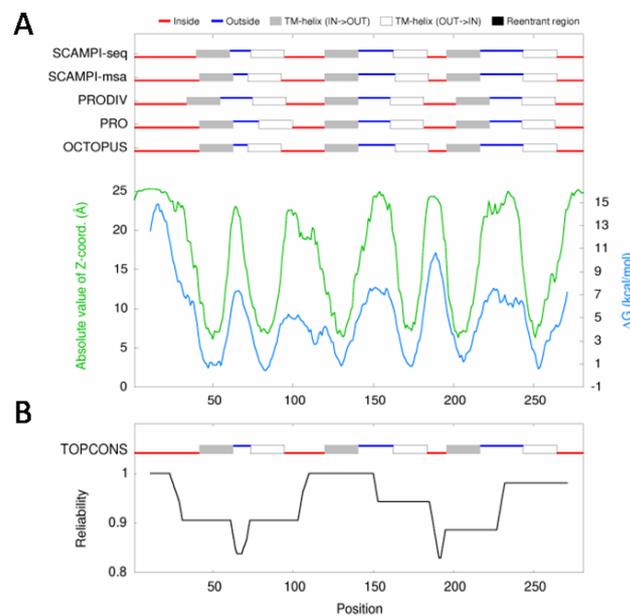


Figura 19: Análisis de la topología de membrana de la proteína BvPIP2;1.

En (A) se muestran las topologías, los valores de ΔG (variación de energía libre de Gibbs) y las distancias predichas al centro de la membrana ($z=0$), según distintos algoritmos: SCAMPI-msa, SCAMPI-seq, PRODIV, PRO, OCTOPUS. En (B) se muestran las predicciones consenso utilizando el programa TOPCONS (*Consensus prediction of membrane protein topology and signal peptides*; <http://topcons.cbr.su.se/>).

Además, BvPIP2;1 presenta todos los residuos que han sido asignados como responsables del transporte de agua en otras PIP, sitios identificados como fosforilables en otros canales de agua (presentes en el C-terminal) y una histidina muy conservada (presente en *loop* intracelular D) que se ha probado es sensora de cambios de pH intracelular (Figura 20) tal como se detalló en la Introducción General de esta Tesis, sección *Regulación de la apertura y cierre de las PIPs (gating)*, página 27. Sin embargo, a diferencia de muchas PIP2, BvPIP2;1 presenta un motivo

Capítulo 1. Resultados

consenso para la N-glicosilación (NETD) en el primer *loop* extracitoplasmático -llamado *loop* A- y ausencia de motivos diacídicos que otras PIP presentan en el dominio N-terminal, señalados como responsables del correcto tráfico de algunas PIP2 a membrana plasmática (Zelazny et al., 2009; Sorieul et al., 2011) (Figura 20).

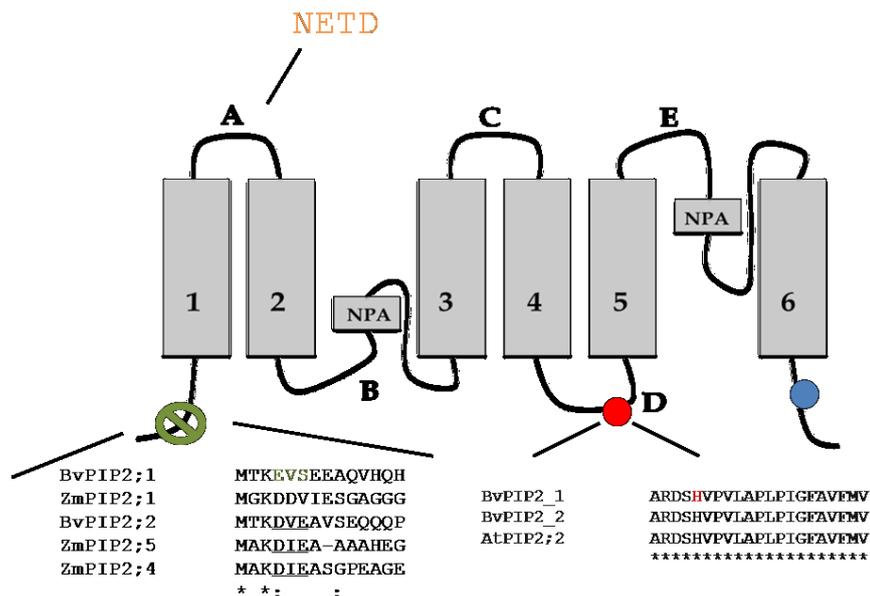


Figura 20: Representación esquemática de una acuaporina tipo PIP2.

Se indican 1-6 los seis pasos transmembrana y los motivos NPA (Asp-Pro-Ala) conservados en todas las acuaporinas tipo PIP. A, C, E corresponden a los *loops* extracitoplasmáticos y B, D a *loops* citosólicos. Sobre el *loop* A se muestra en naranja el motivo de N-glicosilación (NETD) de BvPIP2;1. El círculo rojo indica el sitio donde se encuentra la Histidina 193 de BvPIP2;1 (marcada en rojo en el alineamiento múltiple que se muestra debajo), muy conservada en todas las PIP2, que es sensora del pH. El círculo azul indica sitios putativos de fosforilación identificados en el C-terminal de otros canales tipo PIP y presentes en BvPIP2;1. Sobre el N-terminal se muestra un alineamiento múltiple que indica los motivos diacídicos (subrayados) presentes en algunas PIP2. El motivo DXE ha sido reportado como responsables del direccionamiento de ZmPIP2;4 y ZmPIP2;5 a la membrana plasmática (Zelazny et al., 2009). Este motivo está presente en BvPIP2;2 pero ausente en BvPIP2;1 (marcado en verde en el alineamiento múltiple) y en ZmPIP2;1. Los asteriscos indican sitios de la secuencia aminoacídica muy conservados, los dos puntos indican sitios con conservación media, y la ausencia de marca indica que no hay conservación en ese sitio.

Análisis funcional de BvPIP2;1

Con el objetivo de caracterizar funcionalmente a BvPIP2;1 se procedió a evaluar su actividad biológica al ser expresada en el clásico sistema de expresión de oocitos de *Xenopus* (Figura 21).

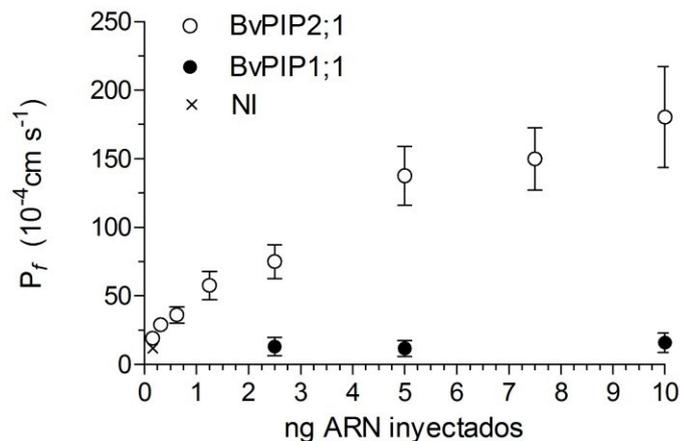


Figura 21: Permeabilidad osmótica (P_f) de membranas de oocitos de *Xenopus* inyectados con distintas masas de ARNc de BvPIP2;1.

Se inyectaron distintas masas de ARNc de BvPIP2;1 en oocitos de *Xenopus* y después de tres días se determinó la permeabilidad osmótica de las membranas (P_f). El control negativo se realiza con oocitos no inyectados, ya que previamente hemos corroborado que no hay diferencias significativas entre la permeabilidad osmótica al agua de éstos respecto a los oocitos inyectados solo con agua. Los datos se expresan como valores medios (media $P_f \pm \text{SEM}$, $n = 8-15$). La figura muestra los datos representativos de tres experimentos independientes.

Los resultados obtenidos mostraron que los oocitos inyectados con el ARNc codificante para BvPIP2;1 presentan, ante un *shock* osmótico, un aumento de volumen significativamente mayor al observado para los oocitos no inyectados, demostrando que esta acuaporina es capaz de transportar agua (Figura 21). Más aun, la permeabilidad osmótica de las membranas que expresan BvPIP2;1 es mayor cuanto mayor es la cantidad de ARNc inyectado en las células, indicando que, dentro de cierto rango, se mantiene una relación entre ARNc inyectado y proteína sintetizada y expresada en membrana plasmática (Figura 21).

Por otro lado, los resultados muestran que la inyección de ARNc codificante para BvPIP1;1 no repercute en un aumento de la permeabilidad osmótica de las membranas, cualquiera sea la masa de ARNc codificante para BvPIP1;1 inyectada (Figura 21). Estos resultados son compatibles con varias hipótesis: i- pueden indicar que BvPIP1;1 es incapaz de transportar agua eficientemente, como fue reportado para otras PIP1 (Daniels et al., 1994; Yamada et al., 1995; Weig et al., 1997; Johansson et al., 1998; Biela et al., 1999; Chaumont et al., 2000; Marin-Olivier et al., 2000; Moshelion et al., 2002), ii- pueden sugerir que BvPIP1;1 es retenida intracelularmente, como fue reportado para otro grupo de PIP1 (Zelazny et al., 2007, 2009; Yaneff et al., 2014) o, iii- pueden señalar que BvPIP1;1 no alcanza la membrana plasmática porque no se expresa eficientemente. Estas hipótesis serán puestas a prueba más adelante.

Como se señaló anteriormente y se mostró en la Figura 10, otras acuaporinas de tipo PIP2 expresadas junto con PIP1 han probado aumentar la permeabilidad de la membrana de oocitos

de *Xenopus* mas allá de la permeabilidad que aporta la expresión de PIP2 sola (Fetter et al., 2004; Vandeleur et al., 2009; Bots et al., 2005; Alleva et al., 2010; Bellati et al., 2010). Por tanto, la caracterización funcional completa de BvPIP2;1 incluye el estudio de su interacción con PIP1. Se procedió a co-expresar BvPIP2;1 junto con BvPIP1;1 en oocitos de *Xenopus laevis* y se observó que la co-inyección de ARNc de BvPIP2;1 con el ARNc de una BvPIP1;1 no repercute en diferencias significativas en cuanto a la permeabilidad osmótica (P_f) de estos oocitos respecto de la P_f hallada para oocitos inyectados solo con el ARNc de BvPIP2;1, incluso variando las relaciones de masas de ARNc co-inyectado (Figura 22).

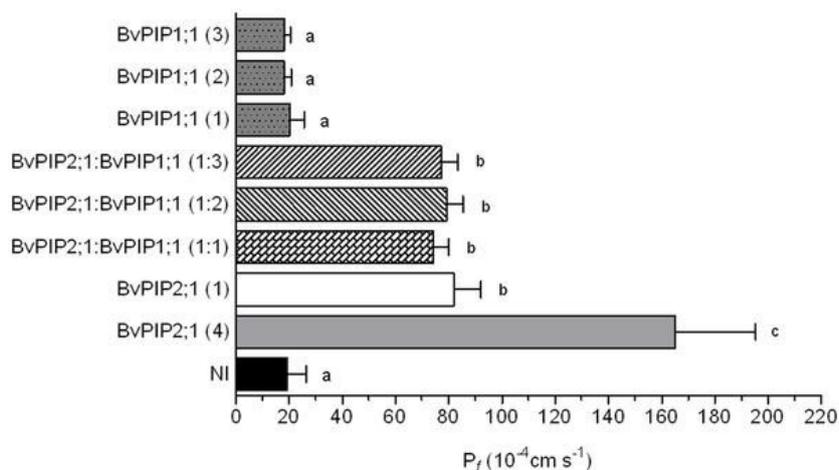


Figura 22: Permeabilidad osmótica (P_f) de membranas de oocitos que co-expresan BvPIP2;1 y BvPIP1;1.

Diferentes cantidades de ARNc de BvPIP2;1, BvPIP1;1 o una mezcla de BvPIP2;1 y BvPIP1;1 (BvPIP2;1:BvPIP1;1) fueron inyectadas. La P_f de los oocitos co-inyectados con diferentes relaciones de masa de ARNc de BvPIP2;1 y BvPIP1;1 (1:1, 1:2, 1:3) no fue significativamente diferente a la P_f observada para la expresión de ARNc de BvPIP2;1 sola. Entre paréntesis se indica la cantidad relativa de ARNc inyectada en cada oocito, siendo 1 equivalente a 2.5 ng, y 2 o 3, dos o tres veces esa cantidad, respectivamente. Una inyección de cuatro veces de BvPIP2;1 (4) se utilizó como control, demostrando que el sistema de expresión no está saturado; NI corresponde a oocitos no inyectados. La P_f de los oocitos inyectados con distintas cantidades de ARNc de BvPIP1;1 no es significativamente diferente a los oocitos control NI ($p > 0,01$). Los datos se expresan como valores medios (media $P_f \pm$ SEM, $n = 12-15$). La figura muestra los datos representativos de cinco experimentos independientes. Letras diferentes indican significancia entre barras ($p < 0,05$).

Como control, se co-inyectó el ARNc de BvPIP2;2 con el de BvPIP1;1, ya que sabemos que en este caso se observa un efecto de aumento de P_f más allá de la permeabilidad que aporta la expresión de BvPIP2;2 sola (Bellati et al., 2010). Estos resultados nos permiten descartar que la falta de interacción funcional hallada para oocitos que co-expresan BvPIP2;1 junto a BvPIP1;1 pueda deberse a alguna anomalía presente en BvPIP1;1 o a alguna falla en su expresión en oocitos (Figura 23).

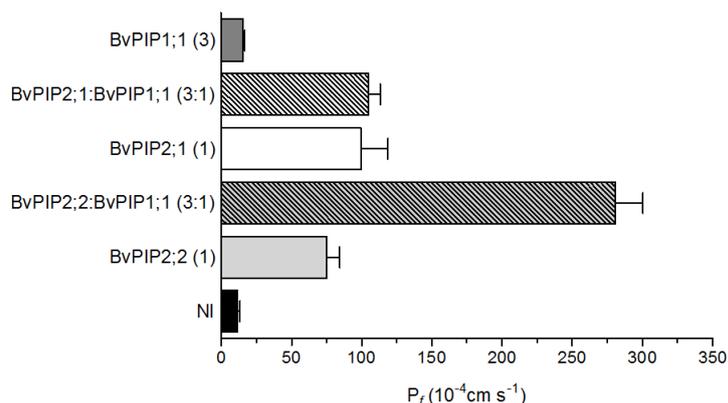


Figura 23: Permeabilidad osmótica (P_f) de membranas de oocitos co-inyectados con el ARNc de BvPIP2;1 y BvPIP1;1 o co-inyectados con el ARNc de BvPIP2;2 y BvPIP1;1.

El ARNc codificante para BvPIP2;2 inyectado junto con el ARNc codificante para BvPIP1;1 muestra un efecto de aumento de P_f de la membrana de oocitos, al igual que otras acuaporinas tipo PIP2 al ser co-inyectadas con PIP1. Sorprendentemente, ante la co-inyección de BvPIP2;1 con BvPIP1;1 el mencionado efecto de aumento de P_f no tiene lugar. Entre paréntesis se indica la cantidad relativa de ARNc inyectada en cada oocito, siendo 1 equivalente a 2,5 ng y 3 equivalente a 7,5 ng de ARNc inyectados. NI corresponde a oocitos no inyectados (control negativo). Los resultados representan el promedio $P_f \pm \text{SEM}$, $n = 10-12$ oocitos para cada tratamiento, $n = 5$ experimentos independientes.

Regulación de la apertura y cierre BvPIP2;1 por acidificación intracelular

Dada la presencia de la His-193 en el *loop* D de BvPIP2;1 (Figura 20), estudiamos la regulación funcional de esta acuaporina por pH, expresada sola y co-expresada con BvPIP1;1.

En la Figura 24 se muestran los resultados de acidificar el interior del oocito y evaluar los cambios de volumen que estos sufren a dos pH intracelulares distintos (6.3 y 7.0), cuando son inyectados con la misma masa de ARNc codificante para BvPIP2;1 y BvPIP1;1 por separado o co-inyectados con BvPIP2;1 y BvPIP1;1 en masas equivalentes.

Podemos concluir que la actividad de BvPIP2;1 se encuentra modulada por acidificación intracelular tal como está descrito para otras PIP2, por ejemplo AtPIP2;2 (Tournaire-Roux et al., 2003), BvPIP2;2 (Bellati et al., 2010) y FaPIP2;1 (Alleva et al., 2010). BvPIP2;1 presenta una inhibición máxima de P_f de $(89 \pm 3)\%$ (media \pm SEM) a pH citosólico 6.3, siendo esta inhibición más alta que la registrada para BvPIP2;2 (aproximadamente 70% según Bellati *et al.*, 2010) y no significativamente distinta a la observada para la co-expresión de BvPIP2;1 con BvPIP1;1 ($p < 0,05$).

Por otro lado, la permeabilidad osmótica de las membranas de oocitos que expresan BvPIP1;1 sola es similar a la hallada para los oocitos control, a ambos pHs (Figura 24).

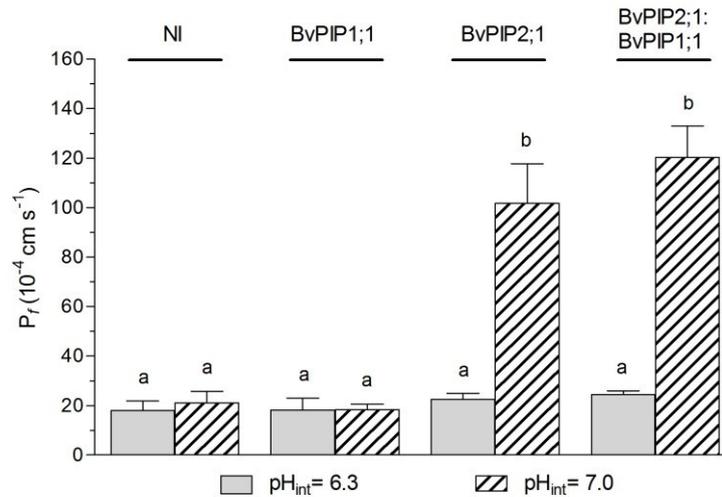


Figura 24: Permeabilidad osmótica (P_f) de membranas de oocitos que expresan BvPIPs solas o co-expresan distintas BvPIPs a pH intracelular 6.3 y 7.0.

Respuesta al pH ácido intracelular 6.3 o a pH intracelular 7.0 de oocitos que expresan BvPIP1;1, BvPIP2;1 o co-expresan BvPIP2;1 con BvPIP1;1. Los oocitos se incubaron 15 min con soluciones de dos pHs diferentes: 6.3 y 7.0. Luego cada oocito se transfirió a un medio diluido cinco veces con el mismo pH y se realizó el ensayo de *swelling*. Se inyectaron 2,5 ng de cada ARNc y se co-inyectaron los ARNc en relación 1:1, lo que equivale a inyectar 2,5 ng de un ARNc + 2,5 ng de otro. Los resultados se expresan como media $P_f \pm \text{SEM}$; $n = 3$ experimentos independientes. Letras diferentes indican significancia entre barras ($p < 0,05$).

Cuando se analizan las curvas dosis respuesta de permeabilidad osmótica (P_f) en función de pH para oocitos que expresan BvPIP2;1 o que co-expresan a BvPIP2;1 junto a BvPIP1;1, se observa que ambas curvas siguen un perfil sigmoideo (Figura 25).

El perfil sigmoideo sugiere que los tetrámeros de BvPIP2;1 responden al pH alostéricamente, siendo el transporte de agua fuertemente inhibido a pHs menores a 6.3 (Figura 25). Es interesante señalar que las curvas dosis-respuesta de BvPIP2;1 expresada sola o co-expresada con BvPIP1;1 muestran perfiles idénticos, y que sus $\text{pH}_{0.5}$ (pH interno al cual se obtiene la mitad de la P_f máxima) no son significativamente distintos: el $\text{pH}_{0.5}$ de BvPIP2;1 expresada sola es de aproximadamente 6.41 ± 0.05 (media $\pm \text{SEM}$; $n = 3$) y el $\text{pH}_{0.5}$ para la co-expresión de BvPIP2;1 junto a BvPIP1;1 es de 6.47 ± 0.01 (media $\pm \text{SEM}$; $n = 3$). Estos datos refuerzan la idea de que BvPIP2;1 no interacciona funcionalmente con BvPIP1;1.

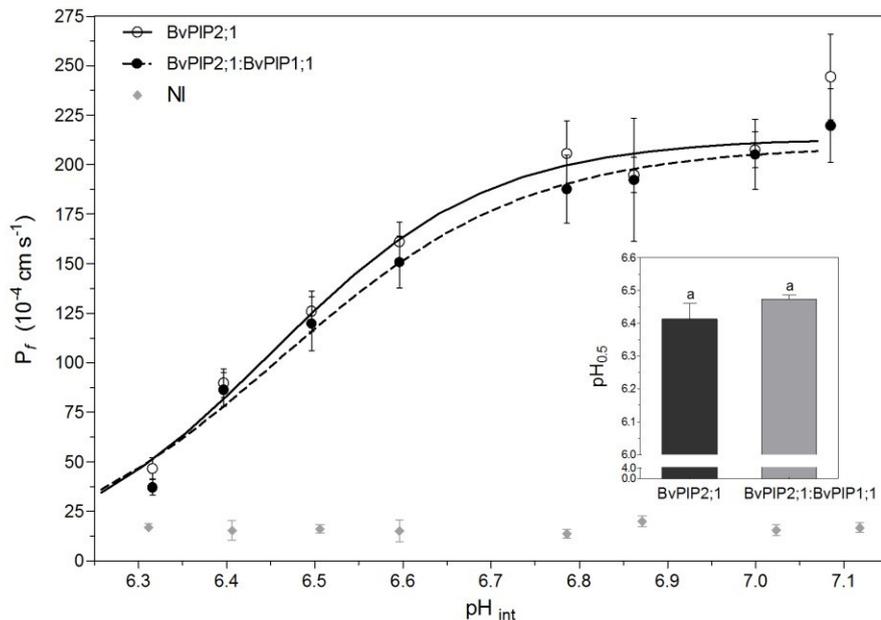


Figura 25: Curva dosis respuesta de P_f en función del pH intracelular para oocitos que expresan BvPIP2;1 o co-expresan BvPIP2;1 y BvPIP1;1.

Para evaluar la respuesta al pH ácido citosólico, los oocitos que expresan BvPIP2;1 sola o co-expresan BvPIP2;1-BvPIP1;1 en una proporción de masa 1:1 se incubaron 15 min con medios de diferentes pHs. Luego cada oocito se transfirió a un medio diluido cinco veces con el mismo pH y se realizó el ensayo de *swelling*. La figura principal muestra valores representativos obtenidos de tres experimentos independientes. Para cada condición de pH se probaron 7-10 oocitos; los resultados se expresan como media $P_f \pm$ SEM. Los datos se ajustaron a una curva sigmoidea utilizando el programa Graph Pad Prism (versión 3.02). Se inyectaron 5 ng de ARNc codificante para BvPIP2;1 y se co-inyectaron 5 ng del ARNc codificante para BvPIP2;1 + 5 ng del ARNc codificante para BvPIP1;1. El cuadro interno muestra la inhibición media, $pH_{0,5} \pm$ SEM, $n= 3$ experimentos independientes. Los $pH_{0,5}$ hallados para la expresión de BvPIP2;1 sola o co-expresada con BvPIP1;1 no son significativamente diferentes ($p > 0,05$) como se indica con la misma letra.

Estudio de la localización celular de BvPIPs

Los resultados de permeabilidad al agua y de modulación por pH indican que no existe interacción funcional entre BvPIP2;1 y BvPIP1;1. Esta falta de interacción puede ser consecuencia de la incapacidad de BvPIP2;1 de relocalizar a BvPIP1;1 a membrana plasmática, como lo hacen otras PIP2 (Zelazny et al., 2009). Si este fuese el caso, y dado los resultados funcionales hallados, es esperable que BvPIP1;1 se encuentre en el interior celular, ya que fue reportado que algunas PIP1 son incapaces de formar homo-tetrámeros funcionales en membrana plasmática (Zelazny et al., 2007; Zelazny et al., 2009; Yaneff et al., 2014). En el caso de que BvPIP2;1 sí interaccione físicamente con BvPIP1;1 y que como consecuencia de ello BvPIP1;1 se localice en membrana plasmática, nuestros resultados estarían indicando que BvPIP1;1 es incapaz de transportar agua eficientemente o de modificar la capacidad de transporte de agua de BvPIP2;1 a pHs fisiológicos o ácidos.

El estudio de la localización nos permite dilucidar entre ambas hipótesis. Para ello se fusionó a BvPIP2;2 y BvPIP1;1 a moléculas fluorescentes (EYFP y ECFP, respectivamente) y se tomaron imágenes de microscopía de fluorescencia de los oocitos inyectados con los ARNc correspondientes. Previo a tomar las imágenes de fluorescencia, se investigó si la fusión a proteínas fluorescentes modificaba las propiedades funcionales halladas previamente para las proteínas *wild type* expresadas en oocitos (Figura 26).

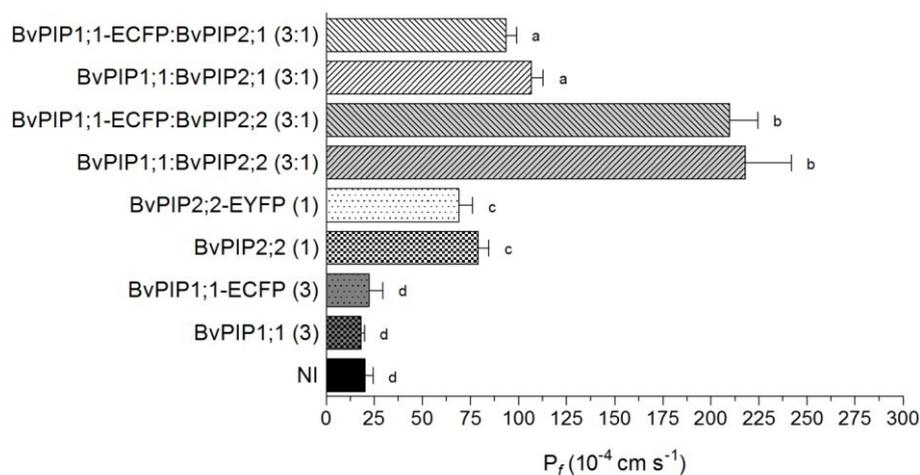


Figura 26: Permeabilidad osmótica (P_f) de membranas de oocitos inyectados con el ARNc de BvPIP fusionadas a proteínas fluorescentes.

BvPIPs fusionadas a proteínas fluorescentes muestran una actividad para el transporte de agua similar a sus correspondientes proteínas sin fusionar, lo que indica que la marca fluorescente no modifica sus actividades o interacción funcional. Entre paréntesis se indica la cantidad relativa de ARNc inyectada en cada oocito, siendo 1 equivalente a 2,5 ng y 3 equivalente a 7,5 ng de ARNc inyectados. NI corresponde a oocitos no inyectados. Los valores corresponden a datos representativos de tres experimentos independientes usando diferentes lotes de oocitos. Para cada condición se muestran los valores como media $P_f \pm$ SEM, $n = 7$ -

10. Letras diferentes indican significancia entre barras ($p < 0,05$).

El resultado de permeabilidad osmótica de oocitos co-inyectados con el ARNc de BvPIP1;1-ECFP junto a BvPIP2;2 o BvPIP2;1 (*wild-type*), o co-inyectados con el ARNc de BvPIP1;1 (*wild-type*) junto a BvPIP2;2 o BvPIP2;1 (*wild-type*) no muestran diferencias significativas. Por lo tanto podemos concluir que la proteínas fluorescentes no modifican las propiedades funcionales halladas previamente para las proteínas *wild type*. Esto fue así tanto para BvPIP1;1- ECFP como para BvPIP2;2-EYFP solas o co-expresadas (Figura 26).

Para los estudios de localización de las acuaporinas mediante microscopía de fluorescencia confocal se utilizó como indicador del interior celular tetrametil-rodamina dextrano (TMR-Dextrano, Invitrogen-Molecular Probes), un fluorocromo no específico sin conjugar que permanece en el área de los gránulos corticales por su alto peso molecular y permite distinguir membrana plasmática del interior celular. Se tomaron secuencias de imágenes de

barrido a diferentes profundidades del oocito (es decir a diferentes alturas en dirección al eje óptico) tomando como referencia $z = 0 \mu\text{m}$ en el primer plano (más externo) en donde se detecta fluorescencia proveniente del oocito, con $z > 0$ adentrándose en la célula.

En la Figura 27 se muestran las imágenes obtenidas de oocitos que expresan BvPIP1;1-ECFP (Figura 27, paneles A y B, en verde), y que expresan BvPIP2;2-EYFP como control de membrana plasmática (Figura 27, paneles C y D, en verde), inyectados previamente con TMR-Dextrano (Figura 27, paneles A-D, en rojo).

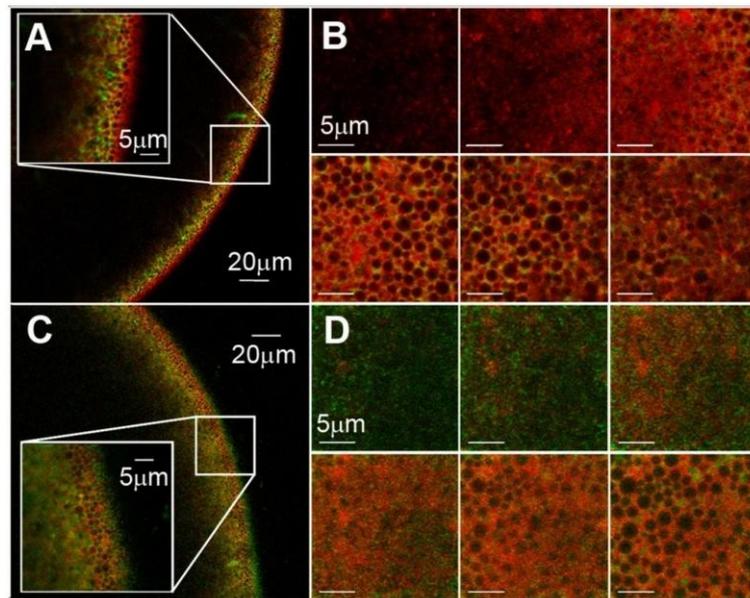


Figura 27: Imágenes confocales de oocitos de *X. laevis* que expresan BvPIP1;1- ECFP y BvPIP2;2-EYFP.

(A) y (C) Imágenes confocales en el plano radial (x-z) de oocitos que expresan BvPIP1;1-ECFP o BvPIP2;2-EYFP (verde), respectivamente, inyectados previamente con TMR-Dextrano (rojo). La superficie de los oocitos se encuentra a la derecha de cada cuadro de imagen y el interior del oocito está a la izquierda. Dentro de cada imagen se muestra una ampliación (zoom 5X) de la sección indicada con el recuadro. (B) y (D) Imágenes confocales (x-y) recogidas a diferentes profundidades focales en oocitos de *X. laevis* que expresan BvPIP1;1-ECFP y BvPIP2;2-EYFP, respectivamente. Los pasos focales se realizan desde el exterior del oocito (a $1 \mu\text{m}$ de la membrana plasmática) hasta el nivel de los gránulos corticales (aproximadamente a $5 \mu\text{m}$ de la membrana plasmática). Se muestran imágenes representativas de siete oocitos analizados para cada condición, cada uno proveniente de lotes de oocitos independientes. Se inyectaron 5 ng de ARNc por oocito en todos los casos.

Los resultados indican que BvPIP1;1-ECFP se localiza preferentemente en el interior celular (Figura 27, paneles A y B, en verde) cuando se la expresa sola, lo que explica que el resultado de permeabilidad osmótica de los oocitos que la expresan es en todos los casos similar al hallado para los oocitos no inyectados (control negativo) (Figura 22). En cambio, BvPIP2;2- EYFP localiza en el límite de la célula, mayoritariamente en membrana plasmática (Figura 27, paneles C y D).

Para evaluar si BvPIP1;1 cambia su localización celular al ser co-expresada con BvPIP2;1, evaluamos la localización celular de BvPIP1;1-ECFP co-inyectando su ARNc con el de BvPIP2;1. Como control co-inyectamos el ARNc de BvPIP1;1-ECFP con el de BvPIP2;2 (Figura 28).

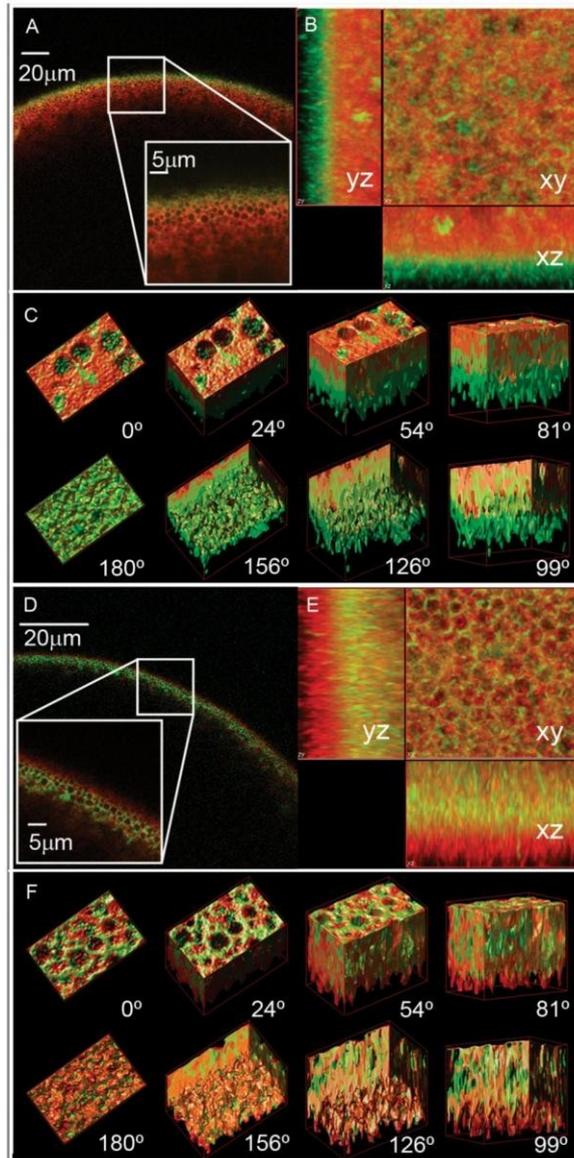


Figura 28: Imágenes confocales de oocitos de *X. laevis* que co-expresan BvPIP1;1-ECFP y BvPIP2;2 o co-expresan BvPIP1;1-ECFP y BvPIP2;1.

- (A) y (D) corresponde a imágenes confocales adquiridas en el plano radial (x-z) para oocitos co-expresando BvPIP1;1-ECFP y BvPIP2;2 (verde) o BvPIP1;1-ECFP y BvPIP2;1 (verde), respectivamente, inyectados previamente con TMR-Dextrano (rojo). La superficie del oocito se encuentra en la parte superior de cada imagen y el interior del oocito se encuentra en la parte inferior. Dentro de la imagen se muestra la ampliación de la sección indicada en el recuadro. (B) y (E) corresponde a imágenes obtenidas en distintos planos focales, según se indica en la imagen, para oocitos co-expresando BvPIP1;1-ECFP y BvPIP2;2 (verde) y BvPIP1;1-ECFP y BvPIP2;1 (verde), respectivamente, inyectados previamente con TMR-Dextrano (rojo). Se recogieron imágenes confocales a diferentes profundidades en el oocito y luego se realizó la deconvolución de las imágenes y se reconstruyeron utilizando el programa Huygens Professional Software. (C) y (F) corresponde a vistas de las imágenes tridimensionales reconstruidas para oocitos co-expresando BvPIP1;1-ECFP y BvPIP2;2 (verde) y BvPIP1;1-ECFP y BvPIP2;1 (verde), respectivamente. La vista 0° corresponde a la zona de los gránulos corticales dentro del oocito y la vista 180° corresponde al plano de la membrana plasmática (aproximadamente 5 µm desde el nivel de gránulos corticales). Las imágenes corresponden a imágenes representativas de seis oocitos analizados para cada condición, cada uno proveniente de lotes de oocitos independientes. En todos los casos se inyectaron 2,5 ng de ARNc de BvPIP2;1 o BvPIP2;2 junto con 5 ng de BvPIP1;1-ECFP por oocito.

Los resultados muestran que cuando co-expresamos BvPIP2;2 con BvPIP1;1-ECFP, la fluorescencia debida a BvPIP1;1-ECFP se traslada a la membrana plasmática (Figura 28; paneles A, B y C), mientras que si se co-expresa BvPIP2;1 con BvPIP1;1-ECFP, esta última permanece en el interior celular (Figura 28; paneles D, E y F).

En la Figura 29 se muestran los perfiles de intensidad de fluorescencia de las imágenes obtenidas en el microscopio.

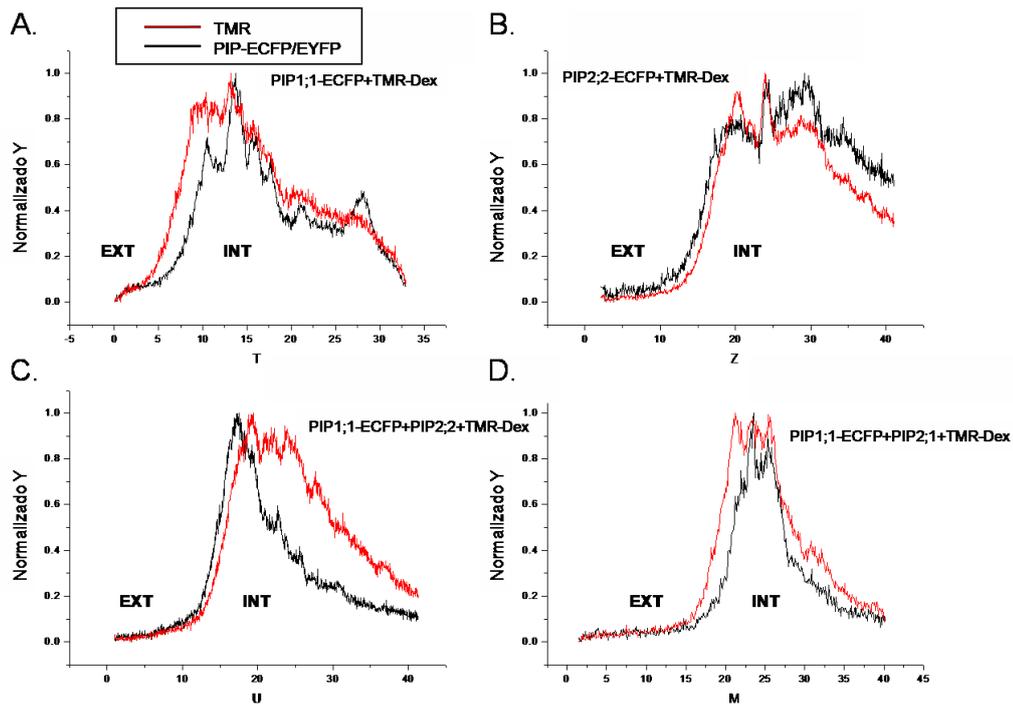


Figura 29: Perfiles de intensidad de fluorescencia normalizados.

Los paneles A-D muestran los perfiles de intensidad de fluorescencia de las imágenes confocales mostradas para oocitos que expresan PIP1;1-ECFP (A), PIP2;2-EYFP (B), o co-expresan PIP1;1-ECFP con PIP2;2 (C), o PIP1;1-ECFP con PIP2;1 (D). La línea de color negro corresponde a los niveles de intensidad de fluorescencia de EYFP/ECFP y la línea de color rojo corresponde a los niveles de intensidad de fluorescencia del marcador intracelular TMR-Dextrano. El exterior celular (EXT) se encuentra hacia la izquierda en el eje X y el interior celular (INT) a la derecha, en todos los paneles. En el caso de la fluorescencia debida a oocitos que expresan PIP1;1-ECFP (A) o co-expresan PIP1;1-ECFP con PIP2;1 (D) se puede ver que la fluorescencia debida a PIP1-ECFP se encuentra por detrás de la marca fluorescente del TMR-Dextrano, lo que indica que PIP1;1-ECFP se encuentra mayoritariamente en el interior celular, contrariamente a lo que se observa para oocitos que expresan PIP2;2-EYFP (B) o co-expresan PIP1;1-ECFP con PIP2;2 (C).

Analizando los resultados en forma conjunta, podemos concluir que BvPIP2;2 es capaz de formar homo-tetrámeros funcionales en membrana plasmática cuando se expresa sola, a diferencia de BvPIP1;1 que es retenida intracelularmente. A su vez, BvPIP2;2 es capaz de trasladar a BvPIP1;1 a membrana plasmática cuando se co-expresa con BvPIP1;1. Como consecuencia de esto, la permeabilidad osmótica de la membrana de los oocitos que co-expresan

estas proteínas se encuentra aumentada respecto a oocitos que solo expresan BvPIP2;2. Contrariamente, BvPIP2;1 no es capaz de traslocar a BvPIP1;1 a membrana plasmática y en los oocitos que expresan ambas acuaporinas, BvPIP1;1 permanece en el interior celular. Esto explica que la *Pf* de los oocitos que co-expresan BvPIP2;1 y BvPIP1;1 no es significativamente distinta de la *Pf* observada para los oocitos que solo expresan BvPIP2;1 en su membrana plasmática.

La diferente interacción funcional que presentan BvPIP2;2 y BvPIP2;1 en cuanto a su capacidad de interacción con BvPIP1;1 podría radicar en alguna diferencia estructural entre estas proteínas.

Diferencias en el *loop A* de BvPIP2

Para intentar abordar el por qué de las diferencias funcionales halladas entre BvPIP2;1 y BvPIP2;2 en cuanto a su capacidad de interacción con BvPIP1;1, analizamos en detalle la estructura primaria de estas acuaporinas, entre ellas y respecto de otras PIP que ya han sido caracterizadas funcionalmente en cuanto a su capacidad de interacción con acuaporinas del tipo PIP1.

Una primera diferencia que apareció al alinear la secuencia primaria de las PIP2 pertenecientes al CLII (como BvPIP2;2) o pertenecientes al CLIII (como BvPIP2;1), fue la presencia de un *gap* (de 3-7 aa) en el primer *loop* extracitoplasmático, llamado *loop A*. Este *gap* está relacionado con una diferencia en el largo del *loop A* en las PIPCLIII en comparación con el *loop A* de las PIPCLII (Figura 30). Sin embargo, esto no puede ser la causa de la falta de interacción de BvPIP2;1 con BvPIP1;1, ya que hay reportes en la literatura de al menos dos PIP2 que presentan este *gap* y aún así responden funcionalmente a la interacción con PIP1 (Vandeleur et al., 2009; Mahdieh et al., 2008).

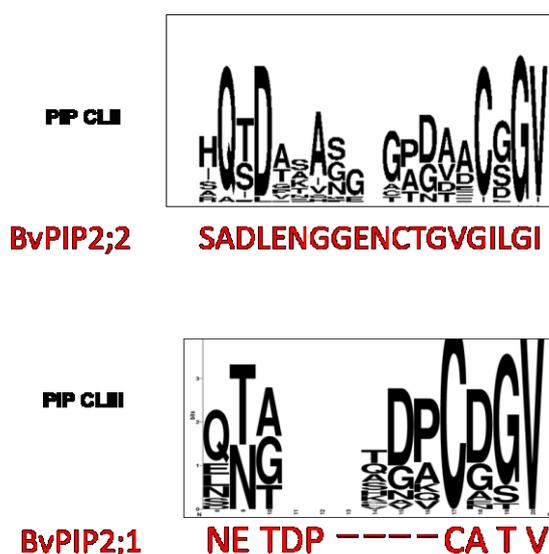


Figura 30: Secuencia consenso correspondiente a los *loop A* de proteínas PIP2.

Se muestran en forma de logotipo los resultados del alineamiento múltiple de 21 secuencias aminoacídicas de PIP2 pertenecientes a PIPCLII (incluyendo BvPIP2;2) y 27 secuencias pertenecientes a PIPCLIII (incluyendo BvPIP2;1). Debajo de los logotipos obtenidos para las PIPCLII y PIPCLIII se muestra en rojo la secuencia de BvPIP2;2 y BvPIP2;1, respectivamente. Los aminoácidos se representan con el código de una letra, y el tamaño de la letra es proporcional a su grado de conservación.

La segunda diferencia importante entre BvPIP2;1 y BvPIP2;2 es la presencia en el *loop* A de BvPIP2;1 de dos aminoácidos distintos a los hallados en otras PIP2, generándose así un motivo de posible N-glicosilación (NETD), ausente en otras acuaporinas de la misma familia (Figura 31). Dado que BvPIP2;1 presenta un *loop* A diferente al de otras AQP de la misma familia y con el objetivo de indagar si este *loop* condiciona la interacción con BvPIP1;1, se diseñaron mutantes. Las mutantes se diseñaron no solo para eliminar el posible motivo de N-glicosilación sino para volver a este *loop* más similar al *loop* A hallado para otras PIP2 (Figura 31). Se construyeron dos mutantes teniendo en cuenta el resultado del alineamiento múltiple entre BvPIP2;1 y otras proteínas PIP2 cuya interacción funcional con PIP1 ya fue reportada. Por un lado y siguiendo la comparación de secuencia aminoacídica de BvPIP2;1 con PIPs de *Zea mays* en el alineamiento múltiple, se procedió a llevar a cabo la mutación puntual de dos aminoácidos (BvPIP2;1N64H/E65Q). Por otro lado, y según el alineamiento entre BvPIP2;1 y una PIP2 de *Arabidopsis thaliana*, se realizó otra doble mutante (BvPIP2;1N64I/E65Q).

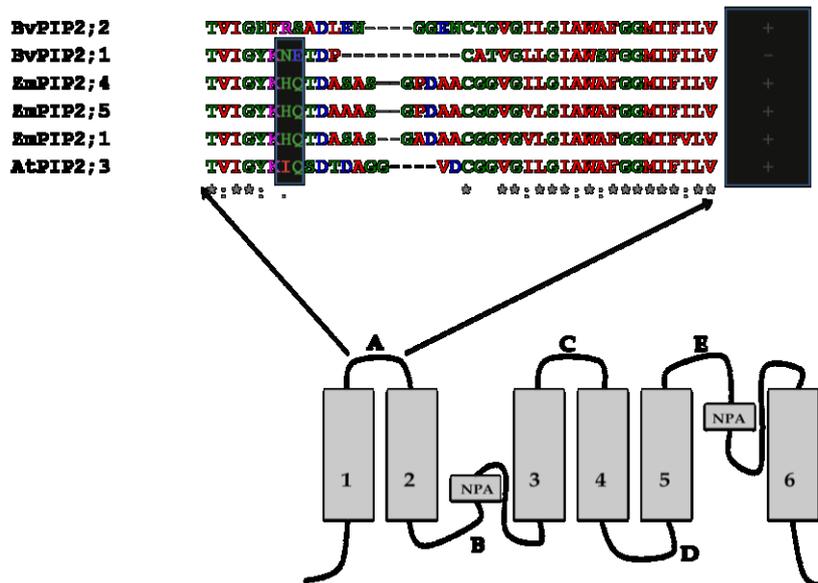


Figura 31: Representación esquemática de una acuaporina PIP2 mostrando los residuos conservados presentes en el *loop* A de PIP2 de distintas especies cuya interacción funcional con PIP1 fue reportada. Se indican 1-6 los seis pasos transmembrana, los dos motivos NPA y A-E corresponden a los *loops*. En el recuadro se indican los residuos que se eligieron mutar siguiendo la comparación de secuencia aminoacídica de BvPIP2;1 (en rojo) con otras PIP2s. Las mutaciones se realizaron con el fin de hacer la secuencia de este *loop* similar a la de otras PIP2 y eliminar la secuencia putativa de N- glicosilación de BvPIP2;1 (NETD). En el recuadro de

la derecha se indica con (+) las PIP2 cuya interacción funcional con PIP1 está reportada en la bibliografía y (-) las PIP2 que no muestran interacción con PIP1 (Fetter et al., 2004; Mut et al., 2008; Bellati et al., 2010).

Se analizó la funcionalidad de las mutantes de BvPIP2;1 N64H/E65Q y BvPIP2;1 N64I/E65Q en el sistema de expresión de oocitos de *Xenopus* (Figura 32). Ambas proteínas de BvPIP2;1 mutantes son acuaporinas capaces de transportar agua, dado que promueven un aumento significativo de la P_f de las membranas que las expresan, pero dan lugar a una P_f menor que la desarrollada por BvPIP2;1 *wild type* (Figura 32).

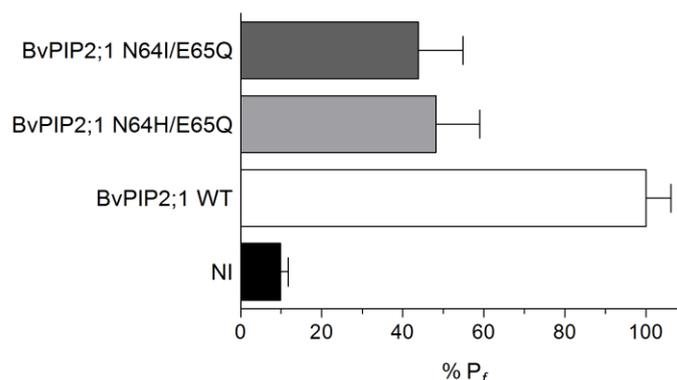


Figura 32: Permeabilidad osmótica (P_f) de membranas de oocitos inyectados con el ARNc de BvPIP2;1 *wild type* (WT) y mutantes.

Se grafican los porcentajes de P_f observado para oocitos inyectados con 5 ng de ARNc de mutantes de BvPIP2;1 (BvPIP2;1 N64H/E65Q y BvPIP2;1 N64I/E65Q) respecto a la P_f observada para BvPIP2;1 *wild type* (BvPIP2;1 WT), considerada como 100% de P_f . Oocitos no inyectados (NI) se utilizaron como control negativo. Los resultados representan el promedio $P_f \pm$ SEM, $n = 7-12$ oocitos para cada tratamiento, $n = 5$ experimentos independientes.

Para evaluar si las mutantes son capaces de interactuar funcionalmente con BvPIP1;1, se procedió a co-inyectar el ARNc que codifica para BvPIP1;1 con el ARNc que codifica para las acuaporinas mutantes de BvPIP2;1 (Figura 33). La proteína mutante BvPIP2;1 N64I/E65Q co-expresada con BvPIP1;1 desencadenó en la membrana un valor de P_f 4,1 veces mayor que la promovida por la misma mutante BvPIP2;1N64I/E65Q expresada sola. Un resultado similar se encontró para la otra mutante, ante la co-inyección del ARNc que codifica para BvPIP1;1 y BvPIP2;1N64H/E65Q, encontrándose un aumento de P_f 4,3 veces mayor respecto a la promovida por la inyección de la misma cantidad de ARNc de la mutante BvPIP2;1N64H/E65Q sola. En contraste con BvPIP2;1, ambas proteínas mutantes de BvPIP2;1 parecen interactuar funcionalmente con BvPIP1;1 (Figura 33).

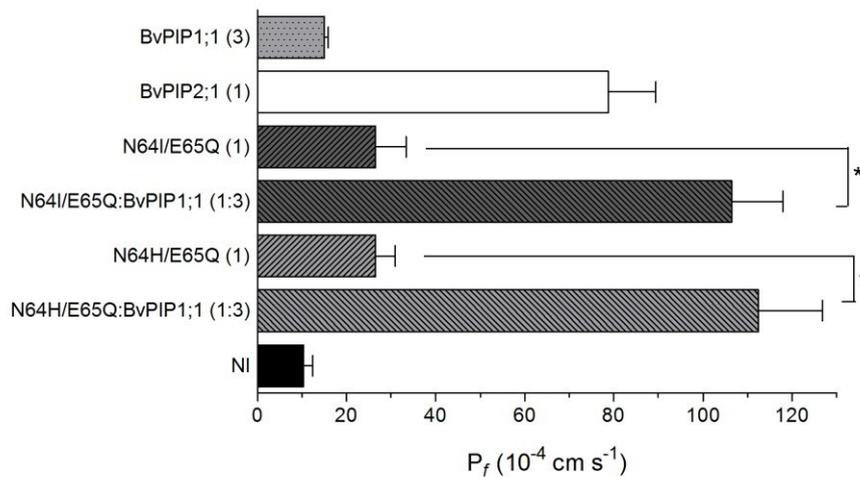


Figura 33: Permeabilidad osmótica (P_f) de oocitos que co-expresan los mutantes de BvPIP2;1 (N64H/E65Q o N64I/E65Q) y BvPIP1;1.

La actividad de transporte de agua de ambas mutantes de BvPIP2;1 (N64H/E65Q y N64I/E65Q) muestra que son acuaporinas funcionales. Además ambas proteínas mutantes son capaces de interactuar funcionalmente con BvPIP1;1, ya que generan valores de permeabilidad de la membrana plasmática del oocito muy superiores a los promovidos por las proteínas mutantes expresadas solas (* $p < 0,001$). Entre paréntesis se indica la cantidad relativa de ARNc inyectada en cada oocito, siendo 1 equivalente a 2,5 ng y 3 equivalente a 7,5 ng de ARNc inyectados. NI corresponde a oocitos no inyectados. Los valores corresponden a datos representativos de tres experimentos independientes usando diferentes lotes de oocitos. Para cada condición los valores medios se muestran como media $P_f \pm \text{SEM}$, $n = 12-15$.

Regulación de la actividad de mutantes de BvPIP2;1 por acidificación intracelular Al

analizar la sensibilidad a pH_{int} de una de las proteínas BvPIP2;1 mutantes (BvPIP2;1

N64I/E65Q), hallamos que al igual que BvPIP2;1 *wild-type*, la capacidad de transportar agua de la proteína mutante N64I/E65Q se inhibe a pH_{int} ácido (Figura 34).

Interesantemente, mientras que la inhibición de la P_f ante la co-expresión de BvPIP2;1 (*wild type*) con BvPIP1;1 a pH_{int} 6.3 es total y no difiere de la observada para la expresión de BvPIP2;1 sola, en el caso de la proteína mutante BvPIP2;1 N64I/E65Q sí se observan diferencias entre la inhibición de la P_f por expresión de la mutante sola o co-expresada con BvPIP1;1 a pH 6.3 (Figura 34). La mutante BvPIP2;1 N64I/E65Q expresada sola presenta una inhibición máxima de P_f de $(53 \pm 5)\%$ (media \pm SEM) a pH citosólico 6.3, mientras que la co-expresión de la mutante BvPIP2;1 N64I/E65Q con BvPIP1;1 presenta una inhibición máxima de P_f de $(88 \pm 4)\%$ (media \pm SEM), no significativamente distinta a la hallada por expresión de BvPIP2;1 *wild type* expresada sola o co-expresada con BvPIP1;1 ($p < 0,05$).

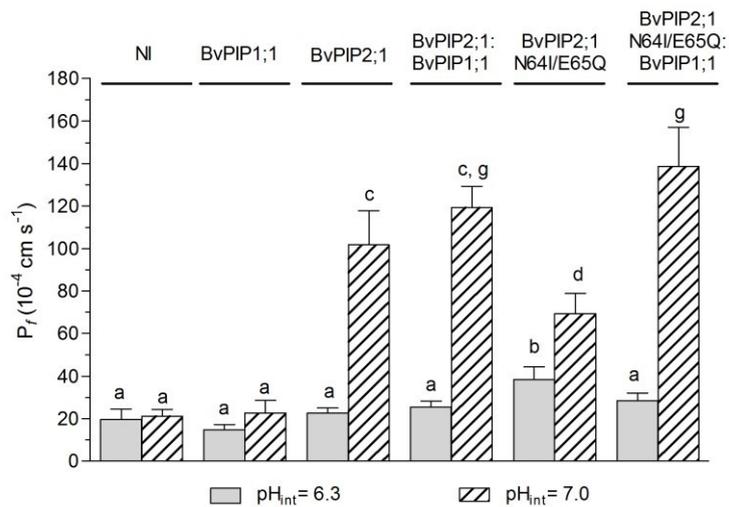


Figura 34: Inhibición de la permeabilidad osmótica de la membrana de oocitos que expresan la mutante de BvPIP2;1 N64I/E65Q sola o co-expresan la mutante con BvPIP1;1 por acidificación citosólica.

Respuesta al pH ácido intracelular 6.3 o a pH intracelular 7.0 de oocitos que expresan BvPIP1;1, BvPIP2;1 *wild type* (WT), la proteína mutante BvPIP2;1 N64I/E65Q, o co-expresan BvPIP1;1 con BvPIP2;1 (*wild type*) o con la mutante BvPIP2;1N64I/E65Q. Los oocitos se incubaron 15 min con soluciones a dos pHs diferentes. Luego cada oocito se transfirió a un medio diluido cinco veces con el mismo pH y se realizó el ensayo de *swelling*. Se inyectaron 2.5 ng de cada ARNc y se co-inyectaron los ARNc en relación 1:1, lo que equivale a inyectar 2.5 ng de un ARNc + 2.5 ng de otro. Los resultados se expresan como media $P_f \pm$ SEM; n = 4 experimentos independientes. Letras diferentes indican significancia entre barras ($p < 0,05$).

Analizando la curva de inhibición de P_f en función del pH_{int} ácido para la expresión de la proteína mutante BvPIP2;1 N64I/E65Q expresada sola (Figura 35), observamos que el pH_{0.5} (pH interno al cual se obtiene la mitad de la P_f máxima) es igual a 6.49 ± 0.02 (media \pm SEM). Este valor es similar al hallado para la curva de P_f en función del pH_{int} de BvPIP2;1 expresada sola (Figura 25). Sin embargo, la co-expresión de la mutante BvPIP2;1 N64I/E65Q con BvPIP1;1 presenta un pH_{0.5} de 6.61 ± 0.03 (media \pm SEM) (Figura 35). Esta modificación en el sensado del pH refuerza el resultado de que las mutaciones recuperan la interacción funcional con BvPIP1;1, dado que el cambio en el sensado corresponde a la presencia de una nueva especie proteica en membrana plasmática.

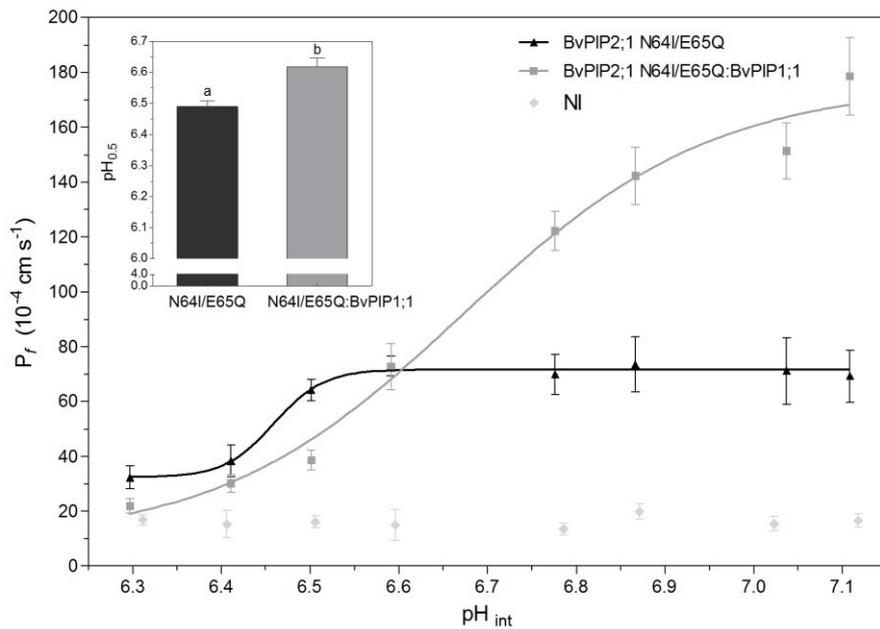


Figura 35: Curva dosis-respuesta de P_f en función del pH_{int} de la proteína mutante BvPIP2;1 N64I/E65Q expresada sola y co-expresada con BvPIP1;1.

Para evaluar la respuesta al pH ácido citosólico, los oocitos que expresan la mutante BvPIP2;1 N64I/E65Q sola o co-expresan dicha mutante con BvPIP1;1 en una proporción de masa 1:1 se incubaron 15 min con medios a diferentes pHs. Luego cada oocito se transfirió a un medio cinco veces diluido con el mismo pH y se realizó el ensayo de *swelling*. La figura principal muestra valores representativos obtenidos de tres experimentos independientes y para cada condición de pH se probaron 8-12 oocitos; los resultados se expresan como media $P_f \pm SEM$. Los datos se ajustaron a una curva sigmoidea utilizando Graph Pad Prism (versión 3.02). El cuadro interno muestra la inhibición media, $pH_{0.5} \pm SEM$, $n = 3$ experimentos independientes. Los valores de inhibición media ($pH_{0.5}$) para la expresión de BvPIP2;1 N64I/E65Q mutante sola o co-expresada con BvPIP1;1 son significativamente diferentes ($p > 0,05$) como se indica con letras distintas.

Localización celular de mutantes de BvPIP2;1

Intentamos determinar la localización de BvPIP1;1 fusionada a una proteína fluorescente (BvPIP1;1-ECFP) al ser co-expresada con las acuaporinas mutantes BvPIP2;1 N64H/E65Q y BvPIP2;1 N64I/E65Q (Figura 36).

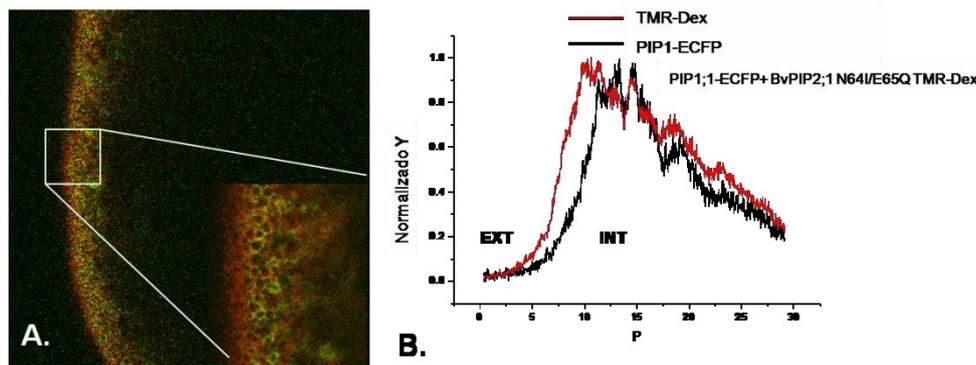


Figura 36: Localización de BvPIP1;1-ECFP al ser co-expresada junto con la acuaporina mutante BvPIP2;1N64I/E65Q en oocitos de *Xenopus*.

- (A) Imagen confocal de un oocito de *X. laevis* que co-expresa BvPIP1;1-ECFP junto a BvPIP2;1N64I/E65Q (verde), inyectado previamente con TMR-Dextrano (rojo). La superficie de los oocitos se encuentra a la izquierda de la imagen y el interior del oocito está a la derecha. Dentro de la imagen se muestra una ampliación (zoom 7X) de la sección indicada con el recuadro. (B) Perfil de intensidad de fluorescencia de la imagen confocal mostrada en A. La línea de color negro corresponde a los niveles de intensidad de fluorescencia de ECFP y la línea de color rojo corresponde a los niveles de intensidad de fluorescencia del marcador intracelular TMR-Dextrano. El exterior celular (EXT) se encuentra hacia la izquierda en el eje X y el interior celular (INT) a la derecha. Se puede ver que la fluorescencia debida a PIP1-ECFP se encuentra por detrás de la marca fluorescente del TMR-Dextrano, lo que indica que PIP1;1-ECFP se encuentra mayoritariamente en el interior celular. Se muestra una imagen representativa (n= 5, utilizando 5 lotes de oocitos diferentes). Se inyectaron 2,5 ng del ARNc de BvPIP2;1 N64I/E65Q más 5 ng de ARNc de BvPIP1;1-ECFP, por oocito en todos los casos. Estos experimentos se realizaron en conjunto con oocitos expresando únicamente BvPIP1;1-ECFP y BvPIP2;2-EYFP como controles (Figura 27).

Los resultados del análisis de localización de las acuaporinas BvPIP2;1 mutantes co-expresadas con BvPIP1;1 no mostraron que estas sean capaces de relocalizar a BvPIP1;1 a membrana plasmática (Figura 36). Este resultado fue inesperado dado que las proteínas mutantes mostraron ser capaces de interactuar funcionalmente con BvPIP1;1 en los experimentos de transporte de agua (Figura 33) y en los experimentos de inhibición por acidificación intracelular (Figura 35). Al estudiar la funcionalidad de las acuaporinas mutantes BvPIP2;1 N64I/E65Q y BvPIP2;1 N64H/E65Q al ser co-expresadas con BvPIP1;1-ECFP observamos que la interacción funcional se perdía, por lo que no se puede utilizar la marca fluorescente para mostrar la re-localización de BvPIP1;1 en la membrana plasmática en esta última situación (Figura 37).

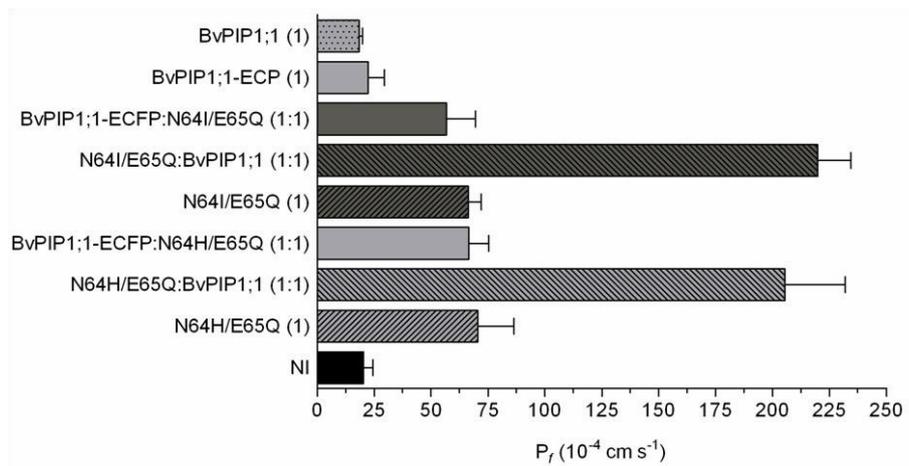


Figura 37: Permeabilidad osmótica de la membrana de oocitos co-expresados con las acuaporinas mutantes BvPIP2;1 N64I/E65Q o BvPIP2;1 N64H/E65Q y BvPIP1;1-ECFP.

BvPIP2;1 mutantes (BvPIP2;1 N64I/E65Q o BvPIP2;1 N64H/E65Q) co-expresadas con BvPIP1;1 fusionada a la proteína fluorescente ECFP muestran una actividad para el transporte de agua diferente al observado ante la co-expresión de las mutantes con BvPIP1;1 *wild-type*, lo que indica que la marca fluorescente modifica sus actividades o interacción funcional. NI corresponde a oocitos no inyectados. Entre paréntesis se indica la cantidad relativa de ARNc inyectada en cada oocito, siendo 1 equivalente a 2,5 ng y la relación 1:1 equivalente a inyectar 2,5 ng de un ARNc + 2,5 ng de otro ARNc. Los valores corresponden a datos representativos de tres experimentos independientes usando diferentes lotes de oocitos. Para cada condición se muestran los valores como media $P_f \pm \text{SEM}$, $n = 7-10$.

No podemos explicar fehacientemente por qué la presencia del *tag* fluorescente de BvPIP1;1 en su extremo C-terminal interfiere con la interacción funcional entre ambas acuaporinas, pero posiblemente la interacción entre las proteínas BvPIP2;1 mutantes y BvPIP1;1 sea más débil que la que ocurre entre BvPIP2;2 *wild type* y BvPIP1;1.

Análisis estructural de BvPIPs

Los resultados funcionales de permeabilidad al agua (Figura 33) y regulación por pH (Figura 35) de las mutantes de BvPIP2;1 sugieren que el *loop A* puede ser un elemento estructural que media la interacción con PIP1, posibilitando la formación de tetrámeros mixtos PIP1-PIP2. Por tanto realizamos un estudio de la estructura del *loop A* de BvPIP2;1. En primer lugar se llevaron a cabo estudios *in silico* a nivel atómico por modelado por homología sobre la base de los datos cristalográficos de SoPIP2;1 (única acuaporina vegetal cuya estructura fue resuelta por cristalografía de Rayos X hasta el momento) (Törnroth-Horsefield et al., 2005). Como se observa en la Figura 38-A y Figura 38-B se obtuvo un modelo consistente utilizando como templado las coordenadas del PDB 2B5F, que corresponde a la estructura cristalizada de SoPIP2;1 en conformación abierta.

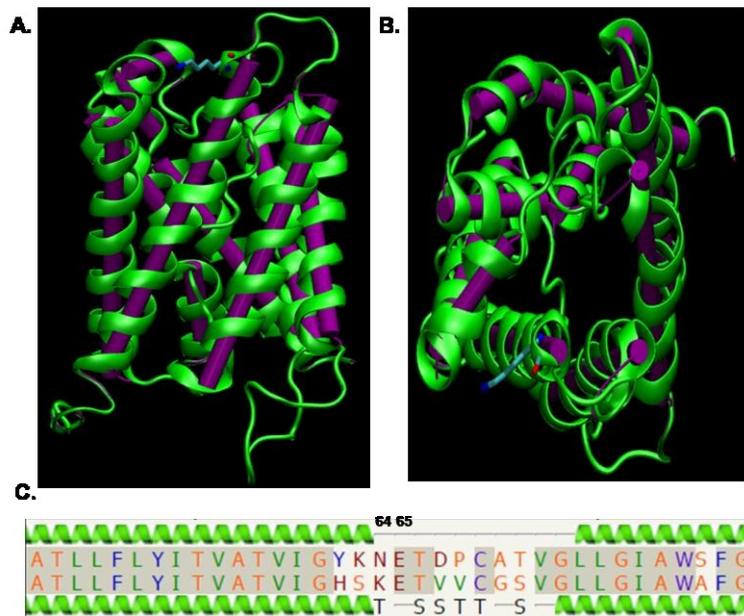


Figura 38: Estructura tridimensional de un monómero de BvPIP2;1.

Representación de la estructura modelada por homología de BvPIP2;1 utilizando como templado la estructura cristalográfica de SoPIP2;1 (PDB 2B5F). (A y B) Vistas superior y lateral del modelo generado de BvPIP2;1 (en violeta) y la cadena A de SoPIP2;1 (PDB 2B5F, en verde) superpuestas. En *licorice* se muestra la posición del residuo N64 (del motivo de glicosilación NETD). Las imágenes fueron generadas en VMD 9.1.2. (C) Alineamiento estructural entre BvPIP2;1 y SoPIP2;1. Se muestran de abajo hacia arriba: i- la estructura secundaria predicha de la secuencia a modelar (BvPIP2;1), ii- la secuencia primaria de la proteína a modelar, iii- la secuencia primaria de la proteína templado (SoPIP2;1), y iv- la estructura secundaria conocida de la proteína templado. Sobre los alineamientos se indican los residuos de las posiciones 64 y 65 de BvPIP2;1. Las letras T y S corresponden a hidrógeno unido y a giros en la estructura de SoPIP2;1, respectivamente. El alineamiento y la elección del templado fueron realizados con el servidor Phyre2.

El modelado por homología muestra que el *loop* A está definido por los residuos de las posiciones 65 a 72 de la secuencia primaria. Por tanto, los residuos mutados N64 y E65 correspondientes a los dos primeros residuos del posible motivo de N-glicosilación NETD, son el último residuo de la primera hélice transmembrana y el primer residuo del *loop* A, respectivamente. Esta localización los hace malos candidatos para la N-glicosilación, ya que serían inaccesibles para que la enzima los glicosilara (Nilsson y von Heijne, 1993). En concordancia, no hallamos diferencias entre la permeabilidad osmótica de la membrana (*Pf*) de oocitos que expresan BvPIP2;1 o co-expresan BvPIP2;1 con BvPIP1;1 (Figura 39) al ser tratados con tunicamicina (un análogo hidrofóbico de la UDP-N-acetil-glucosamina transferasa, enzima que inhibe específicamente la N-glicosilación).

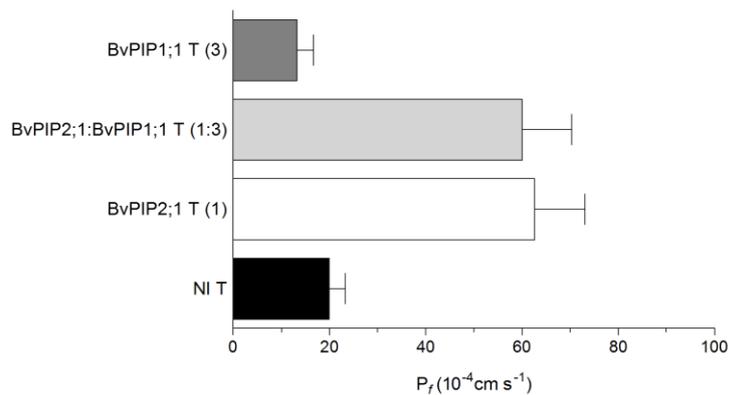


Figura 39: Impacto de la N-glicosilación sobre la funcionalidad de BvPIP2;1 y su capacidad de interacción con BvPIP1;1.

Entre paréntesis se indica la cantidad de ARNc inyectada en cada oocito, siendo 1 equivalente a 2,5 ng de ARNc inyectado y 3 equivalente al triple de dicha masa de ARNc inyectada. Los oocitos fueron pre-inyectados con 40 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de tunicamicina (T). NI T corresponde a oocitos inyectados con tunicamicina y luego con agua, en lugar de ARNc, como control. Los resultados se expresan como media $P_f \pm \text{SEM}$;

n
= 4 experimentos independientes.

Estos resultados indican que la glicosilación no tendría efecto en cuanto a la capacidad de BvPIP2;1 de interaccionar funcionalmente con BvPIP1;1. Vale aclarar que la presencia del antibiótico provocó un efecto de disminución de la permeabilidad osmótica (P_f) en todos los oocitos inyectados o co-inyectados con distintos ARNc de BvPIPs, probablemente porque la tunicamicina induce en cierto grado una inhibición de la síntesis de proteínas en el oocito.

Realizamos estudios de simulación por dinámica molecular (MDS) durante 30 ns sobre el *loop* A de BvPIP2;1. En la Figura 40 se muestra el gráfico de fluctuación cuadrática media (RMSF, por las siglas de *Root Mean Square Fluctuations*, en inglés) de los residuos de cada uno de los *loop* A a lo largo de los períodos de tiempo de 0-10 ns, de 10-20 ns y de 20-30 ns de simulación. Los gráficos muestran valles, que señalan que la estructura secundaria se mantiene estable, y picos que representan partes móviles de la proteína. Los resultados indican que entre los elementos extracelulares, el *loop* A es una zona de alta movilidad en comparación con el *loop* C a lo largo de toda la dinámica molecular. Por otro lado, entre los elementos intracelulares, el *loop* D resulta ser el elemento de mayor movilidad (Figura 40)

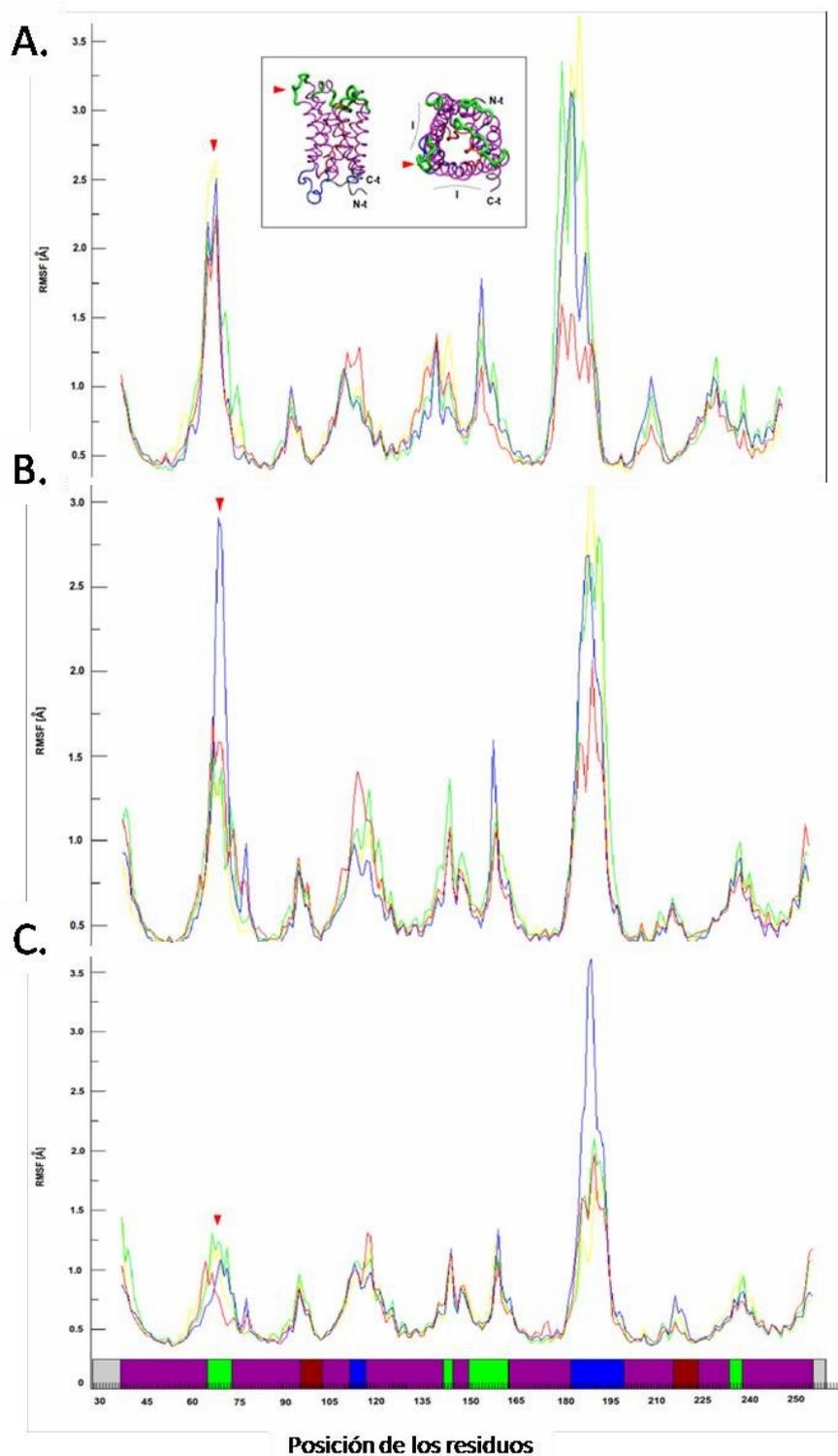


Figura 40: Fluctuación cuadrática media (RMSF) de los residuos de cada uno de los *loop A* de BvPIP2;1. El RMSF muestra las fluctuaciones promedio en función de cada residuo para cada uno de los *loop A*, que se muestran en líneas de color amarillo, verde, azul y rojo correspondientes a las cadenas A, B, C y D, respectivamente, en todos los paneles. Los paneles A-C representan intervalos temporales del MDS que van de 0 a 10 ns, 10 a 20 ns y 20 a 30 ns, respectivamente. El recuadro superior muestra el modelo de BvPIP2;1 donde se utiliza verde para señalar elementos extracelulares de la acuaporina, azul para señalar elementos intracelulares, púrpura para marcar regiones con estructura secundaria hélices alfa, bordo para distinguir los *loops* B y E insertados en la región de la membrana y gris para mostrar las regiones N- y C-terminal de la proteína. El mismo patrón de color se usa en el eje x para discriminar la ubicación de los residuos de la estructura primaria en la proteína. Las flechas rojas señalan el *loop A*.

Por lo tanto, el resultado del RMSF indica que los *loop* A son los elementos más flexibles de la cara externa (extra citoplasmática) de cada uno de los monómeros en el tetrámero, y confirman que el *loop* D corresponde a la parte más flexible del lado citoplasmático del canal, en acuerdo con las propiedades funcionales propuestas para este *loop*, que media la apertura y cierre del canal por cambios en el estado de fosforilación y protonación del mismo (Khandelia et al., 2009).

Se realizaron gráficos de Ramachandran para analizar el espacio conformacional que recorren los aminoácidos del *loop* A de cada monómero (Figura 41). Los gráficos de Ramachandran muestran que los residuos E65, T66, C69, A70, T71 y V72 exploran el espacio conformacional de diferentes maneras dependiendo de la cadena a la que pertenecen, revelando por tanto que los *loop* A de cada uno de los monómeros en el tetrámero recorre el espacio conformacional en forma distinta.

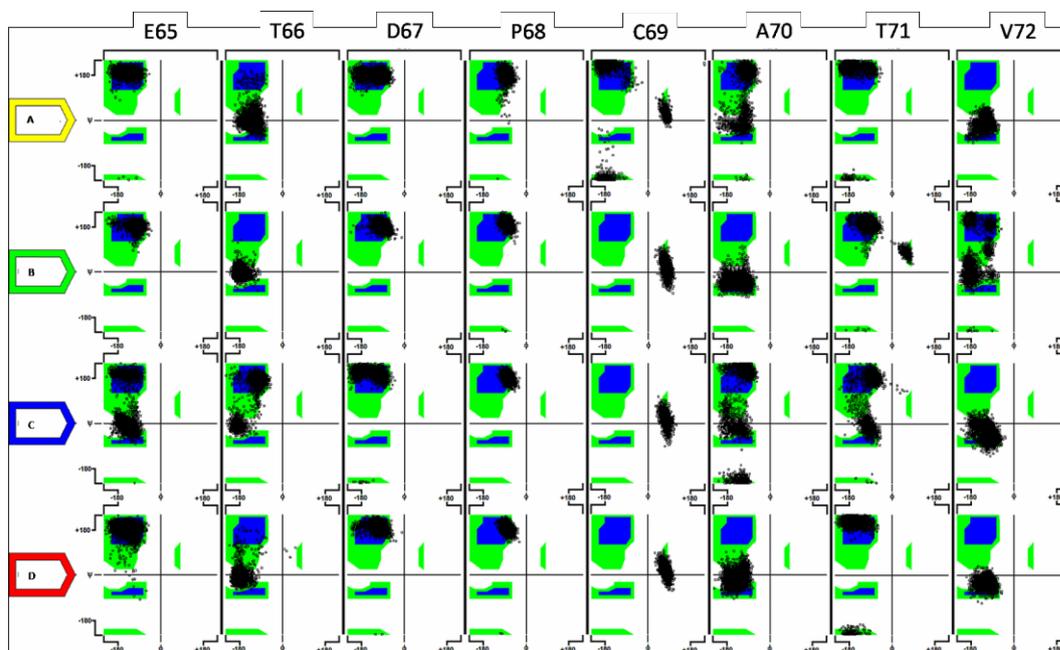


Figura 41: Gráficos de Ramachandran de los residuos que corresponden al *loop* A de BvPIP2;1.

Se muestran los gráficos de Ramachandran para el *loop* A de cada uno de las cadenas A, B, C, D del tetrámero. Cada una de las cadenas se muestra en filas consecutivas que se distinguen por el color amarillo (monómero A), verde (monómero B), azul (monómero C) y rojo (monómero D), respectivamente. Los aminoácidos del *loop* A de cada cadena se indican en la parte superior de la figura; en orden de derecha a izquierda son: E65, T66, D67, P68, C69, A70, T71 y V72.

Además, la dinámica revela que el *loop* A de cada monómero se encuentra orientado hacia el centro del tetrámero (Figura 42) y que cada *loop* monomérico presenta un comportamiento diferencial, a pesar de provenir de idénticas cadenas primarias. Es decir, cada uno de los cuatro *loop* A en el tetrámero desarrolló un movimiento no equivalente, ya que al iniciar en posiciones idénticas (en rojo) alcanzaron diferentes conformaciones finales (en azul) después de 30 ns de simulación (Figura 42). Algunos autores sugieren que los residuos mutados N64 y E65, que

corresponden al último residuo de la primer hélice transmembrana y al primer residuo del *loop* A, pueden ser claves para la conformación del *loop* (Hayward y Kitao, 2010).

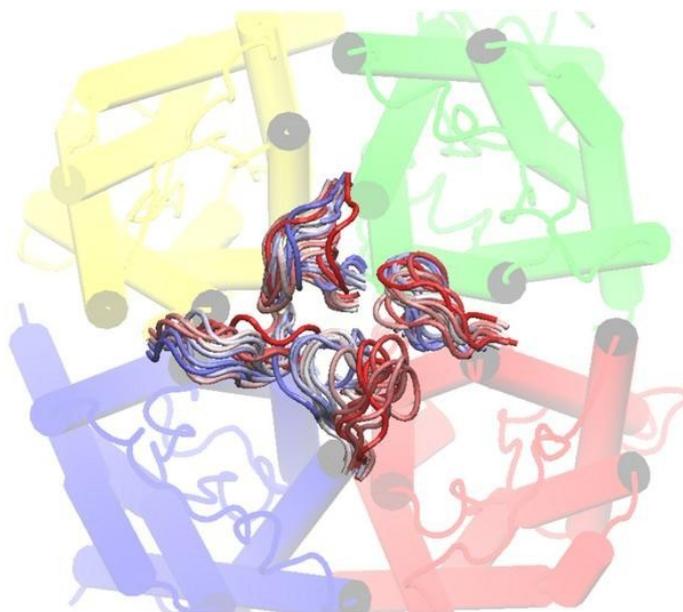


Figura 42: Superposición de imágenes de la dinámica molecular de los *loop* A de cada uno de los monómeros en el tetrámero de BvPIP2;1 durante 30 ns de simulación.

La figura muestra imágenes de dinámica molecular para los *loops* A de cada uno de los monómeros de BvPIP2;1, que se representan por un color diferente: el monómero A se muestra en amarillo, el monómero B en verde, el monómero C en azul y el monómero D en rojo. La superposición de la dinámica de 30 ns de cada uno de los *loops* A de BvPIP2;1 se muestra en una gama de colores, donde el rojo corresponde a la posición inicial, el blanco corresponde a una posición intermedia y el azul corresponde a la posición final.

Notablemente, los resultados de la dinámica a lo largo de 30 ns revelan que los *loop* A de algunos de los monómeros podrían estar en contacto. Teniendo en cuenta: i- estos resultados de dinámica molecular; ii- que fue reportado que las acuaporinas tipo PIP podrían formar dímeros estables a través de puentes disulfuro entre aminoácidos de Cisteína muy conservado en el *loop* A de todas las PIP2 (Bienert et al., 2012); y iii- que fue descrito que las proteínas PIP2 de *Beta vulgaris* forman puentes disulfuro *in vivo* en las células vegetales (Barone et al., 1998), decidimos explorar *in silico* la posibilidad de formación de puentes disulfuro entre los *loop* A de los monómeros de BvPIP2;1 en el homo-tetrámero (Figura 43).

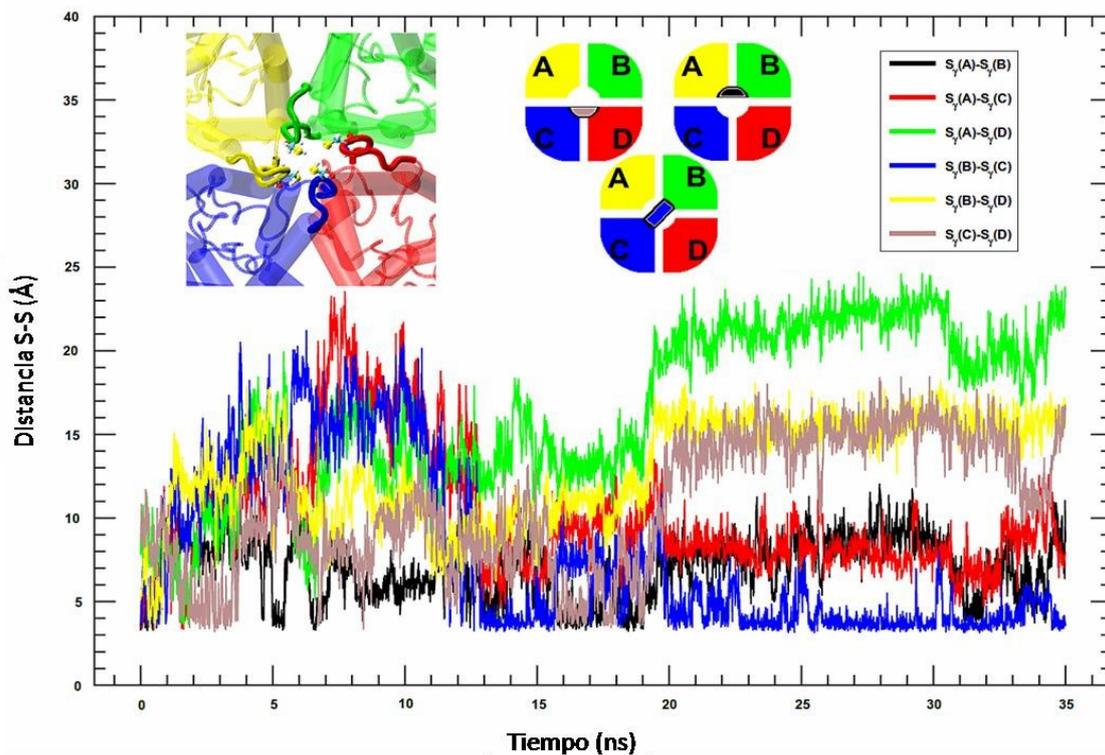


Figura 43: Análisis de la formación de puentes disulfuro entre Cys de los *loop A* de los monómeros en el homo-tetrámero de BvPIP2;1.

La figura muestra las distancias entre todos los posibles pares de átomos de azufre, que corresponden a los residuos de Cisteínas conservadas en el *loop A*, que pudieran estar implicados en puentes disulfuro entre las cuatro cadenas monoméricas a lo largo de la dinámica de 35 ns. El recuadro en la parte superior de la derecha establece las referencias de color para cada par de átomos de azufre (que corresponden a las cadenas monoméricas A, B, C o D) que se muestran en la figura. El recuadro en la parte superior de la izquierda muestra un modelo en el que se resaltan los *loop A* y se representan los átomos de azufre como esferas amarillas (en el estilo CPK). El recuadro en el centro muestra una representación esquemática de los puentes disulfuro que se pueden formar, por lo menos durante cierta ventana de tiempo de la dinámica, entre Cisteínas de los diferentes monómeros.

En la Figura 43 se muestran las distancias entre todos los posibles pares de átomos de azufre, que corresponden a los residuos de cisteínas conservadas en el *loop A*, que pudieran estar implicados en puentes disulfuro entre las cuatro cadenas monoméricas a lo largo de la dinámica de 35 ns. Se pueden identificar tres zonas: una primera zona de desorden entre los 0-12 ns donde casi ningún par de Cisteínas se encuentra a la distancia de formación de puentes disulfuro (< 4 Å), una segunda zona donde aparece un patrón más definido de distancias entre Cisteínas (12-20 ns) y una tercera zona (20-30 ns) en la cual están bien definidas las distancias entre Cisteínas opuestas. Nuestros resultados confirman la posibilidad de contacto entre monómeros contiguos en el tetrámero e incluso entre monómeros opuestos mediante puentes disulfuro, e indican que éstos puentes S-S se pueden formar entre pares de cisteínas de los monómeros C-D (entre las cisteínas $S_{\gamma}(C)-S_{\gamma}(D)$, S514-S750), A-B (entre las cisteínas $S_{\gamma}(A)-S_{\gamma}(B)$, S42-S278) y C-B (entre las cisteínas $S_{\gamma}(B)-S_{\gamma}(C)$, S278-S514) (Figura 43, cuadro superior del centro).

Análisis estructural de mutantes de BvPIP2;1

Con la intención de investigar en mayor profundidad las causas de las respuestas funcionales halladas para las dos mutantes de BvPIP2;1 en comparación con la proteína *wild type*, exploramos *in silico*, y a partir de los modelados por homología obtenidos para las mutantes, la variación de la carga electrostática en el *loop A* de BvPIP2;1 y sus mutantes de BvPIP2;1 (Figura 44).

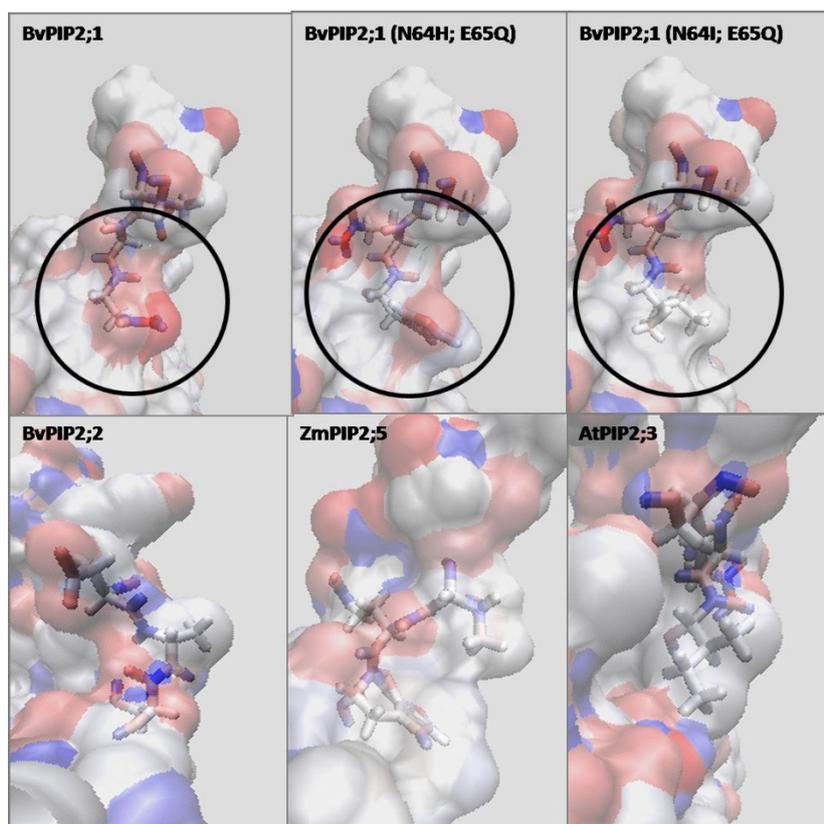


Figura 44: Cargas electrostáticas del *loop A* de BvPIP2;1 *wild type*, BvPIP2;1 mutantes y otras PIP2 capaces de interactuar con PIP1.

La figura muestra para las proteínas BvPIP2;1 *wild type* y BvPIP2;1 mutantes (N64H/E65Q y N64I/E65Q) (arriba) y para las proteínas BvPIP2;2, ZmPIP2;5 y AtPIP2;3 (abajo) la carga electrostática en la zona de los residuos mutados (en *licorice*). Las mutaciones generaron un cambio en la carga electrostática de las proteínas mutantes (recuadro), siendo negativa (en rojo) en el caso de BvPIP2;1 *wild type* y menos negativa en el caso de la mutante de BvPIP2;1 N64H/E65Q. También para el *loop A* de BvPIP2;2 se observa que la carga electrostática es menos negativa en comparación con el *loop A* de BvPIP2;1. En el caso de la otra mutante de BvPIP2;1 N64I/E65Q se observa que la carga electrostática en esa zona es neutra (en blanco), al igual que para las proteínas ZmPIP2;5 y de AtPIP2;3 cuya interacción con PIP1 ya fue reportada (Mut et al., 2008; Fetter et al., 2004).

Los resultados muestran que hay una variación de la carga electrostática en la zona del *loop A* para ambas mutantes en comparación con el *loop A* de BvPIP2;1 *wild type*, siendo esta zona neutra y menos polar en el caso de las mutantes, tal como se observa para otras proteínas capaces de interactuar con PIP1.

En segundo lugar, analizamos mediante el gráfico de fluctuación cuadrática media (RMSF, por las siglas de *Root Mean Square Fluctuations*, en inglés) la flexibilidad del *loop A* de la mutante de BvPIP2;1 N64I/E65Q a lo largo de 35 ns de dinámica molecular (Figura 45).

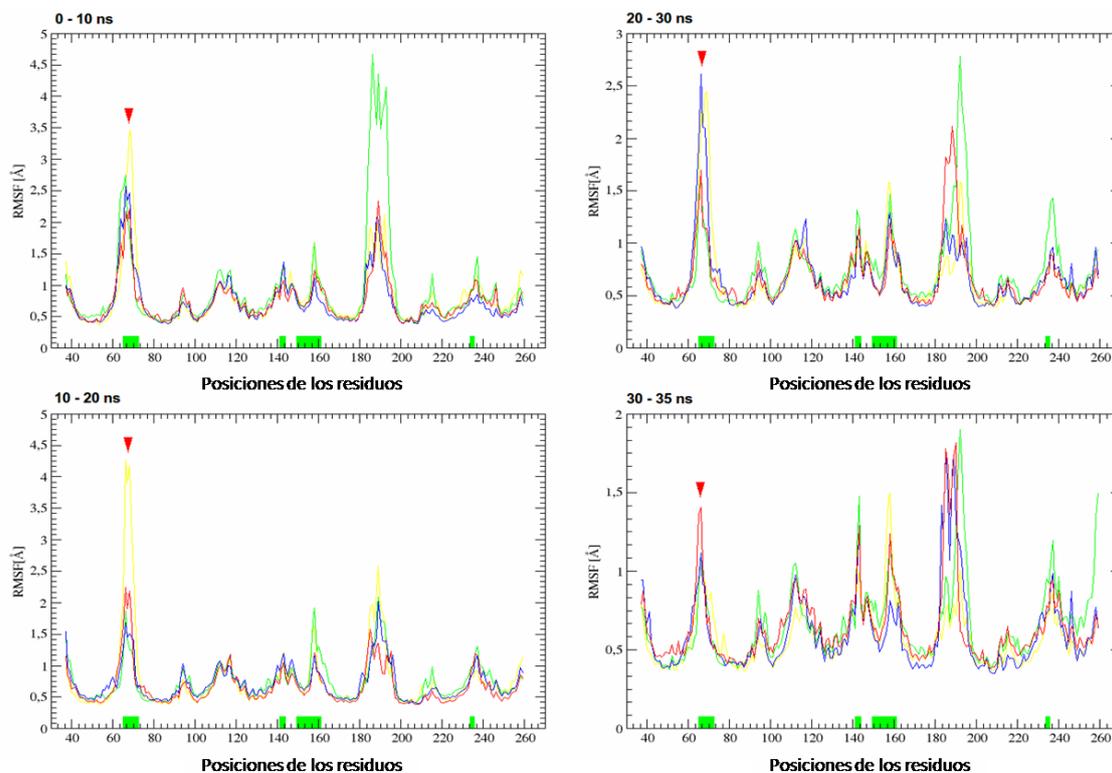


Figura 45: Fluctuación cuadrática media (RMSF) de los residuos de cada uno de los *loops A* de la proteína mutante BvPIP2;1 N64I/E65Q.

El RMSF de cada uno de los *loop A* se muestra en líneas de color amarillo, verde, azul y rojo correspondientes a las cadenas monoméricas A, B, C y D, respectivamente. Los paneles representan intervalos temporales de la dinámica molecular que van de 0 a 10 ns, 10 a 20 ns y 20 a 30 ns y 30-35 ns, respectivamente. Sobre el eje x se utiliza el color verde para señalar los residuos de la estructura primaria de la proteína que corresponden a elementos extracelulares. Las flechas rojas señalan el *loop A*.

Los resultados del RMSF muestran que el *loop A* de la mutante BvPIP2;1 N64I/E65Q es el elemento extracelular más flexible a lo largo de toda la dinámica molecular, a pesar de no ser el más extenso (8 aminoácidos, entre las posiciones 65 a 72); el *loop* extracelular C posee 13 aminoácidos de largo (entre las posiciones 149 a 161) y presenta menor flexibilidad que el *loop A* en todas las ventanas temporales de la dinámica (Figura 45).

Los resultados del análisis de la carga electrostática de las mutantes de BvPIP2;1 sugieren que la falta de interacción funcional de BvPIP2;1 con BvPIP1;1 podría estar en relación con un cambio electrostático en una zona clave (*loop A*) para la interacción entre monómeros en el tetramero. Sin embargo, este cambio no alteraría la movilidad del *loop*, ya que según los resultados de dinámica molecular, la flexibilidad del *loop A* de BvPIP2;1 *wild type* y las mutantes es similar.

Conclusiones

Los objetivos de la primera parte de esta tesis se centraron en caracterizar funcionalmente a la acuaporina BvPIP2;1, para analizar posteriormente las diferencias estructurales entre ella y otras PIP2 que justificaran las diferencias funcionales halladas.

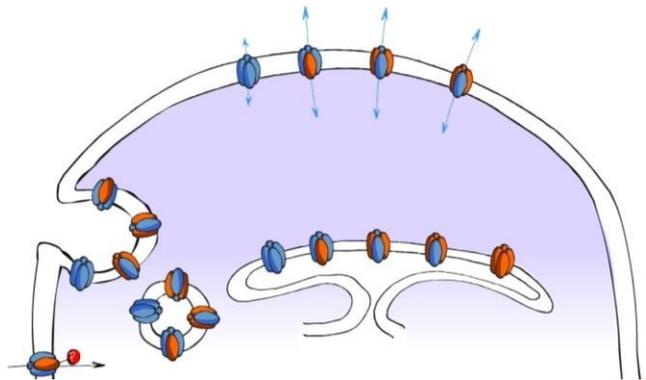
Los resultados de esta primer parte muestran que:

- BvPIP2;1 pertenece a un subtipo de acuaporinas PIP diferente al de BvPIP2;2, encontrándose cada una en distintos *clusters* filogenéticos;
 - BvPIP2;1 presenta alta capacidad de transporte de agua, y se localiza en la membrana plasmática de las células que la expresan;
 - La curva dosis-respuesta para BvPIP2;1 a diferentes pH_{int} presenta un perfil de respuesta sigmoideo (lo que sugiere que los tetrámeros de BvPIP2;1 responden al pH_{int} alostéricamente) y una fuerte inhibición para el transporte de agua a pH_{int} menores a 6.3;
 - BvPIP2;1, a diferencia de BvPIP2;2, es incapaz de interactuar funcionalmente con BvPIP1;1; es decir, la co-expresión de ambas acuaporinas no promueve un aumento de la P_f de las membranas más allá de la observada por expresión de BvPIP2;1 sola;
 - No se observa una modificación de la curva dosis respuesta de permeabilidad osmótica en función del pH_{int} en oocitos que co-expresan BvPIP2;1 y BvPIP1;1, más allá de la respuesta observada por expresión de BvPIP2;1 sola;
 - BvPIP2;2 forma homo-tetrámeros funcionales en membrana plasmática cuando se expresa sola, a diferencia de BvPIP1;1 que es retenida intracelularmente;
 - BvPIP2;1 no es capaz de relocalizar a BvPIP1;1 a membrana plasmática, como sí lo hace BvPIP2;2;
 - Las principales diferencias halladas en la estructura primaria entre BvPIP2;1 y otras PIP2 que son capaces de interactuar con PIP1, se hallan a nivel del primer *loop* extracitoplasmático, *loop A*;
 - Mutaciones en el *loop A* de BvPIP2;1 permiten restaurar la interacción funcional descrita entre algunos pares de PIP1 y PIP2 (como por ejemplo, BvPIP2;2 y BvPIP1;1);
 - Los *loop A* de cada cadena monomérica de BvPIP2;1 se ubican hacia el centro del tetrámero y recorren un espacio conformacional diferente, siendo todos muy móviles pero con diferente ubicación en función del tiempo;
 - Dados los distintos espacios conformacionales que recorren, algunos de estos *loops A* podrían estar mediando los contactos entre monómeros en un posible hetero-tetrámero;
-
- Resultados de dinámica molecular confirman la posibilidad de formación de puentes disulfuro entre los *loop A* de los monómeros de BvPIP2;1 en el homo-tetrámero;

- Estudios *in silico* permiten explicar la falta de interacción entre BvPIP2;1 y BvPIP1;1 a partir de un cambio de carga electrostática en el *loop A* de BvPIP2;1 que condicionaría el ensamblado hetero-tetramérico.

CAPITULO 2.

Estudio de la estequiometría de hetero-tetrámeros mixtos PIP1-PIP2.



Introducción

Durante la primera parte de esta Tesis estudiamos la funcionalidad de BvPIP2;1 y las características estructurales que condicionan su ensamblado con PIP1 para formar oligómeros mixtos. Al analizar los resultados encontramos que el primer *loop* extracitoplasmático de PIP2 juega un rol clave en la interacción entre proteínas PIP1-PIP2. Además, dada la localización de este *loop* hacia el centro del tetrámero, nuestra hipótesis acerca de la existencia de hetero-tetrámeros (oligómeros compuestos por monómeros mixtos PIP1-PIP2 en un mismo tetrámero) es plausible. No obstante, esto no descarta que también existan hetero-oligómeros (homo-tetrámeros de PIP1 junto a homo-tetrámeros de PIP2) *in planta* (Figura 10).

Más allá de la importancia que el estudio de canales multiméricos pudiera tener desde lo biofísico, cabe preguntarse la relevancia de este tipo de estudios desde lo biológico. El monitoreo de la expresión génica de PIPs realizado para diversas especies vegetales, muestra que las PIPs -tanto PIP1 como PIP2- de distintas especies se expresan en diferentes tejidos, pero sin que exista preferencia por uno de los parálogos en particular, es decir, en todos los casos se ha encontrado que ambos parálogos son expresados a la vez (Alexandersson et al., 2005; Hachez et al., 2008; Boursiac et al., 2008). Sin embargo, la relación PIP2/PIP1 (tanto de ARNm como de proteína expresada) puede variar considerablemente entre tejidos o tipos de células; por ejemplo en los estomas se encuentra una expresión de ARNm de PIP1 mucho mayor (~ 80%) a la observada para PIP2 (Heinen et al., 2014).

La observación de que los genes que codifican para PIP1 y PIP2 son co-expresados en una misma célula permitió a los investigadores sugerir que estas proteínas podrían interactuar físicamente para formar hetero-tetrámeros *in planta*. Un estudio genético inverso realizado para PIPs de *Arabidopsis* muestra que la inhibición en la expresión de tres PIP (pertenecientes a las isoformas PIP1 y PIP2) contribuyen individualmente a la misma conductividad hidráulica que la correspondiente triple mutante (Prado y Maurel, 2013). Otro dato interesante es aportado por Martre y colaboradores (Martre et al., 2002), quienes al comparar los parámetros hídricos obtenidos de plantas *antisense* para PIP1, para PIP2 y para la doble mutante PIP1+PIP2, observaron que el grupo de PIPs que no había sido depletado aparecía como inactiva, es decir, que no tenía funcionalidad para el transporte de agua si no se encontraba el otro parálogo.

Estos resultados apoyan lo observado previamente en sistemas heterólogos de expresión ya que indican que es posible que exista un sinergismo funcional entre PIPs co-expresadas en planta. Es en este contexto que el estudio de la formación de tetrámeros mixtos PIP1-PIP2 y de la estequiometría responsable de su actividad se torna relevante. Las preguntas que surgen son: ¿PIP2 forma con PIP1 verdaderos arreglos hetero-tetraméricos que presentan propiedades de transporte de agua y sensibilidad a pH diferentes a los homo-tetrámeros de PIP2? De ser así, ¿qué tipo de estequiometría presenta el hetero-tetrámero formado? Y más aún, ¿todas las especies tetraméricas con distintas estequiometrías presentan la misma funcionalidad y regulación por pH?

Al momento de realizar los experimentos que se describen en este capítulo no había datos experimentales sobre las propiedades biofísicas de las posibles configuraciones estequiométricas de oligómeros de PIPs, mas allá de algunos trabajos que sugieren que la heteromerización tendría gran relevancia funcional ya que podría condicionar la actividad, el gatillado por pH y la localización de estas proteínas multiméricas (Otto et al., 2010; Bellati et al., 2010; Zelazny et al., 2007).

Objetivos

El objetivo general de la segunda parte de esta Tesis Doctoral es estudiar a las acuaporinas vegetales en tanto canales multiméricos, indagando qué estequiometría presentan los arreglos funcionales PIP1-PIP2 y los mecanismos de regulación que condicionan su funcionalidad.

Para llevar a cabo este objetivo general, se propusieron los siguientes Objetivos Específicos:

OE1: Evaluar la existencia de hetero-tetrámeros PIP1-PIP2;

OE2: Evaluar la respuesta funcional de los diferentes arreglos tetraméricos;

OE3: Analizar si los diferentes arreglos hetero-tetraméricos presentan igual o distinta funcionalidad en comparación con los arreglos homo-tetraméricos;

OE4: Analizar los mecanismos de regulación que afectan la actividad de hetero-tetrámeros PIP1-PIP2, en particular, la cooperatividad que presentan en respuesta al pH intracelular.

Dado que BvPIP1;1 y BvPIP2;2 presentan la capacidad de interactuar, como muchos otros pares de proteínas PIP1 y PIP2, los objetivos planteados en esta segunda etapa se llevaron a cabo estudiando únicamente este par de proteínas en tanto representantes de cada uno de estos grupos; por tanto, en adelante nos referimos a ellas como "PIP1" y "PIP2".

Evaluación de las estrategias experimentales para el estudio de la formación de distintas especies tetraméricas de proteínas PIP

Para abordar el estudio de los posibles arreglos tetraméricos capaces de formarse entre BvPIP1;1 (en adelante llamada PIP1) y BvPIP2;2 (en adelante llamada PIP2), evaluamos un diseño experimental que nos permita restringir el número de configuraciones estequiométricas posibles de los hetero-tetrámeros PIP1-PIP2. Basándonos en la bibliografía disponible sobre otros canales tetraméricos, encontramos que en el caso de los canales de potasio, el proceso de tetramerización parece darse primero entre monómeros para formar un dímero, y luego dos dímeros formarían el tetrámero funcional (Naso et al., 2006). También en el caso de la acuagliceroporina GlpF el mecanismo de tetramerización parece ocurrir vía la formación de un intermediario dimérico estable (Veerappan et al., 2011). Por lo tanto, co-expresamos en oocitos de *Xenopus* diferentes tipos y cantidades de ARNc codificante ya sea para los monómeros de PIP1 y/o PIP2, como para los hetero-dímeros PIP2-PIP1 (Figura 46).

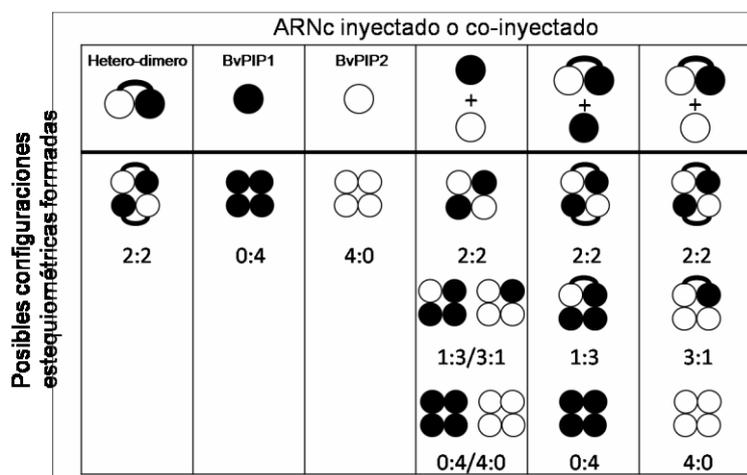


Figura 46: Representación esquemática de las posibles configuraciones tetraméricas generadas por la inyección de ARNc del hetero-dímero, BvPIP1;1, BvPIP2;2 o por la co-inyección de distintas combinaciones de ARNc.

Las acuaporinas de tipo PIP2 se representan como esferas blancas, las de tipo PIP1 como esferas negras y los hetero-dímeros como una esfera blanca conectada a una esfera negra por medio de una línea curva. El orden de las esferas en los tetrámeros no pretende representar el ordenamiento real de los monómeros en el mismo y sólo representa una de las configuraciones posibles. Cuando el ARNc del hetero-dímero, de PIP2 o de PIP1 se inyectan solos en oocitos de *Xenopus*, se forma una única especie tetramérica; pero al co-expresar los monómeros de PIP1 y de PIP2 en iguales relaciones de masas varias configuraciones tetraméricas son posibles. Sin embargo, por co-inyección del hetero-dímero con monómeros de PIP1 o monómeros de PIP2, sólo tres configuraciones tetraméricas son plausibles.

Las co-inyecciones en oocitos del ARNc de dímeros de acuaporinas PIP y monómeros de PIP1 o PIP2 nos permitieron formar todas las configuraciones tetraméricas posibles, restringiendo la

existencia de unas u otras según las combinaciones de ARNc de monómeros y dímeros co-inyectados. Es decir, la expresión del dímero solo o en conjunto con PIP2 o PIP1 da lugar a la formación de homo o hetero-tetrámeros (con distintas estequiometrías) en función de los ARNc inyectados y sus posibilidades de formación (Figura 46).

Control de la actividad de dímeros de proteínas PIP

Estudios previos mostraron que el uso de construcciones diméricas de proteínas en tándem permite el estudio de canales con una composición determinada en el sistema de expresión de oocitos de *Xenopus* (Naso et al., 2006; Lebaudy et al., 2010). Sin embargo, otros reportes indican que la dimerización forzada de subunidades puede afectar a las propiedades biofísicas de los canales (McCormack et al., 1992). Por esta razón, en primer lugar, hemos abordado el estudio funcional de las construcciones homo-diméricas para evaluar que el *linker* entre las subunidades no afecta la funcionalidad de cada canal. Con este fin comparamos la actividad biológica de homo-dímeros en tándem de acuaporinas PIP2 con la actividad biológica observada para los monómeros de dichas acuaporinas (Figura 47).

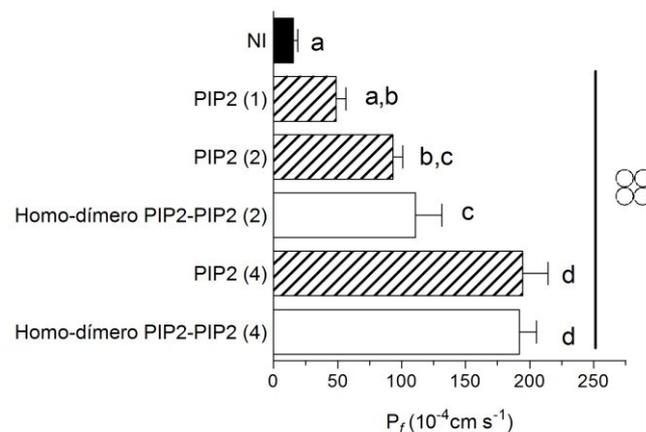


Figura 47: Permeabilidad osmótica (P_f) de las membranas de oocitos que fueron inyectados con distintas masas de ARNc de monómeros de PIP2 y homo-dímeros PIP2-PIP2.

Diferentes cantidades de ARNc codificante para PIP2 y para homo-dímeros PIP2 fueron inyectadas en oocitos de *Xenopus* y tres días post inyección se evaluó el coeficiente de permeabilidad osmótica al agua (P_f). Entre paréntesis se indica la cantidad relativa de ARNc inyectada en cada oocito, 1 equivalente a 2,5 ng, 2 equivalente a 5 ng y 4 equivalente a 10 ng. La P_f de las membranas de oocitos inyectados con el ARNc codificante para el homo-dímero de PIP2 es significativamente diferente a la P_f de la membrana de los oocitos control no inyectados (NI) ($p < 0.05$). La P_f de las membranas de oocitos inyectados con iguales cantidades de ARNc codificante para PIP2 o para el homo-dímero de PIP2 no es significativamente diferente entre sí ($p < 0.05$). Los datos se expresan como valores medios (media $P_f \pm \text{SEM}$, $n = 10-15$). La figura muestra los datos representativos de 2 experimentos independientes. A la derecha de la barra se muestra en forma esquemática el único arreglo tetramérico posible formado por inyección del ARNc de PIP2 o de homo-dímeros de PIP2, que corresponde al homo-tetrámero de PIP2.

Los resultados mostraron que la inyección de ARNc codificante para los homo-dímeros de PIP2 conduce a un aumento significativo de la P_f en comparación con los oocitos control, no inyectados.

Por lo tanto podemos concluir que las construcciones diméricas son capaces de expresarse eficientemente en oocitos de *Xenopus*. Además el transporte de agua que genera la expresión de homo-dímeros PIP2-PIP2 en comparación con el que se obtiene por expresión de monómeros de PIP2 no es significativamente distinto a igual cantidad de ARNc inyectado ($p < 0.05$), siendo en ambos casos la única especie tetramérica capaz de formarse el homo-tetrámero de PIP2 (Figura 47). Estos resultados nos permiten concluir que la presencia del *linker* que une ambas acuaporinas en el dímero no modifica la actividad de las mismas (Figura 47).

A su vez, ensayamos la permeabilidad osmótica de las membranas de oocitos inyectados con iguales cantidades de ARNc del hetero-dímero PIP2-PIP1 o del hetero-dímero PIP1-PIP2, con el fin de determinar si el orden en que las moléculas PIP1 o PIP2 se ensamblaban en el dímero podía afectar el armado del tetrámero (Figura 48).

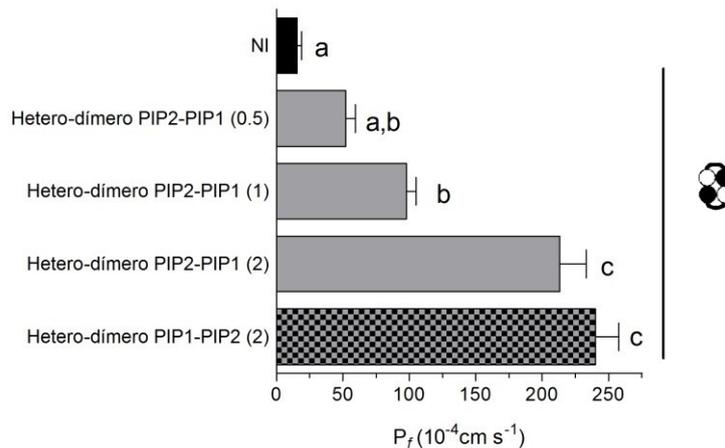


Figura 48: Permeabilidad osmótica (P_f) de las membranas de oocitos que fueron inyectados con distintas masas de ARNc codificante para hetero- dímeros PIP2-PIP1 y hetero-dímeros PIP1-PIP2.

Diferentes cantidades de ARNc codificante para hetero-dímeros PIP2-PIP1 o PIP1-PIP2 fueron inyectadas en oocitos de *Xenopus* y tres días post inyección se evaluó el coeficiente de permeabilidad osmótica al agua (P_f). Entre paréntesis se indica la cantidad relativa de ARNc inyectada en cada oocito, siendo 0.5 equivalente a 1.25 ng, 1 equivalente a 2.5 ng y 2 equivalente a 5 ng. La P_f de las membranas de oocitos inyectados con iguales cantidades de ARNc codificante para el hetero-dímero PIP2-PIP1 o para el hetero-dímero PIP1-PIP2 son significativamente diferentes a la P_f de la membrana de los oocitos control (NI), pero no entre sí cuando se inyectan iguales cantidades de masa de ARNc de cada uno. Los datos se expresan como valores medios (media $P_f \pm$ SEM, $n = 12-15$). La figura muestra los datos representativos de 2 experimentos independientes realizados con distintos lotes de oocitos. A la derecha de la barra se muestran en forma esquemática el único arreglo tetramérico posible por inyección del ARNc codificante para los hetero-dímeros, esto es el hetero-tetrámero de estequiometría 2:2. Los hetero-dímeros se representan como una esfera blanca conectada a una esfera negra por medio de una línea curva. NI corresponde a oocitos control, no inyectados.

Los resultados experimentales muestran que ambas construcciones diméricas son capaces de expresarse en oocitos de *Xenopus*, siendo la P_f obtenida por expresión de los hetero-dímeros mayor que la P_f observada para los oocitos no inyectados (control negativo). En ambos casos sólo hetero-tetrámeros con estequiometría 2:2 pueden formarse. A su vez, encontramos que no hay diferencias significativas en las P_f obtenidas por expresión de estas dos construcciones, cuando se inyecta igual masa de ARNc de cada una ($p < 0.05$). Esto nos permite descartar cambios en la actividad de las proteínas unidas en tándem por efecto de la posición de dichas acuaporinas en 5" o 3" en el dímero. Dado que ambos hetero-dímeros mostraron ser activos para el transporte de agua, en adelante los experimentos se llevaron a cabo con uno solo de estos hetero-dímeros: PIP2-PIP1, que llamaremos *hetero-dímero* para simplificar.

Por otro lado, se puede observar que tanto la permeabilidad osmótica (P_f) de las membranas que expresan PIP2 o los homo-dímeros de PIP2 (Figura 47) como la permeabilidad osmótica (P_f) de las membranas que expresan los hetero-dímeros (Figura 48) son dependientes de la cantidad de ARNc inyectada; esto sugiere que existe una relación entre ARNc inyectado y proteína sintetizada y expresada en membrana plasmática en los rangos ensayados.

Estudio de las características funcionales de hetero-tetrámeros PIP2-PIP1 con estequiometría 2:2

Por co-expresión de monómeros PIP1 y PIP2 es esperable la obtención de una población heterogénea de tetrámeros con hasta 6 estequiometrías distintas (Figura 46). Sin embargo, el único hetero-tetrámero que se puede formar por expresión del hetero-dímero es el de estequiometría 2:2, esto es un hetero-tetrámero compuesto por dos moléculas de PIP2 más dos moléculas de PIP1. Por lo tanto, para evaluar la respuesta funcional de una especie tetramérica única de estequiometría 2:2, inyectamos el ARNc del hetero-dímero y comparamos esta respuesta con la respuesta funcional obtenida tras la co-inyección del ARNc de los monómeros de PIP2 y PIP1 por separado (Figura 49). Cuando se inyectan 5 ng de ARNc que codifica para el hetero-dímero en los oocitos, la P_f observada no es significativamente distinta de la observada cuando se co-inyectan 2,5 ng del ARNc de PIP2 más 2,5 ng del ARNc de PIP1 (relación de masa 1:1), pero como se señaló anteriormente, en este último caso se pueden formar varias configuraciones tetraméricas. Además, ambas permeabilidades son significativamente diferentes de las que se observan por expresión del monómero de PIP2 solo (Figura 49), lo que indica que los homo-tetrámeros de PIP2 otorgan una permeabilidad osmótica a las membranas moderada en comparación con la permeabilidad que otorgan los hetero-tetrámeros PIP1-PIP2.

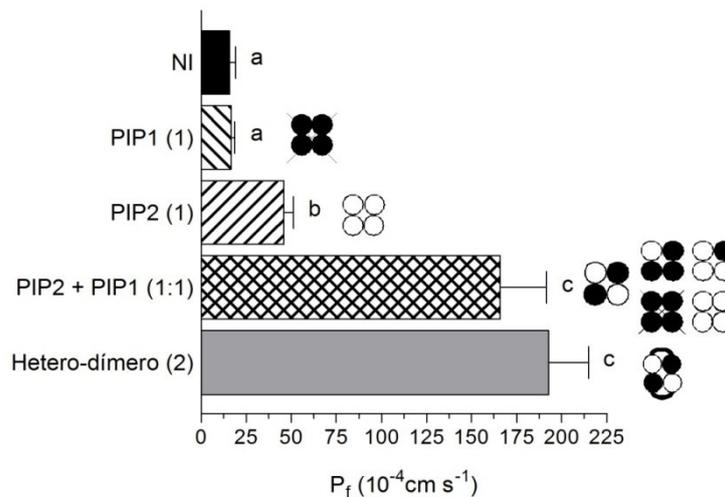


Figura 49: Valores de permeabilidad al agua (P_f) de membranas de oocitos que expresan BvPIP (solas y en combinación) en comparación con la P_f de membranas de oocitos que solo expresan el hetero-dímero.

La expresión de los hetero-dímeros y la co-expresión de PIP2 con PIP1 conducen a un aumento comparable en la permeabilidad al agua de las membranas (P_f) ($p > 0,05$). Además ambas permeabilidades son significativamente diferentes de las que se observan por expresión del monómero de PIP2 solo ($p < 0,01$). La cantidad relativa de ARNc inyectada en cada oocito se muestra entre paréntesis, siendo (1) igual a 2,5 ng/oocito y (2) equivalente a 5 ng/oocito. NI: corresponde a oocitos no inyectados. Los datos se expresan como valores medios (media $P_f \pm$ SEM, $n = 5$), 14-20 oocitos fueron ensayados para cada condición. Letras diferentes indican significancia entre barras ($p < 0,05$). A la derecha de la barra se indican las posibles configuraciones tetraméricas que pueden formarse por inyección o co-inyección de cada ARNc. Las acuaporinas de tipo PIP2 se representan como esferas blancas, las de tipo PIP1 como esferas negras y los hetero-dímeros como una esfera blanca conectada a una esfera negra por medio de una línea curva. Los tetrámeros tachados indican que dichos tetrámeros no se encuentran en la membrana plasmática.

Estos resultados confirman por primera vez la existencia de hetero-tetrámeros formados por moléculas de PIP1 y PIP2, e indican que los hetero-tetrámeros PIP2-PIP1 con estequiometría 2:2 (heterotetrámero compuesto por dos monómeros de PIP2 y dos monómeros de PIP1) son funcionales y se pueden formar por dimerización de dímeros (Figura 49). Además dado que la P_f observada para la expresión del hetero-dímero no es significativamente distinta a la hallada por co-expresión de monómeros de PIP1 y PIP2, estos resultados podrían corresponderse con distintos escenarios posibles, es decir, ante igual cantidad de moléculas PIP1 y PIP2 en la célula puede ocurrir que: i- la única especie que se forme sea la de estequiometría 2:2; ii- se forme preferencialmente la especie 2:2, y las especies 1:3, 3:1 y los homo-tetrámeros de PIP2 se formen en baja cantidad, y por lo tanto detectamos en forma preferencial la actividad de la especie con estequiometría 2:2; iii- se formen todas las especies hetero-tetraméricas posibles (2:2, 1:3 y 3:1), los homo-tetrámeros de PIP2 en baja cantidad, y todas las especies hetero-tetraméricas presenten similar capacidad para el transporte de agua, o iv- se formen todas las especies hetero-tetraméricas posibles (2:2, 1:3 y 3:1), no se formen especies homo-tetraméricas, y todas las especies hetero-tetraméricas presenten similar capacidad para el transporte de agua.

Análisis de la regulación por acidificación intracelular de la actividad de hetero- terámeros PIP2-PIP1 con estequiometría 2:2

La dependencia de la P_f con el pH_{int} del oocito para la co-expresión de PIP2 con PIP1 y para la expresión de PIP2 sola ya fue estudiada y descrita previamente (Bellati et al., 2010). Los resultados experimentales muestran que la inhibición media de la P_f ante acidificación intracelular ($pH_{0.5}$) ocurre a pHs más ácidos cuando PIP2 está expresada sola en la membrana de oocitos, respecto a la co-expresión de PIP2 junto a PIP1 (Bellati et al., 2010). Sin embargo, en estos experimentos se desconocía la composición de las especies tetraméricas presentes en membrana plasmática. Por tanto, estudiamos la regulación por acidificación intracelular de un hetero-tetrámero PIP2-PIP1 de estequiometría conocida (estequiometría 2:2) inyectando el ARNc del hetero-dímero en los oocitos. Comparamos las curvas dosis respuesta de permeabilidad osmótica (P_f) en función de distintos pHs intracelulares para la expresión del hetero-dímero con respecto a la observada para la co-expresión de monómeros de PIP1 y PIP2 o para la expresión de monómeros de PIP2 (Figura 50). La curva dosis-respuesta de P_f en función del pH_{int} de la membrana de los oocitos que expresan el hetero-dímero mostró un perfil de inhibición sigmoideo ante acidificación intracelular muy similar al observado para la curva dosis-respuesta de P_f en función del pH de oocitos que co-expresan ambas acuaporinas. Nuestros resultados muestran que la P_f máxima=

$(217.09 \pm 21.16) 10^{-4} \text{ cm s}^{-1}$ (media \pm SEM, n= 5) y el $pH_{0.5} = 6.79 \pm 0.01$ (media \pm SEM, n= 5), no son significativamente distintos de los parámetros observados para los oocitos que co-expresan PIP2 y PIP1 [P_f máxima= $206.65 \pm 31.82) 10^{-4} \text{ cm s}^{-1}$; $pH_{0.5} = 6.80 \pm 0.01$ (media \pm SEM, n= 5)] ($p > 0.05$). En el caso del homo-tetrámero de PIP2, el $pH_{0.5}$ resultó equivalente a 6.43 ± 0.01 (media \pm SEM, n= 3) y la P_f máxima= $(100.12 \pm 8.59) 10^{-4} \text{ cm s}^{-1}$ (media \pm SEM, n= 3).

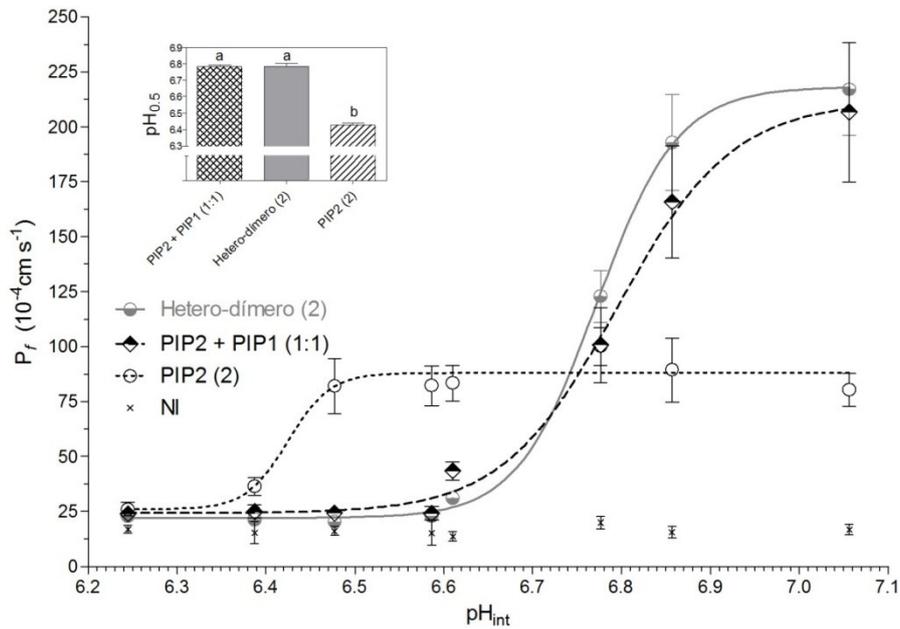


Figura 50: Dependencia de la P_f con el pH_{int} de oocitos que co-expresan PIP1 y PIP2, o que expresan únicamente el hetero-dímero PIP2-PIP1 o el monómero de PIP2.

Después de la acidificación citosólica, se evaluó la P_f de la membrana de los oocitos que expresan el hetero-dímero (línea continua) o co-expresan PIP2 con PIP1 (línea discontinua) en una proporción de masa 1:1 o que expresan únicamente PIP2. La figura muestra valores representativos obtenidos a partir del mismo lote de oocitos (P_f media \pm SEM). La cantidad de ARNc se muestra entre paréntesis, siendo (2) equivalente a 2,5 ng de ARNc por oocito y (1) equivalente a la mitad de dicha masa; por tanto los oocitos fueron co-inyectados con 1,25 ng de un ARNc más 1,25 ng de otro ARNc. El recuadro interior muestra los valores $pH_{0.5}$ (pH al cual ocurre la inhibición media de la P_f) reportados como el promedio de tres a cinco experimentos independientes ($pH_{0.5} \pm$ SEM, $n = 3-5$) para cada tratamiento, 12-16 oocitos fueron ensayados para cada condición. La expresión de los hetero-dímeros muestra una respuesta al pH_{int} diferente en comparación al observado para los oocitos que expresan únicamente PIP2, pero no en comparación con los oocitos que co-expresan monómeros de PIP2 con monómeros de PIP1 en una relación de masa (1:1) ($p < 0,0001$). Letras diferentes indican significancia entre barras ($p < 0,0001$). NI corresponde a oocitos no inyectados (control negativo).

Estos resultados nos permiten concluir que la transición entre el estado abierto y el estado cerrado para los homo-tetrámeros de PIP2 ocurre a una mayor concentración de protones, respecto a la transición del hetero-tetrámero PIP2-PIP1 de estequiometría 2:2. Asimismo, los oocitos que solo expresan PIP2 presentan una permeabilidad osmótica moderada respecto a la permeabilidad osmótica observada para oocitos que co-expresan PIP1 y PIP2. Esta diferencia en las permeabilidades osmóticas observadas pueden explicarse teniendo en cuenta los resultados de Yaneff y colaboradores (2014), quienes aplicando un modelo matemático concluyen que cuando PIP1 y PIP2 se encuentran en membrana plasmática, PIP1 es capaz de transportar agua eficientemente y PIP2 aumenta su capacidad intrínseca de transporte de agua.

Los resultados aquí presentados constituyen la primera caracterización de la regulación por acidificación intracelular de una especie hetero-tetramérica única de estequiometría 2:2. Interesantemente, ante igual cantidad de moléculas PIP1 y PIP2 en la célula, las posibles especies tetraméricas que se forman en membrana plasmática otorgan a dicha membrana una regulación del transporte de agua por acidificación intracelular similar a la observada para el hetero-tetramero formado por dos moléculas de PIP2 más dos moléculas de PIP1.

Análisis funcional de la actividad de hetero-tetrameros con estequiometrías 1:3 y 3:1 Si se co-inyecta el ARNc del hetero-dímero junto con el ARNc de PIP2 o PIP1 es de esperar que, en caso de ser posible, se formen diferentes arreglos hetero-tetraméricos que incluyan no solo la estequiometría 2:2 sino también, las estequiometrías 3:1 y 1:3 (Figura 46). Por supuesto también pueden formarse los homo-tetrameros de PIP2 y PIP1, siendo sólo el homo-tetramero de PIP2 el que se localiza en membrana plasmática, ya que, como mostramos anteriormente, el homo-tetramero de PIP1 queda retenido en el interior celular (Figura 27). Por lo tanto, se procedió a co-inyectar el ARNc del hetero-dímero junto con el ARNc de los monómeros de PIP1 o PIP2 con el fin de evidenciar si hetero-tetrameros de PIP2 y PIP1 con estequiometrías variables son capaces de formarse (Figura 51). Por co-inyección del hetero-dímero con PIP2 se podrían formar tres especies tetraméricas: el homo-tetramero de PIP2, el hetero-tetramero de estequiometría 3:1 y el hetero-tetramero de estequiometría 2:2; mientras que por co-inyección del hetero-dímero con PIP1 se podrían formar las especies hetero-tetraméricas de estequiometría 2:2, 1:3 y el homo-tetramero de PIP1.

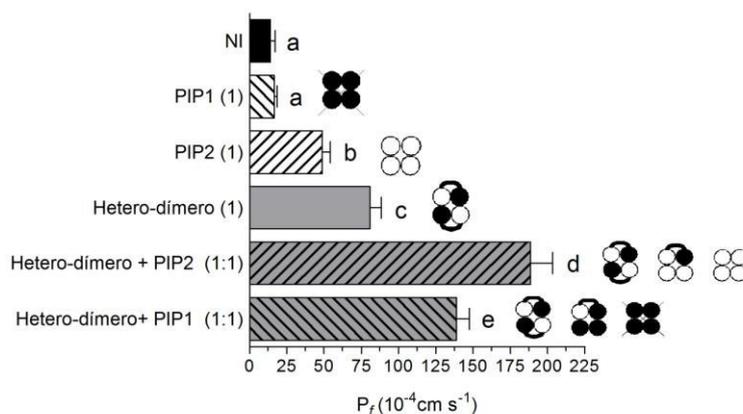


Figura 51: Permeabilidad osmótica al agua de membranas de oocitos que co-expresan el heterodímero y monómeros de PIP2 o PIP1.

Se muestran los resultados de actividad biológica de las membranas de oocitos inyectados con diferentes cantidades de ARNc que codifican para PIP1, PIP2, el hetero-dímero y el hetero-dímero más monómeros PIP1 o PIP2 en una relación de masa 1:1. La cantidad de ARNc se muestra entre paréntesis siendo (1) equivalente a 1,25 ng de ARNc por oocito. Los oocitos que expresan el hetero-dímero en una cantidad de masa (1) muestran una P_f significativamente diferente de la que se observa en oocitos que expresan únicamente PIP2 en una cantidad de masa (1). La co-expresión del hetero-dímero con monómeros de PIP2 o PIP1 en una proporción de masa 1:1 no promueve el mismo aumento en la permeabilidad al agua de la membrana ($p < 0,05$). NI: oocitos no inyectados utilizados como controles negativos. Los resultados se expresan como media $P_f \pm \text{SEM}$; $n = 4$ experimentos independientes, 14-18 oocitos fueron ensayados para cada

condición. Letras a, b, c, d, e indican valores significativamente diferentes ($p < 0.05$). A la derecha de cada barra se muestran en forma esquemática los posibles arreglos tetraméricos formados por inyección o co-inyección de cada ARNc.

En la Figura 51 se observa que la co-expresión del hetero-dímero con monómeros de PIP2 o monómeros de PIP1, promueve en las membranas que los co-expresan una P_f significativamente distinta a la que se observa para la membrana de los oocitos que solo fueron inyectados con el ARNc del hetero-dímero ($p < 0.05$). Dado que la cantidad de ARNc del hetero-dímero inyectado en ambos casos es idéntica, la diferencia observada en la P_f sugiere la presencia de otras especies moleculares en membrana plasmática, además de la especie tetramérica de estequiometría 2:2.

Si se compara la P_f de las membranas de los oocitos que co-expresan el hetero-dímero con PIP1, con la correspondiente a la de oocitos que solo expresan el hetero-dímero en la misma cantidad de masa, la diferencia significativa hallada es una fuerte evidencia a favor de la existencia de heterotetrameros con estequiometría 1:3, dado que el homo-tetramero de PIP1 no puede aportar a la permeabilidad al agua de la membrana plasmática (debido a su localización intracelular).

En el caso de los oocitos que co-expresan el hetero-dímero más PIP2, la observación acerca de la existencia del hetero-tetramero con estequiometría 3:1 no es tan directa, ya que en este caso el homo-tetramero de PIP2 es capaz de localizarse en membrana plasmática y por lo tanto contribuye a la P_f total de la membrana.

En conjunto, estos resultados permiten concluir que la estequiometría 1:3 (heterotetramero formado por 1 monómero de PIP2 y 3 monómeros de PIP1) es capaz de formarse, mientras que la 3:1 es posible (hetero-tetramero formado por 3 monómeros de PIP2 y 1 monómero de PIP1) (Figura 51).

Para continuar con la caracterización de las distintas especies hetero-tetraméricas que podrían encontrarse en membrana plasmática, analizamos la permeabilidad al agua a diferentes valores de pH_{int} de oocitos que expresan el hetero-dímero solo, o co-expresan el hetero-dímero junto con monómeros de PIP2 o monómeros de PIP1, en una relación de masa 1:1 (Figura 52). En concordancia con los resultados hallados previamente (Figura 51), la P_f máxima de las membranas de oocitos que co-expresan el hetero-dímero con PIP1 o el hetero-dímero con PIP2 fue significativamente distinta [P_f máxima = $(156.65 \pm 17.16) 10^{-4} \text{ cm s}^{-1}$ y P_f máxima = $(198.97 \pm 19.56) 10^{-4} \text{ cm s}^{-1}$, respectivamente; $n = 3$]; sin embargo la inhibición media de la P_f máxima no resultó significativamente distinta ($pH_{0.5} = 6.79 \pm 0.01$ y $pH_{0.5} = 6.75 \pm 0.01$, respectivamente; $n = 3$; $p < 0,05$). A su vez, este último parámetro no resultó distinto del observado para los oocitos que solo expresan el hetero-dímero ($pH_{0.5} = 6.79 \pm 0.01$; $n = 5$; $p < 0,05$).

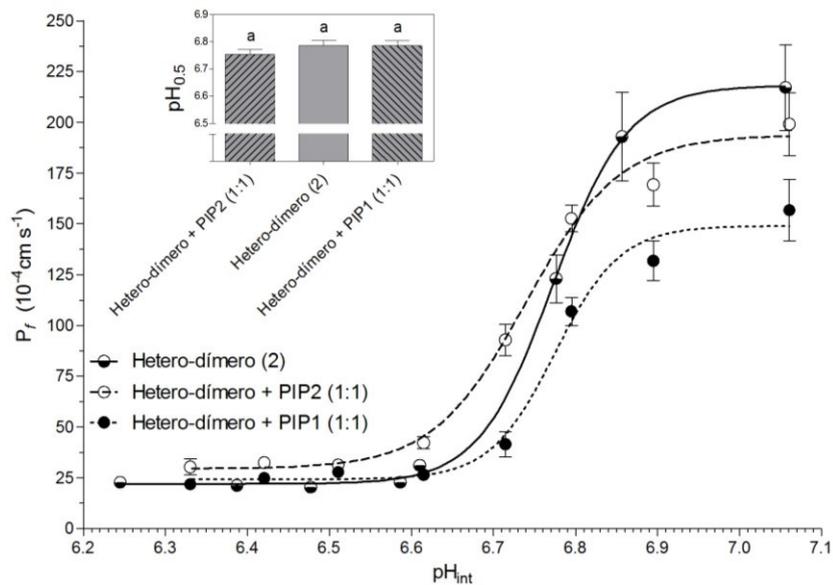


Figura 52: P_f en función del pH_{int} para oocitos co-inyectados con el ARNc de PIP1 o PIP2 y el hetero-dímero en una relación de masa 1:1.

Se estudió la dependencia de la P_f en función del pH interno para membranas plasmáticas de oocitos inyectados con el ARNc del hetero-dímero (línea continua) o co-inyectados con el ARNc del heterodímero más monómeros de PIP2 (círculos vacíos, línea discontinua) o monómeros de PIP1 (círculos llenos, línea discontinua), en una proporción de masa 1:1. Entre paréntesis se indica la cantidad de ARNc inyectada en cada oocito, siendo 1 equivalente a 2,5 ng de ARNc inyectado y la relación 1:1 equivalente a inyectar 2,5 ng de un ARNc + 2,5 ng de otro. Los datos se ajustaron a una curva dosis-respuesta sigmoidea utilizando el programa Graph Pad Prism (versión 3.02) y para cada condición se muestran los valores como P_f media \pm SEM, $n = 8-12$. El recuadro muestra los valores de $pH_{0.5}$ que resultaron del promedio de distintos experimentos independientes ($pH_{0.5} \pm$ SEM, $n = 3-5$). El $pH_{0.5}$ para las tres curvas no es significativamente distinto ($p < 0,05$) como se indica con la misma letra.

Analizando en conjunto los resultados de la co-expresión del hetero-dímero más PIP2, y teniendo en cuenta que: i- los homo-tetrámeros de PIP2 presentan baja P_f y un $pH_{0.5}$ desplazado hacia valores ácidos (Figura 50); ii- la P_f máxima y los valores de $pH_{0.5}$ para el hetero-dímero y para la co- expresión del hetero-dímero más PIP2 son iguales (Figura 52); y iii- la existencia de hetero-tetrámeros con estequiometría 3:1 es posible (heterotetrámero formado por 3 monómeros de PIP2 y 1 monomero de PIP1, Figura 51), estos resultados pueden estar reflejando que el homo-tetrámero de PIP2, si está presente, está en baja en cantidad y que las especies hetero-tetrámicas 2:2 y 3:1 presentan la misma actividad biológica en términos de P_f máxima e inhibición por acidificación intracelular.

Por otro lado, analizando los resultados de la co-expresión del hetero-dímero más PIP1 y teniendo en cuenta que: i- los homo-tetrámeros de PIP1 no se localizan en membrana plasmática, ii- los valores de $pH_{0.5}$ para el hetero-dímero y para la co-expresión del hetero-dímero más PIP1 no son significativamente distintos pero sí la P_f máxima, y iii- la estequiometría 1:3 (heterotetrámero formado por 1 monómero de PIP2 y 3 monomeros de PIP1) es capaz de formarse (Figura 51), estos

resultados sugieren que las especies hetero-tetrámicas 2:2 y 1:3 presentan la misma regulación de la inhibición del transporte de agua por acidificación intracelular.

Estudio de la localización de hetero-tetrámeros con estequiometrías 1:3 y 3:1

En base a los resultados anteriores, las diferencias halladas en las respuestas biológicas de los oocitos que co-expresan el hetero-dímero con PIP2 o con PIP1 en comparación con los oocitos que expresan el hetero-dímero solo, sugieren la presencia de especies moleculares con estequiometría 1:3 y 3:1, además de la 2:2, en membrana plasmática. Además, basándonos en las diferentes P_f máximas encontradas para oocitos que co-expresan el hetero-dímero con PIP2 o co-expresan el hetero-dímero con PIP1, hipotetizamos que dichas respuestas pueden ser explicadas teniendo en cuenta la localización de los homo-tetrámeros de PIP1 y PIP2. Estos homo-tetrámeros pueden estar ausentes o presentes en la membrana plasmática (Figura 27), contribuyendo así al aumento o disminución de la permeabilidad al agua de las membranas, respectivamente. Para poner a prueba estas hipótesis se co-inyectaron oocitos con el ARNc del hetero-dímero junto a monómeros de PIP1 o PIP2 fusionados a proteínas fluorescentes, y se tomaron imágenes en el microscopio confocal de fluorescencia. Previamente, se investigó si la fusión de PIP1 y PIP2 a proteínas fluorescentes modificaba las propiedades funcionales halladas para la co-expresión del hetero-dímero con dichas proteínas *wild type* (Figura 53).

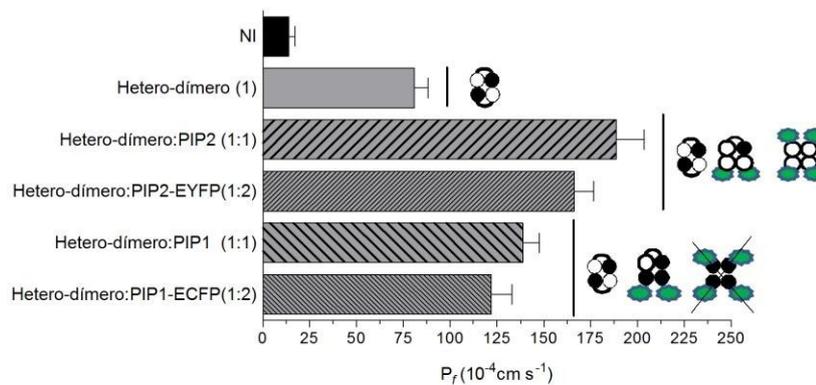


Figura 53: Permeabilidad osmótica (P_f) de membranas de oocitos co-inyectados con el ARNc del hetero-dímero y PIP1 o PIP2 fusionadas a proteínas fluorescentes.

La co-expresión del hetero-dímero con monómeros de PIP2-EYFP mostró que la actividad de transporte de agua es similar a la de la correspondiente co-expresión del hetero-dímero con monómeros de PIP2 *wild type*; el mismo resultado fue observado para la co-expresión del hetero-dímero con monómeros de PIP1-ECFP respecto a la correspondiente co-expresión del hetero-dímero con monómeros de PIP1 *wild type*. La cantidad relativa de ARNc inyectado en cada oocito se muestra entre paréntesis, siendo (1) equivalente a la inyección de 2,5 ng de ARNc y (2) equivalente al doble de esa cantidad. NI corresponde a oocitos no inyectados. Los valores son representativos de cuatro experimentos independientes usando diferentes lotes de oocitos. Para cada condición, los valores medios se muestran como P_f media \pm SEM, $n = 7-10$ oocitos ensayados. A la derecha de cada barra se muestran en forma esquemática los posibles arreglos tetraméricos formados por inyección de cada ARNc. Las acuaporinas de tipo PIP2-EYFP se representan como esferas blancas unidas a marcas verdes, las de tipo PIP1-ECFP como esferas negras unidas a marcas verdes y los hetero-dímeros como una esfera blanca conectada a una esfera negra por medio de una línea curva. Los tetrámeros

tachados indican que dichos tetrámeros no se encuentran en la membrana plasmática.

La co-expresión del hetero-dímero con monómeros de PIP2-EYFP o PIP1-ECFP mostró una actividad de transporte de agua similar a la hallada ante las correspondientes co-expresiones del hetero-dímero con monómeros de PIP1 o PIP2 *wild type*, lo que indica que la fusión a proteínas fluorescentes no modifica la actividad de las proteínas ni su interacción funcional (Figura 53).

Posteriormente, analizamos la localización de las distintas especies hetero-tetraméricas, por co-expresión del hetero-dímero con monómeros de PIP2 o PIP1 fusionados a proteínas fluorescentes (Figura 54).

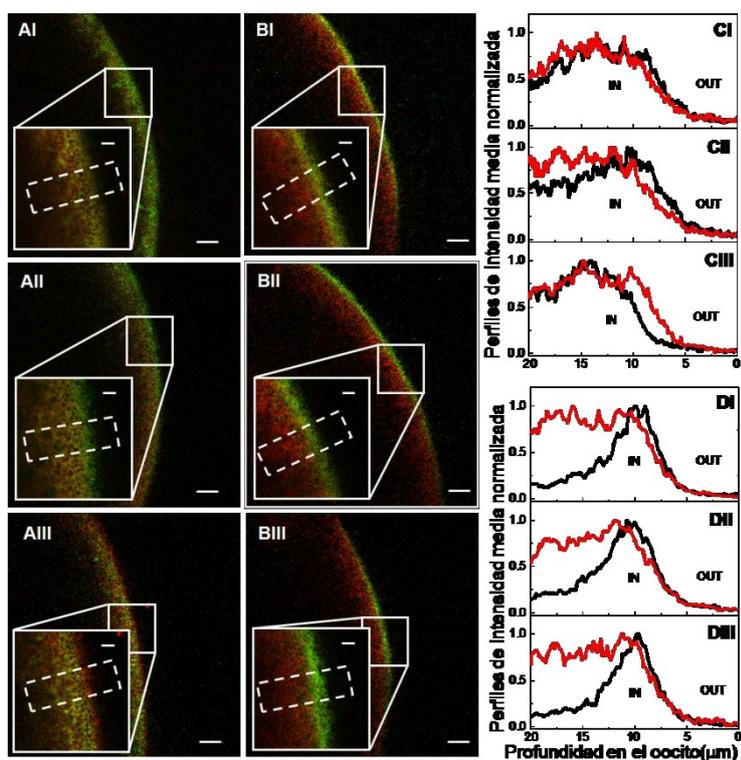


Figura 54: Localización de PIP1-ECFP y PIP2-EYFP por co-expresión con el heterodímero PIP2-PIP1.

(A) Imágenes confocales de oocitos que co-expresan el hetero-dímero con PIP1-ECFP en relación de masas 1:2 (AI) (verde) y 1:1 (AII) (verde) o expresan solamente PIP1-ECFP (AIII) (verde), inyectados previamente con TMR-Dextrano (rojo). (B) Imágenes confocales de oocitos que co-expresan el hetero-dímero con PIP2-EYFP en relación de masas 1:2 (BI) (verde) y 1:1 (BII) (verde) o solo expresan PIP2-EYFP (BIII) (verde), inyectados previamente con TMR-Dextrano (rojo). La superficie del oocito está hacia la derecha de cada cuadro, y el interior del oocito está a la izquierda. El recuadro muestra una ampliación de la sección cuadrada indicada en la imagen. Las barras en la imagen indican la escala: 20 μm en la imagen principal y 5 μm en la ampliación. (C-D) Se muestran los perfiles de intensidad de fluorescencia normalizados de las áreas seleccionadas (marcadas con rectángulos blancos en línea discontinua). Los paneles CI-CIII corresponden a los perfiles de intensidad de los paneles AI-AIII; los paneles DI-DIII corresponden a los perfiles de intensidad de los paneles BI-BIII, respectivamente. La línea de color negro corresponde a la señal de fluorescencia de ECFP o EYFP, y la línea roja a la señal del TMR-Dextrano. *IN/OUT* indican el interior y el exterior celular, respectivamente.

Como se reportó previamente, la localización de PIP1-ECFP coincide con la del marcador de interior celular TMR-Dextrano (Figura 54, AIII y CIII) y la localización de PIP2-EYFP se observa principalmente en el límite de la célula, es decir, en la membrana plasmática (Figura 54, BIII y DIII).

Por co-expresión del hetero-dímero con PIP1-ECFP pueden formarse tres especies tetraméricas distintas: la de estequiometría 2:2 (formada por dimerización del hetero-dímero, y que por tanto no puede visualizarse por fluorescencia), la de estequiometría 1:3 (que corresponde a la especie que contiene 1 molécula de PIP2 y 3 moléculas de PIP1 fusionadas a proteínas fluorescentes) y la de estequiometría 0:4 (que corresponde al homo-tetrámero de PIP1, compuesto 4 moléculas de PIP1-ECFP). Los resultados de las Figura 54, AI y AII (y CI y CII) indican que los oocitos que co-expresan el hetero-dímero con PIP1-ECFP (en distintas relaciones de masa) muestran una localización en el límite de la célula. Estos resultados son compatibles con la presencia de hetero-tetrámeros con estequiometría 1:3 en la membrana plasmática. A su vez se observa fluorescencia intracelular en ambos casos, lo que indica la presencia de homo-tetrámeros de PIP1 (Figura 54, AI y AII).

Por co-expresión del hetero-dímero con PIP2-EYFP también pueden formarse tres especies tetraméricas distintas: la de estequiometría 2:2 (formada por dimerización del hetero-dímero), la de estequiometría 3:1 (que corresponde a la especie que contiene 3 moléculas de PIP2 fusionadas a proteínas fluorescentes y 1 molécula de PIP1) y la de estequiometría 4:0 (que corresponde al homo-tetrámero de PIP2, compuesto 4 moléculas de PIP2-EYFP). Los resultados de las Figura 54, BI y BII (y DI y DII) indican que en el caso de los oocitos que co-expresan el hetero-dímero con PIP2-EYFP en distintas relaciones de masa, también se observa la fluorescencia mayormente en el límite de la célula, es decir en membrana plasmática, pero en este caso no se observa fluorescencia intracelular. Estos resultados son compatibles con la localización en membrana plasmática de hetero-tetrámeros con estequiometría 3:1 y homo-tetrámeros de PIP2.

Para analizar por una técnica independiente la presencia de todas las especies estequiométricas presentes al mismo tiempo en la membrana plasmática de la célula al co-expresar moléculas de PIP1 y PIP2, realizamos distintas variantes de electroforesis en gel y revelamos su presencia por fluorescencia (Figura 55). Esta aproximación experimental nos permite prescindir de anticuerpos específicos, a la vez que es altamente sensible y específica, ya que sólo aquellas proteínas *taggeadas* en el C-terminal que tengan un plegado adecuado presentan fluorescencia (Geertsma et al., 2008). Comparamos el patrón de bandas obtenido por co-expresión del hetero-dímero junto a monómeros PIP *versus* el patrón obtenido por co-expresión de monómeros de PIP1 y PIP2 (Figura 55).

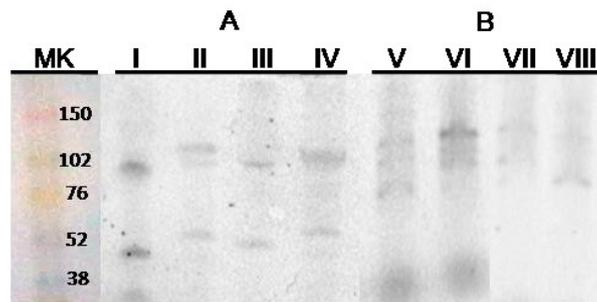


Figura 55: Electroforesis en gel de membranas de oocitos que expresan oligómeros PIP y posterior revelado por fluorescencia.

Se utilizaron geles Tris-Tricina en gradiente de 10-15% de acrilamida, para separar las proteínas de membrana de los oocitos y posteriormente se revelaron por detección de la fluorescencia en gel. A la izquierda se muestra el marcador de peso molecular (*Rainbow full-range molecular weight*, Amersham), que se utilizó como control de la separación de las proteínas en los geles y únicamente permitió asignar masa molecular a las bandas observadas en el gel A (bajo condiciones desnaturalizantes), pero no en el caso de las bandas observadas en el gel B (bajo condiciones de bajo contenido de SDS). (A) Corresponde al patrón de separación de las acuaporinas obtenido bajo condiciones de desnaturalización (calles I-IV). Se muestran las membranas aisladas de oocitos co-expresando el hetero-dímero más PIP1-ECFP (calle I), el heterodímero más PIP2-EYFP (calle II), o expresando PIP1-ECFP (calle III) o PIP2-EYFP (calle IV). Todas las muestras en las calles I-IV se solubilizaron con buffer de siembra I (ver Materiales y Métodos, sección 5.4, *Detección de BvPIPs por fluorescencia en gel*). En estas condiciones, las PIP revelaron dos bandas principales correspondientes al tamaño esperado para los monómeros y dímeros, respectivamente. (B) Corresponde al patrón de separación de las acuaporinas observado bajo condiciones de bajo contenido de SDS (calles V-VIII). Se muestran las membranas aisladas de oocitos co-expresando el hetero-dímero más PIP1-ECFP (calle V), el hetero-dímero más PIP2-EYFP (calle VI), PIP1 con PIP2-EYFP (calle VII) o PIP2 con PIP1-ECFP (calle VIII). En este caso, las muestras de proteínas se solubilizaron con buffer de siembra II. Bajo estas condiciones, se observaron varias bandas correspondientes a diferentes formas hetero-oligoméricas de PIPs, que se ven tanto ante la co-expresión de los hetero-dímeros con PIP1-ECFP o PIP2-EYFP (calles V y VI, respectivamente), como ante la co-expresión de los monómeros de PIP2-EYFP junto a PIP1 (calle VII) o la co-expresión de PIP1-ECFP más PIP2 (calle VIII). Se muestran 2 geles representativos de 4 geles independientes corridos para cada condición (bajo condiciones desnaturalizantes y con bajo contenido de SDS).

Bajo condiciones desnaturalizantes (Figura 55, panel A) el patrón de bandas observado fue diferente del patrón obtenido bajo condiciones de bajo contenido de SDS (Figura 55, panel B). En el primer caso, las proteínas PIP revelaron dos bandas principales, con pesos moleculares de 49 y 100 KDa aproximadamente (calles I y III, panel A) y 57 y 103 KDa (calles II y IV, panel B), correspondientes al peso molecular esperado de los monómeros y dímeros de PIP1-ECFP y de PIP2-EYFP, respectivamente.

Por el contrario, varias bandas se observaron bajo condiciones de bajo contenido de SDS (Figura 55, panel B) para las membranas aisladas de oocitos que co-expresaron el hetero-dímero con PIP1-ECFP o que co-expresaron el hetero-dímero con PIP2-EYFP (calles V y VI, respectivamente, panel B). Este patrón de bandas es muy similar al hallado por co-expresión de los monómeros de PIP2-EYFP con PIP1 (calle VI *versus* calle VII, panel B) o por co-expresión de PIP1-ECFP con PIP2 (calle V *versus* calle VIII, panel B). Bajo estas condiciones no desnaturalizantes, la determinación de la masa molecular por comparación con marcadores moleculares no es posible porque la

movilidad electroforética no depende estrictamente del peso molecular, sino de la forma y carga de la proteína. Sin embargo, este mismo patrón de bandas encontrado en las diferentes co-expresiones (entre el hetero-dímero con monómeros, calles V y VI, o entre monómeros, calles VII y VIII) demuestra que las mismas especies hetero-tetraméricas pueden formarse entre monómeros de PIP1 y PIP2, más allá de la presencia del hetero-dímero forzado.

Los datos obtenidos de localización celular y de los análisis de fluorescencia en gel, en conjunto con los resultados funcionales (Figura 51), nos permiten descartar la existencia de una estequiometría fija para los tetrámeros mixtos compuestos por monómeros PIP1 y PIP2. Más aún, estos resultados indican que las distintas especies hetero-tetraméricas con estequiometría 2:2, 1:3 y 3:1 son todas especies activas para el transporte de agua, capaces de localizarse en membrana plasmática, de formarse por dimerización de dímeros o por co-expresión de monómeros, y presentan una similar respuesta ante la acidificación intracelular, siendo esta respuesta distinta a la observada para las especies homo-tetraméricas.

Estudio de la cooperatividad en la respuesta al pH_{int} ácido por co-inyección del hetero-dímero con monómeros PIP en distintas relaciones de masas

Con el objetivo de estudiar la cooperatividad en la respuesta al pH_{int} de hetero-tetrámeros PIP1-PIP2 con distintas estequiometrías, realizamos co-expresiones del ARNc del hetero-dímero y los monómeros de PIP1 y PIP2 en distintas relaciones de masa (Figura 56). De esta manera intentamos forzar la formación de una u otra especie tetramérica, ya que algunos reportes indican que la hetero-oligomerización *random* de proteínas de membrana puede depender del nivel de expresión relativa de las subunidades que los componen (Wang et al., 1998; Barrera et al., 2007; Stewart et al., 2012).

Para cada condición se analizaron 3 parámetros: la P_f máxima hallada, el pH_{0.5} (pH_{int} en el que se halla la mitad de la máxima P_f) y el coeficiente n (como medida del grado de cooperatividad de la unión de los protones a la proteína).

Para estudiar la cooperatividad en la respuesta al pH intracelular de los oocitos que co-expresan el hetero-dímero más monómeros de PIP1, se ensayó la co-inyección de ambos ARNc en tres relaciones de masa diferentes: con partes iguales de ambos ARNc, relación de masas 1:1 (corresponde a co-inyectar 2,5 ng de hetero-dímero más 2,5 ng de PIP1); con una parte del hetero-dímero y dos partes de monómero de PIP1, relación de masas 1:2 (corresponde a inyectar 2,5 ng de hetero-dímero más 5 ng de PIP1); y con una parte de hetero-dímero más cuatro partes de monómero de PIP1, relación de masas 0.5:2 (corresponde a inyectar 1,25 ng de hetero-dímero más 5 ng de PIP1) (Figura 56). Además se estudió la cooperatividad en la respuesta al pH_{int} de los oocitos que expresan únicamente el hetero-dímero, con fines comparativos (Figura 56-B).

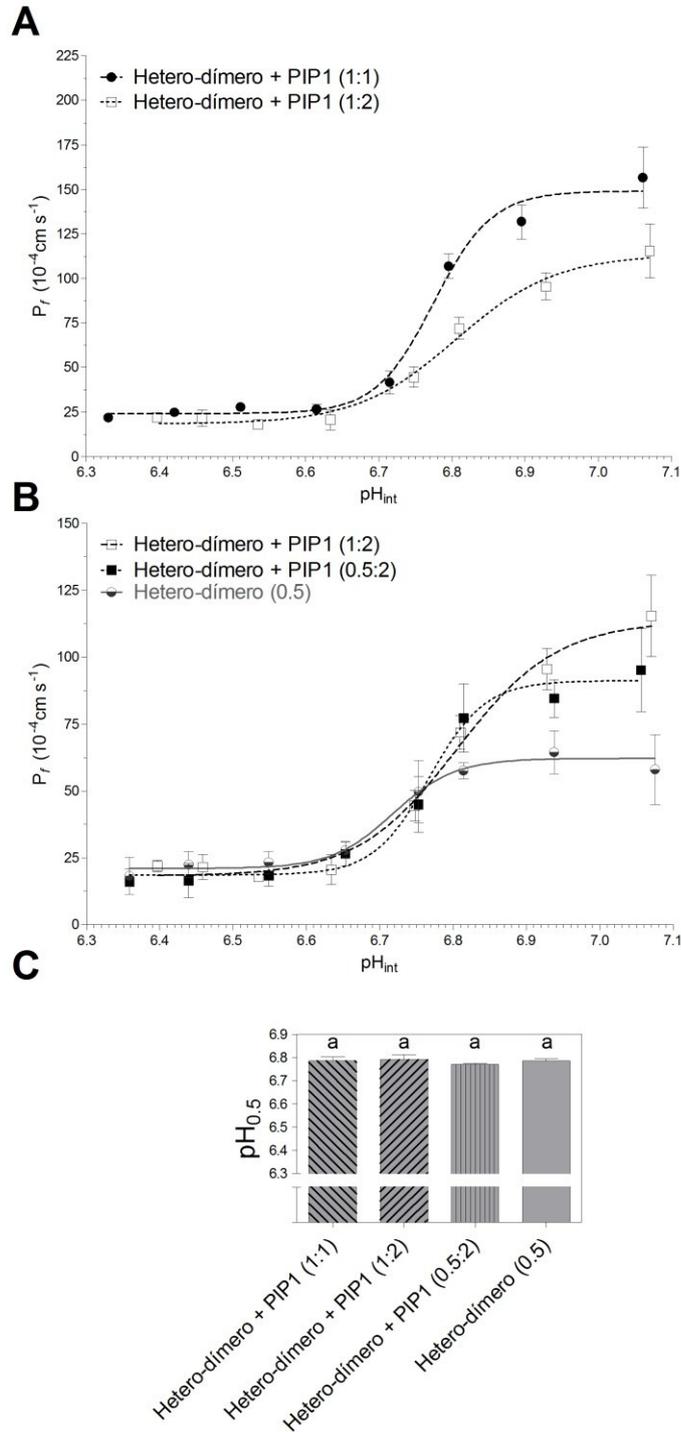


Figura 56: Dependencia de la P_f con la acidificación intracelular de oocitos que expresan el hetero-dímero y monómeros de PIP1 en diferentes relaciones de masa.

El comportamiento de la P_f después de la acidificación citosólica se ensayó en oocitos co-inyectados con el hetero-dímero junto a monómeros de PIP1 en relaciones de masa 1:1 (A), 1:2 (A-B) o 0.5:2 (B). En (B) se muestra también la curva dosis-respuesta de P_f en función del pH_{int} para oocitos que expresan el ARNc del hetero-dímero en baja cantidad de masa. Los valores medios se muestran como media $P_f \pm \text{SEM}$, $n = 8-15$. Entre paréntesis se indica la cantidad de ARNc inyectada en cada oocito, siendo 0.5 equivalente a 1,25 ng de ARNc inyectado, 1 equivalente a 2,5 ng y 2 equivalente a 5 ng.

(C) Se muestran los datos de $\text{pH}_{0.5}$ para las tres relaciones de masa ensayadas (1:1, 1:2 y 0.5:2) y para el hetero-dímero expresado solo, $n = 3-5$ experimentos independientes para cada condición de relación de masas usando diferentes lotes de oocitos. Los datos de $\text{pH}_{0.5}$ no son significativamente diferentes entre sí ($p > 0,05$) como se indica con la misma letra.

La Figura 56-A muestra la co-expresión del hetero-dímero con PIP1 en dos relaciones de masas distintas (1:1 y 1:2). Los resultados indican que cuando la cantidad de PIP1 inyectada es superior respecto a la cantidad de hetero-dímero co-inyectada en la célula (relación de masas 1:2 *versus* relación de masas 1:1), la Pf máxima disminuye pero el $pH_{0.5}$ se mantiene (6.79 ± 0.02 *versus* 6.79

± 0.01 , respectivamente, $p > 0,05$, $n = 3$ experimentos independientes para cada condición; Figura 56-C). Cuando la cantidad de ARNc inyectada del hetero-dímero fue cuatro veces menor respecto a la cantidad de ARNc de PIP1 inyectada (relación de masa 0.5:2), la Pf máxima fue menor a la observada para la co-expresión de ambos ARNc en relación de masas 1:2 (Figura 56-B), pero el $pH_{0.5}$ no varió (6.79 ± 0.02 *versus* 6.77 ± 0.01 , $p > 0,05$, $n = 3$ experimentos independientes para cada condición; Figura 56-C). A su vez, estos valores de inhibición media no son significativamente distintos de los hallados para la expresión del hetero-dímero solo ($pH_{0.5}$ hetero-dímero = 6.79 ± 0.01 , $n = 5$, $p > 0,05$; Figura 56-C). Es interesante señalar que en todos los experimentos realizados a partir de la co-inyección de diferentes relaciones de masas del ARNc de PIP1 más el ARNc del hetero-dímero, el valor del coeficiente n que se obtuvo fue de 6.

Estos resultados indican que los hetero-tetrámeros PIP2-PIP1 con estequiometría 2:2 y 1:3, presentan todos la misma cooperatividad en la respuesta por acidificación citosólica. Además, estos resultados son compatibles con la presencia de especies tetraméricas con mayor número de moléculas de PIP1 al aumentar la cantidad relativa de masa de ARNc de PIP1 inyectada en la célula, respecto a la cantidad de masa de ARNc del hetero-dímero co-inyectada. Dado que el homotetrámero de PIP1 no se localiza en membrana plasmática, su formación no repercute en un aumento de la permeabilidad osmótica de las membranas, por lo que la Pf máxima se hace cada vez menor (relación de masas 1:2 *versus* relación de masas 1:1 y relación de masas 0.5:2 *versus* relación de masas 1:2) y se acerca a la Pf observada para la expresión del hetero-dímero sólo (que únicamente puede formar el tetrámero con estequiometría 2:2) (Figura 56-B). Los resultados también muestran que aunque la Pf máxima disminuye, el $pH_{0.5}$ se mantiene constante en todas las co-inyecciones con diferentes relaciones de masa de ARNc ensayadas (Figura 56-C).

Para estudiar la cooperatividad en la respuesta al pH intracelular de los oocitos que co-expresan el hetero-dímero más monómeros de PIP2, se procedió de la misma manera, ensayando la co-inyección de ambos ARNc en tres relaciones de masa diferentes: con partes iguales de ambos ARNc, relación de masas 1:1 (corresponde a co-inyectar 2,5 ng de hetero-dímero más 2,5 ng de PIP2); con una parte del hetero-dímero y dos partes de monómero de PIP2, relación de masas 1:2 (corresponde a inyectar 2,5 ng de hetero-dímero más 5 ng de PIP2); y con una parte de hetero-dímero más cuatro partes de monómero de PIP2, relación de masas 0.5:2 (corresponde a inyectar 1,25 ng de hetero-dímero más 5 ng de PIP1) (Figura 57). Además se estudió la cooperatividad en la respuesta al pH_{int} de los oocitos que expresan únicamente PIP2 (Figura 57-B).

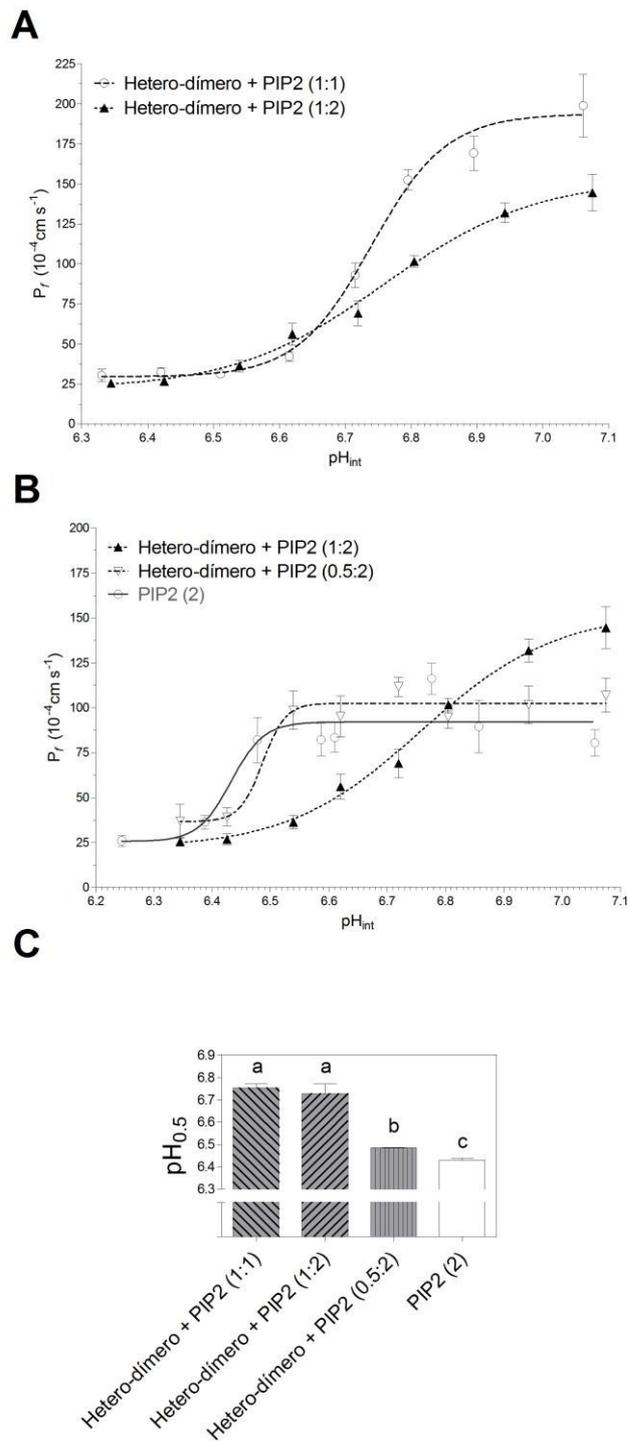


Figura 57: Dependencia de la P_f con la acidificación intracelular de oocitos que expresan el hetero-dímero y monómeros de PIP2 en diferentes relaciones de masa.

Curvas de P_f en función del pH_{int} de oocitos que co-expresan monómeros de PIP2 con el hetero-dímero en diferentes relaciones de masa: 1:1 (A), 1:2 (A-B) o 0.5:2 (B). En (B) también se muestra la curva de P_f en función del pH_{int} de los oocitos que expresan únicamente el monómero de PIP2. Los valores medios se muestran como media $P_f \pm SEM$, $n = 8-12$. Entre paréntesis se indica la cantidad de ARNc inyectada en cada oocito, siendo 0.5 equivalente a 1,25 ng de ARNc inyectado, 1 equivalente a 2,5 ng y 2 equivalente a 5 ng. (C) Se muestra la inhibición media, $pH_{0.5} \pm SEM$, para las tres relaciones de masa ensayadas (1:1, 1:2 y 0.5:2) y para PIP2 expresada sola, $n = 3-5$ experimentos independientes para cada condición; letras distintas indican que el $pH_{0.5}$ es significativamente diferente ($p < 0,05$).

En el caso de la co-expresión del hetero-dímero con PIP2, en relación de masas 1:2 y 1:1 (Figura 57-A), se observa que cuando la cantidad de ARNc de PIP2 inyectada es mayor que la masa de hetero-dímero co-inyectada (relación de masas 1:2 *versus* relación de masas 1:1), hay una disminución de la P_f máxima y el $pH_{0.5}$ se mantiene constante (6.73 ± 0.03 *versus* 6.75 ± 0.01 , respectivamente, $p > 0,05$, $n = 3$ experimentos independientes para cada condición; Figura 57-C). En la Figura 57-B se observan los resultados de la co-inyección de ARNc del hetero-dímero con una cantidad de masa de ARNc de PIP2 cuatro veces mayor (relación de masas 0.5:2). En este caso, el $pH_{0.5}$ hallado fue de 6.48 ± 0.01 (media \pm SEM, $n = 3$ experimentos independientes), significativamente distinto del obtenido para la co-expresión del hetero-dímero con PIP2 en relación de masas 1:2 ($pH_{0.5} = 6.73 \pm 0.03$, $p > 0,05$, $n = 3$ experimentos independientes; Figura 57-C). Además en la Figura 57-B se observa que la P_f máxima obtenida para la co-inyección de ARNc del hetero-dímero con una cantidad de masa de ARNc de PIP2 cuatro veces mayor (relación de masas 0.5:2) es muy similar a la hallada para la curva de PIP2 sola (inyectada en la misma cantidad de masa) pero los $pH_{0.5}$ de ambas curvas son significativamente distintos ($pH_{0.5}$ PIP2 = 6.43 ± 0.01 *versus* $pH_{0.5}$ (relación de masas 0.5:2) = 6.48 ± 0.01 , $p < 0,05$, $n = 3$ experimentos independientes; Figura 57-C). Respecto al valor del coeficiente n , el valor que se obtuvo fue de 6 cuando la cantidad de ARNc de PIP2 inyectada es igual a la masa de hetero-dímero co-inyectada (relación de masas 1:1) y fue de 3 cuando la cantidad de ARNc de PIP2 inyectada es superior a la masa de hetero-dímero co-inyectada (relación de masas 1:2 y 0.5:2). Por otro lado, el valor de n hallado para la expresión de PIP2 sola fue de 6.

Estos resultados son compatibles con una mayor presencia de homo-tetrámeros de PIP2 en la membrana plasmática cuando la cantidad de masa de ARNc de PIP2 inyectada es superior en relación con la cantidad de masa de ARNc del hetero-dímero co-inyectada (relación de masas 1:2 *versus* relación de masas 1:1 y relación de masas 0.5:2 *versus* relación de masa 1:2). Dado que los homo-tetrámeros de PIP2 otorgan una permeabilidad osmótica a las membranas moderada en comparación con la permeabilidad que otorgan los hetero-tetrámeros PIP1-PIP2, la P_f máxima disminuye (Figura 49). Esta observación es más clara cuando la diferencia entre las relaciones de masas co-inyectadas de PIP2 y hetero-dímero es más extrema (relación de masas 0.5:2), ya que la curva que se observa es muy similar a la obtenida por expresión de monómeros de PIP2 únicamente (Figura 57-B). Los resultados también muestran que el $pH_{0.5}$ se corre hacia pHs más ácidos cuando la cantidad de masa de ARNc de PIP2 inyectada es muy superior en relación con la cantidad de masa de ARNc del hetero-dímero co-inyectada en la célula (relación de masas 0.5:2 *versus* relación de masas 1:2) (Figura 56-C), y se acerca (aunque es significativamente distinto, $p < 0,05$) al $pH_{0.5}$ observado para la expresión de monómeros de PIP2 únicamente. A su vez, los valores de n hallados indican que la presencia de homo-tetrámeros de PIP2 en membrana plasmática lleva a una cooperatividad aparente más baja, en relación con la cooperatividad observada para la presencia de una especie hetero-tetramérica única de estequiometría 2:2,

probablemente debido a una mezcla de especies tetraméricas (homo-tetrámeros de PIP2 junto a hetero-tetrámeros) presentes en membrana plasmática.

Los resultados en conjunto muestran que el $pH_{0.5}$ y el coeficiente n para los hetero-dímeros expresados solos ($pH_{0.5} = 6,79 \pm 0,01$; $n = 6$) o los hetero-dímeros co-expresados con PIP1 o PIP2 en una relación de masas de ARNc 1:1 (Figura 56-A y Figura 57-A, respectivamente) no son diferentes; estos datos podrían ser consecuencia de que todas las configuraciones hetero-tetraméricas presentan la misma actividad biológica en términos de regulación de la inhibición del transporte de agua por acidificación intracelular (Figura 56-C y Figura 57-C) y cooperatividad en la respuesta ($n = 6$, en los tres casos). Además estos resultados refuerzan los resultados previos que indican que todas las estequiometrías son posibles (2:2, 1:3, 3:1) cuando PIP1 y PIP2 se hallan co-expresados, y señalan que la abundancia de estas especies tetraméricas en la célula es variable y dependiente del nivel de expresión relativa de los monómeros de PIP1 y PIP2.

Análisis de la co-evolución entre aminoácidos en las distintas familias de acuaporinas vegetales

Algunos reportes sugieren que los monómeros de proteínas que tienden a oligomerizar presentan una tasa de evolución más lenta respecto a otras proteínas, debido a la necesidad de las proteínas de evolucionar a una tasa similar a sus pares de interacción (Mintseris y Weng, 2005). Debido a que la medición de la tasa de co-evolución entre pares de aminoácidos y entre grupos de aminoácidos ha sido utilizada eficientemente para predecir interacciones entre proteínas (Lovell y Robertson, 2010) y dado que en la actualidad disponemos de un gran número de secuencias proteicas en bases de datos, analizamos la co-evolución entre pares de proteínas PIP1 y PIP2 correspondientes a 30 plantas, por análisis de co-evolución entre sus aminoácidos (Figura 58). Se utilizaron dos medidas específicas de co-evolución: la co-evolución entre pares de aminoácidos, calculada como el número de pares de aminoácidos que co-evolucionan en sitios específicos (Figura 58-A), y entre grupos de aminoácidos, que da cuenta de la posible interacción entre estos residuos de aminoácidos (Figura 58-B).

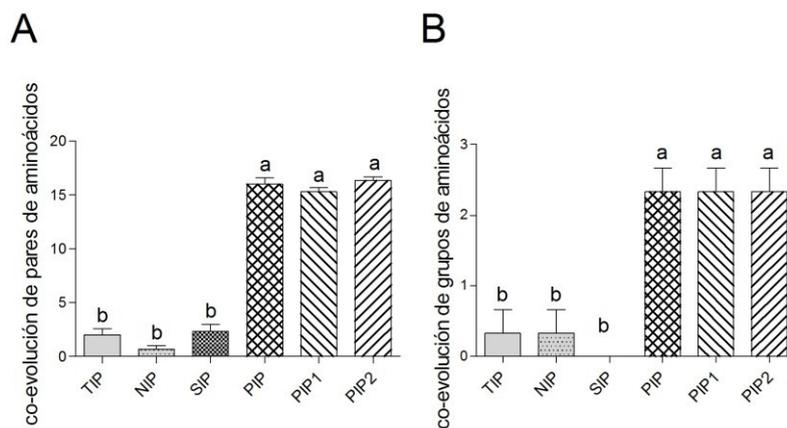


Figura 58: Análisis de co-evolución de las subfamilias de acuaporinas vegetales TIP, NIP, SIP y PIP.

Se analizó el nivel de co-evolución de aminoácidos de las subfamilias PIP (incluyendo PIP1 y PIP2), TIP, NIP, SIP, y de los grupos PIP1 y PIP2 en treinta genomas de plantas. (A) Número de pares significativos de aminoácidos que co-evolucionan. (B) Número de grupos de aminoácidos que co-evolucionan. Letras a, b indican valores significativamente diferentes ($p < 0,0001$) entre sí, determinados por un análisis ANOVA de un factor, seguido de test de Tukey.

Los resultados del análisis de co-evolución tanto a nivel de pares como a nivel de grupos de aminoácidos mostraron que la subfamilia PIP (incluyendo los subgrupos PIP1 y PIP2) tiene una alta tasa de co-evolución en comparación con las subfamilias TIP, NIP y SIP. Los grupos PIP1 y PIP2 presentaron un nivel de co-evolución tan alto como el de la subfamilia PIP completa, lo que sugiere una interacción íntima entre los grupos de proteínas PIP1 y PIP2 de distintas especies y dentro de estos grupos. Por lo tanto, no es esperable que existan restricciones en la estequiometría de especies hetero-tetraméricas formadas por proteínas PIP1 y PIP2.

Conclusiones

A través de diferentes enfoques experimentales (análisis de la permeabilidad osmótica, estudio de la inhibición del transporte de agua por acidificación intracelular, localización celular por microscopía de fluorescencia confocal y estudios de electroforesis en gel revelados por fluorescencia), demostramos que:

- A partir de la co-expresión de PIP1 y PIP2, todas las configuraciones hetero-tetraméricas posibles pueden formarse, es decir, los hetero-tetrámeros con estequiometría 3:1, 1:3 y 2:2 pueden existir en la membrana plasmática;
- La respuesta de la P_f al pH_{int} ácido para una especie hetero-tetramérica única con estequiometría 2:2 presenta un perfil sigmoideo y similar al hallado por co-expresión de monómeros individuales de PIP1 y PIP2, pero diferente al perfil funcional observado para el homo-tetrámero de PIP2;
- El ensamblado entre monómeros de PIP1 y PIP2 en los hetero-tetrámeros es flexible y dependiente de la cantidad de moléculas de PIP1 y PIP2 disponibles en la célula;
- Cuando cantidades similares de los monómeros de PIP1 y PIP2 están presentes en la célula se forman hetero-tetrámeros de estequiometría variable (2:2, 3:1 y 1:3), la inhibición del transporte de agua por acidificación intracelular ocurre a $pH_{int} \sim 7$ y la permeabilidad osmótica de la membrana es alta;
- Si un monómero PIP (PIP1 o PIP2) está en mayor cantidad en comparación con el otro, se ve favorecida la formación de hetero-tetrámeros con mayor número de moléculas del monómero en exceso (hetero-tetrámeros con estequiometrías 1:3 y 3:1, respectivamente);
- Cuando la cantidad de moléculas de un monómero es muy superior al número de moléculas del otro monómero, se forman preferentemente homo-tetrámeros: i- cuando el monómero en exceso es PIP2, se forman preferentemente homo-tetrámeros de PIP2, y en membrana se encontrarán estos homo-tetrámeros junto a algunos hetero-tetrámeros, ii- cuando el monómero en exceso es PIP1, se forman homo-tetrámeros de PIP1 que son retenidos intracelularmente, y en membrana se encontrarán algunos hetero-tetrámeros. En ambos casos la P_f de la membrana es moderada y la inhibición del transporte de agua por acidificación intracelular ocurre a $pH_{int} \sim 7$ (cuando el monómero en exceso es PIP1) o a $pH_{int} \sim 6.5$ (cuando el monómero en exceso es PIP2);
- Todas las configuraciones hetero-tetraméricas (hetero-tetrámeros de estequiometría 3:1, 1:3 y 2:2) presentan la misma cooperatividad;
- PIP1 y PIP2 presentan una alta tasa de co-evolución compatible con la estequiometría flexible que se evidencia entre estas proteínas.

Discusión

En 2004 se mostró por primera vez que las proteínas ZmPIP1;2 y ZmPIP2;5 eran capaces de interactuar funcionalmente (Fetter et al., 2004), aumentando la permeabilidad al agua de la membrana que co-expresa ambas AQP. Más tarde, se demostró que cuando ZmPIP1;2 se co-expresa junto con ZmPIP2;5, ZmPIP1;2 relocaliza a membrana plasmática (Zelazny et al., 2007). Estos resultados mostraron por primera vez que la interacción PIP1-PIP2 es necesaria para la correcta localización de PIP1 desde el interior celular a la membrana plasmática, y que dicha relocalización es consecuencia de una interacción física entre PIP1 y PIP2. Estos resultados abrieron un nuevo campo de estudio en el ámbito de las acuaporinas vegetales. En esta Tesis Doctoral se han abordado algunas de las preguntas que surgieron a partir del reconocimiento de que estos dos parálogos son capaces de interactuar.

Los resultados aquí presentados corresponden al estudio de tres acuaporinas pertenecientes a la subfamilia PIP: BvPIP1;1, BvPIP2;2 y BvPIP2;1 (números de acceso en Genbank: GQ227845, GQ227846, U60148, respectivamente). Estas tres PIP pertenecen a *Beta vulgaris* y presentan alta expresión en todos los tejidos y órganos. Debido a la alta identidad de secuencia (> 80 %) que presentan entre ellas, es posible que estas AQP puedan interactuar para formar arreglos hetero-oligoméricos, permitiendo así múltiples combinaciones moleculares y ampliando su espectro funcional. BvPIP2;2 y BvPIP2;1 no se comportan del mismo modo en cuanto a su interacción con BvPIP1;1: mientras BvPIP2;2 es capaz de relocalizar a BvPIP1;1 desde el interior celular hasta la membrana plasmática, aumentando así la permeabilidad osmótica de esta membrana y modificando la respuesta de la inhibición del transporte de agua por acidificación intracelular, BvPIP2;1 es incapaz de relocalizarla. La co-expresión de BvPIP2;1 y BvPIP1;1 no conlleva a un aumento de la permeabilidad osmótica de las membranas ni modifica el sentido de pH ácido interno, más allá de la respuesta observada para la expresión de BvPIP2;1 sola, a menos que la secuencia primaria de BvPIP2;1 sea modificada en el primer *loop* extracitoplasmático (*loop A*). Este *loop* tiene un papel clave en la interacción entre monómeros en un tetrámero y podría condicionar el ensamblado homo u hetero-oligomérico de las proteínas PIP.

En cuanto la interacción PIP1-PIP2, encontramos que BvPIP2;2 y BvPIP1;1 pueden interactuar para formar hetero-tetrámeros con estequiometrías variables dependiendo de la cantidad relativa de monómeros PIP1/PIP2 expresados en la célula. Todos los hetero-tetrámeros, independientemente de su estequiometría, son capaces de alcanzar la membrana plasmática y presentan la misma actividad biológica tanto para el transporte de agua como para el sentido cooperativo de pH_{int}. Sin embargo, los hetero-tetrámeros presentan una actividad diferente a la hallada tanto para homo-tetrámeros de BvPIP2;2 como de BvPIP2;1. Es interesante destacar que PIP1 y PIP2 presentan una alta tasa de co-evolución respecto a otras subfamilias de acuaporinas vegetales, lo que proporciona una explicación para la estequiometría aleatoria que encontramos entre las proteínas BvPIP1;1 y BvPIP2;2.

Interacción PIP1-PIP2: rol del *loop A*

Los resultados que encontramos para la co-expresión de BvPIP2;1 y BvPIP1;1 indican que la interacción PIP1-PIP2 no es una característica general de toda PIP2 y toda PIP1, sino que existen diferencias intrínsecas dentro de cada una de estas subfamilias que condicionan el ensamblado oligomérico y por ende su funcionalidad. Si bien no podemos generalizar, al menos para las PIP aquí estudiadas y considerando los resultados obtenidos del estudio de mutantes del *loop A* de BvPIP2;1, podemos decir que el *loop A* de las acuaporinas PIP2 resulta un elemento estructural clave en la interacción con PIP1. Más aún, la orientación de este *loop* hacia el centro del tetramero y los resultados de dinámica molecular, sugieren que los contactos entre PIP1 y PIP2 en un hetero-tetramero podrían ser mediados por este *loop* (Kukulski et al., 2005; Jozefkowicz et al., 2013 -resultados que son parte de esta tesis). En concordancia con estos resultados, fue demostrado por mutagénesis, que la cisteína altamente conservada hallada en el *loop A* de PIP2 de maíz tendría un rol importante en la estabilización de dímeros PIP estableciendo entre ellos puentes disulfuro (Bienert et al., 2012). Dímeros de PIP también fueron hallados previamente para *Beta vulgaris* (Barone et al., 1998), corroborando que no son artefactos sino que ocurren *in vivo* en las células vegetales. Nuestros resultados de dinámica molecular también sugieren que pueden formarse puentes disulfuro entre cisteínas de algunos monómeros en el homo-tetramero de BvPIP2;1. Sin embargo, la formación de estos puentes S-S no influenciaría ni en la correcta llegada de las PIPs a membrana plasmática, ni en su actividad, permeabilidad a sustratos, o formación de hetero-oligómeros (Bienert et al., 2012), descartándose así que sea este residuo de cisteína el responsable de la formación de hetero-oligómeros PIP1-PIP2.

En conjunto, nuestros resultados apuntan a la posibilidad de los *loop A* como mediadores del contacto entre monómeros, y su carga electrostática sería un elemento clave para que ocurra dicha interacción. La relevancia del *loop A* para la hetero-tetramerización, no descarta que existan otros elementos estructurales involucrados en la interacción PIP1-PIP2; por ejemplo, el *loop E* y ciertos motivos transmembrana han sido reportados como importantes en la estabilización y el ensamblado de hetero-oligómeros de AQP (Fetter et al., 2004; Duchesne et al., 2002; Murata et al., 2000; Mathai and Agre, 1999; Suga and Maeshima, 2004).

A pesar de que se ha encontrado que algunos pares de proteínas PIP1-PIP2 (incluidos BvPIP1;1 y BvPIP2;1) son incapaces de interactuar, muchos otros pares (incluidos BvPIP1;1 y BvPIP2;2) de distintas especies vegetales, han demostrado ser capaces de hacerlo en distintos sistemas de expresión tales como protoplastos, oocitos y levaduras (Zelazny et al., 2007; Temmei et al., 2005; Vandeleur et al., 2009; Bellati et al., 2010; Alleva et al., 2010; Otto et al., 2010; Bienert et al., 2012; Jozefkowicz et al., 2013; Yaneff et al., 2014), lo que indica que la regulación de esta interacción y el reconocimiento específico de los motivos y elementos estructurales que median la interacción entre estas proteínas son conservados.

¿Hetero-tetrámeros o hetero-oligómeros?

El estudio de los pares de proteínas PIP1-PIP2 capaces de interactuar física y funcionalmente fue llevado a cabo mediante el uso de diversas técnicas: co-expresión en sistemas heterólogos, transferencia de la energía de resonancia de Förster (FRET), complementación de la fluorescencia bimolecular (BiFC), inmuno-precipitación, entre otras. Sin embargo, estas técnicas no permiten discriminar la existencia de hetero-oligómeros (estructuras supramoleculares formadas por dos homo-tetrámeros de AQP capaces de interactuar) de la existencia de hetero-tetrámeros PIP1-PIP2 (hetero-tetrámeros formados por monómeros de distintos tipos de AQP), dado que las distancias necesarias para observar una interacción entre estas proteínas son compatibles con ambos tipos de arreglos proteicos. En consecuencia, los términos "hetero-oligómeros" y "hetero-tetrámeros" fueron utilizados en la literatura como sinónimos y hasta la obtención de los resultados experimentales que fueron presentados en la segunda parte de esta Tesis no había sido elucidada cuál de estas especies existía en las células que co-expresaban PIP1 y PIP2. Empleando como estrategia el uso de hetero-dímeros, pudimos comprobar por primera vez la existencia de hetero-tetrámeros PIP2-PIP1 con estequiometría 2:2, es decir formados por la presencia de dos monómeros de PIP2 y dos monómeros de PIP1. Estos arreglos hetero-tetraméricos presentan mayor permeabilidad al agua y sensado cooperativo de pH intracelular con un valor medio alcanzado a pH_{int} más alcalinos que los homo-tetrámeros de PIP2.

Además nuestros resultados indican que hetero-tetrámeros con estequiometrías variables (3:1 y 1:3) pueden co-existir en la membrana plasmática cuando ambos parálogos cumplen los requisitos estructurales que les permiten interactuar (como es el caso de BvPIP2;2 y BvPIP1;1) y se encuentran co-expresados en la misma célula. Del mismo modo que en el caso de las PIPs, existen reportes de otros canales con estequiometrías variables sin condicionamiento en el arreglo de las subunidades (Wang et al., 1998; Stewart et al., 2012; Bartoi et al., 2014). En forma similar a nuestros resultados, se ha reportado que la estequiometría de los receptores ionotrópicos P2X depende de los niveles de expresión relativa de las subunidades del receptor (Barrera et al., 2007). También, para los canales de potasio vegetales se ha evidenciado que distintos hetero-tetrámeros son plausibles: tanto la formación de tetrámeros compuestos por dos diferentes dímeros homoméricos (KAT1-KAT1 + KDC1-KDC1) como la relación estequiométrica 3KAT1-1KDC1 son funcionales (Naso et al., 2006). En cambio, en el caso de los canales de potasio animales formado por subunidades Kv2.1 y subunidades modulatorias Kv9.3 sabemos que presentan una estequiometría fija 3:1 y que dicha estequiometría es condicionante de su funcionalidad (Kerschensteiner et al., 2005). En muchos de los ejemplos mencionados resta comprender cómo es que las subunidades individuales de un canal multimérico interactúan entre sí para controlar la actividad de dicho canal, y por qué en algunos casos el ensamblado de las subunidades de los canales multiméricos es fija y en otros, variable. En este sentido, nuestros

resultados, focalizados en un tipo particular de canales, las acuaporinas, son un aporte a la comprensión general de los múltiples modos funcionales que presentan los arreglos multiméricos.

La expresión de monómeros PIP como condicionante de la formación de distintas especies tetraméricas

En el caso de las acuaporinas PIP no solo encontramos que todas las especies estequiométricas son funcionales, sino que además la hetero-tetramerización de PIP1 y PIP2 es dependiente de la cantidad de monómeros expresados. Cuando la cantidad de PIP1 o PIP2 es muy superior a la cantidad expresada del otro monómero en la célula, se forman preferentemente hetero-tetrámeros con mayor número de moléculas de PIP1 o PIP2 (hetero-tetrámeros con estequiometrías 1:3 y 3:1, respectivamente), hasta llegar al caso extremo en que la cantidad de moléculas de un monómero es muy superior al número de moléculas del otro monómero, y por lo tanto se forman preferentemente homo-tetrámeros. Cuando ocurre esto, y la relación PIP1/PIP2 es baja, por lo que se forman preferentemente homo-tetrámeros de PIP2, el $pH_{0.5}$ de la curva de permeabilidad osmótica en función de pH_{int} , se corre hacia pH_{int} más ácidos y la permeabilidad al agua de las membranas es moderada (debido a que los homo-tetrámeros de PIP2 presentan menor capacidad de transportar agua que los hetero-tetrámeros). Esto quiere decir, que en esta situación, los homo-tetrámeros de PIP2, a pH_{int} fisiológico, tienen alta probabilidad de encontrarse en estado abierto. En cambio, cuando la relación PIP1/PIP2 es alta y se forman preferentemente homo-tetrámeros de PIP1, la regulación de la inhibición del transporte de agua por acidificación intracelular se corre hacia pH_{int} más fisiológicos ($pH_{int} \sim 7$) y la permeabilidad osmótica de la membrana disminuye, como consecuencia de que los homo-tetrámeros de PIP1 formados no están localizados en dicha membrana y solo llegan a ésta algunos pocos hetero-tetrámeros. Por último, cuando la relación PIP1/PIP2 es ~ 1 , se forman preferentemente hetero-tetrámeros conteniendo dos moléculas de PIP1 y dos moléculas de PIP2 (estequiometría 2:2), aunque también se puede formar una cierta cantidad de hetero-tetrámeros con estequiometrías 1:3 y 3:1, y en menor medida homo-tetrámeros. En este caso el 50% de la inhibición del transporte de agua de la membrana ante acidificación intracelular ocurre a $pH_{int} \sim 7$ y la permeabilidad osmótica resultante de la membrana es alta.

Estos resultados están en concordancia con los reportes que indican que si bien en todos los tejidos estudiados hasta el momento para diferentes especies vegetales los genes que codifican para PIP1 y PIP2 son co-expresados, no hay un patrón de expresión homogéneo para todas las PIP (Gomes et al., 2009), tanto en condiciones fisiológicas como ante distintas condiciones de estrés. Por ejemplo, se observó que en raíz y en hoja de maíz, todos los genes de ZmPIP (excepto ZmPIP2;7) se expresan en forma dependiente al estado madurativo del tejido (Hachez et al., 2008). Asimismo, fue reportado que los cambios en los niveles de expresión de las PIPs acompaña las variaciones circadianas (Beaudette et al., 2007). También ante condiciones de

sequía, la transcripción de la mayoría de las acuaporinas de *Arabidopsis thaliana* se encuentra inhibida, excepto por el ARNm que codifica para la proteína AtPIP2;6 cuya expresión permanece constante, y las proteínas AtPIP1;4 y AtPIP2;5 cuya expresión se encuentra inducida (Alexandersson et al., 2010). Junto con todos estos datos sobre la expresión de genes de PIP1 y PIP2, algunos reportes muestran también cambios a nivel proteico, mediante cambios en las tasas de transcripción, de degradación y/o por cambios en la re-localización subcelular de estas proteínas (revisado en Hachez et al., 2006).

Nuestros resultados obtenidos en sistemas de expresión heterólogos en conjunto con los resultados de expresión de genes o proteínas PIP obtenidos en planta, permiten pensar en las variaciones de la expresión de monómeros PIP como un mecanismo condicionante de la formación de distintas especies homo u hetero-tetraméricas necesarias para una correcta adaptación de la planta a diferentes condiciones que requieran un ajustado manejo del transporte de agua.

Relevancia funcional de la existencia de tetrámeros con estequiometrías variables

Dado que las proteínas PIP se han localizado en órganos y tejidos vasculares de plantas que presentan grandes flujos de agua, por ejemplo, en raíces y células de la guarda -que delimitan los estomas- (Gomes et al. 2009), nuestros resultados indican que la hetero-tetramerización tiene gran relevancia funcional ya que puede: i- controlar la localización de las acuaporinas (por ejemplo, la llegada de PIP1 a membrana plasmática), ii- ajustar la permeabilidad osmótica al agua de las membranas según las necesidades de la célula, y iii- controlar la actividad de las especies tetraméricas ante distintos cambios del medio, como ser por ejemplo, el pH intracelular.

- A nivel de la localización de las PIPs (*trafficking*)

Respecto a los distintas señales que gobiernan la localización de las PIPs en distintas membranas celulares, se ha encontrado tanto para PIP2 de maíz como de *Arabidopsis*, que estas proteínas tienen secuencias diacídicas claves en el N-terminal (DxE) que les permiten abandonar el retículo endoplásmico (Zelazny et al., 2007; Sorieul et al., 2011), probablemente via reclusión de Sec24 e inducción de la formación de vesículas de clatrina COPII, que median el transporte anterógrado (revisado en Hachez et al., 2013). Estas secuencias diacídicas estarían ausentes en las PIP1, por lo cual los autores proponen que la hetero-tetramerización de ambos parálogos sería necesaria para que PIP1 alcance la membrana (Zelazny et al., 2009). Sin embargo, la importancia de este motivo no ha podido ser generalizado: no todas las acuaporinas que llegan a membrana tienen esta secuencia y otras que sí la poseen fallan en su localización a membrana. Por ejemplo, en nuestro caso encontramos que BvPIP2;1 carece de estas secuencias diacídicas y es capaz de localizarse en membrana plasmática, mientras que BvPIP2;2 sí la posee. En forma semejante a lo que ocurre con BvPIP2;1, ZmPIP2;1 y ZmPIP2;2 pueden alcanzar la membrana

plasmática en ausencia de dicho motivo (Zelazny et al., 2009). Esta situación aún no resuelta, dió lugar a que se haya hipotetizado en la literatura sobre la existencia de otras señales mediadoras, tanto de retención de PIP1 en RE como de exportación de PIP1 y de PIP2 hacia membrana plasmática (Zelazny et al., 2009; Chevalier et al., 2014). Siguiendo estas propuestas y dado que BvPIP1;1 no es capaz localizarse en membrana plasmática hasta tanto hetero-tetramerice con BvPIP2;2, nuestros resultados son compatibles con distintas hipótesis: i- la interacción PIP1-PIP2 induciría un cambio conformacional en PIP1 que vuelve accesible motivos de localización de PIP1 a la maquinaria de exportación, ii- las señales de retención en RE de PIP1 se ocultarían ante la interacción de PIP1 con PIP2, o iii- la interacción de PIP1 con PIP2 sería suficiente para asegurar la presencia de PIP1 en la membrana plasmática, incluso en ausencia de señales de exportación.

También se han descrito varias vías endocíticas capaces de influir en la redistribución de las PIP a nivel celular. Por ejemplo, en condiciones de estrés salino o cuando existe acumulación celular de H₂O₂, la endocitosis y exocitosis de AtPIP2;1 desde y hacia la membrana plasmática se incrementa significativamente (Martiniere et al., 2012; Luu et al., 2012; Wudick et al., 2015). Estos datos demuestran que las PIPs son constitutivamente sometidas a endocitosis y exocitosis. La endocitosis dependiente de clatrina es hasta el momento la principal vía endocítica descrita para las PIP2 (Dhonukshe et al., 2007). La interacción con SNAREs (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor*, en inglés) influencia en el *trafficking* a membrana plasmática y en la re-localización subcelular de las PIPs (Hachez et al., 2013; Chevalier et al., 2014). Estos mecanismos complejos y altamente regulados otorgan plasticidad en el control de la actividad de estos canales en respuesta a los rápidos cambios ambientales, y en este contexto, la modulación de la hetero-tetramerización *versus* la homo-tetramerización aparece como uno de los tantos mecanismos puestos en juego, que puede condicionar la localización de estos canales.

- **A nivel del transporte de agua y selectividad a sustratos de PIPs**

Dado que se ha demostrado que las proteínas PIP son capaces de transportar distintos tipos de solutos, no se puede descartar que la existencia de homo-tetrámeros PIP1 en el interior celular cumpla un rol biológico. La co-existencia de homo-tetrámeros de PIP1 en organelas intracelulares junto con la presencia de hetero-tetrámeros PIP1-PIP2 en membrana plasmática podría permitir mecanismos de transporte coordinados de distintos solutos y/o agua desde el apoplasto (exterior celular) hacia distintas organelas intracelulares. Esto a su vez permitiría el direccionamiento y/o la acumulación de solutos de importancia fisiológica y/o agua en distintos compartimentos intracelulares (mediado por PIPs o por las otras subfamilias de AQP vegetales) y podría disparar distintas cascadas de señalización. Por ejemplo, la localización dual reportada para NtAQP1 en tejidos nativos (membrana plasmática y membranas internas del cloroplasto) permitiría que las distintas membranas celulares presenten diferentes permeabilidades: al agua,

en la membrana plasmática (mediado por hetero-terámeros PIP1-PIP2) o al dióxido de carbono, en las membranas internas del cloroplasto (mediado por homo-tetrámeros de PIP1) (Uehlein et al., 2008). Más adelante se demostró, mediante la construcción de tetrámeros forzados de acuaporinas de esta proteína NtAQP1 y NtPIP2;1 puestas tándem, que la presencia de 1, 2, 3 o 4 moléculas de NtAQP1 en el tetrámero permite alcanzar en forma creciente una mayor permeabilidad de la membrana al dióxido de carbono (Otto et al., 2010). También para el transporte de peróxido de hidrógeno se ha demostrado que la co-expresión de ZmPIP2;5 y ZmPIP1;2 puede disminuir la permeabilidad de la membrana plasmática a este soluto, comparada con la permeabilidad observada por expresión de homo-tetrámeros de PIP2, dado que ZmPIP2;5, pero no ZmPIP1;2, es capaz de transportar H₂O₂ (Bienert et al., 2014). A su vez el transporte de distintos solutos podría desencadenar distintas respuestas celulares. Por ejemplo, en el caso de las PIPs se sabe que el H₂O₂ actúa como una molécula de señalización que desencadena la relocalización de PIP1 y PIP2 a distintos compartimientos intracelulares (Boursiac et al., 2008).

Respecto al transporte de agua, resultados obtenidos mediante modelado matemático, indican que la permeabilidad intrínseca de PIP2 al agua aumenta cuando interacciona con PIP1 (Yanef et al., 2013). Estos resultados son compatibles con nuestros hallazgos acerca de las variaciones de transporte de agua detectado en función del tipo de tetrámero PIP presente en membrana. Dado que algunas PIP2 son capaces de interactuar funcionalmente con PIP1 y otras no, variando las cantidades de los distintos parálogos PIP1 o PIP2 expresados y por ende la localización de las especies tetraméricas a las que dan lugar, la célula podría regular la permeabilidad de las distintas membranas celulares al agua (y a distintos solutos) en forma precisa.

- **A nivel de la apertura y cierre del canal (*gating*)**

Dado que la actividad de las acuaporinas PIP puede ser modulada por acidificación intracelular tanto en sistemas heterólogos como en sistemas nativos (Gerbeau et al., 2002; Tournaire-Roux et al., 2003; Alleva et al., 2006; Verdoucq et al., 2008), la existencia de distintas especies tetraméricas permitiría una regulación diferencial de la actividad de estos canales ante distintos pH_{int}. En este sentido, es interesante señalar que resultados previos indican que la permeabilidad al agua de células de raíz almacenadora de remolacha (*Beta vulgaris*) presentan una inhibición media a pH_{int} ~ 6,7 (Alleva et al., 2006, 2009). Sin embargo, cuando estudiamos a BvPIP2;2 o BvPIP2;1 en forma independiente en oocitos de *Xenopus*, hallamos que las inhibiciones medias ocurren a pH_{int} = 6,4 – 6,5. Esto significa que ninguna de las curvas halladas para PIP2 expresada sola en oocitos reproduce la respuesta de la membrana plasmática nativa. En otras palabras, el perfil de transporte de agua de las células a diferentes concentraciones de protones no puede explicarse por la expresión de un solo tipo de acuaporinas PIP en la membrana

plasmática. Sin embargo, la respuesta hallada para membranas nativas y para los oocitos que co-expresan BvPIP2;2 y BvPIP1;1 es comparable (pH0.5 para membrana nativas ~ 6,7 y pH0.5 para oocitos que co-expresan BvPIP2;2 y BvPIP1;1= 6,7 – 6,8). Asimismo, encontramos que la cooperatividad en la respuesta a pH_{int} para las distintas especies hetero-tetraméricas es similar. Estos datos son compatibles con la expresión en membranas nativas de más de un parólogo PIP. Por supuesto, no podemos descartar la presencia de otras PIP (no estudiadas aquí) en las células de la raíz almacenadora de *Beta vulgaris*, pero tanto nosotros como otros grupos de investigación encontramos que estas tres AQP presentan alta expresión en dichas células (Qi et al., 1995; Barone et al., 1998; Bellati et al., 2010).

Consideraciones finales

Analizando nuestros resultados en un contexto más amplio (esto es, considerando a las proteínas multiméricas en forma general) la estructura y afinidad de las interacciones proteína-proteína para formar hetero-oligómeros usualmente está relacionada con sus funciones biológicas; según Nooreen y Thorton, las interacciones entre proteínas evolucionan para optimizar su eficacia funcional (Nooren and Thornton, 2003). Se ha propuesto que las proteínas que se ensamblan en oligómeros tienden a evolucionar a un ritmo más lento que otras con el fin de mejorar la co-evolución de sus pares de interacción (Mintseris and Weng, 2005). La familia PIP ha experimentado muy pocos cambios en su tasa de evolución, y ni la divergencia en plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas ni los eventos de duplicación que acompañaron la evolución de las plantas con flores, han aumentado esta tasa para la mencionada subfamilia (Soto et al., 2012). En particular, nuestros resultados muestran que PIP1 y PIP2 presentan una alta tasa de co-evolución, dentro y entre los miembros de cada grupo, respecto a las otras subfamilias de acuaporinas vegetales TIP, NIP y SIP, lo que indicaría que existió una alta presión de selección sobre algunos miembros de PIP1 y PIP2, de manera de conservar la capacidad de interacción entre ellas.

Se ha propuesto que durante la evolución ocurrió una duplicación génica que dio lugar a los dos parálogos PIP1 y PIP2 (Chaumont et al., 2001; Forrest y Bhave, 2007). Dado que la mayoría de las duplicaciones génicas llevan a una redundancia funcional, la característica más común de los genes que sufren duplicación es la pérdida de uno de los parálogos (por ejemplo, PIP1) por acumulación de mutaciones deletéreas, lo que conduce a la pérdida de su funcionalidad (Otto, 2007). Para explicar la persistencia de ambos parálogos en ciertas familias de proteínas, se han propuesto algunos modelos que asumen la neo-funcionalización o sub-funcionalización de los mismos (Conant and Wolfe, 2008). Nuestros resultados experimentales y bioinformáticos, junto con otros reportes (Soto et al., 2012), apoyan un proceso de sub-funcionalización de la familia de proteínas PIP, en la cual dos parálogos que interactúan (por ejemplo, PIP1 y PIP2) son necesarios para mantener la función inicial. Este proceso proporciona una explicación no sólo

para la persistencia de ambos parálogos sino también para la estequiometría aleatoria que encontramos entre las proteínas PIP1 y PIP2 estudiadas (BvPIP2;2 y BvPIP1;1, respectivamente). Estos resultados pueden extenderse a otros pares de proteínas PIP1-PIP2, como los estudiados previamente por nuestro grupo (FaPIP2;1 y FaPIP1;1 de *Fragaria x ananassa*) (Alleva et al., 2010; Yaneff et al., 2013) y los estudiados por otros grupos, pertenecientes a *Nicotiana tabacum* y *Zea mays* (Otto et al., 2010; Fetter et al., 2004).

Sin duda, el curso que ha tomado la investigación sobre la oligomerización de acuaporinas vegetales en el que se enmarcan nuestros resultados, permiten dar un paso más allá de lo planteado por algunos investigadores en las instancias iniciales de trabajo en el área; la hipótesis en favor de una redundancia funcional para las acuaporinas de esta subfamilia ha quedado atrás. Es decir, tanto las diferentes PIP1 como las diferentes PIP2 que existen en cada especie pueden ser regulados diferencialmente en algunos casos o co-regulados en otros; pero en lugar de ocurrir una compensación fenotípica o redundancia funcional, es posible pensar en el ensamblado de los distintos miembros de esta familia ya sea en forma de homo u hetero-tetrámeros como un mecanismo de respuesta funcional en la respuesta a diferentes procesos fisiológicos o estreses.

Modelo

A partir de los resultados surgidos en esta Tesis Doctoral y considerando el contexto de los conocimientos actuales sobre la funcionalidad y las características estructurales de las acuaporinas de la subfamilia PIP, postulamos un modelo del rol que estos canales podrían tener en la célula vegetal (Figura 59).

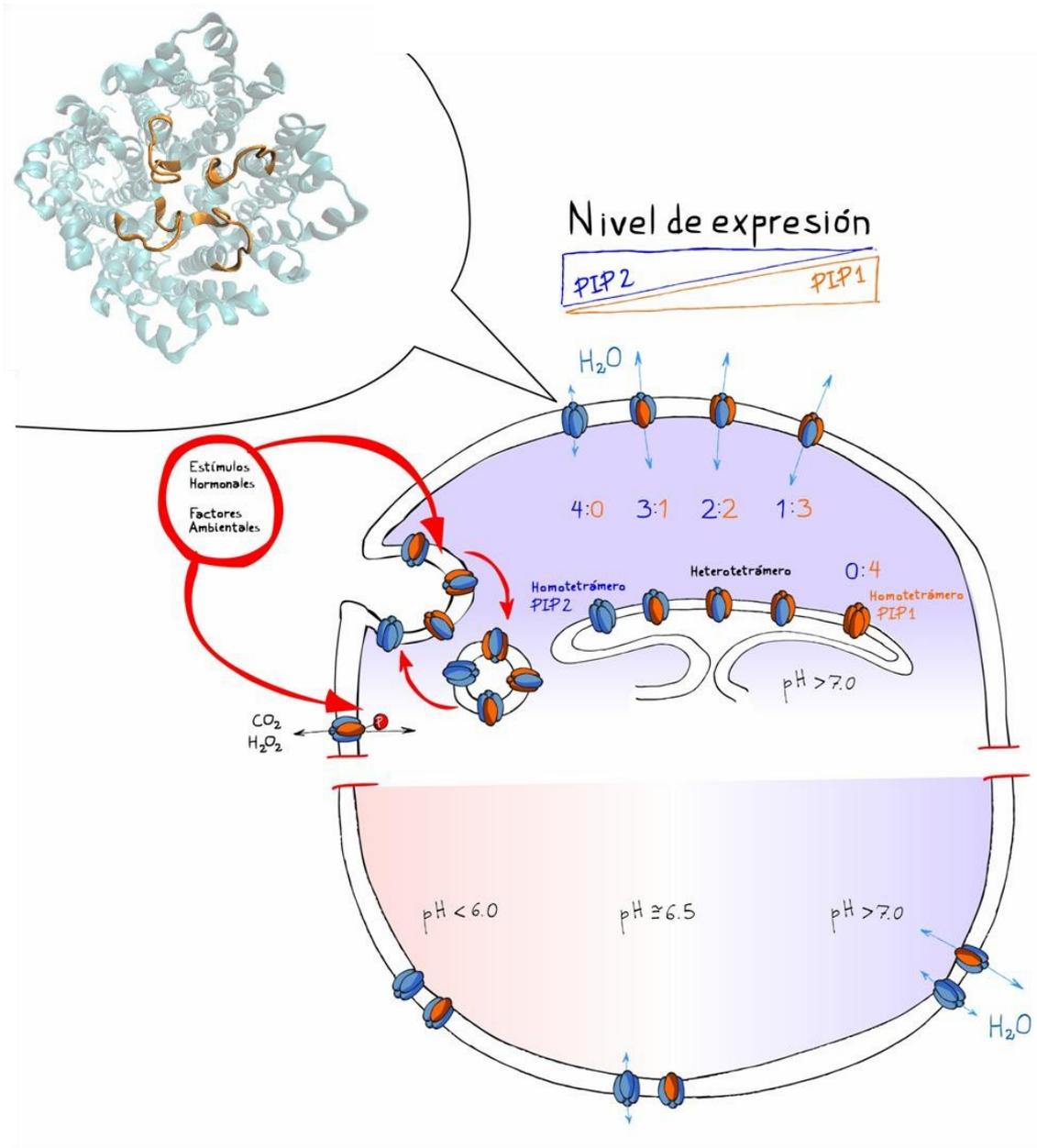


Figura 59: Modelo propuesto.

Se muestra un esquema de célula vegetal donde se expresan monómeros de PIP1 (en naranja) y monómeros de PIP2 (en azul) formando diferentes tetrámeros dependiendo de los niveles de expresión de cada uno. En la parte inferior del esquema la célula se encuentra a distintos pHs: < 6.0 , ~ 6.5 y > 7.0 ; en la parte superior del esquema la célula se encuentra a $pH > 7.0$. La capacidad de transportar agua de cada especie se indica con una flecha celeste. La capacidad de transportar otros solutos (como CO_2 o H_2O_2) se indica con una flecha negra.

Parte superior de la figura:

Cuando la cantidad de PIP2 es muy alta en relación con la cantidad de PIP1, se forman preferentemente homo-tetrámeros de PIP2 capaces de alcanzar la membrana plasmática y hetero-tetrámeros con estequiometrías variables (3:1, 2:2, y 1:3 en menor cantidad). En este caso la permeabilidad al agua de la membrana es moderada (debido a que los homo-tetrámeros de PIP2 presentan menor capacidad para el transporte de agua en comparación con los hetero-tetrámeros). En cambio, cuando la cantidad de PIP1 expresada es alta en relación con la cantidad de PIP2, se forman preferentemente homo-tetrámeros de PIP1 y la permeabilidad osmótica de la membrana disminuye, como consecuencia de que éstos homo-tetrámeros son retenidos intracelularmente y sólo llegan a la membrana plasmática algunos pocos hetero-tetrámeros. Cuando la cantidad de PIP1 y PIP2 expresada es similar, la permeabilidad osmótica resultante de la membrana es alta, y está dada principalmente por la presencia de hetero-tetrámeros conteniendo dos moléculas de PIP1 y dos moléculas de PIP2 (estequiometría 2:2), aunque también se puede formar una cierta cantidad de hetero-tetrámeros con estequiometrías 1:3 y 3:1, y en menor medida homo-tetrámeros. Así, variando las cantidades de los distintos parálogos PIP1 y PIP2 expresados, la célula puede regular: i- la permeabilidad de las membranas celulares al agua y a distintos solutos (como dióxido de carbono y peróxido de hidrógeno; solutos que han sido probados pueden ser transportados por PIPs), y ii- la localización de las distintas especies tetraméricas.

Dado que cada especie vegetal presenta una gran variedad de PIP1 y PIP2, otro punto de control estaría dado por la expresión de distintos tipos de cada uno de estos parálogos. Dado que no todas las PIP1 y todas las PIP2 son capaces de interactuar, la localización de PIP1 en membrana plasmática estaría condicionada por su interacción con ciertas PIP2. Dentro de los elementos estructurales que condicionan la interacción entre PIP1-PIP2, el *loop* A (indicado en color naranja en cada monómero del cuadro superior de la izquierda) es un elemento involucrado en la interacción entre monómeros en el tetrámero y por ende un posible controlador de la hetero u homo-tetramerización.

Por otro lado, distintos estímulos hormonales o factores ambientales pueden provocar la internalización de las PIPs mediado por vesículas o desencadenar cascadas de señalización que provoquen modificaciones post-traduccionales (como ser la fosforilación) de estos canales, lo que puede producir un cambio en su funcionalidad o localización.

Parte inferior de la figura:

A nivel de la apertura y cierre del canal, los cambios intracelulares de pH pueden regular diferencialmente la actividad de los canales PIP que se encuentran en membrana plasmática, ya sea en forma de homo u hetero-tetrámeros. A pHs intracelulares menores a 6.0, tanto los homo-tetrámeros de PIP2 como los hetero-tetrámeros se encuentran inhibidos en su actividad como canales transportadores de agua. A pHs intracelulares ~6.5 los homo-tetrámeros de PIP2 se encuentran en estado abierto y pueden transportar agua eficientemente, mientras que los hetero-tetrámeros se encuentran inhibidos. En esta situación la permeabilidad al agua de la membrana es moderada. A pHs intracelulares mayores a 7.0, tanto los homo- tetrámeros de PIP2 como los hetero-tetrámeros PIP1-PIP2 se encuentran en estado abierto y la permeabilidad al agua resultante de la membrana es alta.

Aclaración: En este esquema sólo se representan las acuaporinas vegetales pertenecientes a la subfamilia PIP, pero vale aclarar que en la célula vegetal también se encuentran otras subfamilias (como ser las NIPs, TIP, SIPs) que pueden mediar el transporte de agua y solutos en las distintas membranas celulares.

Bibliografía

- Agre, P., J.C. Mathai, B.L. Smith, and G.M. Preston. 1999. Functional analyses of aquaporin water channel proteins. *Methods Enzymol.* 294:550–72.
- Agre, P., G.M. Preston, B.L. Smith, J.S. Jung, S. Raina, C. Moon, W.B. Guggino, and S. Nielsen. 1993. Aquaporin CHIP: the archetypal molecular water channel. *Am. J. Physiol.* 265:F463–76.
- Alexandersson, E., J.A.H. Danielson, J. Råde, V.K. Moparathi, M. Fontes, P. Kjellbom, and U. Johanson. 2010. Transcriptional regulation of aquaporins in accessions of *Arabidopsis* in response to drought stress. *Plant J.* 61:650–60. doi:10.1111/j.1365-313X.2009.04087.x.
- Alexandersson, E., L. Fraysse, S. Sjövall-Larsen, S. Gustavsson, M. Fellert, M. Karlsson, U. Johanson, and P. Kjellbom. 2005. Whole Gene Family Expression and Drought Stress Regulation of Aquaporins. *Plant Mol. Biol.* 59:469–484. doi:10.1007/s11103-005-0352-1.
- Alleva, K., O. Chara, and G. Amodeo. 2012. Aquaporins: another piece in the osmotic puzzle. *FEBS Lett.* 586:2991–9. doi:10.1016/j.febslet.2012.06.013.
- Alleva, K., O. Chara, M.R. Sutka, and G. Amodeo. 2009. Analysis of the source of heterogeneity in the osmotic response of plant membrane vesicles. *Eur. Biophys. J.* 38:175–84. doi:10.1007/s00249-008-0365-1.
- Alleva, K., M. Marquez, N. Villarreal, P. Mut, C. Bustamante, J. Bellati, G. Martínez, M. Civello, and G. Amodeo. 2010. Cloning, functional characterization, and co-expression studies of a novel aquaporin (FaPIP2;1) of strawberry fruit. *J. Exp. Bot.* 61:3935–3945. doi:10.1093/jxb/erq210.
- Alleva, K., C.M. Niemietz, M. Sutka, C. Maurel, M. Parisi, S.D. Tyerman, and G. Amodeo. 2006. Plasma membrane of *Beta vulgaris* storage root shows high water channel activity regulated by cytoplasmic pH and a dual range of calcium concentrations. *J. Exp. Bot.* 57:609–621. doi:10.1093/jxb/erj046.
- Amezcu-Romero, J.C., O. Pantoja, and R. Vera-Estrella. 2010. Ser123 is essential for the water channel activity of McPIP2;1 from *Mesembryanthemum crystallinum*. *J. Biol. Chem.* 285:16739–16747. doi:10.1074/jbc.M109.053850.
- Anderberg, H.I., P. Kjellbom, and U. Johanson. 2012. Annotation of *Selaginella moellendorffii* Major Intrinsic Proteins and the Evolution of the Protein Family in Terrestrial Plants. *Front. Plant Sci.* 3:33. doi:10.3389/fpls.2012.00033.
- Arnold, K., L. Bordoli, J. Kopp, and T. Schwede. 2006. The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics.* 22:195–201. doi:10.1093/bioinformatics/bti770.
- Ayadi, M., D. Cavez, N. Miled, F. Chaumont, and K. Masmoudi. 2011. Identification and characterization of two plasma membrane aquaporins in durum wheat (*Triticum turgidum* L. subsp. *durum*) and their role in abiotic stress tolerance. *Plant Physiol. Biochem.* 49:1029–1039. doi:10.1016/j.plaphy.2011.06.002.

- Baker, N.A., D. Sept, S. Joseph, M.J. Holst, and J.A. McCammon. 2001. Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98:10037–41. doi:10.1073/pnas.181342398.
- Bansal, A., and R. Sankararamakrishnan. 2007. Homology modeling of major intrinsic proteins in rice, maize and *Arabidopsis*: comparative analysis of transmembrane helix association and aromatic/arginine selectivity filters. *BMC Struct. Biol.* 7:27. doi:10.1186/1472-6807-7-27.
- Barone, L.M., H.H. Mu, C.J. Shih, K.B. Kashlan, and B.P. Wasserman. 1998. Distinct biochemical and topological properties of the 31- and 27-kilodalton plasma membrane intrinsic protein subgroups from red beet. *Plant Physiol.* 118:315–322. doi:10.1104/pp.118.1.315.
- Barrera, N.P., R.M. Henderson, R.D. Murrell-Lagnado, and J.M. Edwardson. 2007. The stoichiometry of P2X₂/6 receptor heteromers depends on relative subunit expression levels. *Biophys. J.* 93:505–12. doi:10.1529/biophysj.106.101048.
- Bartoi, T., K. Augustynowski, G. Polleichtner, S. Gründer, and M.H. Ulbrich. 2014. Acid-sensing ion channel (ASIC) 1a/2a heteromers have a flexible 2:1/1:2 stoichiometry. 1–6. doi:10.1073/pnas.1324060111.
- Bárzana, G., R. Aroca, G.P. Bienert, F. Chaumont, and J.M. Ruiz-Lozano. 2014. New insights into the regulation of aquaporins by the arbuscular mycorrhizal symbiosis in maize plants under drought stress and possible implications for plant performance. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 27:349–63. doi:10.1094/MPMI-09-13-0268-R.
- Baumgarten, R., M.H. Van De Pol, J.F. Wetzels, C.H. Van Os, and P.M. Deen. 1998. Glycosylation is not essential for vasopressin-dependent routing of aquaporin-2 in transfected Madin-Darby canine kidney cells. *J. Am. Soc. Nephrol.* 9:1553–9.
- Beaudette, P.C., M. Chlup, J. Yee, and R.J.N. Emery. 2007. Relationships of root conductivity and aquaporin gene expression in *Pisum sativum*: diurnal patterns and the response to HgCl₂ and ABA. *J. Exp. Bot.* 58:1291–300. doi:10.1093/jxb/erl289.
- Beitz, E., K. Liu, M. Ikeda, W.B. Guggino, P. Agre, and M. Yasui. 2006. Determinants of AQP6 trafficking to intracellular sites versus the plasma membrane in transfected mammalian cells. *Biol. Cell.* 98:101–109. doi:10.1042/BC20050025.
- Bellati, J., K. Alleva, G. Soto, V. Vitali, C. Jozefkowicz, and G. Amodeo. 2010. Intracellular pH sensing is altered by plasma membrane PIP aquaporin co-expression. *Plant Mol. Biol.* 74:105–118.
- Besserer, A., E. Burnotte, G.P. Bienert, A.S. Chevalier, A. Errachid, C. Grefen, M.R. Blatt, and F. Chaumont. 2012. Selective regulation of maize plasma membrane aquaporin trafficking and activity by the SNARE SYP121. *Plant Cell.* 24:3463–81. doi:10.1105/tpc.112.101758.
- Biela, A., K. Grote, B. Otto, S. Hoth, R. Hedrich, and R. Kaldenhoff. 1999. The *Nicotiana tabacum* plasma membrane aquaporin NtAQP1 is mercury-insensitive and permeable for glycerol. *Plant J.* 18:565–570. doi:10.1046/j.1365-313X.1999.00474.x.
- Bienert, G.P., M.D. Bienert, T.P. Jahn, M. Boutry, and F. Chaumont. 2011. Solanaceae XIPs are plasma membrane aquaporins that facilitate the transport of many uncharged substrates. *Plant J.* 66:306–17. doi:10.1111/j.1365-313X.2011.04496.x.

- Bienert, G.P., D. Cavez, A. Besserer, M.C. Berny, D. Gilis, M. Rooman, and F. Chaumont. 2012. A conserved cysteine residue is involved in disulfide bond formation between plant plasma membrane aquaporin monomers. *Biochem. J.* 445:101–11. doi:10.1042/BJ20111704.
- Bienert, G.P., R.B. Heinen, M.C. Berny, and F. Chaumont. 2014. Biochimica et Biophysica Acta Maize plasma membrane aquaporin ZmPIP2;5, but not ZmPIP1;2, facilitates transmembrane diffusion of hydrogen peroxide. *BBA - Biomembr.* 1838:216–222. doi:10.1016/j.bbamem.2013.08.011.
- Bienert, G.P., M. Thorsen, M.D. Schüssler, H.R. Nilsson, A. Wagner, M.J. Tamás, and T.P. Jahn. 2008. A subgroup of plant aquaporins facilitate the bi-directional diffusion of As(OH)₃ and Sb(OH)₃ across membranes. *BMC Biol.* 6:26. doi:10.1186/1741-7007-6-26.
- Bots, M., R. Feron, N. Uehlein, K. Weterings, R. Kaldenhoff, and T. Mariani. 2005. PIP1 and PIP2 aquaporins are differentially expressed during tobacco anther and stigma development. *J. Exp. Bot.* 56:113–121. doi:10.1093/jxb/eri009.
- Boursiac, Y., S. Chen, D. Luu, M. Sorieul, N. Van Den Dries, and C. Maurel. 2005. Early Effects of Salinity on Water Transport in *Arabidopsis* Roots: Molecular and Cellular Features of Aquaporin Expression. *Plant Physiol.* 139:790–805. doi:10.1104/pp.105.065029.water.
- Boursiac, Y., S. Prak, J. Boudet, O. Postaire, D. Luu, C. Tournaire-roux, and V. Santoni. 2008. The response of *Arabidopsis* root water transport to a challenging environment implicates reactive oxygen species and phosphorylation dependent internalization of aquaporins. *Biochimie.* 3:1096–1098. doi:10.1111/j.1365-313X.2008.03594.1096.
- 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.* 72:248–54.
- Campbell, E.M., A. Ball, S. Hoppler, and A.S. Bowman. 2008. Invertebrate aquaporins: a review. *J. Comp. Physiol. B.* 178:935–55. doi:10.1007/s00360-008-0288-2.
- Cao, Y., M. Anderova, N.M. Crawford, and J.I. Schroeder. 1992. Expression of an outward-rectifying potassium channel from maize mRNA and complementary RNA in *Xenopus* oocytes. *Plant Cell.* 4:961–9. doi:10.1105/tpc.4.8.961.
- Casado-Vela, J., B. Muries, M. Carvajal, I. Iloro, F. Elortza, and M.C. Martínez-Ballesta. 2010. Analysis of root plasma membrane aquaporins from *Brassica oleracea*: post-translational modifications, de novo sequencing and detection of isoforms by high resolution mass spectrometry. *J. Proteome Res.* 9:3479–94. doi:10.1021/pr901150g.
- Case DA, Darden TA, Cheatham TE, Simmerling CL, Wang J, et al. 2010. AMBER11. <http://infoscience.epfl.ch/record/150146/files/Amber11.pdf?version=1>.
- Chaumont, F., F. Barrieu, R. Jung, and M.J. Chrispeels. 2000. Plasma membrane intrinsic proteins from maize cluster in two sequence subgroups with differential aquaporin activity. *Plant Physiol.* 122:1025–1034. doi:10.1104/pp.122.4.1025.
- Chaumont, F., F. Barrieu, E. Wojcik, M.J. Chrispeels, and R. Jung. 2001. Aquaporins constitute a large and highly divergent protein family in maize. *Plant Physiol.* 125:1206–1215. doi:10.1104/pp.125.3.1206.

- Chevalier, A.S. 2015. Trafficking of Plant Plasma Membrane Aquaporins: Multiple Regulation Levels and Complex Sorting Signals. *56*:819–829. doi:10.1093/pcp/pcu203.
- Chevalier, A.S., G.P. Bienert, and F. Chaumont. 2014. A new LxxxA motif in the transmembrane Helix3 of maize aquaporins belonging to the plasma membrane intrinsic protein PIP2 group is required for their trafficking to the plasma membrane. *Plant Physiol.* 166:125–38. doi:10.1104/pp.114.240945.
- Choi, W.G., and D.M. Roberts. 2007. Arabidopsis NIP2;1, a Major Intrinsic Protein Transporter of Lactic Acid Induced by Anoxic Stress. *J. Biol. Chem.* 282:24209–24218. doi:10.1074/jbc.M700982200.
- Conant, G.C., and K.H. Wolfe. 2008. Turning a hobby into a job: how duplicated genes find new functions. *Nat. Rev. Genet.* 9:938–950.
- Dainty, J., and C.R. House. 1966. An examination of the evidence for membrane pores in frog skin. *J. Physiol.* 185:172–84.
- Daniels, M.J., M.J. Chrispeels, and M. Yeager. 1999. Projection structure of a plant vacuole membrane aquaporin by electron cryo-crystallography. *J. Mol. Biol.* 294:1337–49. doi:10.1006/jmbi.1999.3293.
- Daniels, M.J., T.E. Mirkov, and M.J. Chrispeels. 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.* 106:1325–33.
- Daniels, M.J., and M. Yeager. 2005. Phosphorylation of aquaporin PvTIP3;1 defined by mass spectrometry and molecular modeling. *Biochemistry.* 44:14443–54. doi:10.1021/bi050565d.
- Danielson, J.A.H., and U. Johanson. 2008. Unexpected complexity of the aquaporin gene family in the moss *Physcomitrella patens*. *BMC Plant Biol.* 8:45. doi:10.1186/1471-2229-8-45.
- Dhonukshe, P., F. Aniento, I. Hwang, D.G. Robinson, J. Mravec, Y.-D. Stierhof, and J. Friml. 2007. Clathrin-mediated constitutive endocytosis of PIN auxin efflux carriers in *Arabidopsis*. *Curr. Biol.* 17:520–7. doi:10.1016/j.cub.2007.01.052.
- Dolinsky, T.J., J.E. Nielsen, J.A. McCammon, and N.A. Baker. 2004. PDB2PQR: an automated pipeline for the setup of Poisson-Boltzmann electrostatics calculations. *Nucleic Acids Res.* 32:W665–7. doi:10.1093/nar/gkh381.
- Dordas, C., M.J. Chrispeels, and P.H. Brown. 2000. Permeability and channel-mediated transport of boric acid across membrane vesicles isolated from squash roots. *Plant Physiol.* 124:1349–1362. doi:10.1104/pp.124.3.1349.
- Duchesne, L., S. Deschamps, I. Pellerin, V. Lagree, A. Froger, D. Thomas, P. Bron, C. Delamarque, and J.-F. Hubert. 2001. Oligomerization of water and solute channels of the major intrinsic protein (MIP) family. *Kidney Int.* 60:422–426. doi:10.1046/j.1523-1755.2001.060002422.x.
- Duchesne, L., I. Pellerin, C. Delamarque, S. Deschamps, V. Lagree, A. Froger, G. Bonnac, D. Thomas, and J.-F. Hubert. 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.* 277:20598–604. doi:10.1074/jbc.M201179200.
- Duksin, D., and W.C. Mahoney. 1982. Relationship of the structure and biological activity of the natural homologues of tunicamycin. *J. Biol. Chem.* 257:3105–9.
- Dutheil, J., and N. Galtier. 2007. Detecting groups of coevolving positions in a molecule: a clustering approach. *BMC Evol. Biol.* 7:242. doi:10.1186/1471-2148-7-242.
- Dynowski, M., G. Schaaf, D. Loque, O. Moran, and U. Ludewig. 2008. Plant plasma membrane water channels conduct the signalling molecule H₂O₂. *Biochem. J.* 414:53–61. doi:10.1042/BJ20080287.
- Fares, M. a., and D. McNally. 2006. CAPS: Coevolution analysis using protein sequences. *Bioinformatics.* 22:2821–2822. doi:10.1093/bioinformatics/btl493.
- Fetter, K., V. Van Wilder, M. Moshelion, and F. Chaumont. 2004. Interactions between plasma membrane aquaporins modulate their water channel activity. *Plant Cell.* 16:215–228. doi:10.1105/tpc.017194.
- Forrest, K.L., and M. Bhave. 2007. Major intrinsic proteins (MIPs) in plants: A complex gene family with major impacts on plant phenotype. *Funct. Integr. Genomics.* 7:263–289. doi:10.1007/s10142-007-0049-4.
- Fotiadis, D., P. Jenö, T. Mini, S. Wirtz, S. a. Müller, L. Fraysse, P. Kjellbom, and A. Engel. 2001. Structural characterization of two aquaporins isolated from native spinach leaf plasma membranes. *J. Biol. Chem.* 276:1707–1714. doi:10.1074/jbc.M009383200.
- Frick, A., M. Järvå, M. Ekvall, P. Uzdavinyš, M. Nyblom, and S. Törnroth-Horsefield. 2013a. Mercury increases water permeability of a plant aquaporin through a non-cysteine-related mechanism. *Biochem. J.* 454:491–499. doi:10.1042/BJ20130377

- Frick, A., M. Järvå, and S. Törnroth-horsefield. 2013b. Structural basis for pH gating of plant aquaporins. *FEBS Lett.* 587:989–993. doi:10.1016/j.febslet.2013.02.038.
- Froger, a, B. Tallur, D. Thomas, and C. Delamarche. 1998. Prediction of functional residues in water channels and related proteins. *Protein Sci.* 7:1458–1468. doi:10.1002/pro.5560070623.
- Galizia, L., M.P. Flamenco, V. Rivarola, C. Capurro, and P. Ford. 2008. Role of AQP2 in activation of calcium entry by hypotonicity: implications in cell volume regulation. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 294:F582–90. doi:10.1152/ajprenal.00427.2007.
- Galka, J.J., S.J. Baturin, D.M. Manley, A.J. Kehler, and J.D. O'Neil. 2008. Stability of the glycerol facilitator in detergent solutions. *Biochemistry.* 47:3513–24. doi:10.1021/bi7021409.
- Gallie, D.R. 1991. The cap and poly(A) tail function synergistically to regulate mRNA translational efficiency. *Genes Dev.* 5:2108–2116. doi:10.1101/gad.5.11.2108.
- Galtier, N., and J. Dutheil. 2007. Coevolution within and between genes. *Genome Dyn.* 3:1–12. doi:10.1159/000107599.
- Gaspar, M., A. Bousser, I. Sissoëff, O. Roche, J. Hoarau, and A. Mahé. 2003. Cloning and characterization of ZmPIP1-5b, an aquaporin transporting water and urea. *Plant Sci.* 165:21–31. doi:10.1016/S0168-9452(03)00117-1.
- Gazzarrini, S., M. Kang, S. Epimashko, J.L. Van Etten, J. Dainty, G. Thiel, and A. Moroni. 2006. *Chlorella* virus MT325 encodes water and potassium channels that interact synergistically. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103:5355–5360. doi:10.1073/pnas.0600848103.
- Geertsma, E.R., M. Groeneveld, D.-J. Slotboom, and B. Poolman. 2008. Quality control of overexpressed membrane proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105:5722–5727.
- Gerbeau, P., G. Amodeo, T. Henzler, V. Santoni, P. Ripoché, and C. Maurel. 2002. The water permeability of Arabidopsis plasma membrane is regulated by divalent cations and pH. *Plant J.* 30:71–81. doi:10.1046/j.1365-313X.2002.01268.x.
- Gerbeau, P., J. Güçlü, P. Ripoché, and C. Maurel. 1999. Aquaporin Nt-TIPa can account for the high permeability of tobacco cell vacuolar membrane to small neutral solutes. *Plant J.* 18:577–87.
- Gomes, D., A. Agasse, P. Thiébaud, S. Delrot, H. Gerós, and F. Chaumont. 2009. Aquaporins are multifunctional water and solute transporters highly divergent in living organisms. *Biochim. Biophys. Acta.* 1788:1213–28. doi:10.1016/j.bbamem.2009.03.009.
- Gonen, T., and T. Walz. 2006. The structure of aquaporins. *Q. Rev. Biophys.* 39:361–396. doi:10.1017/S0033583506004458.
- Gorgoni, B., L. Fiorentino, M. Marchioni, and F. Carnevali. 1995. Cloning, expression and functional role of XrpFI alpha and beta subunits in *Xenopus laevis* oocyte. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 215:1088–95. doi:10.1006/bbrc.1995.2575.

- Gorin, M.B., S.B. Yancey, J. Cline, J.P. Revel, and J. Horwitz. 1984. The major intrinsic protein (MIP) of the bovine lens fiber membrane: characterization and structure based on cDNA cloning. *Cell*. 39:49–59.
- Guenther, J.F., N. Chanmanivone, M.P. Galetovic, I.S. Wallace, J.A. Cobb, and D.M. Roberts. 2003. Phosphorylation of soybean nodulin 26 on serine 262 enhances water permeability and is regulated developmentally and by osmotic signals. *Plant Cell*. 15:981–91.
- Hachez, C., A. Besserer, A.S. Chevalier, and F. Chaumont. 2013. Insights into plant plasma membrane aquaporin trafficking. *Trends Plant Sci.* 18:344–352. doi:10.1016/j.tplants.2012.12.003.
- Hachez, C., R.B. Heinen, X. Draye, and F. Chaumont. 2008. The expression pattern of plasma membrane aquaporins in maize leaf highlights their role in hydraulic regulation. *Plant Mol. Biol.* 68:337–353. doi:10.1007/s11103-008-9373-x.
- Hachez, C., E. Zelazny, and F. Chaumont. 2006. Modulating the expression of aquaporin genes in planta: A key to understand their physiological functions? *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1758:1142–1156. doi:10.1016/j.bbamem.2006.02.017.
- Hall, T. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 41:95–98. doi:citeulike-article-id:691774.
- Hayashi, M., S. Sasaki, H. Tsuganezawa, T. Monkawa, W. Kitajima, K. Konishi, K. Fushimi, F. Marumo, and T. Saruta. 1996. Role of vasopressin V2 receptor in acute regulation of aquaporin-2. *Kidney Blood Press. Res.* 19:32–7.
- Hayward, S., and A. Kitao. 2010. The effect of end constraints on protein loop kinematics. *Biophys. J.* 98:1976–1985. doi:10.1016/j.bpj.2010.01.017.
- Hazama, A., D. Kozono, W.B. Guggino, P. Agre, and M. Yasui. 2002. Ion permeation of AQP6 water channel protein. Single channel recordings after Hg²⁺ activation. *J. Biol. Chem.* 277:29224–30. doi:10.1074/jbc.M204258200.
- Hedfalk, K., S. Törnroth-Horsefield, M. Nyblom, U. Johanson, P. Kjellbom, and R. Neutze. 2006. Aquaporin gating. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 16:447–456. doi:10.1016/j.sbi.2006.06.009.
- Heinen, R.B., G.P. Bienert, D. Cohen, A.S. Chevalier, N. Uehlein, C. Hachez, R. Kaldenhoff, D. Le Thiec, and F. Chaumont. 2014. Expression and characterization of plasma membrane aquaporins in stomatal complexes of *Zea mays*. *Plant Mol. Biol.* 86:335–350. doi:10.1007/s11103-014-0232-7.
- Hendriks, G., M. Koudijs, B.W.M. van Balkom, V. Oorschot, J. Klumperman, P.M.T. Deen, and P. van der Sluijs. 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.* 279:2975–83. doi:10.1074/jbc.M310767200.
- Hiroaki, Y., K. Tani, A. Kamegawa, N. Gyobu, K. Nishikawa, H. Suzuki, T. Walz, S. Sasaki, K. Mitsuoka, K. Kimura, A. Mizoguchi, and Y. Fujiyoshi. 2006. Implications of the

- aquaporin-4 structure on array formation and cell adhesion. *J. Mol. Biol.* 355:628–39. doi:10.1016/j.jmb.2005.10.081.
- van Hoek, a N., M.C. Wiener, J.M. Verbavatz, D. Brown, P.H. Lipniunas, R.R. Townsend, and a S. Verkman. 1995. Purification and structure-function analysis of native, PNGase F-treated, and endo- beta-galactosidase-treated CHIP28 water channels. *Biochemistry.* 34:2212–2219. doi:10.1021/bi00007a015.
- Holt, J.M., and G.K. Ackers. 2009. Chapter 7 The Hill Coefficient: Inadequate Resolution of Cooperativity in Human Hemoglobin. *In* *Biothermodynamics, Part A*. Michael L. Johnson, editor. Academic Press. 193–212.
- Hooijmaijers, C., J.Y. Rhee, K.J. Kwak, G.C. Chung, T. Horie, M. Katsuhara, and H. Kang. 2012. Hydrogen peroxide permeability of plasma membrane aquaporins of *Arabidopsis thaliana*. *J. Plant Res.* 125:147–153. doi:10.1007/s10265-011-0413-2.
- Hove, R.M., and M. Bhawe. 2011. Plant aquaporins with non-aqua functions: deciphering the signature sequences. *Plant Mol. Biol.* 75:413–30. doi:10.1007/s11103-011-9737-5.
- Hwang, J.H., S.R. Ellingson, and D.M. Roberts. 2010. Ammonia permeability of the soybean nodulin 26 channel. *FEBS Lett.* 584:4339–43. doi:10.1016/j.febslet.2010.09.033.
- Jahn, T.P., A.L.B. Møller, T. Zeuthen, L.M. Holm, D.A. Klaerke, B. Mohsin, W. Kühlbrandt, and J.K. Schjoerring. 2004. Aquaporin homologues in plants and mammals transport ammonia. *FEBS Lett.* 574:31–6. doi:10.1016/j.febslet.2004.08.004.
- Jin, B.J., A. Rossi, and A.S. Verkman. 2011. Model of aquaporin-4 supramolecular assembly in orthogonal arrays based on heterotetrameric association of M1-M23 isoforms. *Biophys. J.* 100:2936–45. doi:10.1016/j.bpj.2011.05.012.
- Johanson, U., M. Karlsson, I. Johansson, S. Gustavsson, S. Sjövall, L. Fraysse, a R. Weig, and P. Kjellbom. 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. doi:10.1104/pp.126.4.1358.
- Johansson, I., M. Karlsson, V.K. Shukla, M.J. Chrispeels, C. Larsson, and P. Kjellbom. 1998. Water transport activity of the plasma membrane aquaporin PM28A is regulated by phosphorylation. *Plant Cell.* 10:451–9.
- Johansson, I., C. Larsson, B. Ek, and P. Kjellbom. 1996. The major integral proteins of spinach leaf plasma membranes are putative aquaporins and are phosphorylated in response to Ca^{2+} and apoplastic water potential. *Plant Cell.* 8:1181–91. doi:10.1105/tpc.8.7.1181.
- Johnson, K.D., and M.J. Chrispeels. 1992. Tonoplast-bound protein kinase phosphorylates tonoplast intrinsic protein. *Plant Physiol.* 100:1787–95.
- Johnson, K.D., H. Höfte, and M.J. Chrispeels. 1990. An intrinsic tonoplast protein of protein storage vacuoles in seeds is structurally related to a bacterial solute transporter (GIpF). *Plant Cell.* 2:525–32.
- Jozefkowicz, C., P. Rosi, L. Sigaut, G. Soto, L.I. Pietrasanta, G. Amodio, and K. Allewa. 2013. *Loop A* Is Critical for the Functional Interaction of Two Beta vulgaris PIP Aquaporins. *PLoS One.* 8(3):e57993. doi: 10.1371/journal.pone.0057993.

- Jung, J.S., G.M. Preston, B.L. Smith, W.B. Guggino, and P. Agre. 1994. Molecular structure of the water channel through aquaporin CHIP. The hourglass model. *J. Biol. Chem.* 269:14648–54.
- Kerschensteiner, D., F. Soto, and M. Stocker. 2005. Fluorescence measurements reveal stoichiometry of K⁺ channels formed by modulatory and delayed rectifier alpha-subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102:6160–6165. doi:10.1073/pnas.0500468102.
- Khaleghpour, K., Y. V. Svitkin, A.W. Craig, C.T. DeMaria, R.C. Deo, S.K. Burley, and N. Sonenberg. 2001. Translational repression by a novel partner of human poly(A) binding protein, Paip2. *Mol. Cell.* 7:205–216. doi:10.1016/S1097-2765(01)00168-X.
- Khandelia, H., M.Ø. Jensen, and O.G. Mouritsen. 2009. To gate or not to gate: using molecular dynamics simulations to morph gated plant aquaporins into constitutively open conformations. *J. Phys. Chem. B.* 113:5239–44. doi:10.1021/jp809152c.
- King, I.A., and A. Tabiowo. 1981. Effect of tunicamycin on epidermal glycoprotein and glycosaminoglycan synthesis in vitro. *Biochem. J.* 198:331–8.
- Krieg, P.A., and D.A. Melton. 1985. Developmental regulation of a gastrula-specific gene injected into fertilized *Xenopus* eggs. *EMBO J.* 4:3463–71.
- Kukulski, W., a. D. Schenk, U. Johanson, T. Braun, B.L. De Groot, D. Fotiadis, P. Kjellbom, and a. Engel. 2005. The 5□A structure of heterologously expressed plant aquaporin SoPIP2;1. *J. Mol. Biol.* 350:611–616. doi:10.1016/j.jmb.2005.05.001.
- Lebaudy, A., F. Pascaud, A.A. Véry, C. Alcon, I. Dreyer, J.B. Thibaud, and B. Lacombe. 2010. Preferential KAT1-KAT2 heteromerization determines inward K⁺ current properties in *Arabidopsis* guard cells. *J. Biol. Chem.* 285:6265–6274. doi:10.1074/jbc.M109.068445.
- Lee, Y.-J., and T.-H. Kwon. 2009. Ubiquitination of aquaporin-2 in the kidney. *Electrolyte Blood Press.* 7:1–4. doi:10.5049/EBP.2009.7.1.1.
- Li, G., V. Santoni, and C. Maurel. 2014. Plant aquaporins: roles in plant physiology. *Biochim. Biophys. Acta.* 1840:1574–82. doi:10.1016/j.bbagen.2013.11.004.
- Li, X., X. Wang, Y. Yang, R. Li, Q. He, X. Fang, D.-T. Luu, C. Maurel, and J. Lin. 2011. Single- Molecule Analysis of PIP2;1 Dynamics and Partitioning Reveals Multiple Modes of *Arabidopsis* Plasma Membrane Aquaporin Regulation. *Plant Cell.* 23:3780–3797. doi:10.1105/tpc.111.091454.
- Lovell, S.C., and D.L. Robertson. 2010. An integrated view of molecular coevolution in protein-protein interactions. *Mol. Biol. Evol.* 27:2567–2575.
- Lu, L., C. Montrose-Rafizadeh, T.C. Hwang, and W.B. Guggino. 1990a. A delayed rectifier potassium current in *Xenopus* oocytes. *Biophys. J.* 57:1117–23. doi:10.1016/S0006-3495(90)82632-1.

- Lu, L., M. Montrose-Rafizadeh, and W.B. Guggino. 1990b. $\text{Ca}^{2(+)}$ -activated K^+ channels from rabbit kidney medullary thick ascending limb cells expressed in *Xenopus* oocytes. *J. Biol. Chem.* 265:16190–4.
- Lu, M., M.D. Lee, B.L. Smith, J.S. Jung, P. Agre, M.A. Verdijk, G. Merckx, J.P. Rijss, and P.M. Deen. 1996. The human AQP4 gene: definition of the locus encoding two water channel polypeptides in brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93:10908–12.
- Luu, D.T., A. Martinière, M. Sorieul, J. Runions, and C. Maurel. 2012. Fluorescence recovery after photobleaching reveals high cycling dynamics of plasma membrane aquaporins in *Arabidopsis* roots under salt stress. *Plant J.* 69:894–905. doi:10.1111/j.1365-313X.2011.04841.x.
- Ma, J.F., K. Tamai, N. Yamaji, N. Mitani, S. Konishi, M. Katsuhara, M. Ishiguro, Y. Murata, and M. Yano. 2006. A silicon transporter in rice. *Nature.* 440:688–91. doi:10.1038/nature04590.
- Macey, R.I. 1984. Transport of water and urea in red blood cells. *Am. J. Physiol.* 246:C195–203.
- Maeshima, M., and F. Ishikawa. 2008. ER membrane aquaporins in plants. *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* 456:709–716. doi:10.1007/s00424-007-0363-7.
- Mahdieh, M., A. Mostajeran, T. Horie, and M. Katsuhara. 2008. Drought stress alters water relations and expression of PIP-type aquaporin genes in *Nicotiana tabacum* plants. *Plant Cell Physiol.* 49:801–813. doi:10.1093/pcp/pcn054.
- Mahoney, W.C., and D. Duksin. 1979. Biological activities of the two major components of tunicamycin. *J. Biol. Chem.* 254:6572–6.
- Marin-Olivier, M., T. Chevalier, I. Fobis-Loisy, C. Dumas, and T. Gaude. 2000. Aquaporin PIP genes are not expressed in the stigma papillae in *Brassica oleracea*. *Plant J.* 24:231–240. doi:10.1046/j.1365-313X.2000.00874.x.
- Martiniere, A., I. Lavagi, G. Nageswaran, D.J. Rolfe, L. Maneta-Peyret, D.-T. Luu, S.W. Botchway, S.E.D. Webb, S. Mongrand, C. Maurel, M.L. Martin-Fernandez, J. Kleine-Vehn, J. Friml, P. Moreau, and J. Runions. 2012. Cell wall constrains lateral diffusion of plant plasma-membrane proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109:12805–12810. doi:10.1073/pnas.1202040109.
- Martre, P., R. Morillon, F. Barrieu, G.B. North, P.S. Nobel, and M.J. Chrispeels. 2002. Plasma membrane aquaporins play a significant role during recovery from water deficit. *Plant Physiol.* 130:2101–2110. doi:10.1104/pp.009019.
- Mathai, J.C., and P. Agre. 1999. Hourglass pore-forming domains restrict aquaporin-1 tetramer assembly. *Biochemistry.* 38:923–8. doi:10.1021/bi9823683.

- Matsumoto, T., H.L. Lian, W.A. Su, D. Tanaka, C.W. Liu, I. Iwasaki, and Y. Kitagawa. 2009. Role of the aquaporin PIP1 subfamily in the chilling tolerance of rice. *Plant Cell Physiol.* 50:216–229. doi:10.1093/pcp/pcn190.
- Maurel, C., Y. Boursiac, D. Luu, V. Santoni, Z. Shahzad, L. Verdoucq. 2015. Aquaporins in plants. *Physiol Rev.* 95:1321–1358. doi:10.1152/physrev.00008.2015.
- Maurel, C., R.T. Kado, J. Guern, and M.J. Chrispeels. 1995. Phosphorylation regulates the water channel activity of the seed-specific aquaporin α -TIP. *EMBO J.* 14:3028–3035.
- Maurel, C., J. Reizer, J.I. Schroeder, M.J. Chrispeels, and M.H. Saier. 1994. Functional characterization of the *Escherichia coli* glycerol facilitator, GlpF, in *Xenopus* oocytes. *J. Biol. Chem.* 269:11869–72.
- Maurel, C., L. Verdoucq, D.T. Luu, and V. Santoni. 2008. Plant aquaporins: membrane channels with multiple integrated functions. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59:595–624. doi:10.1146/annurev.arplant.59.032607.092734.
- McCormack, K., L. Lin, L.E. Iverson, M. a Tanouye, and F.J. Sigworth. 1992. Tandem linkage of Shaker K⁺ channel subunits does not ensure the stoichiometry of expressed channels. *Biophys. J.* 63:1406–1411. doi:10.1016/S0006-3495(92)81703-4.
- Miao, G.H., Z. Hong, and D.P. Verma. 1992. Topology and phosphorylation of soybean nodulin-26, an intrinsic protein of the peribacteroid membrane. *J. Cell Biol.* 118:481–90.
- Mintseris, J., and Z. Weng. 2005. Structure, function, and evolution of transient and obligate protein-protein interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102:10930–5. doi:10.1073/pnas.0502667102.
- Mitani-Ueno, N., N. Yamaji, F.J. Zhao, and J.F. Ma. 2011. The aromatic/arginine selectivity filter of NIP aquaporins plays a critical role in substrate selectivity for silicon, boron, and arsenic. *J. Exp. Bot.* 62:4391–4398. doi:10.1093/jxb/err158.
- Miyazawa, A., Y. Fujiyoshi, and N. Unwin. 2003. Structure and gating mechanism of the acetylcholine receptor pore. *Nature.* 423:949–55. doi:10.1038/nature01748.
- Mori, I.C., J. Rhee, M. Shibasaka, S. Sasano, T. Kaneko, T. Horie, and M. Katsuhara. 2014. CO₂ transport by PIP2 aquaporins of barley. *Plant Cell Physiol.* 55:251–257. doi:10.1093/pcp/pcu003.
- Moshelion, M., D. Becker, A. Biela, N. Uehlein, R. Hedrich, B. Otto, H. Levi, N. Moran, and R. Kaldenhoff. 2002. Plasma membrane aquaporins in the motor cells of *Samanea saman*: diurnal and circadian regulation. *Plant Cell.* 14:727–739. doi:10.1105/tpc.010351.
- Mulders, S.M., J.P. Rijss, A. Hartog, R.J. Bindels, C.H. van Os, and P.M. Deen. 1997. Importance of the mercury-sensitive cysteine on function and routing of AQP1 and AQP2 in oocytes. *Am. J. Physiol.* 273:F451–6.
- Muramatsu, S., and T. Mizuno. 1989. Nucleotide sequence of the region encompassing the glpKF operon and its upstream region containing a bent DNA sequence of *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* 17:4378.

- Murata, K., K. Mitsuoka, T. Hirai, T. Walz, P. Agre, J.B. Heymann, a Engel, and Y. Fujiyoshi. 2000. Structural determinants of water permeation through aquaporin-1. *Nature*. 407:599–605. doi:10.1038/35036519.
- Murozuka, E., S. Hanisch, T.G. Pomorski, T.P. Jahn, and J.K. Schjoerring. 2013. Bimolecular fluorescence complementation and interaction of various *Arabidopsis* major intrinsic proteins expressed in yeast. *Physiol. Plant*. 148:422–31. doi:10.1111/ppl.12000.
- Mut, P., C. Bustamante, G. Martínez, K. Alleva, M. Sutka, M. Civello, and G. Amodeo. 2008. A fruit-specific plasma membrane aquaporin subtype PIP1;1 is regulated during strawberry (*Fragaria x ananassa*) fruit ripening. *Physiol. Plant*. 132:538–51. doi:10.1111/j.1399-3054.2007.01046.x.
- Naso, A., R. Montisci, F. Gambale, and C. Picco. 2006. Stoichiometry studies reveal functional properties of KDC1 in plant shaker potassium channels. *Biophys. J*. 91:3673–3683. doi:10.1529/biophysj.106.091777.
- Neely, J.D., B.M. Christensen, S. Nielsen, and P. Agre. 1999. Heterotetrameric Composition of Aquaporin-4 Water Channels. *Biochemistry*. 38:11156–11163. doi:10.1021/bi990941s.
- Nilsson, I.M., and G. von Heijne. 1993. Determination of the distance between the oligosaccharyltransferase active site and the endoplasmic reticulum membrane. *J. Biol. Chem*. 268:5798–801.
- Nooren, I.M.A., and J.M. Thornton. 2003. Diversity of protein-protein interactions. *EMBO J*. 22:3486–92. doi:10.1093/emboj/cdg359.
- Noronha, H., A. Agasse, A.P. Martins, M.C. Berny, D. Gomes, O. Zarrouk, P. Thiebaud, S. Delrot, G. Soveral, F. Chaumont, and H. Gerós. 2014. The grape aquaporin VvSIP1 transports water across the ER membrane. *J. Exp. Bot*. 65:981–93. doi:10.1093/jxb/ert448.
- Nuhse, T.S., A. Stensballe, O.N. Jensen, S.C. Peck. 2004. Phosphoproteomics of the Arabidopsis Plasma Membrane and a New Phosphorylation Site Database. *Plant Cell*. 16:2394–2405. doi:10.1105/tpc.104.023150.
- Nyblom, M., A. Frick, Y. Wang, M. Ekvall, K. Hallgren, K. Hedfalk, R. Neutze, E. Tajkhorshid, and S. Törnroth-Horsefield. 2009. Structural and functional analysis of SoPIP2;1 mutants adds insight into plant aquaporin gating. *J. Mol. Biol*. 387:653–68. doi:10.1016/j.jmb.2009.01.065.
- Otto, B., N. Uehlein, S. Sdorra, M. Fischer, M. Ayaz, X. Belastegui-Macadam, M. Heckwolf, M. Lachnit, N. Pede, N. Priem, A. Reinhard, S. Siegfart, M. Urban, and R. Kaldenhoff. 2010. Aquaporin tetramer composition modifies the function of tobacco aquaporins. *J. Biol. Chem*. 285:31253–31260. doi:10.1074/jbc.M110.115881.
- Otto, S.P. 2007. The Evolutionary Consequences of Polyploidy. *Cell*. 131:452–462.
- Paganelli, C. V, and A.K. Solomon. 1957. The rate of exchange of tritiated water across the human red cell membrane. *J. Gen. Physiol*. 41:259–77.
- Pao, G.M., L.F. Wu, K.D. Johnson, H. Höfte, M.J. Chrispeels, G. Sweet, N.N. Sandal, and M.H. Saier. 1991. Evolution of the MIP family of integral membrane transport proteins. *Mol. Microbiol*. 5:33–7.

- Perez Di Giorgio, J., G. Soto, K. Alleva, C. Jozefkowicz, G. Amodeo, J.P. Muschietti, and N.D. Ayub. 2014. Prediction of aquaporin function by integrating evolutionary and functional analyses. *J. Membr. Biol.* 247:107–25.
- Pettersson, N., C. Filipsson, E. Becit, L. Brive, and S. Hohmann. 2005. Aquaporins in yeasts and filamentous fungi. *Biol. Cell.* 97:487–500. doi:10.1042/BC20040144.
- di Pietro, M., J. Vialaret, G.-W. Li, S. Hem, K. Prado, M. Rossignol, C. Maurel, and V. Santoni. 2013. Coordinated Post-translational Responses of Aquaporins to Abiotic and Nutritional Stimuli in *Arabidopsis* Roots. *Mol. Cell. Proteomics.* 12:3886–3897. doi:10.1074/mcp.M113.028241.
- Pommerrenig, B., T.A. Diehn, and G.P. Bienert. 2015. Metalloido-porins: Essentiality of Nodulin 26-like intrinsic proteins in metalloid transport. *Plant Sci.* 238:212–227. doi:10.1016/j.plantsci.2015.06.002.
- Prado, K., and C. Maurel. 2013. Regulation of leaf hydraulics: from molecular to whole plant levels. *Front. Plant Sci.* 4:255. doi:10.3389/fpls.2013.00255.
- Prak, S., S. Hem, J. Boudet, G. Viennois, N. Sommerer, M. Rossignol, C. Maurel, and V. Santoni. 2008. Multiple phosphorylations in the C-terminal tail of plant plasma membrane aquaporins: role in subcellular trafficking of AtPIP2;1 in response to salt stress. *Mol. Cell. Proteomics.* 7:1019–30. doi:10.1074/mcp.M700566-MCP200.
- Preston, G.M., and P. Agre. 1991. Isolation of the cDNA for erythrocyte integral membrane protein of 28 kilodaltons: member of an ancient channel family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88:11110–4.
- Preston, G.M., T.P. Carroll, W.B. Guggino, and P. Agre. 1992. Appearance of water channels in *Xenopus* oocytes expressing red cell CHIP28 protein. *Science.* 256:358–7.
- Preston, G.M., W.B. Gugginoll, and P. Agre. 1993. The Mercury-sensitive Residue at Cysteine 189 in CHIP28 Water Channel. *J. Biol. Chem.* 268:17–20.
- Qi, X., C.Y.Y. Tai, and B.P.P. Wasserman. 1995. Plasma membrane intrinsic proteins of *Beta vulgaris* L. *Plant Physiol.* 108:387–92.
- Quigley, F., J.M. Rosenberg, Y. Shachar-Hill, and H.J. Bohnert. 2002. From genome to function: the *Arabidopsis* aquaporins. *Genome Biol.* 3:RESEARCH0001.
- Rao, Y., L.Y. Jan, and Y.N. Jan. 1990. Similarity of the product of the *Drosophila* neurogenic gene big brain to transmembrane channel proteins. *Nature.* 345:163–7. doi:10.1038/345163a0.
- Rash, J.E., T. Yasumura, C.S. Hudson, P. Agre, and S. Nielsen. 1998. Direct immunogold labeling of aquaporin-4 in square arrays of astrocyte and ependymocyte plasma membranes in rat brain and spinal cord. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95:11981–6.

- Rich, G.T., I. Sha“afi, A. Romualdez, and A.K. Solomon. 1968. Effect of osmolality on the hydraulic permeability coefficient of red cells. *J. Gen. Physiol.* 52:941–54.
- Rossi, A., J. Ratelade, M.C. Papadopoulos, J.L. Bennett, and A.S. Verkman. 2012. Neuromyelitis optica IgG does not alter aquaporin-4 water permeability, plasma membrane M1/M23 isoform content, or supramolecular assembly. *Glia.* 60:2027–39. doi:10.1002/glia.22417.
- Sachss, A., and E. Wahle. 1993. Poly (A) Tail Metabolism and Function in Eucaryotes. *J. Biol. Chem.* 268:22955-8.
- Sakurai, J., F. Ishikawa, T. Yamaguchi, M. Uemura, and M. Maeshima. 2005. Identification of 33 rice aquaporin genes and analysis of their expression and function. *Plant Cell Physiol.* 46:1568–1577. doi:10.1093/pcp/pci172.
- Sandal, N.N., and K.A. Marcker. 1988. Soybean nodulin 26 is homologous to the major intrinsic protein of the bovine lens fiber membrane. *Nucleic Acids Res.* 16:9347.
- Santoni, V., L. Verdoucq, N. Sommerer, J. Vinh, D. Pflieger, and C. Maurel. 2006. Methylation of aquaporins in plant plasma membrane. *Biochem. J.* 400:189–97. doi:10.1042/BJ20060569.
- Santoni, V., J. Vinh, D. Pflieger, N. Sommerer, and C. Maurel. 2003. A proteomic study reveals novel insights into the diversity of aquaporin forms expressed in the plasma membrane of plant roots. *Biochem. J.* 373:289–96. doi:10.1042/BJ20030159.
- Schmalzing, G., K. Ruhl, and S.M. Gloor. 1997. Isoform-specific interactions of Na,K-ATPase subunits are mediated via extracellular domains and carbohydrates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94:1136–41.
- Shi, L.B., W.R. Skach, and a. S. Verkman. 1994. Functional independence of monomeric CHIP28 water channels revealed by expression of wild-type mutant heterodimers. *J. Biol. Chem.* 269:10417– 10422.
- Sjövall-Larsen, S., E. Alexandersson, I. Johansson, M. Karlsson, U. Johanson, and P. Kjellbom. 2006. Purification and characterization of two protein kinases acting on the aquaporin SoPIP2;1. *Biochim. Biophys. Acta.* 1758:1157–64. doi:10.1016/j.bbamem.2006.06.002.
- Smith, C.P., and K.F. Chater. 1988. Cloning and transcription analysis of the entire glycerol utilization (gylABX) operon of *Streptomyces coelicolor* A3(2) and identification of a closely associated transcription unit. *Mol. Gen. Genet.* 211:129–37.
- Sohara, E., T. Rai, S.-S. Yang, K. Uchida, K. Nitta, S. Horita, M. Ohno, A. Harada, S. Sasaki, and S. Uchida. 2006. Pathogenesis and treatment of autosomal-dominant nephrogenic diabetes insipidus caused by an aquaporin 2 mutation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103:14217–14222. doi:10.1073/pnas.0602331103.
- Sorbo, J.G., S.E. Moe, O.P. Ottersen, and T. Holen. 2008. The molecular composition of square arrays. *Biochemistry.* 47:2631–7. doi:10.1021/bi702146k.

- Sorieul, M., C. Maurel, and D. Luu. 2011. Mechanisms and Effects of Retention of Over-Expressed Aquaporin AtPIP2□; 1 in the Endoplasmic Reticulum. 2:473–482. doi:10.1111/j.1600-0854.2010.01154.x.
- Soto, G., K. Alleva, G. Amodeo, J. Muschiatti, and N.D. Ayub. 2012. New insight into the evolution of aquaporins from flowering plants and vertebrates: Orthologous identification and functional transfer is possible. *Gene*. 503:165–176. doi:10.1016/j.gene.2012.04.021.
- Stewart, A.P., J.C. Gómez-Posada, J. McGeorge, M.J. Rouhani, A. Villarroel, R.D. Murrell-Lagnado, and J.M. Edwardson. 2012. The Kv7.2/Kv7.3 heterotetramer assembles with a random subunit arrangement. *J. Biol. Chem.* 287:11870–11877. doi:10.1074/jbc.M111.336511.
- Suga, S., and M. Maeshima. 2004. Water channel activity of radish plasma membrane aquaporins heterologously expressed in yeast and their modification by site-directed mutagenesis. *Plant Cell Physiol.* 45:823–830. doi:10.1093/pcp/pch120.
- Takano, J., M. Wada, U. Ludewig, G. Schaaf, N. von Wirén, and T. Fujiwara. 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. doi:10.1105/tpc.106.041640.
- Tamura, K., J. Dudley, M. Nei, and S. Kumar. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24:1596–9. doi:10.1093/molbev/msm092.
- Temmei, Y., S. Uchida, D. Hoshino, N. Kanzawa, M. Kuwahara, S. Sasaki, and T. Tsuchiya. 2005. Water channel activities of *Mimosa pudica* plasma membrane intrinsic proteins are regulated by direct interaction and phosphorylation. *FEBS Lett.* 579:4417–4422. doi:10.1016/j.febslet.2005.06.082.
- Terasaki, M., L.L. Runft, and a R. Hand. 2001. Changes in organization of the endoplasmic reticulum during *Xenopus* oocyte maturation and activation. *Mol. Biol. Cell.* 12:1103–1116.
- Törnroth-Horsefield, S., Y. Wang, K. Hedfalk, U. Johanson, M. Karlsson, E. Tajkhorshid, R. Neutze, and P. Kjellbom. 2005. Structural mechanism of plant aquaporin gating. *Nature*. 439:688–694. doi:10.1038/nature04316.
- Tournaire-Roux, C., M. Sutka, H. Javot, E. Gout, P. Gerbeau, D.T. Luu, R. Bligny, and C. Maurel. 2003. Cytosolic pH regulates root water transport during anoxic stress through gating of aquaporins. *Nature*. 425:393–7. doi:10.1038/nature01853.
- Uehlein, N., C. Lovisolo, F. Siefritz, and R. Kaldenhoff. 2003. The tobacco aquaporin NtAQPI is a membrane CO₂ pore with physiological functions. *Nature*. 425:734–7. doi:10.1038/nature02027.
- Uehlein, N., B. Otto, D.T. Hanson, M. Fischer, N. McDowell, and R. Kaldenhoff. 2008. Function of *Nicotiana tabacum* Aquaporins as Chloroplast Gas Pores Challenges the Concept of Membrane CO₂ Permeability. *Plant cell.* 20:648–657. doi:10.1105/tpc.107.054023.

- Uysal, S., L.G. Cuello, D.M. Cortes, S. Koide, A.A. Kossiakov, and E. Perozo. 2011. Mechanism of activation gating in the full-length KcsA K⁺ channel. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108:11896–11899. doi:10.1073/pnas.1105112108.
- Vandeleur, R.K., G. Mayo, M.C. Shelden, M. Gilliam, B.N. Kaiser, and S.D. Tyerman. 2009. The role of plasma membrane intrinsic protein aquaporins in water transport through roots: diurnal and drought stress responses reveal different strategies between isohydric and anisohydric cultivars of grapevine. *Plant Physiol.* 149:445–460. doi:10.1104/pp.108.128645.
- Veerappan, A., F. Cymer, N. Klein, and D. Schneider. 2011. The tetrameric α -helical membrane protein GlpF unfolds via a dimeric folding intermediate. *Biochemistry.* 50:10223–30. doi:10.1021/bi201266m.
- Vera-Estrella, R., B.J. Barkla, H.J. Bohnert, and O. Pantoja. 2004. Novel regulation of aquaporins during osmotic stress. *Plant Physiol.* 135:2318–2329. doi:10.1104/pp.104.044891.
- Verbavatz, J.M., D. Brown, I. Sabolić, G. Valenti, D.A. Ausiello, A.N. Van Hoek, T. Ma, and A.S. Verkman. 1993. Tetrameric assembly of CHIP28 water channels in liposomes and cell membranes: a freeze-fracture study. *J. Cell Biol.* 123:605–18.
- Verdoucq, L., A. Grondin, and C. Maurel. 2008. Structure-function analysis of plant aquaporin AtPIP2;1 gating by divalent cations and protons. *Biochem. J.* 415:409–416. doi:10.1042/BJ20080275.
- Verdoucq, L., O. Rodrigues, A. Martinie, D.T. Luu, and C. Maurel. 2014. Plant aquaporins on the move: reversible phosphorylation, lateral motion and cycling. *Curr Opin Plant Biol.* doi:10.1016/j.pbi.2014.09.011.
- Verkman, a S. 2005. More than just water channels: unexpected cellular roles of aquaporins. *J. Cell Sci.* 118:3225–3232. doi:10.1242/jcs.02519.
- Wallace, I.S., and D.M. Roberts. 2004. Homology modeling of representative subfamilies of *Arabidopsis* major intrinsic proteins. Classification based on the aromatic/arginine selectivity filter. *Plant Physiol.* 135:1059–68. doi:10.1104/pp.103.033415.
- Wang, W., J. Xia, and R.S. Kass. 1998. MinK-KvLQT1 fusion proteins, evidence for multiple stoichiometries of the assembled I(sK) channel. *J. Biol. Chem.* 273:34069–34074. doi:10.1074/jbc.273.51.34069.
- Weaver, C.D., and D.M. Roberts. 1992. Determination of the site of phosphorylation of nodulin 26 by the calcium-dependent protein kinase from soybean nodules. *Biochemistry.* 31:8954–9.
- Wei, W., E. Alexandersson, D. Gollack, A.J. Miller, P.O. Kjellbom, and W. Fricke. 2007. HvPIP1;6, a barley (*Hordeum vulgare* L.) plasma membrane water channel particularly expressed in growing compared with non-growing leaf tissues. *Plant Cell Physiol.* 48:1132–1147. doi:10.1093/pcp/pcm083.

- Weig, A, C. Deswarte, and M.J. Chrispeels. 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. doi:10.1104/pp.114.4.1347.
- Van Wilder, V., U. Miecielica, H. Degand, R. Derua, E. Waelkens, and F. Chaumont. 2008. Maize plasma membrane aquaporins belonging to the PIP1 and PIP2 subgroups are in vivo phosphorylated. *Plant Cell Physiol.* 49:1364–1377. doi:10.1093/pcp/pcn112.
- Wittig, I., M. Karas, and H. Schägger. 2007. High resolution clear native electrophoresis for in-gel functional assays and fluorescence studies of membrane protein complexes. *Mol. Cell. Proteomics.* 6:1215–1225. doi:10.1074/mcp.M700076-MCP200.
- Wudick, M.M., X. Li, V. Valentini, N. Geldner, J. Chory, J. Lin, C. Maurel, and D.-T. Luu. 2015. Subcellular Redistribution of Root Aquaporins Induced by Hydrogen Peroxide. *Mol. Plant.* 8:1103–14. doi:10.1016/j.molp.2015.02.017.
- Yamada, S., M. Katsuhara, W.B. Kelly, C.B. Michalowski, and H.J. Bohnert. 1995. A family of transcripts encoding water channel proteins: tissue-specific expression in the common ice plant. *Plant Cell.* 7:1129–1142. doi:10.1105/tpc.7.8.1129.
- Yaneff, A., L. Sigaut, M. Marquez, K. Alleva, L.I. Pietrasanta, and G. Amodeo. 2014. Heteromerization of PIP aquaporins affects their intrinsic permeability. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111:231–6.
- Yasui, M., T.H. Kwon, M.A. Knepper, S. Nielsen, and P. Agre. 1999. Aquaporin-6: An intracellular vesicle water channel protein in renal epithelia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96:5808–13.
- Zardoya, R. 2005. Phylogeny and evolution of the major intrinsic protein family. *Biol. Cell.* 97:397–414. doi:10.1042/BC20040134.
- Zardoya, R., and S. Villalba. 2001. A phylogenetic framework for the aquaporin family in eukaryotes. *J. Mol. Evol.* 52:391–404. doi:10.1007/s002390010169.
- Zelazny, E., J.W. Borst, M. Muylaert, H. Batoko, M. a Hemminga, and F. Chaumont. 2007. FRET imaging in living maize cells reveals that plasma membrane aquaporins interact to regulate their subcellular localization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104:12359–12364. doi:10.1073/pnas.0701180104.
- Zelazny, E., U. Miecielica, J.W. Borst, M. a Hemminga, and F. Chaumont. 2009. An N-terminal diacidic motif is required for the trafficking of maize aquaporins ZmPIP2;4 and ZmPIP2;5 to the plasma membrane. *Plant J.* 57:346–355. doi:10.1111/j.1365-313X.2008.03691.x.
- Zeuthen, T., and D.A. Klaerke. 1999. Transport of water and glycerol in aquaporin 3 is gated by H⁽⁺⁾. *J. Biol. Chem.* 274:21631–6.
- Zhao, X.Q., N. Mitani, N. Yamaji, R.F. Shen, and J.F. Ma. 2010. Involvement of silicon influx transporter OsNIP2;1 in selenite uptake in rice. *Plant Physiol.* 153:1871–7. doi:10.1104/pp.110.157867.

Parte de los resultados presentados en esta Tesis Doctoral se encuentran publicados en los siguientes artículos de revistas internacionales con referato:

Bellati J, Alleva K, Soto G, Vitali V, **Jozefkowicz C**, Amodeo G. *Intracellular pH sensing is altered by plasma membrane PIP aquaporin coexpression*. Plant Molecular Biology (2010). 74(1-2):105-18.

Jozefkowicz C, Rosi P, Sigaut L, Soto G, Pietrasanta LI, Amodeo G, Alleva K. *Loop A is critical for the functional interaction of two Beta vulgaris PIP aquaporins*. PLoS One (2013). 8(3):e57993doi: 10.1371/journal.pone.0057993.

Perez Di Giorgio J, Soto G, Alleva K, **Jozefkowicz C**, Amodeo G, Muschietti JP, Ayub ND. *Prediction of aquaporin functions by integrating evolutionary and functional analyses*. Journal of Membrane Biology. (2014). 247(2):107-25.

Jozefkowicz C, Sigaut L, Scochera F, Soto G, Ayub N, Pietrasanta LI, Amodeo G, González Flecha L, Alleva K. *PIP water transport and its pH dependence are regulated by tetramer stoichiometry determined by the relative abundance of PIP1 and PIP2 monomers*. Biophysical Journal (2016). 110(6):1312-1321