



Do Gene à Função:

*Investigação do Papel dos
Receptores de Glutamato na
Fisiologia do Transporte de
Cálcio em Tubos Polínicos*

***Instituto Gulbenkian de Ciência, grupo de
Desenvolvimento Vegetal.***

*Trabalho supervisionado por José Feijó, Professor
Catedrático da FCUL e Investigador Residente no IGC.*

Trabalho realizado por João E. Carvalho

Introdução

A evolução conduziu as plantas superiores a desenvolverem um extraordinário sistema de reprodução sexual, este que é altamente especializado e diferenciado permite facilmente a adaptação a um vida sésil e a ambientes variados, o que justifica o sucesso que estas plantas têm na colonização dos mais variados habitats. O seu sucesso reside, fundamentalmente, na pequena fase gametofítica característica. A reprodução sexual tem lugar em órgãos especializados presentes na flor: o pólen, gametófito masculino, é libertado pelas anteras e posteriormente adere, desenvolve-se e interage com vários tecidos ao longo do órgão feminino, designado de pistilo. Por fim dá-se a fertilização, a qual acontece no saco embrionário.¹

Os grãos de pólen são libertados para a atmosfera num estado extremo de desidratação, o que lhes permite superar as condições mais adversas do ambiente envolvente, assim como, a realização de longas viagens até que encontrem um pistilo favorável, se este for compatível dar-se-á a germinação, o que conduz ao aparecimento do tubo polínico. O tubo polínico é uma célula altamente especializada que resulta do desenvolvimento da parte vegetativa do grão de pólen. A zona de rápido crescimento citoplasmático (tubo) serve como meio de transporte para as células espermáticas, conduzindo-as desde a superfície do órgão feminino (estigma) até junto do ovário.² Visto ser este o processo fundamental da reprodução sexuada, em plantas, é de extrema importância o estudo deste sistema tanto num campo teórico, como num campo mais aplicado. Devido à complexidade e dificuldade que todo o processo envolve, este é rigidamente controlado tanto espacialmente como temporalmente.

Assimetria e polaridade são cruciais não só para o desenvolvimento, mas também para aspectos funcionais por parte da célula. Mecanismos que controlam e mantêm a polaridade evoluíram de variadas formas, mas os mais comuns são os que têm por base a distribuição assimétrica de proteínas ou distribuição diferencial de diferentes organitos celulares.³ Um dos casos já demonstrados é o gradiente de cálcio que se verifica ao longo do tubo, este é dependente de transportadores de iões, visto que, quando se adiciona um inibidor dos canais de Ca^{2+} o fluxo parece ser alterado. O gradiente de Ca^{2+} que se estabelece, entrada massiva e quase exclusiva pelo ápice, parece ser fundamental para o desenvolvimento do tubo e para o seu alongamento, podendo também actuar como modelador da direcção do alongamento.² A identificação dos canais e transportadores de Ca^{2+} que estão directamente envolvidos é um grande desafio, por um lado para perceber a fisiologia do tubo polínico, por outro para entender mais genericamente o mecanismo molecular da sinalização do Ca^{2+} na planta. Estudos recentes apontam para três famílias de canais catiónicos, que possuem elevada

homologia com canais presentes em animais, como sendo bons candidatos no controlo do influxo de Ca^{2+} através da membrana plasmática no ápice: os *cyclic-nucleotide gated channels* (cNGC), os *ionotropic amino-acid receptors* (iAAR) e *annexines*.²

Focando agora a nossa atenção numa família específica de canais responsáveis pelo transporte de Ca^{2+} , os receptores de glutamato (GluR), os quais possuem um papel fundamental na neurotransmissão excitatória rápida por parte do sistema nervoso central, em animais. Os mesmos que estão também relacionados com o desenvolvimento, assim como com a plasticidade neuronal, possuindo um papel importante em processos cognitivos, por exemplo memória e aprendizagem.⁴ Em plantas os GluR estão ligados à formação de um gradiente de Ca^{2+} no ápice do tubo polínico (dados não publicados). Num dos organismos modelo mais utilizados em plantas, *Arabidopsis thaliana*, já foram identificados 21 genes que aparentam codificar para este tipo de receptores⁵, seis dos quais foram claramente reconhecidos como sendo expressos nos grãos de pólen⁶. Em tabaco foi demonstrado que alguns activadores (agonistas – D-serina e glicina) e inibidores (antagonistas – CNQX e DNQX) de GluR afectam o crescimento do tubo polínico, assim como o gradiente de Ca^{2+} e o seu fluxo em redor do tubo polínico.

Para realizar uma abordagem semelhante em *Arabidopsis* foram criadas linhas que possuem inserções mutagénicas nos genes que codificam para GluR nos grãos de pólen, após o cultivo dos mesmos é de realçar que o fenótipo dos mutantes *glr3.7-1* (At2g32400) e *glr1.2-1* (At5g48400) parece promissor, uma vez que a taxa de crescimento verificada é menor e os ápices dos tubos polínicos apresentam-se anormais (dados não publicados). Tendo por base a homologia que estes receptores possuem com os animais suspeita-se que serão, igualmente, dependentes de ligando, isto é são activados por ligandos extracelulares, mas, ainda assim, o agonista natural de GluR, em plantas, permanece desconhecido. Em animais a forma racémica de L-serina, a D-serina, é apontada como sendo fundamental na activação de alguns destes canais, portanto a hipótese de que este mesmo aminoácido pode ser um agonista em plantas está a ser investigada. Ainda na linha de análise deste possível agonista é interessante o que é observado na germinação de tubos polínicos sob um *background* genético de um pistilo mutante para o enzima serina racemase (*sr1-1*). Este enzima é responsável pela racemização de L-serina em D-serina, e os tubos polínicos que germinam nas condições referidas apresentam deformações, facto este que vem enfatizar a real importância dos receptores ionotrópicos de aminoácidos como estruturas basilares, no estrito controlo a que o desenvolvimento de tubos polínicos é submetido.

Ao longo deste estágio os objectivos foram sendo actualizados, sendo que na fase inicial o essencial seria o estudo do crescimento de tubos polínicos com mutações em diferentes GluR

(glr1.2 e glr3.7) *in vitro*. Numa fase posterior o que era pedido passava pela avaliação do efeito na fertilidade de uma mutação glr1.2, e numa fase final o objectivo seria obter um duplo mutante para glr1.2/glr3.7 e perceber quais as implicações destas mesmas mutações e conjunto.

Material e Métodos

Linhas de plantas

Arabidopsis thaliana (ecotipo Col0), germinadas em solo, sob condições de dia longo, na estufa (21 °C, 16 h luz). Linhagens com inserção de T-DNA foram obtidas a partir do SALK (<http://signal.salk.edu/about.html>) e plantas homozigóticas foram seleccionadas por PCR.

Extracção de DNA

Após serem recolhidas de 2-3 folhas foram reduzidas a pó em azoto líquido, adicionando imediatamente 600 µL de tampão CTAB (0,8% de CTAB, 0,14M de Manitol, 0,22M de Tris-HCl (pH 8), 0,022M de EDTA, 0,8M de NaCl e 1% de N-Lauroilsarcosina). O preparado anterior foi transferido para tubos de 500 µL e foram colocados na estufa a 65°C durante 30 minutos. Foram adicionados 500 µL de uma solução fenol:clorofórmio (1:1) previamente preparada. Os tubos foram levados ao vortex e seguidamente à centrifugadora durante 30 minutos a velocidade máxima. Procedeu-se à recolha de 150 µL da camada superior e transferiu-se para novos tubos, adicionando 15 µL de Acetato de Sódio 3M e 110 µL de Isopropanol. Foram colocados a 4°C durante cerca de 30 minutos e procedeu-se a nova centrifugação durante 20 minutos a velocidade máxima. Foi retirado o sobrenadante e procedeu-se à lavagem com etanol 70%, deixou-se secar o *pellet*. A ressuspensão foi efectuada em 20 µL de água destilada.

PCR

As soluções de PCR continham por cada amostra de DNA 2,5 µL de tampão, 0,5 µL de dNTP (10 mM), 1 µL de cada *primer* (10 µM), 0,3 µL de *Pac* polimerase e 0,5 µL do respectivo DNA, o volume de 25 µL era perfeito com água destilada. As condições das reacções foram: 95°C durante 2 minutos seguidos de 35 ciclos (95°C durante 1 minuto, seguido de 1 minuto a 60°C e por fim 2 minutos a 72°C).

Primers

Dentro do gene de interesse

glr1.2_for	CATACCTGAAAATCCTCCTTG
glr1.2_rev	TGAAGAGGATCCTGAAATGTC
glr3.7_for	AACTCCCTTACATCGAACTGT

glr3.7_rev GCATCGAGGATGTTCTCTCCA

Dentro da inserção de T-DNA

LBa1: TGGTTCACGTAGTGGCCATCG

Genotipagem de mutantes *qrt*

Com vista a confirmar se os mutantes têm, efectivamente, uma importante função junto do fenótipo dos tubos polínicos recorreu-se ao cruzamento de plantas homizogóticas para o mutante *quartet (qrt/qrt)* – este mutante conduz à falha na separação dos quatro produtos da microesporogénese, sendo os grãos de pólen libertados sob a forma de tétradas, facilitando a sua visualização (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8197459?ordinalpos=11&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_DefaultReportPanel.Pubmed_RVDocSum) – com plantas homozigóticas para o respectivo mutante de receptores de glutamato (*glr1.2/glr1.2* ou *glr3.7/glr3.7*). Após o cruzamento das plantas realizou-se um segundo cruzamento, mas desta vez das linhas obtidas (auto-cruzamento), criando-se assim a linha mutante F2. Nas plantas obtidas em F2 realizou-se uma selecção diferencial para indivíduos *qrt/qrt* (através de observação na lupa) e uma triagem posterior através de PCR, a qual visava à selecção de indivíduos heterozigóticos para receptores de glutamato (*+/glr1.2* ou *+/glr3.7*). Procedeu-se à cultura das tétradas seleccionadas, observando-se o crescimento *in vitro* dos respectivos tubos polínicos, sendo assim possível a observação em paralelo do crescimento de PT *wt* e mutados, sobre as mesmas condições laboratoriais.

Germinação de tubos polínicos *in vitro*

Foram recolhidos grãos de pólen de *Arabidopsis* adultas com 8-12 semanas de idade e foram germinados em meio sólido (CaCl₂ 10 mM, KCl 1 mM, ácido bórico 1.6 mM, MES 1 mM – pH 6.5 NaOH – agar 2%).

Testes de fertilidade de duplos mutantes

Plantas (*wt* e *sr1/sr1*) foram emasculadas e polinizadas com pólen de plantas heterozigóticas *+/glr1.2*. As posteriores experiências foram realizadas com pistilos *wild type* e com pistilos de plantas com mutação para serina racemase.

Também foram genotipados plantas provenientes do auto-cruzamento *glr1.2/glr1.2* *::+/glr3.7* (plantas resultantes da linha F2 do cruzamento *glr1.2/glr1.2* x *glr3.7/glr3.7*). Para avaliar a viabilidade destes mutantes genotipou-se, em ambas as situações, a geração F1 através de PCR.

Resultados e Discussão

Crescimento de tubos polínicos *in vitro*

Após a selecção dos indivíduos com real importância foram recolhidos os grãos de pólen e colocados a germinar, estes foram posteriormente observados na lupa e fotografados obtendo-se assim as imagens seguintes para indivíduos *qrt/qrt +/glr3.7* e *qrt/qrt +/glr1.2*, respectivamente.

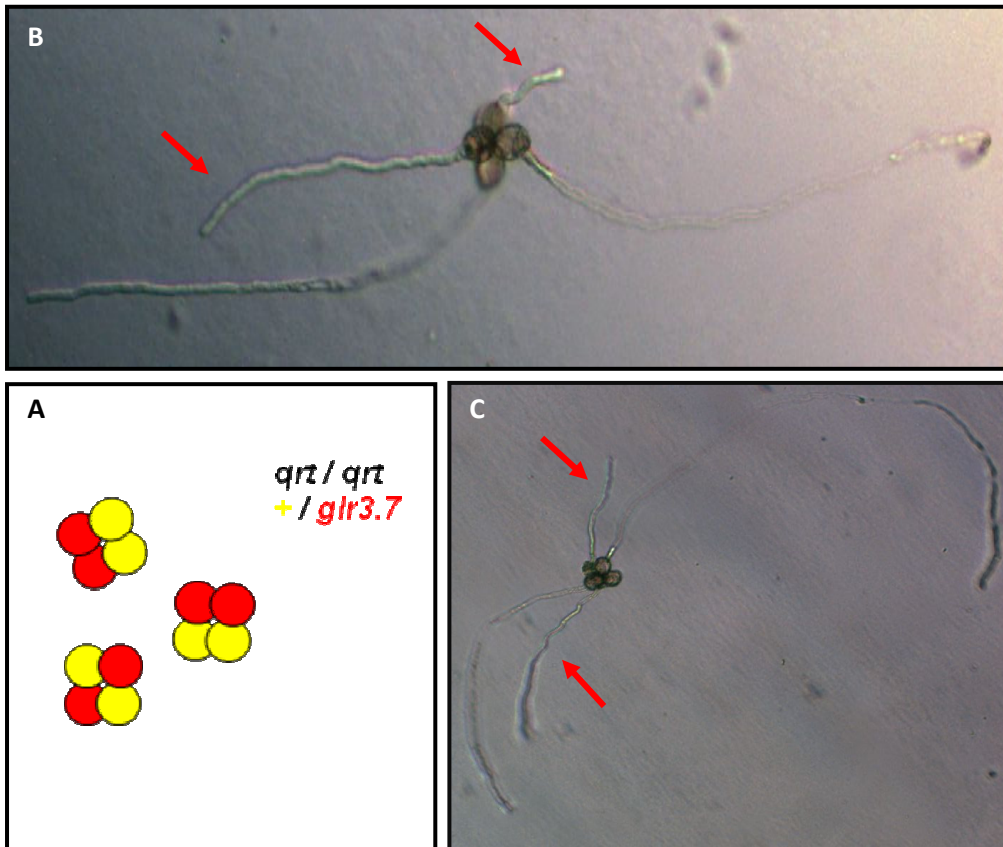


Figura 1 – geração F2 do cruzamento *qrt/qrt* x *glr3.7/glr3.7*, germinação de pólen recolhido de indivíduos *qrt/qrt +/glr3.7*; A – esquema representativo dos possíveis arranjos de grãos *wt* e *glr3.7* nas tétradas de pólen; B,C – imagens de germinação, onde as setas vermelhas indicam os grãos que serão mutantes *glr3.7*, estes apresentam uma dimensão reduzida, comparativamente aos *wt*.

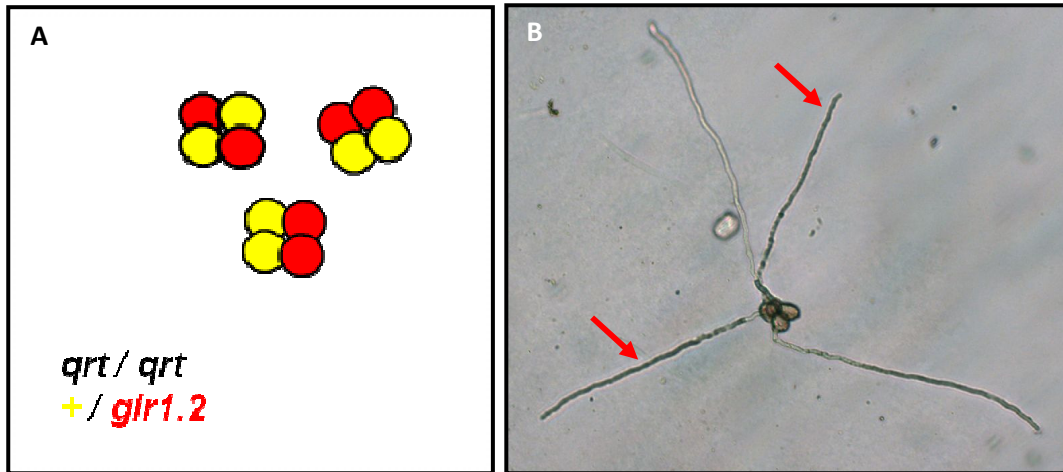


Figura 2 – geração F2 do cruzamento *qrt/qrt* x *glr1.2/glr1.2*, germinação de pólen recolhido de indivíduos *qrt/qrt +/glr1.2*; A – esquema representativo dos possíveis arranjos de grãos *wt* e *glr1.2* nas tétradas de pólen; B – imagens de germinação de grãos de pólen onde as setas vermelhas indicam os grãos que serão mutantes *glr1.2*, os quais apresentam um aspecto anormal, quando comparados com os *wt*.

Através dos resultados obtidos podemos afirmar que o mutante para *glr3.7* tem um problema no que toca ao crescimento dos tubos polínicos, pois é observável uma grande diferença no que toca ao tamanho relativo. Este facto sugere que os receptores de glutamato 3.7 estão directamente envolvidos no crescimento do tubo polínico. Por outro lado nos mutantes para *glr1.2* este facto não é tão marcado, apesar de ser observável que o fenótipo é algo diferente quando comparado com os *wt*. Numa observação mais pormenorizada dos ápices é visível que estes apresentam deformações, o que leva a supor que este receptor de glutamato estará envolvido na correcta orientação e organização durante o desenvolvimento do ápice

Teste de fertilidade para mutantes *sr1*

Dos vários cruzamentos efectuados, obtiveram-se valores um pouco diferentes. No caso do cruzamento do indivíduo selvagem com o heterozigótico para *glr1.2 (+/glr1.2)*, obteve-se para a geração F1 um total de cerca de 50% de indivíduos *wt*. Facto este, que demonstra, que não existe nenhum problema com a fertilidade.

No outro cruzamento experimental a geração F1 originou cerca de 41% de indivíduos *wt*, ou seja os tubos mutantes mostram uma maior fertilidade que tubos polínicos *wt*, quando estes se encontram num background genético de indivíduos mutantes para serina racemase (*sr1/sr1*). A explicação para este facto ainda não está esclarecida, portanto não podemos afirmar claramente que há uma ligação entre serina racemase e o receptor de glutamato 1.2.

Devido a este pequeno desvio do que seria esperado fica, então, a questão: será a D-serina efectivamente um ligando natural para este canal?

Teste de fertilidade para duplos mutantes de GluR

Como resultado do cruzamento experimental entre plantas mutantes para *glr1.2* e plantas heterozigóticas para *glr3.7*, a geração F2 (*glr1.2/glr1.2* :: *+/glr3.7*) apresentou uma proporção de 1/3 de indivíduos *wilde type* (*glr1.2/glr1.2* :: *+/+*) e 2/3 de indivíduos que apresentam um genótipo heterozigótico (*glr1.2/glr1.2* :: *+/glr3.7*), após a análise de 50 plantas. Este facto indica que o duplo mutante não permite a formação de embriões, sendo portanto letal.

Conclusão

Ao longo do estágio adquiri bases e metodologias de trabalho em biologia molecular em plantas, assim como a capacidade de trabalho e percepção do que se realiza num laboratório de investigação científica de alto nível.

Em suma, os iAAR desempenham um papel importante na morfogénese do tubo polínico, assim como na sua condução no caminho para alcançar o micrópilo, possibilitando assim a fecundação. Apesar de não terem sido identificados ligandos endógenos para estes receptores, o trabalho desenvolvido pelo grupo vem mostrar que D-serina é um ligando natural de iAAR.

É de realçar a extrema importância que este trabalho tem, pois a ligação estabelecida entre o desenvolvimento do tubo polínico e receptores de glutamato não só vem facilitar a compreensão do que se passa do ponto vista fisiológico, no que toca às oscilações de cálcio, como também vem permitir uma enorme aplicabilidade destes estudos junto da investigação clínica. O paralelismo entre o que se passa em plantas e a forma como canais semelhantes afectam as propriedades de libertação de alguns neurotransmissores induzidos por Ca²⁺, vem demonstrar um espectacular evento de preservação evolutiva. O facto de os tubos polínicos crescerem rapidamente, os quais são muito facilmente cultivados, torna-os como um crescente e bem adaptado modelo de polarização celular e de estudos morfogenéticos, assim como torna possível uma efectiva dissecação ao nível de investigação fundamental neste receptores, tão largamente importantes em doenças neurodegenerativas.

Agradecimentos

Agradeço ao professor José Feijó por esta incrível e enriquecedora experiência, ao PL e EM pelo apoio pessoal e científico e pela forma como me receberam, agradeço também a ACS pelo apoio técnico.

Bibliografia

1. Boavida et al., 2005 *Int J Dev Biol* 49: 615
2. Michard et al., 2008 *Int J Dev Biol*
3. Certal et al., 2008 *The Plant Cell* 20: 614
4. Dingleline et al., 1999 *Pharmacol Rev* **51** (1), 7; Lynch et al., 2004 *Curr Opin Pharmacol* **4** (1), 4; Madden et al., 2002 *Opin Drug Discov Devel* **5** (5), 741
5. Lacombe et al., 2001 *Science* 292: 1486
6. Pina et al., 2005 *Plant Physiol* 138: 744