

Tesis Doctoral

# Análisis genético de la regulación del almacenamiento de ARNm en cuerpos citoplasmáticos de granos de polen maduro en *Arabidopsis thaliana*

Scarpin, María Regina

2016-03-14

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

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

Cita tipo APA:

Scarpin, María Regina. (2016-03-14). Análisis genético de la regulación del almacenamiento de ARNm en cuerpos citoplasmáticos de granos de polen maduro en *Arabidopsis thaliana*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Scarpin, María Regina. "Análisis genético de la regulación del almacenamiento de ARNm en cuerpos citoplasmáticos de granos de polen maduro en *Arabidopsis thaliana*". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2016-03-14.

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**Análisis genético de la regulación del almacenamiento  
de ARNm en cuerpos citoplasmáticos de granos de  
polen maduro en *Arabidopsis thaliana***

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

**Lic. María Regina Scarpin**

Director de tesis: Dr. Jorge P. Muschiatti

Consejero de Estudios: Dr. Jorge P. Muschiatti

Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética  
y Biología Molecular “Dr. Héctor N. Torres”

Buenos Aires, 2016

Fecha de defensa: 14 de Marzo de 2016

# Resumen

---

## **Análisis genético de la regulación del almacenamiento de ARNm en cuerpos citoplasmáticos de granos de polen maduro en *Arabidopsis thaliana***

Se ha descrito que algunos ARNm de polen son sintetizados durante el desarrollo del polen y acumulados en grano de polen maduro deshidratado, para ser traducidos luego de la germinación del polen. Nuestra hipótesis es que la regulación de la acumulación de estos ARNm de polen pre-sintetizados está mediada por cuerpos citoplasmáticos. Para probar dicha hipótesis, analizamos la localización celular de algunos ARNm pre-sintetizados durante el desarrollo del polen utilizando el sistema MS2-CP. Utilizamos como sistema biológico a *Arabidopsis thaliana* que permite llevar a cabo un análisis genético, molecular y de desarrollo de la expresión específica de genes de polen. Por otro lado, estudiamos gránulos de estrés (SG) y cuerpos de procesamiento (PB) en polen maduro de *Arabidopsis* como posibles estructuras celulares donde estos ARNm pre-sintetizados polínicos puedan ser almacenados. En otra línea de estudio, caracterizamos cuerpos de cajal (CB) para investigar si su número y tamaño varían durante los procesos de división celular y diferenciación celular que ocurren en el desarrollo del grano de polen.

Nuestros resultados demuestran la presencia de agregados de ARNm citoplasmáticos en polen maduro en líneas transgénicas que contienen el sistema MS2-CP. Validamos y cuantificamos estos agregados de ARNm usando un análisis automatizado de MATLAB. Luego verificamos si estos agregados de ARNm co-localizan con gránulos de estrés y/o cuerpos de procesamiento mediante el análisis de líneas transgénicas que expresan el sistema MS2-CP y a la vez proteínas marcadas de SG o PB. Hemos demostrado que uno de cada cinco agregados, aproximadamente, co-localiza con alguna de las proteínas marcadoras de PB, lo que sugiere que los PB son sitios de almacenamiento de los ARNm en granos de polen maduro. Además, analizamos de qué manera se afecta la presencia y la localización de los agregados citoplasmáticos en ausencia de los genes marcadores de SG y PB. Hemos determinado que dichas proteínas serían necesarias para la localización de los ARNm en

acúmulos citoplasmáticos. Nuestros resultados además sugieren que los CB responden durante el desarrollo del polen a las diferentes necesidades fisiológicas de los distintos tipos de células gametofíticas masculinas. Estos resultados contribuirán a entender los mecanismos de regulación transcripcional y traduccional en granos de polen de *Arabidopsis thaliana*.

Palabras claves: polen, genes tardíos, cuerpos de cajal, cuerpos de procesamiento, gránulos de estrés

# Abstract

---

## **Genetic analysis of the regulation of mRNA storage in cytoplasmic bodies of mature pollen in *Arabidopsis thaliana***

It has been described that some pollen mRNAs are synthesized during pollen development and accumulated in dehydrated mature pollen grains, being translated only after pollen germination. Our hypothesis is that the regulation of the accumulation of these pre-synthesized pollen mRNAs is mediated by cytoplasmic bodies. To probe this, we analyzed the cellular localization of some defined pollen pre-synthesized mRNAs during pollen development using the MS2-CP system. We used *Arabidopsis thaliana* a good system to carry genetic, molecular and developmental analysis of specific expression of pollen genes. We study stress granules (SG) and processing bodies (PB) in *Arabidopsis* mature pollen as possible cellular structures where these pre-synthesized pollen mRNAs can be stored before being translated. We also characterized Cajal Bodies (CB) in order to investigate whether their number and size vary during cell division and cellular differentiation processes that occur during pollen development.

Our results showed the presence of cytoplasmic mRNA aggregates in mature pollen on transgenic lines containing the MS2-CP system. We validated and quantified these mRNA aggregates using a MATLAB automated analysis. Once confirmed, we studied whether these mRNA aggregates co-localized with stress granules and processing bodies by analyzing transgenic lines expressing both the MS2-CP system and tagged marker proteins from either SG or PB. Our findings showed that one of five aggregates, approximately, co-localized with some marker protein from PBs, which indicates that these pre-synthesized pollen mRNAs can be stored in PB. Otherwise, we analyzed whether the localization of these cytoplasmic aggregates is modified in the absence of the marker for SG and PB. Our results further suggested that CB respond during pollen development to the diverse physiological needs of the different types of male gametophytic cells. Our results would contribute to understand the mechanisms of transcriptional and translational regulation in *Arabidopsis thaliana* pollen.

Keywords: pollen, late genes, Cajal Bodies, Processing Bodies, Stress Granules

# Agradecimientos

---

A lo largo de todos estos años muchas personas fueron muy importantes para mi crecimiento, a todos ellos que colaboraron de una u otra manera, infinitamente gracias.

A Jorge, por haberme permitido ser parte de su grupo, por haber puesto tantas energías en que este proyecto prospere, por haberme ayudado a crecer.

A los chicos del lab, los que fueron parte, los que están y los nuevos, por dedicar parte de su tiempo en mi aprendizaje, por compartir tantos lindos momentos, por poner cada uno lo mejor de sí haciendo los momentos duros mas amenos y los buenos aún mejores, por haber sido parte importante de todos estos años.

A Leo y Agus, por tantas charlas compartidas, por estar siempre dispuestos a colaborar.

A las Dras. Lia Pietrasanta y Lorena Sigaut, por las innumerables reuniones y por la dedicación brindada para que este trabajo se lleve a cabo.

A la Dra. Graciela Boccaccio por haber brindado su tiempo y energía en ayudarnos a llevar adelante gran parte de este trabajo.

A mi familia, por ser incondicional todos estos años, por haberme ayudado y apoyado en todas mis decisiones.

A Silvio, por estar siempre en las buenas y en las malas, por las incontables horas de charlas, por colaborar con esta tesis como si fuese propia, por hacerme feliz.

A mis amigos, por el tiempo y viajes compartidos, por estar siempre dispuestos a escuchar, por querer siempre ayudar como si fuesen compañeros de lab.

# Indice

---

<b>Resumen</b> .....	<b>1</b>
ANÁLISIS GENÉTICO DE LA REGULACIÓN DEL ALMACENAMIENTO DE ARNm EN CUERPOS CITOPLASMÁTICOS DE GRANOS DE POLEN MADURO EN <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> .....	1
<b>Abstract</b> .....	<b>3</b>
GENETIC ANALYSIS OF THE REGULATION OF mRNA STORAGE IN CYTOPLASMIC BODIES OF MATURE POLLEN IN <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> .....	3
<b>Agradecimientos</b> .....	<b>4</b>
<b>Glosario</b> .....	<b>5</b>
<b>Introducción</b> .....	<b>6</b>
EL POLEN EN LA REPRODUCCIÓN SEXUAL.....	6
DESARROLLO DEL GRANO DE POLEN .....	7
MICROESPOROGÉNESIS Y MICROGAMETOGÉNESIS.....	7
EL ENTENDIMIENTO DEL DESARROLLO DEL POLEN CON LOS RECURSOS ACTUALES .....	9
Genes tardíos.....	12
CUERPOS INVOLUCRADOS EN LA REGULACIÓN DE ARN .....	14
Cuerpos de Cajal (CBs) .....	14
Cuerpos de procesamiento (PBs).....	15
Gránulos de estrés (SGs).....	17
Relación entre cuerpos de procesamiento y gránulos de estrés .....	20
<b>Objetivos</b> .....	<b>23</b>
<b>Materiales y Métodos</b> .....	<b>24</b>
1. CEPAS BACTERIANAS .....	24
1.1. Conservación de cepas bacterianas .....	24
1.2. <i>Escherichia coli</i> .....	24
1.2.1. Condiciones de cultivo.....	24
1.2.2. Preparación de bacterias <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ y DH10 $\beta$ electro-competentes .....	24
1.2.3. Transformación de células electro-competentes de <i>E. coli</i> .....	25
1.3. <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	25
1.3.1. Cepas y condiciones de cultivo.....	25
1.3.2. Preparación de células competentes de <i>A. tumefaciens</i> .....	25
1.3.3. Transformación de células competentes de <i>A. tumefaciens</i> .....	26
1.3.4 Transformación de <i>Arabidopsis</i> mediante <i>A. tumefaciens</i> .....	26
2. MATERIAL VEGETAL .....	27
2.1. Elección de <i>Arabidopsis thaliana</i> como sistema de estudio .....	27

2.2. Arabidopsis y condiciones de crecimiento.....	27
2.3. Líneas mutantes simples de inserción de ADN-T.....	28
2.3.1. Genotipificación.....	28
3. PLÁSMIDOS Y CONSTRUCCIONES.....	29
3.1. Clonado por restricción y ligada.....	29
3.1.1. Amplificación de secuencias por PCR.....	29
3.1.2. Restricción de insertos y vectores.....	30
3.1.3. Purificación de insertos y vectores.....	30
3.1.4. Ligaciones inserto – vector.....	31
3.1.5. Transformación bacteriana.....	31
3.1.6. Confirmación de clones positivos.....	31
3.1.7. Amplificación de las construcciones plasmídicas.....	31
3.1.8. Restricción de las construcciones plasmídicas.....	32
3.1.9. Secuenciación de las construcciones plasmídicas.....	32
3.2. Clonado por recombinación homóloga.....	32
3.3. Proteína marcadora de Cuerpos de Cajal.....	32
3.4. Líneas de seguimiento de ARNm.....	33
3.4.1. Sistema MS2.....	33
3.4.2. Líneas MS2.....	35
3.5. Proteínas marcadoras de cuerpos de procesamiento y gránulos de estrés.....	37
3.6. Generación de líneas transgénicas MS2 en plantas mutantes simples de inserción de ADN-T.....	38
4. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE GENES.....	38
4.1. Extracción de ADN de plantas de Arabidopsis.....	38
4.2. Genotipificación de líneas mutantes y transgénicas por PCR.....	39
4.3. Recolección de polen maduro de Arabidopsis.....	39
4.4. Germinación in vitro de polen de Arabidopsis.....	40
5. MICROSCOPIA.....	40
5.1. Microscopía de epifluorescencia.....	40
5.2. Microscopía Confocal.....	40
6. ANÁLISIS AUTOMATIZADO POR MEDIO DE MATLAB.....	41
6.1. Rutina de detección de acúmulos citoplasmáticos.....	41
6.2. Rutina de detección de cuerpos.....	44
6.3. Rutina de co-localización.....	45
7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	47
<b>CAPITULO I.....</b>	<b>48</b>
<b>Caracterización de Cuerpos de Cajal (CBs) durante el desarrollo del grano de polen de <i>Arabidopsis thaliana</i>.....</b>	<b>48</b>



INTRODUCCIÓN .....	48
RESULTADOS.....	49
Caracterización de cuerpos de Cajal (CBs) durante el desarrollo del polen y el crecimiento del tubo polínico .....	49
DISCUSIÓN.....	56
Los cuerpos de Cajal (CBs) están regulados durante el desarrollo del grano de polen y el crecimiento del tubo polínico en <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	56
<b>CAPITULO II .....</b>	<b>57</b>
<b>Estudio de la regulación de genes tardíos en polen maduro de <i>Arabidopsis thaliana</i>.....</b>	<b>57</b>
INTRODUCCIÓN .....	57
RESULTADOS.....	58
Análisis de localización de genes tardíos en granos de polen maduros de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	58
Estudio de seguimiento de ARNm en polen maduro de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	59
Marcación de cuerpos de procesamiento (PBs) y gránulos de estrés (SGs) en polen maduro.....	67
Estudios de co-localización de acúmulos citoplasmáticos y cuerpos de procesamiento (PBs) en polen maduro .....	70
Estudios de co-localización de acúmulos citoplasmáticos y gránulos de estrés (SGs) en polen maduro .....	80
Análisis de localización de los ARNm en polen maduro de plantas mutantes simples de inserción de ADN-T para los genes VCS y DCP1 de cuerpos de procesamiento (PBs) .....	85
Análisis de localización de los ARNm en polen maduro de plantas mutantes simples de inserción de ADN-T para el gen ATX-2 de gránulos de estrés (SGs).....	90
DISCUSIÓN.....	92
Los ARNm <i>skt14</i> y <i>at59</i> se localizan en acúmulos citoplasmáticos en granos de polen maduros .....	93
Los acúmulos citoplasmáticos de los ARNm <i>skt14</i> y <i>at59</i> co-localizan con proteínas pertenecientes a cuerpos de procesamiento (PBs) y gránulos de estrés (SGs).....	95
Los ARNm <i>at59</i> y <i>skt14</i> no se localizan en acúmulos citoplasmáticos en polen de mutantes nulas para los genes VCS, DCP1 y ATX-2.....	100
<b>Conclusiones finales.....</b>	<b>102</b>
<b>Bibliografía .....</b>	<b>104</b>

# Glosario

---

5'UTR	Región 5' no traducida del ARNm, por sus siglas en inglés <i>5' Untranslated Region</i>
CBs	Cuerpos de Cajal, por sus siglas en inglés <i>Cajal Bodies</i>
mRNPs	Partículas ribonucleoproteicas de almacenamiento de mensajeros, por sus siglas en inglés <i>messenger Ribonucleoprotein Particles</i>
MU	Microespora Unicelular
NCG	Núcleo de la célula generativa
NCE	Núcleo de la célula espermática
NCV	Núcleo de la célula vegetativa
NLS	Señal de localización nuclear, por sus siglas en inglés <i>Nuclear Localization Signal</i>
PB	Polen Bicelular
PBs	Cuerpos de Procesamiento, por sus siglas en inglés <i>Processing Bodies</i>
PM	Polen Maduro
PT	Polen Tricelular
Rpm	Revoluciones por minuto
SGs	Gránulos de Estrés, por sus siglas en inglés <i>Stress Granules</i>

# Introducción

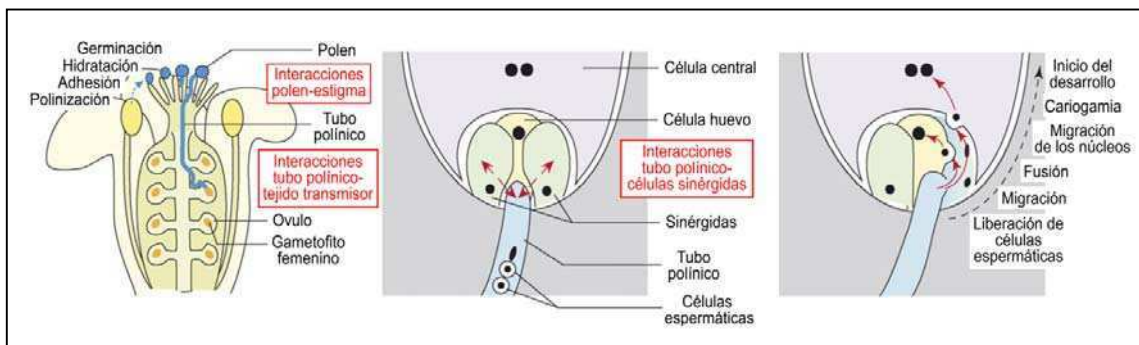
---

## El polen en la reproducción sexual

La reproducción sexual es un proceso vital para el éxito de las plantas con flor, ya que no solo asegura el mantenimiento de las especies, sino que además incrementa la diversidad genética y confiere de esta forma el potencial de adaptarse a diferentes ambientes. En todos los organismos que se reproducen sexualmente, para que la reproducción ocurra, deben encontrarse las gametas masculinas con las femeninas. En animales superiores, los mecanismos para la determinación del sexo poseen diferencias en el desarrollo entre machos y hembras; en contraste, las plantas superiores desarrollan las estructuras femeninas y masculinas en la misma flor, permitiendo la auto-fertilización.

En el caso de las plantas se distinguen dos fases en este proceso: la polinización y la fecundación. La polinización comprende el paso del polen o gametofito masculino desde el aparato reproductor masculino al aparato femenino de las plantas. La dispersión de los granos de polen puede efectuarse de tres maneras distintas: en general en plantas con flores vistosas, algunos insectos o aves actúan de agentes polinizadores; el viento también puede actuar en el transporte o este proceso se puede producir por autopolinización, si el polen de los estambres cae sobre los estigmas de la misma planta. Cuando un grano de polen compatible se deposita sobre el pistilo, el polen se hidrata y germina. Desde el grano de polen emerge un tubo polínico que crece de manera apical, concentrándose su actividad metabólica y crecimiento en la región del *tip*. El mismo crece dentro del pistilo para llegar al gametofito femenino dentro del óvulo. Los tejidos femeninos regulan el crecimiento direccional del tubo polínico. La fecundación se inicia cuando el grano de polen se posa sobre la superficie del estigma y concluye cuando el núcleo de una de las gametas presentes en el polen se fusiona con el de la ovocélula femenina, mientras el núcleo de la otra gameta masculina se fusiona con los dos núcleos de la célula central. Como producto de esta doble fecundación característica de las plantas con flor, se genera el cigoto ( $2n$ ) y el endosperma ( $3n$ ), respectivamente (Figura 1) (Boavida et al., 2005a, 2005b).

La fecundación en las plantas con flor es un mecanismo que requiere gran coordinación entre los diferentes tejidos involucrados para guiar hacia los óvulos a las células espermáticas; el polen juega un papel vital en la fertilidad de la planta a través de la generación y traslado de las gametas masculinas hasta el saco embrionario. Además de su importancia intrínseca en la reproducción sexual, el linaje celular simple y el desarrollo orquestado del gametofito masculino representa también un microcosmos de desarrollo celular (Borg et al., 2009).



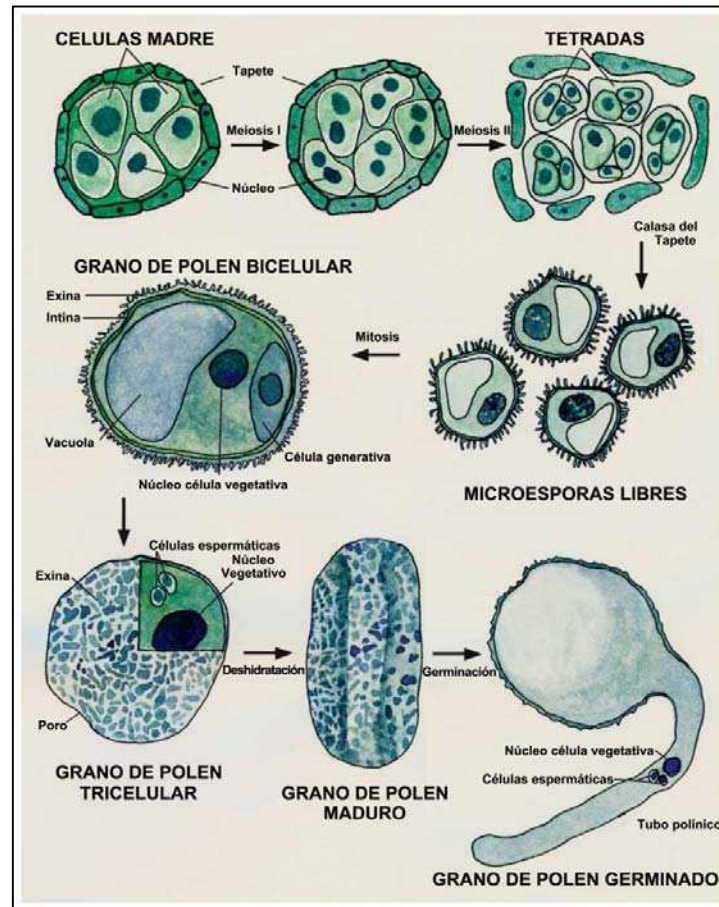
**Figura 1** - Esquema de la reproducción de una planta con flor. Se detallan los tejidos pertenecientes a los órganos sexuales y los procesos involucrados en la polinización y doble fecundación. Adaptado de Berger et al., 2008.

El modelo de estudio elegido en esta tesis es *Arabidopsis thaliana*, planta pequeña, sin valor agronómico, pero seleccionada como organismo modelo para los estudios de biología molecular, fisiología y genética de plantas debido a importantes ventajas operativas que presenta para la investigación básica, enumeradas en la sección Materiales y Métodos.

## Desarrollo del grano de polen

### Microesporogénesis y Microgametogénesis

En las plantas a diferencia de los animales, el desarrollo de los tejidos reproductivos comienza con una diferenciación eventual del tejido meristemático dando lugar a los órganos reproductivos que contienen células esporogénicas diploides. En la Figura 2 se muestran de modo esquemático los principales eventos que conforman el desarrollo del polen.



**Figura 2** - Esquema de microesporogénesis de *Arabidopsis thaliana*. Adaptado de McCormick, 2004.

En la antera, las células madre de la microspora se encapsulan en calosa, aislándose de esta forma de las células esporofíticas del tapete. El desarrollo de granos de polen viables depende del tapete, que posee la función de nutrición de las microesporas, la formación de la exina y la deposición de una cubierta lipídica en la pared del polen. A partir de este momento las células madre entran en meiosis para dar lugar a tétradas de microesporas haploides; cada una de las tétradas se encuentra encapsulada en una pared de calosa. Las microesporas se liberan de la tétrada por acción de la calasa, una enzima que se produce en el tapete y digiere la calosa envolvente. Las microesporas ya libres sufren una reorganización en su citoplasma, el cual adopta una distribución polar que desencadena una mitosis asimétrica que da como productos una célula de mayor tamaño (célula vegetativa) y otra más pequeña (célula generativa) embebida dentro del citoplasma de la anterior. Esta división es importante para definir el destino celular de cada una de las células. Juntas, ambas células, componen el polen bicelular. La célula vegetativa no sufre más divisiones y da lugar al tubo polínico. La célula

generativa es envuelta por el citoplasma de la célula vegetativa y participa de un segundo ciclo mitótico, simétrico en este caso, en el que se producen dos células espermáticas idénticas encargadas de la doble fecundación. El momento en el que ocurre la segunda mitosis varía según la planta; en las Crucíferas y los pastos ocurre dentro de las anteras, dando lugar al estadio de polen tricelular (ver Figura 2), pero lo más frecuente es que suceda durante la elongación del tubo polínico (McCormick, 2004). Los pasos finales de la maduración del polen coinciden con la antesis y la dehiscencia de las anteras, finalizando con la liberación de los granos de polen deshidratados (Boavida et al., 2005a).

## **El entendimiento del desarrollo del polen con los recursos actuales**

El grano de polen o gametofito masculino haploide de las plantas con flor es un sistema ampliamente utilizado para estudiar la expresión de genes y su regulación, ya que su desarrollo depende de la ontogenia de una sola célula y la cooperación de linajes de dos células para permitir la doble fertilización (Twell, 2011).

En la última década, se alcanzaron progresos significativos en cuanto al entendimiento del desarrollo del gametofito masculino a nivel molecular. Estos logros fueron posibles por el impetuoso avance tecnológico de la genética y genómica. El ejemplo más destacado fue posiblemente "*The Arabidopsis Genome Initiative, 2000*"; este proyecto aportó cuantiosa información no solo por la secuenciación del genoma de *Arabidopsis thaliana* en forma completa, sino también por la base de datos pública asociada de mutantes de inserción (Alonso y Stepanova, 2003). Al mismo tiempo, el apogeo de las estrategias de genética reversa y directa con las mutantes de *Arabidopsis* tuvo un impacto positivo en el conocimiento de la funcionalidad e interacción de los genes y particularmente posibilitó la identificación de varios mutantes gametofíticos (revisados en Borg et al., 2009).

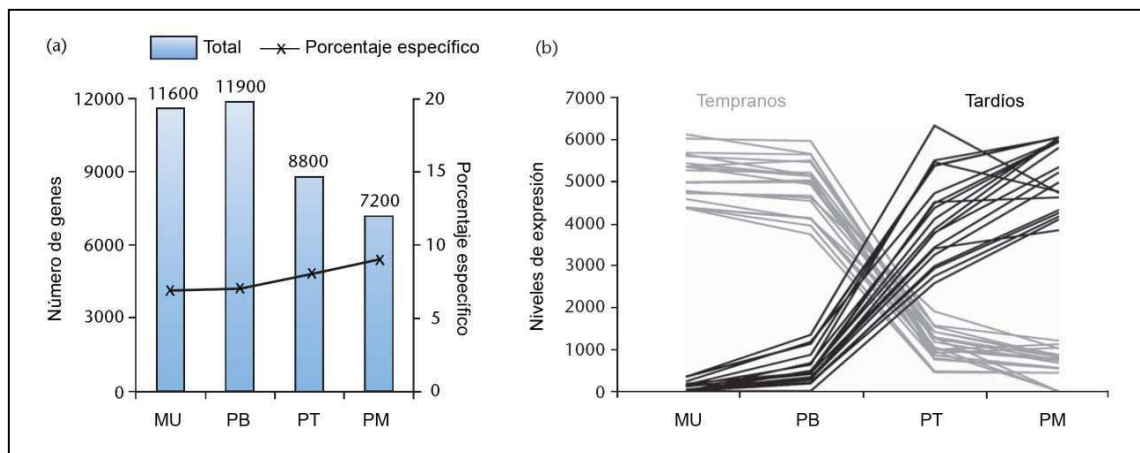
Otro hito de alta envergadura sobre dicho avance es el conjunto de datos adquiridos a partir de estudios de transcriptomas de polen de *Arabidopsis thaliana* utilizando microarreglos que contienen el 80% de los genes de *Arabidopsis* (22.500 loci) (*Affymetrix Arabidopsis ATH1 array*). Entre estos se destacan los estudios transcriptómicos comparativos del desarrollo del polen (Bock et al., 2006; Honys y Twell, 2004; Pina et al., 2005), de granos de polen maduro

y tubos polínicos germinados *in vitro* y *semi in vivo* (Qin et al., 2009; Wang et al., 2008), de pistilos polinizados *in vivo* (Boavida et al., 2011) y de células espermáticas aisladas (Borges et al., 2008). En base a dichos microarreglos se determinó que aproximadamente sólo 14.000 genes se encuentran expresados durante el desarrollo del grano de polen y crecimiento del tubo polínico, de los cuales el 6,9% son específicos de polen en microesporas uninucleadas, mientras que el 8,6% es específico en grano de polen maduro; esto evidencia una importante represión transcripcional conjuntamente con una especialización funcional del grano de polen maduro (Rutley y Twell, 2015).

Se dispone de herramientas que favorecen notablemente el trabajo bioinformático, no solo permitiendo comparaciones de muchos *sets* de datos, sino además una visualización de la información en forma muy simple y gráfica. Utilizando estas herramientas, y con la cuantiosa información pública sobre tejidos esporofíticos, se estudió la superposición de transcriptomas gametofito masculino-tejidos esporofíticos. El porcentaje estimado de genes específicos de polen resultó ser de un 5% del total de los genes expresados en *Arabidopsis* (Twell, 2006). Este porcentaje de genes específicos de polen varía dependiendo de los criterios e información utilizada para su estimación, sin embargo es en todos los casos estimados mayor que para el resto de los tejidos esporofíticos analizados (Ma et al., 2005). El alto número de genes específicos que se encuentra en el polen, refleja la especificidad funcional del gametofito masculino en la protección de las gametas y la entrega durante el desarrollo. Consistente con esto, los genes específicos de polen se caracterizan por presentar también valores de expresión elevados.

Como se mencionó previamente el desarrollo del polen se divide usualmente en dos fases, una fase temprana que comprende la microespora y el polen bicelular, y una fase tardía que incluye al polen tricelular y maduro. Estas fases también se diferencian claramente en sus perfiles transcripcionales, diferenciando dos grandes grupos de genes: los genes tempranos se expresan a partir del estadio de microespora y su abundancia decrece antes de la maduración del polen, y los genes tardíos expresados luego de la mitosis asimétrica, que se acumulan hasta la maduración del polen, creando un *pool* estable de ARNm que serían esenciales para la germinación y el crecimiento temprano del tubo polínico. De este modo, al momento de la anthesis, todas las proteínas necesarias para la germinación y el crecimiento del tubo polínico estarían presentes en el grano de polen o en su defecto, si tienen que ser sintetizadas, sus respectivos ARNm ya están presentes en el grano de polen maduro (Boavida et al., 2005a).

En la primera etapa de la gametogénesis (MU) se expresa un 60% más de genes que en la última (PM); a pesar de esto se observa un aumento en la expresión de genes específicos de polen (Honys y Twell, 2004) (Figura 3a). La reducción de la complejidad y el cambio a la fase tardía está acompañado por un incremento en los genes involucrados en el metabolismo de la pared celular, citoesqueleto y señalización celular, importantes para la madurez del polen, germinación y elongación del tubo polínico (Borg y Twell, 2011; Twell, 2006). Es por esto que suele afirmarse que el desarrollo del grano de polen está caracterizado por una represión génica asociada a gran escala. Dicha represión está ligada a una activación selectiva de un nuevo grupo de genes (genes tardíos Figura 3b), que seguramente, se encuentran involucrados en los pasos finales de maduración y en interacciones con los tejidos femeninos del pistilo durante los eventos de polinización.



**Figura 3** - En el panel (a) se muestran perfiles transcripcionales del número de genes expresados durante el desarrollo del polen superpuesto con la proporción de genes específicos de polen. A pesar de que el número global de genes expresados durante el desarrollo es menor, hay un claro aumento en la expresión de genes específicos de polen. En el panel (b) se presentan los niveles de expresión de los genes pertenecientes a cada uno de los grupos transcripcionales tempranos y tardíos en los distintos estadios del desarrollo. MU: microespora unicelular; PB: polen bicelular; PT: polen tricelular; PM: polen maduro. Adaptado de Borg y Twell, 2011.

Lo arriba expuesto nos lleva a señalar que genes cuya expresión en polen maduro (PM) es alta y además específica, adquieren una importancia relevante para el estudio de los eventos posteriores a la maduración del grano de polen. Las interacciones célula-célula que el grano de polen establece en su corta vida son limitadas y definidas, una gran ventaja para su estudio



cuando se lo compara con otros tejidos de la misma planta. Así el polen durante su desarrollo interactúa con el tapete (tejido esporofítico) y en la fecundación con tejidos del órgano reproductivo femenino (estigma, estilo y óvulo).

## Genes tardíos

El crecimiento del tubo polínico es un proceso que ocurre de manera explosiva, requiriendo de un rápido aumento en la cantidad de pectinas para la extensión del *tip*. Un número de transcriptos específicos de polen aparecen en el grano de polen luego de la mitosis I y se acumulan durante la maduración (Twell et al., 1989) (Figura 3b). Algunos de estos genes tardíos de polen codifican productos con homología a enzimas relacionadas con el metabolismo de pectinas como poligalacturonasa (Brown y Crouch, 1990; Niogret et al., 1991; Rogers y Lonsdale, 1992), pectin metil esterasa (Mu et al., 1994; Wakeley et al., 1998) y pectato liasa (Rogers et al., 1992; Wing et al., 1989). La germinación de polen de muchas especies se ha demostrado que es altamente independiente de la transcripción pero dependiente de la traducción (Twell, 1994).

Se han descrito algunos ejemplos de la regulación traduccional en polen. Uno de los genes regulados a nivel traduccional es *lat52*, gen específico de antera de tomate que codifica para una proteína rica en cisteínas y que es abundante en polen maduro (Muschiatti et al., 1994). Los transcriptos de *lat52* se almacenan al menos por 16 horas en polen maduro hasta la germinación del polen y la generación del tubo polínico (Ursin et al., 1989). Los transcriptos de *lat52* son traducidos durante el desarrollo del polen, pero son también almacenados en polen maduro, junto con la proteína LAT52, para su uso durante el crecimiento del tubo polínico. El ARNm de *lat52* es expresado de manera abundante durante la maduración del polen y además de ser regulado a nivel transcripcional, se ha demostrado que la región 5' no codificante del ARNm actúa como un activador traduccional autónomo y específico de polen (Bate et al., 1996; Twell et al., 1989).

Otro gen específico de polen que se regula de manera tardía durante el desarrollo es *ntp303* de tabaco, cuyo transcripto es almacenado en polen maduro para ser traducido luego de la germinación del grano de polen. La proteína NTP303 está presente en la membrana plasmática de la célula vegetativa, en la membrana vegetativa que envuelve las gametas y en los tapones de calosa de tubos polínicos; posee homología con las ascorbato oxidasas, y su

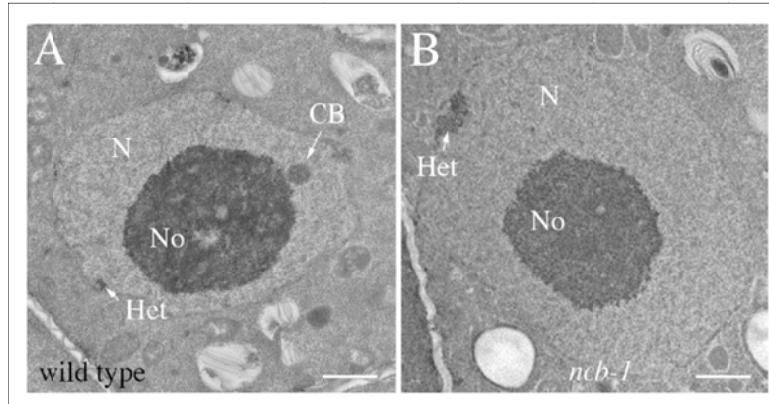
función estaría relacionada a un evento específico de polen como es la interacción entre las células de los tejidos masculino y femenino (Schrauwen et al., 1999). Cuando se estudió el mecanismo de regulación de la traducción mediado por el 5'UTR en polen se determinó que el mismo tiene la capacidad de promover la traducción sólo en tubos polínicos, donde actúa como un elemento autónomo de manera independiente del promotor, la región codificante o las secuencias del 3'UTR. Secuencias específicas de dos estructuras *stem loop* predichas de la región 5'UTR son esenciales para activar la traducción (Honys et al., 2000; Hulzink et al., 2002). Dado que la acción del 5'UTR de *ntp303* es independiente de los otros componentes del gen, Hulzink y colaboradores proponen que esta región contiene elementos en su secuencia o estructuras secundarias que serían esenciales para llevar a cabo el efecto regulatorio. La presencia, posición y arquitectura de estructuras secundarias y la naturaleza de secuencias primarias se ha demostrado que modulan los niveles en la eficiencia de traducción de los ARNm en eucariotas superiores (Curie y McCormick, 1997; Gallie et al., 2000).

En contraste con el gen *lat52* descrito por Bate y colaboradores, el cual demuestra que el gen contiene un activador traduccional en su 5'UTR que regula la expresión de manera positiva y específica en los estadios más tardíos de la maduración del polen, Curie y colaboradores observaron que la secuencia que codifica para el 5'UTR de otro gen tardío de tomate *lat59* inhibe la expresión del gen tanto en polen maduro como germinado (Curie y McCormick, 1997). Este gen codifica para una proteína perteneciente a la familia de las pectato liasas, encargadas de la degradación de paredes a través del clivaje de pectinas y posee una alta expresión durante el crecimiento del tubo polínico. También se demostró que los niveles de la proteína LAT59 aumentan significativamente luego de la germinación del polen aunque este efecto sería post-transcripcional y no por una regulación mediada por el 5'UTR. Se han propuesto dos hipótesis sobre la regulación del elemento inhibitorio, la primera es que la inhibición que ocurre en polen maduro podría ser relajada durante la germinación permitiendo la acumulación de la proteína LAT59; por otro lado, las pectato liasas en polen están involucradas en el crecimiento del tubo polínico tanto por la desestabilización de los enlaces de pectinas para ayudar a la construcción de la pared o facilitando la penetración del tubo a través de la matriz rica en pectinas del estilo. Este proceso de degradación de paredes podría comprometer a los tejidos somáticos por lo que se debe prevenir en estos tejidos a través del elemento inhibitorio para expresarse luego en el tubo polínico (Curie y McCormick, 1997).

## Cuerpos involucrados en la regulación de ARN

### Cuerpos de Cajal (CBs)

Los Cuerpos de Cajal (CBs) son cuerpos sub-nucleares primero descritos en neuronas por Ramón y Cajal en 1903 y, posteriormente, caracterizados tanto en plantas como en animales (Gall, 2003). Aparecen cerca del nucléolo como focos discretos cuyo tamaño y número varía durante el ciclo celular (Strzelecka et al., 2010). Son estructuras dinámicas que se mueven, fusionan y se separan dependiendo del estado transcripcional de la célula (Cioce y Lamond, 2005). Los CBs están involucrados en el ensamblado y el tráfico de ribonucleoproteínas nucleolares pequeñas (snoRNPs) y en el ensamblado y tráfico de complejos de ribonucleoproteínas nucleares pequeñas de spliceosoma (snRNPs) que se encuentran involucrados en el proceso de *splicing* del ARNm (Cioce y Lamond, 2005; Gall, 2003). Los Cuerpos de Cajal también contienen componentes de la maquinaria implicada en el silenciamiento mediado por siRNA y en la metilación de ADN repetitivo (Li et al., 2006). Los cuerpos de Cajal de vertebrados contienen una alta concentración de coilina, una proteína que se utiliza regularmente como un marcador molecular para CBs (Cioce y Lamond, 2005). En *Arabidopsis thaliana* existe un homólogo distante del gen de *coilina* de vertebrados (Collier et al., 2006). Una mutante de *Arabidopsis*, *ncb-1* (*no cajal bodies 1*), carece de CBs debido a un solo cambio de base en un sitio de empalme (*splice site*) del gen *coilina* de *Arabidopsis* (At1g13030), resultando en el desensamblado total de CBs, como se observa en la Figura 4 (Collier et al., 2006; Fang y Spector, 2007). La introducción de la versión salvaje de *coilina* de *Arabidopsis* recupera la formación de los CBs en plantas *ncb-1* (Collier et al., 2006).



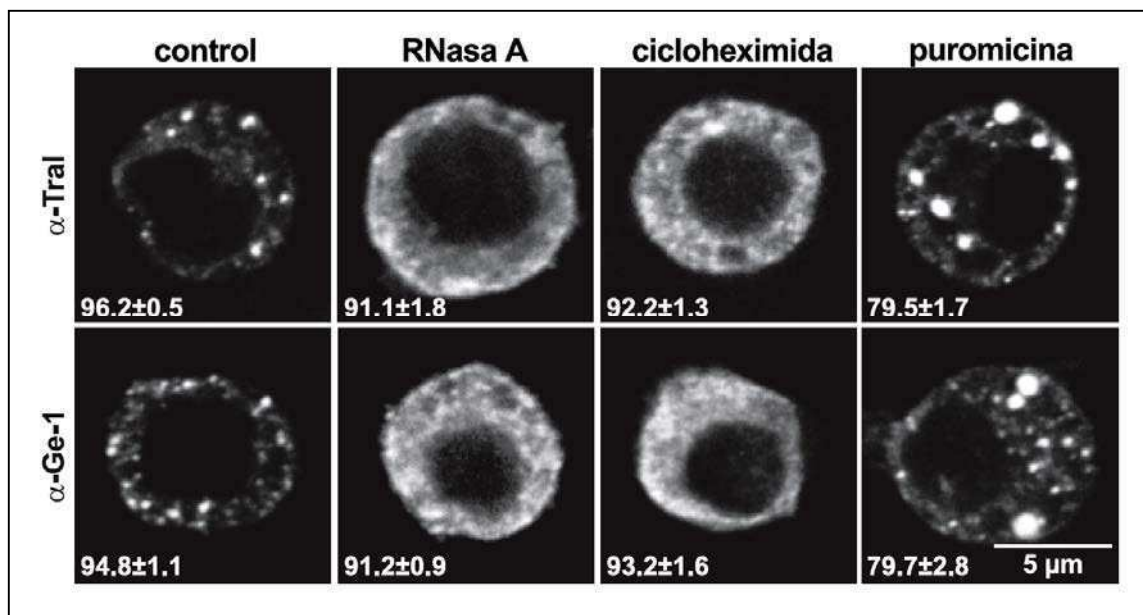
**Figura 4** - Imágenes de microscopía electrónica de transmisión y marcado de CBs mediante anti-fibrilarina de núcleos de hoja. La fibrilarina es una metil-transferasa involucrada en la metilación de ARN ribosomal y se encuentra localizada en alta concentración en CBs. Línea con fondo genético salvaje mostró un CB (flecha) cercano al nucléolo (panel A) mientras que la línea *ncb-1* nunca presenta CBs visibles en imágenes de microscopía electrónica. N: Núcleo; No: Nucléolo; Het: Heterocromatina. Barra de tamaño, 1  $\mu\text{m}$ . Adaptado de Collier et al., 2006.

A pesar de la relevancia funcional de los CBs en el procesamiento de ARN, se han obtenido mutantes *knock-out* de coilina en ratones, aunque estos muestran una reducida viabilidad (Walker et al., 2009), mientras que plantas de *Arabidopsis thaliana* y moscas (*Drosophila melanogaster*) que no poseen CBs son completamente viables y normales (Collier et al., 2006; Liu et al., 2009). Estos resultados sugieren que los procesos que normalmente se llevan a cabo en los CBs pueden realizarse en el nucleoplasma.

### Cuerpos de procesamiento (PBs)

Los cuerpos de procesamiento (PBs) son agregados citoplasmáticos de proteínas involucrados en la degradación y arresto de la traducción de los ARNm. En levaduras se demostró que la remoción del *cap* y la degradación 5' a 3' del ARNm se llevan a cabo en estos cuerpos. Primero, las proteínas que activan o catalizan la remoción del *cap* se encuentran concentradas en estas estructuras. Segundo, la inhibición del procesamiento de ARNm antes de la remoción del *cap* lleva a la pérdida de PBs; sin embargo, si se inhibe el procesamiento en el momento o luego de la remoción del *cap*, se observa un aumento en el número y tamaño de los PBs. Finalmente, los intermediarios de la degradación de los ARNm se encuentran

localizados en estos cuerpos (Sheth y Parker, 2003). La formación de los PBs varía con la disponibilidad de ARNm libre en el citoplasma o no asociado a polisomas. En *Drosophila* se estudió cómo varían en tamaño y número estos cuerpos cuando células S2 eran tratadas con drogas que afectan a la estabilidad de los ARNm. Se observó que los PBs desaparecían luego del agregado de RNasa A y cicloheximida, droga que actúa inhibiendo la elongación de la traducción y estabiliza los ARNm en los polisomas; por otro lado, el tamaño de los PBs aumenta cuando las células son tratadas con puromicina, que causa la terminación prematura de la cadena polipeptídica y produce el desensamblado de los polisomas (Figura 5) (Eulalio et al., 2007). Esto estaría indicando que para su localización en PBs, los ARNm deben salir del ciclo de traducción, quedando libres en el citoplasma.



**Figura 5** - Análisis de la formación de PBs. Las células S2 fueron tratadas con RNasa A (15 min, 100  $\mu$ g/ml), cicloheximida (1 h, 10  $\mu$ g/ml) o puromicina (1 h, 100  $\mu$ g/ml). La marcación de PBs se realizó con anticuerpos anti-TraI o anti-Ge-1. Adaptado de Eulalio et al., 2007.

En eucariotas se caracterizaron algunos de los componentes de los PBs, encontrándose proteínas pertenecientes al complejo de remoción del *cap*, la 5' exoribonucleasa y deadenilasas. En *Arabidopsis* se describió la composición del complejo de remoción del *cap*. Se determinó por métodos de interacción *in vitro* e *in vivo* que los PBs se encuentran formados en principio por las proteínas DCP1 (*decapping protein 1*), DCP2 (*decapping*

*protein 2*), DCP5 (*decapping protein 5*) y VCS (*varicose*) (Xu y Chua, 2009; Xu et al., 2006). La presencia de la proteína VCS, homólogo de la proteína humana Hedls que no se encuentra en levaduras, sugiere que los PBs de plantas son estructuralmente más cercanos a los PBs humanos que a los de levaduras. Por otro lado, se determinó que DCP2 es la única que posee actividad catalítica de remoción del *cap* siendo este efecto estimulado por los demás componentes. Los ARNm que fueron removidos de su *cap* son llevados a degradación 5' a 3', proceso, que en Arabidopsis, se lleva a cabo por la ARNasa XRN4, que co-localiza con DCP1 (Weber et al., 2008). Otros de los componentes de los cuerpos de procesamiento son las deadenilasas y sus proteínas regulatorias, que juegan un rol esencial tanto en la degradación 5' a 3' del ARN como en la formación de los PBs (Zheng et al., 2008). En tomate se demostró que el ARNm poliadenilado se agrega en gránulos de estrés (SGs) y pero no en gránulos de *heat shock* (HSGs) (Weber et al., 2008); por lo tanto la deadenilación sería necesaria para enviar los ARNm a un cuerpo diferente. El acortamiento de poli-A excluye a las proteínas de unión a poli-A y proteínas asociadas con la traducción para disminuir la eficiencia de traducción y dejar accesibles los ARNm a los componentes de PBs (Maldonado-Bonilla, 2014).

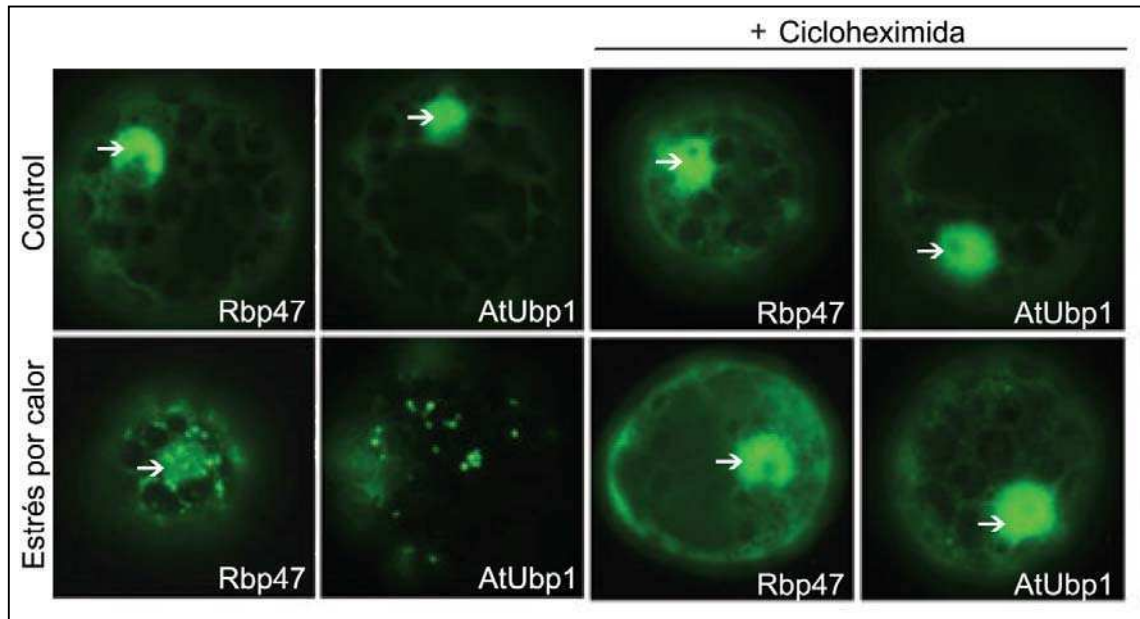
En plantas, se han generado líneas *knock out* de los genes arriba mencionados y se estudió como se veía afectada la formación de los PBs. Se generaron las líneas *dcp1-1* que posee la inserción de ADN-T en el sexto intrón del gen *dcp1*, la línea *dcp2-1* posee la inserción en el tercer intrón del gen *dcp2* y *vcs-6* contiene la inserción de ADN-T en el primer exón del gen *vcs*. El crecimiento en diferentes tipos celulares diferenciados, incluyendo células vasculares, células de estoma, células epidérmicas y pelos radiculares se vio afectado en las líneas *dcp1-1*, *dcp2-1* y *vcs-6*; estos resultados sugieren que estas proteínas cumplen un rol fundamental en la remoción del *cap* de los ARNm durante el desarrollo post-embriionario (Xu et al., 2006).

### **Gránulos de estrés (SGs)**

Los gránulos de estrés (SGs) son agregados citoplasmáticos de silenciamiento de ARNm que contienen transcritos que son excluidos transitoriamente del *pool* activo de traducción. Estos cuerpos son inducidos en respuesta a eventos de estrés celular, como por ejemplo estrés por calor, estrés oxidativo o estrés por radiación UV; estos desencadenan el silenciamiento de la traducción global por muchas vías, incluyendo la fosforilación del factor de iniciación de la

traducción eIF2 $\alpha$  por quinasas específicas y el clivaje de ARNt, entre otras (Thomas et al., 2011). En respuesta a estrés, las células eucariotas reprograman el metabolismo del ARNm para reparar el daño inducido por estrés y adaptarse a las nuevas condiciones. Durante este proceso, la traducción de los ARNm que codifican para proteínas *house keeping* es abortada, mientras que la de las chaperonas moleculares y enzimas involucradas en reparar el daño es aumentada. El reclutamiento selectivo de ARNm específicos a SGs se cree que serviría para regular su estabilidad y traducción (Anderson y Kedersha, 2002). Se han sugerido a los SGs como sitios de clasificación donde los ARNm son enviados a almacenamiento, re-iniciación o degradación por transferencia a PBs (Kedersha et al., 2005).

En *Nicotiana plumbaginifolia* y *Arabidopsis thaliana* se han identificado dos proteínas nucleares (UBP1 y RBP47) relacionadas con TIA-1 de mamíferos (Lambermon et al., 2000), como componentes de *splicing* de pre-ARNm. Estas proteínas también contienen el dominio asociado a prion rico en glutamina (PRD) además de 3 motivos de reconocimiento a ARN (RRM) que comparten cierta homología de secuencia con la proteína TIA-1 de humanos (Weber et al., 2008). Weber y colaboradores estudiaron la localización de las proteínas UBP1, RBP47, factores de inicio de la traducción y ARNm poli A<sup>+</sup>, encontrando que los mismos son reclutados a estructuras citoplasmáticas del tipo SGs, cuando las células son tratadas con calor; sin embargo, esta localización se ve afectada cuando las mismas son tratadas con cicloheximida, lo que estaría indicando que los SGs poseen un intercambio dinámico con los polisomas, y que su ensamblado depende de la liberación de mRNPs no traducidos de polisomas. Estos resultados son similares a los observados para células de mamífero, aportando evidencia de la existencia de SGs en plantas (Figura 6).



**Figura 6** - La formación de SGs depende de ARNm no traducibles, y el reclutamiento de Rbp47 y Ubp1. Protoplastos de mesófilo de tabaco transformados con los plásmidos GFP-RBP47 y GFP-UBP1 fueron incubados en condiciones normales o estresados por calor 30 min a 39°C. Con flechas se indica la posición de los núcleos. Análisis de localización de las proteínas RBP47 y UB1, en condiciones normales y bajo tratamiento con cicloheximida (100 µg/ml) por 15 min, y luego tratamiento con calor por 30 min a 39°C. Adaptado de Weber et al., 2008.

De manera similar a lo reportado en mamíferos (Kedersha et al., 2000), los SGs de plantas se forman bajo distintas condiciones de estrés, como estrés por calor y arsenito, y se desensamblan durante el período de recuperación. Los gránulos de estrés de plantas sirven de lugares de almacenamiento para mRNPs no traducidos liberados de complejos ribosomales.

La dinámica de los PBs en el control del destino de los ARNm podría relacionar funcionalmente a los PBs con otras estructuras citoplasmáticas que contengan ARNm, como los SGs. La proximidad física entre SGs/HSGs y PBs ha sido estudiada en células humanas y *Arabidopsis* (Kedersha et al., 2005; Weber et al., 2008). Esta proximidad sería necesaria para el movimiento apropiado de los ARNm luego de ser liberados de los polisomas o para facilitar el intercambio de ARNm y proteínas en un espacio subcelular confinado. Como la formación de los SGs es desencadenada por estrés, éstos deben proteger a los transcritos durante el período de estrés y luego reiniciar la traducción una vez que las condiciones sean favorables. Si la traducción de algunos transcritos agregados en SGs no es requerida,

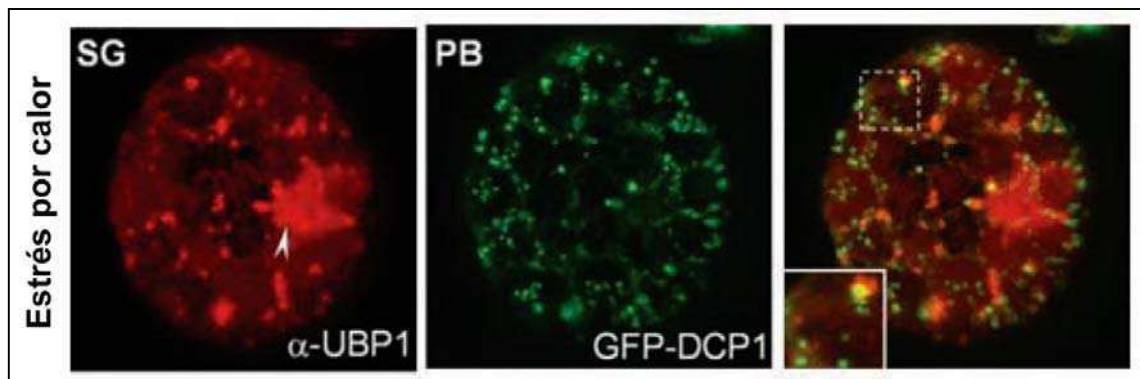


entonces la proximidad entre los cuerpos podría facilitar el transporte y el decaimiento en PBs.

### Relación entre cuerpos de procesamiento y gránulos de estrés

Los SGs y PBs son estructuras citoplasmáticas discretas que comparten algunas proteínas y componentes de ARNm así también como algunas propiedades funcionales. Ambas estructuras son inducidas por estrés pero son reguladas por distintos eventos de señalización, y cada uno puede existir de manera independiente del otro.

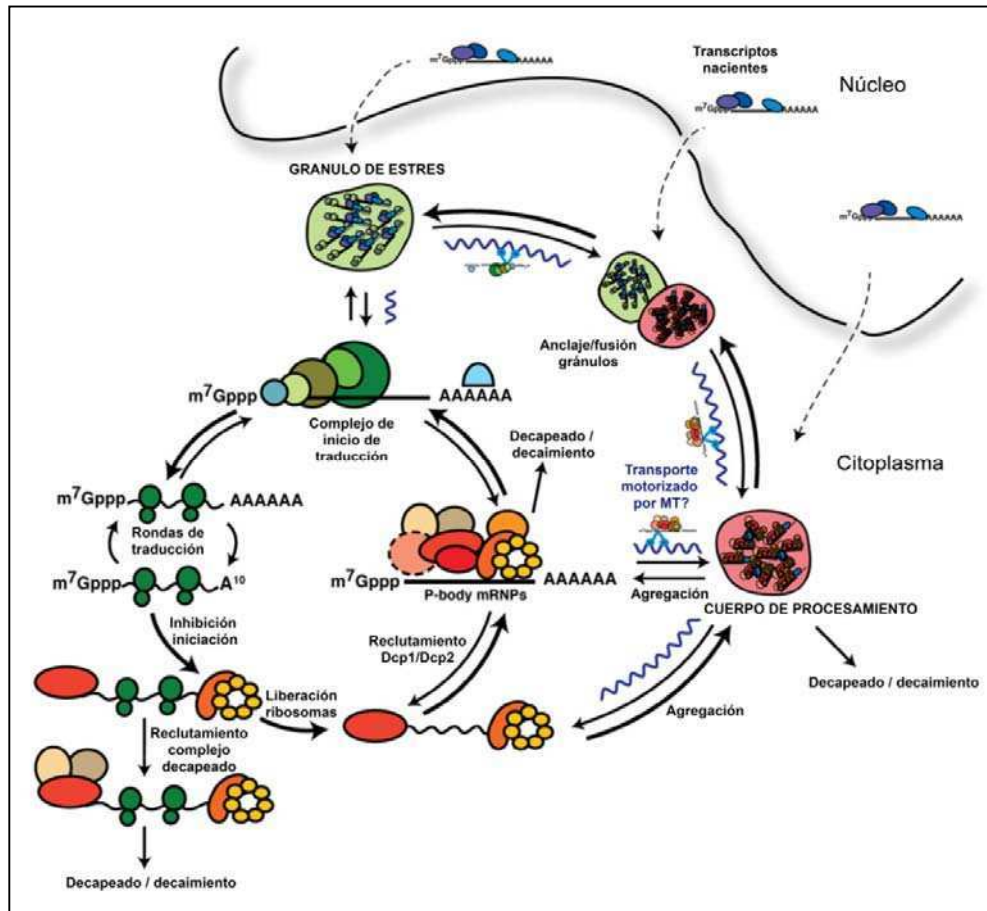
En protoplastos de tabaco se estudió cómo es la relación entre los PBs y los SGs. Para esto se realizaron análisis de co-localización mediante marcación de la proteína UBP1 (marcadora de SGs) y de DCP1 (como marcadora de PBs) (Figura 7). Se demostró una localización cercana de estas dos proteínas en el citoplasma sugiriendo que ambas estructuras no tendrían una relación funcional directa; un resultado similar fue reportado en células de mamífero (Kedersha et al., 2005). Este resultado sugiere que las mRNPs son transferidas directamente de SGs a la maquinaria de degradación de PBs (Weber et al., 2008).



**Figura 7** - Los cuerpos de procesamiento y los gránulos de estrés son distintas estructuras citoplasmáticas. Para estudiar la co-localización de PBs y SGs los protoplastos fueron tratados con calor a 41°C por 30 min. Para la detección de PBs se transformaron protoplastos con el plásmido de expresión *GFP-DCP1*. Los SGs fueron detectados por inmunofluorescencia indirecta, por marcación de UBP1 endógeno. En el panel de la derecha (ver ampliación) se observa que en parte las proteínas DCP1 y UBP1 se encuentran co-localizando y cercanas. Punta de flecha: núcleo. Adaptado de Weber et al., 2008.

Buchan y colaboradores proponen un modelo en el cual postulan un ciclo de mRNPs citoplasmáticas en el que hay un intercambio de ARNm entre polisomas, cuerpos de procesamiento y gránulos de estrés (Buchan y Parker, 2009) (Figura 8). Las mRNPs que se localizan en cuerpos de procesamiento pueden ser remodeladas y luego acumuladas en gránulos de estrés, los cuales tendrían un importante rol en la clasificación para determinar si un ARNm es almacenado, degradado o si reinicia la traducción. Por otro lado, los ARNm podrían localizarse en gránulos de estrés directamente, sin pasar por el estado de cuerpo de procesamiento.

El ensamblado de gránulos de estrés se encuentra regulado principalmente por tres factores. En primer lugar, la modificación de proteínas que regula la interacción y la función de muchos componentes mRNPs de gránulos de estrés. Por otro lado, los dominios de interacción proteína-proteína regulan el ensamblado en varias proteínas de unión a ARN. Finalmente, la red de microtúbulos es un factor importante en el ensamblado de los gránulos de estrés.



**Figura 8** - Modelo integrativo de gránulos de estrés y cuerpos de procesamiento, en un ciclo de mRNP. Modelo hipotético de las transiciones de mRNPs, particularmente durante estrés. Las líneas punteadas indican posibles destinos de los transcritos nacientes exportados. Las líneas violetas onduladas representan microtúbulos y su posible contribución a la agregación de gránulos del transporte motorizado dineína/kinesina, y/o el movimiento de mRNPs entre diferentes estados de mRNPs. Adaptado de Buchan y Parker, 2009.

Los PBs y SGs muestran un alto grado de movilidad cuando se encuentran aislados, pero son menos móviles cuando se encuentran unidos, y esta interacción es promovida por la proteína desestabilizante de ARNm TTP. La relación dinámica entre SGs y PBs muestra la importancia de la compartimentalización en la regulación del destino de los ARNm en el citoplasma (Kedersha et al., 2005).

Como hipótesis de trabajo de esta tesis planteamos que los ARNm *at59* y *sksl4* de *Arabidopsis thaliana*, pertenecientes al grupo tardío de transcritos de polen, se acumulan en cuerpos citoplasmáticos, cuerpos de procesamiento y gránulos de estrés durante los estadios finales del desarrollo del grano de polen.

## Objetivos

---

- Caracterizar la dinámica de Cuerpos de Cajal durante el desarrollo del grano de polen de *Arabidopsis thaliana*.
- Identificar y caracterizar funcionalmente el proceso de almacenamiento de los ARNm *at59* y *sksl4* en granos de polen maduro antes del inicio de la germinación.
- Estudiar la existencia de cuerpos de procesamiento y gránulos de estrés en polen maduro de *Arabidopsis* como sitios potenciales donde los ARNm *at59* y *sksl4* de polen podrían almacenarse y esperar a ser traducidos luego que el polen germine.

# Materiales y Métodos

---

## 1. Cepas bacterianas

### 1.1. Conservación de cepas bacterianas

En el caso de clones bacterianos, se mezcló en un tubo *Eppendorf* un volumen de cultivo crecido durante toda una noche con una solución de glicerol estéril, hasta alcanzar una concentración final de 10-20% de glicerol. Los *stocks* bacterianos se guardaron a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

### 1.2. *Escherichia coli*

#### 1.2.1. Condiciones de cultivo

Se utilizaron las cepas DH5 $\alpha$  y DH10 $\beta$  de *E. coli*. Los cultivos líquidos se desarrollaron a  $37^{\circ}\text{C}$  en medio LB (peptona de caseína o triptona 10 g/l, extracto de levadura 5 g/l, y NaCl 5 g/l) con agitación a 250 r.p.m. Los cultivos sólidos se realizaron en placas de Petri a  $37^{\circ}\text{C}$ , en medio LB adicionado con 1,5% de agar. De acuerdo con la resistencia conferida por cada vector, el medio de cultivo se suplementó con ampicilina (100 mg/l), kanamicina (50 mg/l), estreptomycinina (100 mg/l) o espectinomycinina (100 mg/l).

#### 1.2.2. Preparación de bacterias *E. coli* DH5 $\alpha$ y DH10 $\beta$ electro-competentes

Se inoculó 1l de medio LB con un cultivo crecido durante toda la noche (dilución 1/100) a partir de una colonia de *E. coli*. El cultivo se incubó con agitación a 250 r.p.m. a  $37^{\circ}\text{C}$  hasta alcanzar una D.O.<sub>600nm</sub> de 0,6-0,8. Posteriormente, se colocó el cultivo en hielo durante 15 min y se centrifugaron las células a 3000 r.p.m. durante 15 min a  $4^{\circ}\text{C}$ . Luego, se removió el sobrenadante y se resuspendió el *pellet* con 600 ml de solución de Glicerol 10% estéril y pre-enfriada y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones. El procedimiento de centrifugación y lavado del *pellet* se repitió dos veces, utilizando 400 y 250 ml de glicerol 10%. Finalmente, el *pellet* se resuspendió en 1,5 ml de glicerol 10%. Las células se

fraccionaron en alícuotas de 50  $\mu$ l, se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido y se guardaron a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

### **1.2.3. Transformación de células electro-competentes de *E. coli***

Se dejó descongelar un tubo *Eppendorf* con 50  $\mu$ l de bacterias electrocompetentes y se agregó 1 o 2  $\mu$ l de la reacción de ligación o recombinación. Se mezcló bien y se traspasó la mezcla en una cubeta de electroporación fría de 0,1 cm. Se colocó la cubeta en el electroporador (*Micro pulser, Bio-Rad*) y se dio un pulso a 1,8 kV. Inmediatamente se agregó 250  $\mu$ l de SOC (2% peptona, 0,5% extracto de levadura, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 20 mM glucosa) sin antibiótico; las bacterias se resuspendieron rápidamente y se incubaron durante 1 hora a  $37^{\circ}\text{C}$  con agitación a 250 r.p.m. Luego, se rastrillaron 50 y 100  $\mu$ l de la solución bacteriana en placas de Petri con LB agar y el antibiótico requerido en la concentración adecuada.

## **1.3. *Agrobacterium tumefaciens***

### **1.3.1. Cepas y condiciones de cultivo**

Se utilizó la cepa EHA105 que tiene resistencia genómica a rifampicina. Los cultivos de *A. tumefaciens* se realizaron en medio LB suplementado con rifampicina (100 mg/l) y se incubaron con agitación durante toda la noche a 250 r.p.m. y  $28^{\circ}\text{C}$ .

### **1.3.2. Preparación de células competentes de *A. tumefaciens***

Para la preparación de células de *Agrobacterium* competentes, se partió de una colonia aislada y se inició con ésta un cultivo en 3 ml de medio LB suplementado con el antibiótico correspondiente a la cepa utilizada. El cultivo se incubó con agitación durante toda la noche a 100-150 r.p.m. y a  $28^{\circ}\text{C}$ . Se utilizaron 2 ml de este pre-cultivo para inocular 50 ml de medio LB fresco, el cual se incubó en las mismas condiciones por 12-16 horas hasta alcanzar una  $\text{D.O.}_{600\text{nm}}$  de 0,5-1, correspondiente con la fase exponencial de su crecimiento. Las células se centrifugaron a 5.000 g por 5 min a  $4^{\circ}\text{C}$  y se resuspendieron en 8 ml de HEPES/KOH 1 mM a  $4^{\circ}\text{C}$ . Las células se centrifugaron nuevamente a 5.000 g por 5 min a  $4^{\circ}\text{C}$  y se repitió el lavado 2 veces más. Luego, se removió el sobrenadante y se resuspendió el *pellet* con 8 ml de glicerol 10% a  $4^{\circ}\text{C}$  y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones. Finalmente, el *pellet*

se resuspendió en 600 µl de glicerol 10%. Las células se fraccionaron en alícuotas de 50 µl, se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido y se guardaron a -70°C.

### **1.3.3. Transformación de células competentes de *A. tumefaciens***

Se agregaron entre 100-250 ng del ADN de interés a 50 µl de células competentes previamente descongeladas. Una vez agregado el ADN, la mezcla se mantuvo en hielo por 10 min. Las células se transformaron por electroporación utilizando las mismas condiciones detalladas en la Sección 1.2.3. La recuperación de las células se efectuó por agregado de 950 µl de medio LB líquido e incubación durante 1 h a 28°C. Las células transformantes se seleccionaron sembrando 50 µl de suspensión bacteriana en medio LB sólido suplementado con los antibióticos correspondientes luego de una incubación de 48 h a 28°C.

### **1.3.4 Transformación de *Arabidopsis* mediante *A. tumefaciens***

Se utilizó el protocolo descrito por Zhang et al., 2006. Brevemente, a partir de una colonia de EHA105 transformada previamente con la construcción de interés y confirmada su transformación por PCR, se inoculó un pre-cultivo de 3 ml que se cultivó por 48 h a 28°C en agitación a 200 r.p.m. Con el pre-cultivo se inocularon 500 ml de LB (dilución 1/100) suplementado con rifampicina (100 mg/l) y los antibióticos correspondientes con la resistencia otorgada por la construcción de interés: kanamicina (50 mg/l) para el vector binario pK7WG2D (cedido por la Dra. Alicia Zelada, IBBEA-CONICET), y estreptomycinina (100 mg/l) y espectinomicina (100 mg/l) para pZY03 (cedido por la Dra. Sheila McCormick, UC-Berkeley, EEUU). Se incubó durante 16 horas en las mismas condiciones. Pasado este tiempo, se confirmó una D.O.<sub>600nm</sub> de 0,5-0,8 y se centrifugó por 10 min a 4.000 g. Luego, las bacterias se resuspendieron en 500 ml de medio de inoculación (5% sacarosa, 0,02% *silwet L-77* (Lehle Seeds) y se vertió en una bandeja plástica donde se sumergieron las flores de *Arabidopsis* durante 10 segundos, dos veces seguidas dejando escurrir el medio de inoculación excedente. Para aumentar la frecuencia de transformación, este procedimiento se repitió 2 veces, separado por un intervalo de 7 días. Las plantas transformadas se dispusieron en posición horizontal envueltas en papel transparente para conservar la humedad y reparadas de la luz durante 1 día. Luego, se continuó con el crecimiento normal de las plantas hasta cosechar las semillas.

## 2. Material vegetal

### 2.1. Elección de *Arabidopsis thaliana* como sistema de estudio

Las plantas de *Arabidopsis* presentan varias ventajas comparativas con cualquier otra planta que se quiera utilizar como modelo:

- Genoma pequeño, distribuido en sólo 5 cromosomas. Su genoma se encuentra completamente secuenciado desde diciembre de 2000 (*Arabidopsis* Genome Initiative, 2000) (125 Mb total; alrededor de 28.000 genes. El 70% tiene ya una función asignada).
- Ciclo de vida corto: en nuestras condiciones de crecimiento, de alrededor de 9 semanas, entre la germinación y la aparición de semillas maduras.
- Fácil producción de semillas y fácil cultivo en condiciones de laboratorio. No requiere mucho espacio.
- Transformación eficiente con *Agrobacterium tumefaciens*.
- Genoma saturado de líneas mutantes disponibles.
- Numerosa información disponible proveniente de microarreglos. Además aporta la posibilidad de realizar microarreglos propios.

Sin embargo presenta la desventaja de su tamaño pequeño como limitante para estudiar en forma bioquímica sus tejidos; específicamente el trabajo con polen representa un desafío.

Si bien *Arabidopsis* no ofrece un interés peculiar como planta de cultivo sus genes han sido encontrados en casi todas las especies de valor agronómico, facilitando la transferencia de ingeniería vegetal.

### 2.2. *Arabidopsis* y condiciones de crecimiento

Se utilizaron plantas de *Arabidopsis thaliana*, ecotipo Columbia 0 (Col-0). En todos los casos las semillas fueron previamente esterilizadas, se sembraron en placa conteniendo medio de cultivo (Murashige & Skoog (1962) 0,5X, 1% sacarosa y 0,8% agar), y se conservaron en oscuridad a 4°C durante 3-5 días para sincronizar su germinación.



Cuando se cultivaron las líneas mutantes simples de inserción de ADN-T *dcp1-040*, *vcs-147* y *atx-2-060*, se utilizaron placas con medio MS 0,5X, 1% sacarosa, 0,8% agar, suplementadas con kanamicina 50 mg/l.

Luego, las semillas fueron germinadas en cámara de crecimiento vegetal en condiciones normales de luz y temperatura, 150  $\mu\text{mol}/\text{seg} \times \text{m}^2$  a 22°C, con fotoperíodo de día largo (16/8 hs luz/oscuridad) y 60% de humedad relativa. Después de 7-10 días de germinadas las semillas, las plántulas se trasplantaron a macetas con sustrato inerte (*Terrafertil Grow Mix Multipro*) y se las crecieron en cámaras de cultivo en las condiciones de luz, temperatura, y humedad descritas. Las plantas fueron regadas 3 veces por semana con agua corriente.

### 2.3. Líneas mutantes simples de inserción de ADN-T

Las mutantes simples de inserción de ADN-T *Arabidopsis thaliana* (ecotipo Columbia-0) para el gen *AtDCP1* (At1g08370): SALK\_040521.52.95.x (designada como *dcp1-040*), para el gen *AtVCS* (At3g13300): SALK\_147270.46.60.x (*vcs-147*) y para el gen *AtATX-2* (At1g54170): SALK\_060298.19.25.n (*atx-2-060*), fueron adquiridas del *Arabidopsis Biological Resource Center* (ABRC: <http://abrc.osu.edu/>). Se obtuvieron plantas homocigotas por cruzamientos manuales para cada una de las líneas y se corroboraron mediante genotipificación por PCR. Se analizaron cada una de las mutaciones en la segunda generación F2.

#### 2.3.1. Genotipificación

Para la genotipificación de cada línea mutante de inserción se diseñaron dos *primers* (LP y RP) específicos para la secuencia flanqueante a la inserción. Los *primers* se diseñaron a partir de las líneas utilizando el software “*iSect primer design tool*” disponible en SIGnAL; <http://signal.salk.edu>, (Alonso y Stepanova, 2003). El *primer* LBa1 es específico del borde izquierdo del ADN-T de las líneas SALK.

Para cada planta se efectuaron dos reacciones de PCR. La primera, con los *primers* LP+RP que pone de manifiesto el alelo salvaje y por lo tanto sólo estará presente en plantas salvajes y heterocigotas. La segunda, con los *primers* RP+LBA1, evidencia el alelo que sufrió la inserción, estando presente tanto en plantas homocigotas como heterocigotas para la inserción.

Línea ADN-T	Primer (Seq 5'a 3')	Condiciones de PCR	Producto Obtenido (pb)
<b>dcp1-040</b>	014LP: GATTCCTCGTCTTCTTGGTCC	Ta: 56°C por 30 seg	LP+RP 1027
	064RP: GATCCTTCAACGTCCTTACGAC	Extensión: 72°C por	LB+RP 489-
	LBa1: TGGTTCACGTAGTGGGCCATCG	80 seg	789
<b>vcs-147</b>	147LP: CATTATGGGAATCTGGTGTGG	Ta: 54°C por 30 seg	LP+RP 1113
	147RP: TCGGTACACGAATAGGACCTG	Extensión: 72°C por	LB+RP 503-
	LBa1: TGGTTCACGTAGTGGGCCATCG	80 seg	803
<b>atx-2-060</b>	060LP: AGTTGAGCTCGAATTTTGGG	Ta: 55°C por 30 seg	LP+RP 1123
	060RP: TACGAAAGACACAACTTGCG	Extensión: 72°C por	LB+RP 553-
	LBa1: TGGTTCACGTAGTGGGCCATCG	80 seg	853

**Tabla 1** - Lista de *primers* utilizados para genotipificar las líneas de inserción de ADN-T por PCR para la obtención de plantas homocigotas de cada una de ellas por cruzamiento y análisis de su descendencia.

### 3. Plásmidos y construcciones

Todos los clonados que se realizaron en esta tesis respetaron el esquema protocolar detallado a continuación. Solamente se variaron los materiales usados en las construcciones (insertos, vectores, enzimas de restricción, antibióticos) y se especifican en cada caso.

#### 3.1. Clonado por restricción y ligada

##### 3.1.1. Amplificación de secuencias por PCR

Las secuencias se amplificaron con la enzima polimerasa *Pfx Platinum* (Invitrogen, California, EEUU), de acuerdo al protocolo sugerido y con los *buffers* suministrados. En cada reacción se utilizaron 30-100 ng de ADN como molde, *buffer* de reacción 2X, MgSO<sub>4</sub> 1 mM, dNTPs 300 µM, 0,3 µM de cada *primer forward* y *reverse* y 1 unidad de ADN polimerasa *Pfx Platinum*, en 50 µl de volumen de reacción. El ciclado se realizó de la siguiente manera:

<b>Desnaturalización inicial</b>	95°C	5 min
<b>Ciclado 35 a 40 ciclos</b>	95°C	30 seg
	Ta	30 seg
	68°C	1 min/kb
<b>Extensión final</b>	68°C	5-10 min

**Tabla 2** - Esquema de ciclado para reacciones de amplificación por PCR con la enzima polimerasa *Pfx Platinum* (Invitrogen, California, EEUU).

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 *web* <http://idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer> y se utilizó una Ta 5°C menor que la del *primer* con menor Tm. Los productos de PCR se analizaron por electroforesis en geles de agarosa 0,7-2% p/v dependiendo del tamaño de producto esperado en *buffer* TAE 1X, conteniendo 1 µg/ml de bromuro de etidio para su visualización por exposición a la luz UV en un transiluminador.

### 3.1.2. Restricción de insertos y vectores

Los productos de PCR y vectores fueron digeridos con enzimas de restricción (Promega, Madison, WI, EEUU), siguiendo las condiciones sugeridas por los fabricantes. En algunos casos, los vectores de clonado digeridos fueron además tratados con la enzima fosfatasa alcalina termosensible TSAP (Promega, Madison, WI, EEUU), la cual remueve el grupo 5'fosfato del ADN, impidiendo su re-circularización y re-ligación.

### 3.1.3. Purificación de insertos y vectores

Los productos de PCR y vectores digeridos se identificaron por electroforesis en gel de agarosa en *buffer* TAE 1X (ver Sección 3.1.1). Se cortaron del gel las bandas correspondientes, y se purificaron utilizando el *kit* comercial *QIAEXII Gel Extraction Kit* (QIAGEN, Alemania), de acuerdo al protocolo del fabricante. Los productos de PCR utilizados en reacciones de ligación sin restricción previa, se purificaron directamente con el *kit* comercial “*Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit*” (GE Healthcare Lifesciences, EEUU), siguiendo las especificaciones del fabricante.

### 3.1.4. Ligaciones inserto – vector

Las secuencias amplificadas por PCR o productos de restricción purificados y los vectores destino digeridos y purificados fueron ligados con la enzima T4 ligasa (Promega, Madison, WI, EEUU), de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Se utilizaron de 20 a 100 ng de vector, reacciones molares de inserto vector 3:1 para todas las ligaciones y 10 unidades de enzima, en un volumen final de reacción de 10 µl. Las reacciones se incubaron a 4°C durante toda la noche.

### 3.1.5. Transformación bacteriana

Se transformaron 50 µl de bacterias *Escherichia coli* DH10β o DH5α electro-competentes con 1 o 2 µl de la reacción de ligación o recombinación en cubetas 0,1 cm (Bio Rad) por electroporación. A continuación se agregaron 250 µl de medio de cultivo SOC y se incubaron sin antibiótico durante 1 hora a 37°C. Luego, se rastrillaron 50 y 100 µl de la solución bacteriana en placas de Petri con LB agar y el antibiótico requerido en la concentración adecuada.

### 3.1.6. Confirmación de clones positivos

Se analizaron al menos 10 colonias de las placas de transformación mediante PCR *colony* con la enzima Taq Polimerasa Recombinante (Invitrogen, Brasil) y los mismos *primers* específicos indicados para amplificar el inserto.

### 3.1.7. Amplificación de las construcciones plasmídicas

Las colonias confirmadas fueron amplificadas mediante cultivo en 4 ml de medio LB líquido con el antibiótico correspondiente. A partir de los cultivos se realizaron las purificaciones plasmídicas con el *QIAprep Spin Miniprep Kit* (QIAGEN, Alemania), de acuerdo al protocolo del fabricante.

### 3.1.8. Restricción de las construcciones plasmídicas

A partir de los plásmidos confirmados purificados, se corroboró la presencia de los insertos de interés mediante digestión con las mismas enzimas de restricción previamente utilizadas para el clonado (Promega, Madison, WI, EEUU) y electroforesis en gel de agarosa 1%.

### 3.1.9. Secuenciación de las construcciones plasmídicas

A partir de los plásmidos confirmados por PCR *colony* y restricción, se corroboró la secuencia de los insertos de interés mediante secuenciación (Macrogen Inc., Corea del Sur). Los análisis de secuencias obtenidas se realizaron utilizando el sitio web BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

## 3.2. Clonado por recombinación homóloga

Alternativamente, se generaron vectores binarios por recombinación homóloga utilizando vectores del sistema Gateway® y la enzima LR recombinasa (Invitrogen, California, EEUU), siguiendo el protocolo propuesto por el fabricante. Se utilizaron vectores de entrada pENTR1A (Invitrogen, California, EEUU), previamente clonados con las secuencias de interés entre los sitios de recombinación attL, y los vectores de destino binarios pZY03 y pK7WG2D que poseen los sitios de recombinación attR. Además, los vectores de entrada y de destino poseen el gen letal *ccdB*, el cual favorece ampliamente el muestreo de clones positivos. Luego, se procedió con el protocolo de transformación bacteriana, confirmación de clones por PCR *colony*, restricción y secuenciación, de manera similar a la señalada en las secciones 3.1.5 a 3.1.9.

## 3.3. Proteína marcadora de Cuerpos de Cajal

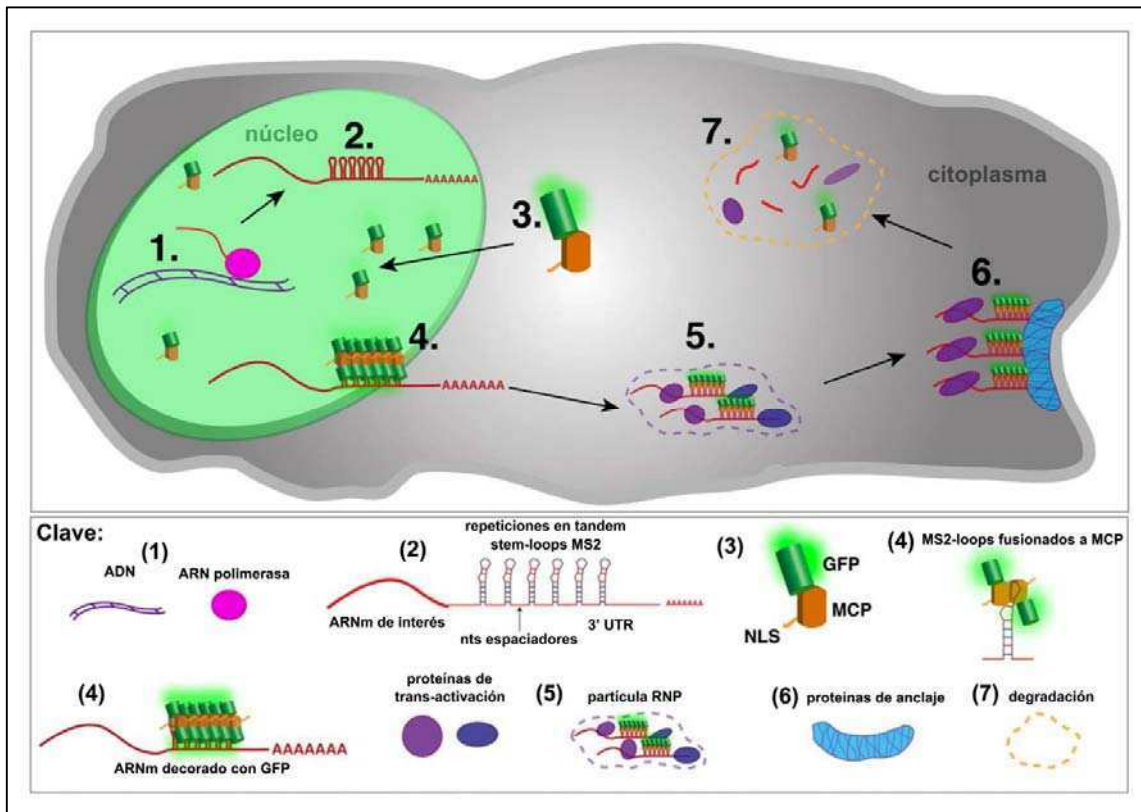
Los estudios realizados para estudiar la dinámica de los Cuerpos de Cajal fueron llevados a cabo con la construcción *pCoilin-Coilin-YFP*, gentilmente cedida por los doctores Alison Pendle y Peter Shaw (John Innes Centre, Colney, Norwich NR4 7UH, United Kingdom) y David Spector (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York 11724, EEUU).

### 3.4. Líneas de seguimiento de ARNm

Uno de los métodos más utilizados para seguir ARN mensajeros (ARNm) en muestras fijadas es la Hibridación in situ fluorescente (FISH), pero este presenta la desventaja de no poder seguir el movimiento de los mensajeros en vivo ya que no posee resolución temporal. Teniendo en cuenta esto, Bertrand y colaboradores desarrollaron un método en levadura que se basa en la fuerte asociación, casi irreversible, de la proteína de la cápside del bacteriófago MS2 (MCP) con estructuras de 19 nucleótidos de ARN que poseen el codón de inicio del gen de replicasa del fago (*loops* de MS2) (Bertrand et al., 1998).

#### 3.4.1. Sistema MS2

El sistema consiste en dos construcciones. La primera posee la secuencia de GFP fusionada a la proteína de cápside del fago MS2 (MCP) y una señal de localización nuclear para favorecer la visualización de los ARNm en el citoplasma. En la segunda construcción, seis sitios de la región de unión de MS2 ubicados en tándem (cada uno conteniendo *loops* de ARN de 19 nucleótidos) se insertan río abajo del ARNm a estudiar. El hecho de colocar seis sitios para la unión de MS2 provee una señal aumentada del pegado de GFP (Bertrand et al., 1998). Se han desarrollado variantes en el número de sitios para aumentar la señal de GFP, como 12, 24 y hasta 48 copias de los *loops* (Lionnet et al., 2011). En el esquema de la Figura 9 se detallan los pasos involucrados en el seguimiento en tiempo real de los ARNm.



**Figura 9** – Esquema que detalla el sistema MS2. La ARN polimerasa transcribe al ARN en el núcleo conteniendo los *loops* de MS2 (1 y 2). La proteína de la cápside (MCP) junto al GFP se traduce en el citoplasma y la misma es enviada al núcleo por la señal de localización nuclear (3). MCP-GFP se une como dímero a los *loops* de MS2 (4). El ARNm marcado forma complejos de ribonucleoproteínas (RNP) con factores de transactivación. Estas partículas incluyen estabilizadores, proteínas de control de la traducción y proteínas de localización (5). El ARNm es llevado al destino celular (6). Luego de la traducción, los ARNm son degradados (7). Modificado de Weil et al., 2010.

Una ventaja que presenta este sistema frente a la marcación con GFP de proteínas de unión a ARN es que MCP-GFP se une de manera específica a los ARNs que contengan los *loops* de MS2, mientras que las proteínas de unión a ARN se unen a varios ARNm (Querido y Chartrand, 2008). A pesar de que fue desarrollado en levaduras, el sistema ha sido ampliamente utilizado de manera eficiente en plantas (Hamada et al., 2003; Sambade et al., 2008; Zhang y Simon, 2003). En este trabajo decidimos utilizarlo pues permite seguir en vivo a los ARNm a través de la célula marcando de manera específica el mensajero en estudio.

### 3.4.2. Líneas MS2

En este trabajo nos propusimos estudiar la localización de los mensajeros *sk514* y *at59*. Las construcciones se realizaron a partir del clonado de dichos genes incluyendo sus 5'UTRs, ya que como se detalló en la introducción, la regulación de la traducción de estos mensajeros se encontraría determinada por esta región.

El procedimiento de clonado consistió en amplificar la región correspondiente a *MCP-GFP* del vector *pMS2-GFP* (Addgene plasmid #27121) usando la ADN Polimerasa *Pfx* (Invitrogen, California, EEUU) y los *primers forward MCP-left* y *reverse MCP-right*. Dicho fragmento fue clonado mediante corte y ligado con las enzimas de restricción *NheI* y *XbaI* (Promega, Madison, WI, EEUU) en el vector pZD05, río abajo del promotor LAT52, el cual es un promotor fuerte, específico de polen de tomate (Muschiatti et al., 1994) y activo en polen de *Arabidopsis thaliana*. A continuación se amplificó la región *pLAT52-MCP-GFP* mediante PCR con *primers* específicos (*forward LAT52-MCP-left* y *reverse LAT52-MCP-right*) y se clonó mediante corte y ligado con las enzimas de restricción *NheI* y *XbaI* (Promega, Madison, WI, EEUU) en el vector pENTR1a (Invitrogen, California, EEUU), para finalmente clonarlo mediante recombinación homóloga por la recombinasa LR (Invitrogen, California, EEUU) en el vector destino pK7WG2D obteniendo el vector *pLAT52-MCP-GFP*, el cual fue utilizado como línea control. Por otro lado se amplificaron los genes *SKS14* y *AT59* de ADNg de hojas de plantas salvajes usando la ADN Polimerasa *Pfx* (Invitrogen, California, EEUU) y los *primers forward SKS14-F* y *AT59-F* y *reverse SKS14-R* y *AT59-R*, y mediante corte con las enzimas de restricción *EcoRI* y *BamHI* (Promega, Madison, WI, EEUU) fueron clonados en el vector pSL-MS2-12X (Addgene plasmid # 27119). El siguiente paso consistió en amplificar las regiones *SKS14-MS2-12X* y *AT59-MS2-12X* con los *primers forward SKS14-MS2-left* y *AT59-MS2-left* y *reverse SKS14-MS2-right* y *AT59-MS2-right* y clonarlos mediante corte y ligación con las enzimas de restricción *NheI* y *NdeI* (Promega, Madison, WI, EEUU) en el vector pZD05, río abajo del promotor LAT52. A continuación se amplificó toda la región *pLAT52-SKS14-MS2-12X* y *pLAT52-AT59-MS2-12X* por PCR con *primers forward LAT52-MS2-12X-left* y *reverse LAT52-MS2-12X-right* para clonarlo definitivamente por corte y ligación con la enzima *SpeI* (Promega, Madison, WI, EEUU) en el vector final *pK7WG2D-pLAT52-MCP-GFP*. Las construcciones finales *pLAT52-MCP-GFP / pLAT52-SKS14-MS2-12X* y *pLAT52-MCP-GFP / pLAT52-AT59-MS2-12X* fueron confirmadas por secuenciación (Macrogen Inc, Corea del Sur) y transferidas a plantas salvajes de *Arabidopsis thaliana* (Col-0) por medio de la transformación con *Agrobacterium*



*tumefaciens* (cepa EHA105) por el método de *floral dip* (ver sección 1.3.4). Las líneas transgénicas fueron seleccionadas en placas con medio de cultivo MS 0,5X 1% sacarosa con Kanamicina 50 mg/l y confirmadas por PCR con *primers* específicos para GFP.

Amplificación de la secuencia MCP-GFP	
<b>Primers</b>	MCP-left: <u>GGGGCTAGC</u> cgttaaaatggcttctaac ( <u>NheI</u> Tm 61°C)
	MCP-right: GGGTCTAG <u>Attataccttctctctttttgg</u> ( <u>XbaI</u> Tm 57°C)
<b>ADN molde</b>	Vector MCP-GFP (Addgene)
Amplificación de la secuencia LAT52-MCP-GFP	
<b>Primers</b>	LAT52-MCP-left: <u>GGGGTACC</u> atactcgactcagaagg ( <u>KpnI</u> Tm 61,5°C)
	LAT52-MCP-right: GGGCTCGAG <u>gggtctagattataccttc</u> ( <u>XhoI</u> Tm 60,9°C)
<b>ADN molde</b>	Vector pZD05
Amplificación de genes <i>SKS14</i> y <i>AT59</i>	
<b>Primers</b>	SKS14-F: <u>GGGGAATT</u> Caaaaggattcattaagag ( <u>EcoRI</u> Tm 56°C)
	SKS14-R: GGGGGATCCgtaatgaaagcaaaactgg ( <u>BamHI</u> Tm 61,5°C)
<b>Primers</b>	AT59-F: <u>GGGGAATT</u> Caatctttaaaccggc ( <u>EcoRI</u> Tm 58,3°C)
	AT59-R: GGGGGATCCgatgaaagtattacgagg ( <u>BamHI</u> Tm 60,1°C)
<b>ADN molde</b>	ADNg de hojas de plantas salvajes
Amplificación de la secuencia <i>SKS14-MS2-12X</i> y <i>AT59-MS2-12X</i>	
<b>Primers</b>	SKS14-MS2-left: <u>GGGGCTAGC</u> aaaaggattcattaagagcaaaaacaagt ( <u>NheI</u> Tm 63,9°C)
	SKS14-MS2-right: CCCCATATGgcgctgatatcgatcgcgcgag ( <u>NdeI</u> Tm 66°C)
<b>Primers</b>	AT59-MS2-left: <u>GGGGCTAGC</u> aatctttaaaccggc ( <u>NheI</u> Tm 61,8°C)
	AT59-MS2-right: CCCCATATGgcgctgatatcgatcgcgcgag ( <u>NdeI</u> Tm 66°C)
<b>ADN molde</b>	Vector MS2-12X (Addgene)
Amplificación de la secuencia <i>LAT52-SKS14-MS2-12X</i> y <i>LAT52-AT59-MS2-12X</i>	
<b>Primers</b>	LAT52-MS2-12X-left: <u>CCCACTAGT</u> cctgcaggtcgacatactcgactc ( <u>SpeI</u> Tm 62°C)
	LAT52-MS2-12X-right: CCCACTAGTgcgctgatatcgatcgcgcgag ( <u>SpeI</u> Tm 66°C)
<b>ADN molde</b>	Vector pZD05
Genotipificación de plantas transgénicas	
<b>Primers</b>	GFP-F: GCGACGTAAACGGCCACAAG (Tm 60°C)
	GFP-R: CGTCCATGCCGAGAGTGATC (Tm 58°C)
<b>ADN molde</b>	ADNg de hojas de plantas transgénicas

**Tabla 3** - Reacciones de PCR y genotipificación realizadas para la construcción y confirmación de las líneas *pLAT52-MCP-GFP*, *pLAT52-MCP-GFP / pLAT52-SKS14-MS2-12X* y *pLAT52-MCP-GFP / pLAT52-AT59-MS2-12X*. Se indican los *primers* y los ADN molde empleados. Se subrayan los sitios de corte de las enzimas de restricción usadas para los clonados.

### 3.5. Proteínas marcadoras de cuerpos de procesamiento y gránulos de estrés

El procedimiento de clonado consistió en amplificar los genes *VCS* y *DCP1* pertenecientes a cuerpos de procesamiento y *ATX-2* perteneciente a gránulos de estrés a partir de ADN genómico de plantas salvajes de *Arabidopsis thaliana* utilizando la ADN Polimerasa *Pfx* (Invitrogen, California, EEUU) y los *primers* específicos *forward* y *reverse*, *VCS-F* y *VCS-R*, *DCP1-F* y *DCP-1-R* y *ATX-2-F* y *ATX-2-R*, respectivamente para cada uno de los genes. Estas secuencias fueron clonadas utilizando las enzimas de restricción *KpnI* y *NotI* para los genes *VCS* y *DCP1* y *BamHI* y *NotI* para el gen *ATX-2* (Promega, Madison, WI, EEUU) y posterior ligación en el vector *pENTR1A* (Invitrogen, California, EEUU), para finalmente clonarlo mediante recombinación homóloga por la recombinasa *LR* (Invitrogen, California, EEUU) en el vector destino *pK7WG2D*. Finalmente, se amplificó la secuencia *LAT52-RFP* utilizando los *primers forward* *LAT52-RFP-F* y *reverse* *LAT52-RFP-R* a partir del vector *pZD05* para clonarlo mediante corte con la enzima de restricción *SpeI* (Promega, Madison, WI, EEUU) y posterior ligación en cada uno de los vectores generados previamente, para obtener los vectores finales *pLAT52-RFP-VCS*, *pLAT52-RFP-DCP1* y *pLAT52-RFP-ATX-2*; dichos clones fueron confirmados por secuenciación (Macrogen Inc, Corea del Sur) y transferidos a plantas salvajes de *Arabidopsis thaliana* (Col-0) por medio de la transformación con *Agrobacterium tumefaciens* (cepa EHA105) por el método de *floral dip* (ver sección 1.3.4). Las líneas transgénicas fueron seleccionadas en placas con medio de cultivo MS 0,5X 1% sacarosa con Kanamicina 50 mg/l y confirmadas por PCR con *primers* específicos para RFP.

Amplificación de los genes <i>VCS</i> y <i>DCP1</i> (cuerpos de procesamiento)	
<b>Primers</b>	<i>VCS-F</i> : GGGGGTACCctatggcgtcttctctgg ( <u>KpnI</u> Tm 55°C)
	<i>VCS-R</i> : CCCGCGGCCGCcgaacaagaagagagaacgag ( <u>NotI</u> Tm 54°C)
<b>Primers</b>	<i>DCP1-F</i> : GGGGGTACCagatgtctcaaacgggaag ( <u>KpnI</u> Tm 53°C)
	<i>DCP1-R</i> : CCCGCGGCCGCgcagcttcattgttgaagtgc ( <u>NotI</u> Tm 57°C)
<b>ADN molde</b>	ADNg de hojas de plantas salvajes
Amplificación del gen <i>ATX-2</i> (gránulos de estrés)	
<b>Primers</b>	<i>ATX-2-F</i> : GGGGGATCCctatgaagcgttcttctact ( <u>BamHI</u> Tm 54°C)
	<i>ATX-2-R</i> : CCCGCGGCCGCctaataagagtcttcttcttgtatgg ( <u>NotI</u> Tm 55°C)
<b>ADN molde</b>	ADNg de hojas de plantas salvajes
Amplificación de la secuencia <i>LAT52-RFP</i>	
<b>Primers</b>	<i>LAT52-RFP-F</i> : CCCACTAGTcctgcaggtcgacatactcgactc ( <u>SpeI</u> Tm 62°C)
	<i>LAT52-RFP-R</i> : GGGACTAGTggcgccggtggagtggcggc ( <u>SpeI</u> Tm 72°C)
<b>ADN molde</b>	Vector <i>pZD05</i>

Genotipificación de plantas transgénicas	
<b>Primers</b>	RFP-F: gcctcctccgaggacgtcatc (Tm 62°C)
	RFP-R: gcggcgccggtggagtggcggc (Tm 70°C)
<b>ADN molde</b>	ADNg de hojas de plantas transgénicas

**Tabla 4** - Reacciones de PCR y genotipificación realizadas para la construcción y confirmación de las líneas pLAT52-RFP-VCS, pLAT52-RFP-DCP1 y pLAT52-RFP-ATX-2. Se indican los *primers* y los ADN molde empleados. Se subrayan los sitios de corte de las enzimas de restricción usadas para los clonados.

### 3.6. Generación de líneas transgénicas MS2 en plantas mutantes simples de inserción de ADN-T

Se procedió a transformar mediante el método de *floral dip* (ver sección 1.3.4) las plantas mutantes simples de inserción de ADN-T de *Arabidopsis thaliana* para los genes *VCS*, *DCP1* y *ATX-2*, detallados previamente en la sección 2.3, con las construcciones de seguimiento de mensajeros detalladas en la sección 3.4.2. Las líneas transgénicas fueron seleccionadas en placas con medio de cultivo MS 0,5X 1% sacarosa con Kanamicina 50 mg/l y confirmadas por PCR con *primers* específicos para GFP.

## 4. Caracterización molecular de genes

### 4.1. Extracción de ADN de plantas de *Arabidopsis*

Se cortaron dos hojas de cada planta con 6 o más hojas en su roseta. Se trituró el material vegetal en un tubo *Eppendorf* con un émbolo. Luego se homogeneizó con 350 µl de *buffer* de lisis (50 mM Tris-HCl pH 8; 10 mM EDTA pH 8; 100 mM NaCl; 1% SDS; 10 mM β-mercaptoetanol). Se incubó el tubo a 65°C durante 10 minutos y se añadió solución de neutralización (11% ácido acético; 3 M KCOOH) mezclando por inversión. Luego se incubó en hielo por 20 minutos y se centrifugó en frío a 16.000 g. El sobrenadante se traspasó a un nuevo tubo y se precipitó centrifugando por 15 minutos a 16.000 g con 1 volumen de isopropanol a 4°C.

Finalmente se lavó el *pellet* con etanol 80%, y cuando se evaporó el alcohol se resuspendió en 25 µl de agua y se conservó a -20°C. Se utilizó 1 µl de cada una de estas preparaciones para las reacciones de PCR.

## 4.2. Genotipificación de líneas mutantes y transgénicas por PCR

Se realizaron reacciones de PCR para seleccionar plantas homocigotas mutantes simples de inserción de ADN-T, transgénicas de expresión del sistema MS2 y expresión de proteínas.

La genotipificación de las plantas se realizó usando la enzima polimerasa Taq ADN polimerasa (Invitrogen, Brasil), de acuerdo al protocolo sugerido por el fabricante. En cada reacción se utilizó 1 µl de ADN purificado como molde (ver Sección 5.1.), el *buffer* de reacción suministrado 1X, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, dNTPs 200 µM, y 0,8 µM de cada *primer forward* y *reverse* y 1 unidad de Taq ADN polimerasa, en 25 µl de volumen de reacción. El ciclado se realizó de la siguiente manera:

<b>Desnaturalización inicial</b>	94°C	5 min
<b>Ciclado 35 a 40 ciclos</b>	94°C	30 seg
	Ta	30 seg
	72°C	1min/kb
<b>Extensión final</b>	72°C	5-10 min

**Tabla 5** - Esquema de ciclado para las reacciones de genotipificación por PCR con la enzima polimerasa Taq ADN polimerasa (Invitrogen, Brasil).

Se utilizó una temperatura de *annealing* (Ta) 5°C menor que la del *primer* con menor Tm. Los productos de PCR se analizaron por electroforesis en geles de agarosa 1% p/v en *buffer* TAE 1X, conteniendo 1 µg/ml de bromuro de etidio para su visualización por exposición a la luz UV en un transiluminador.

## 4.3. Recolección de polen maduro de Arabidopsis

Se recolectaron 15 flores de plantas de cada genotipo y se agitaron en un tubo *Eppendorf* con 200 µl de *buffer* TE (Tris-EDTA). Se centrifugó durante 3 minutos a 5.000 r.p.m. Posteriormente, se separaron las flores y los granos de polen fueron traspasados a cámaras (*Lab-Tek™ Chambered Coverglass*) con un *tip* con punta cortada.

#### **4.4. Germinación *in vitro* de polen de Arabidopsis**

Se siguió el protocolo de germinación de polen de Arabidopsis de Boavida y McCormick, 2007 con modificaciones. En los experimentos de germinación de polen en medio líquido, se sumergieron 15 flores por repetición en 100  $\mu$ l de medio de germinación de polen estándar (0,01%  $H_3BO_3$ , 5 mM  $CaCl_2$ , 5 mM  $KCl$ , 1 mM  $MgSO_4$  y 10% sacarosa, pH 7,8) dispuesto en tubos cónicos de vidrio de 5 ml. Se agitaron los tubos con las flores por 1-2 minutos para desprender el polen y luego se taparon con papel transparente y se incubaron por 3 horas en cámara de cultivo en condiciones controladas de luz y temperatura. Luego se incubaron con DAPI (5 ng/ $\mu$ l) por 2 horas en oscuridad a 22°C.

### **5. Microscopía**

#### **5.1. Microscopía de epifluorescencia**

El polen se visualizó en un microscopio de epifluorescencia Olympus DX41 (*Olympus America Inc, Melville, NY*) utilizando diferentes filtros adecuados. Las fotos fueron tomadas con un objetivo de inmersión en aceite 100X.

#### **5.2. Microscopía Confocal**

Los análisis de localización celular fueron realizados en un microscopio confocal invertido (*Olympus IX81 FV1000*) usando un objetivo 60X con 1.2 de apertura numérica e inmersión en agua. Los núcleos fueron teñidos con DAPI y estos fueron visualizados por excitación con un láser de longitud de onda de 440 nm. La emisión fue adquirida con filtros de paso de banda (*band pass*) 480-495 nm. Las proteínas fluorescentes GFP y YFP fueron excitadas con un láser de longitud de onda de 488 nm. La emisión fue adquirida con el filtro de paso de banda (*band pass*) 535-565 nm. En cambio, para la proteína fluorescente RFP se utilizó un láser de longitud de onda de 543 nm y la emisión fue adquirida con el filtro de paso de banda (*band pass*) 560-620 nm. Simultáneamente se adquirieron imágenes con microscopía diferencial de contraste de interferencia (DIC). Para llevar a cabo el análisis de la proteína coilina y la localización de ARNm se tomó un plano de 256 por 256 píxeles de la zona media de los granos de polen y tubos polínicos, con una velocidad de adquisición de 10  $\mu$ s/píxel.

Para el análisis de co-localización se tomaron 5 planos de 256 por 256 píxeles con una diferencia de 0,5  $\mu\text{m}$  entre planos; el plano central se ubicó en la zona media del grano de polen.

## 6. Análisis automatizado por medio de MATLAB

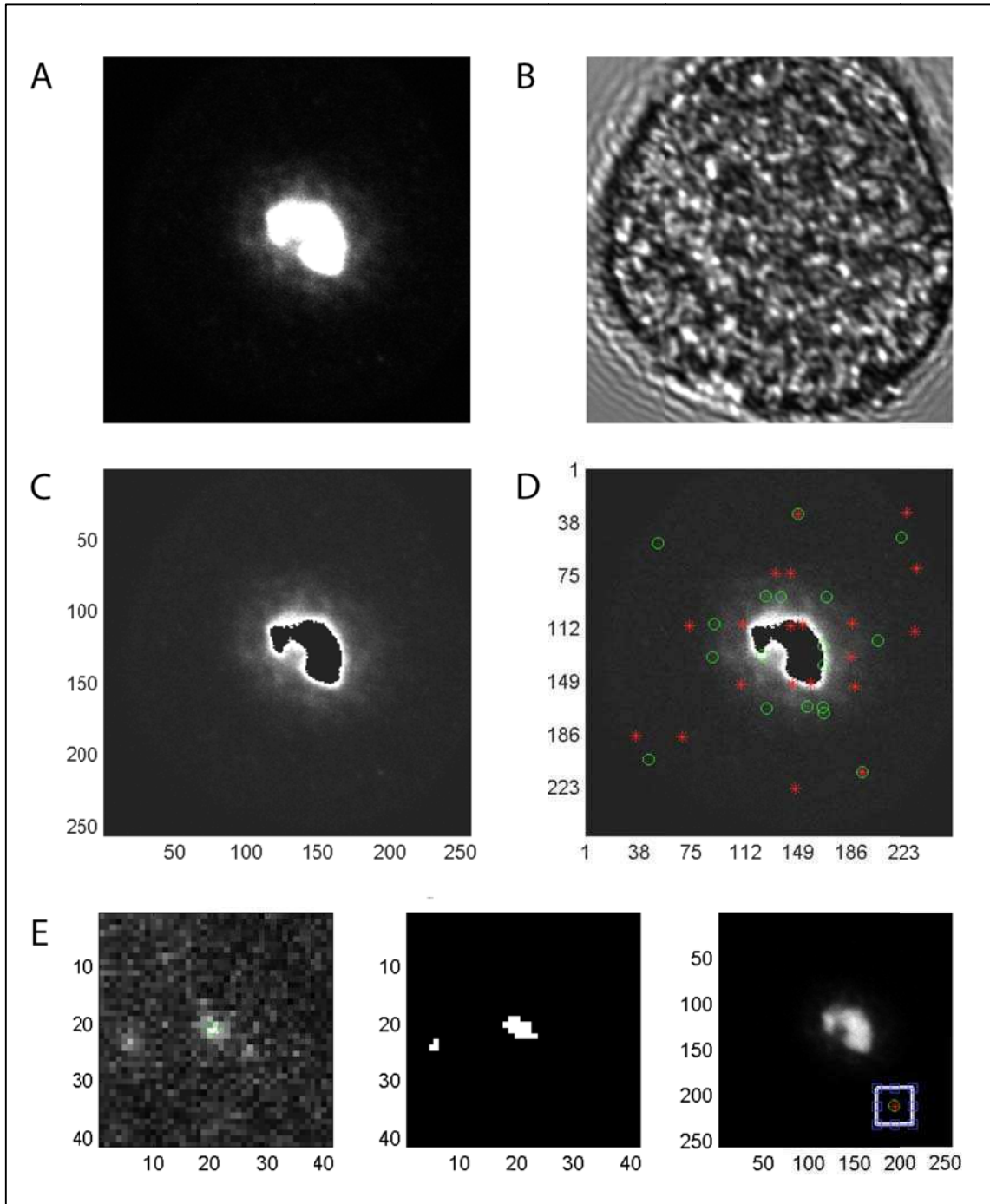
El análisis automatizado por MATLAB es una herramienta ampliamente utilizada ya que facilita el análisis de una amplia variedad y un gran número de datos. Presenta la ventaja que el análisis se realiza de manera independiente del observador ya que se aplica exactamente el mismo procedimiento a todos los datos experimentales y permite la exploración de distintos parámetros de análisis, con el objetivo de probar la robustez de los resultados obtenidos. Por otro lado, las posibilidades de cómputos permiten llevar a cabo estudios imposibles de desarrollar de otra manera, como el procedimiento de *shuffling* descrito en secciones posteriores.

En este trabajo se decidió aplicarlo, en primer lugar, por la difícil tarea de visualizar las imágenes que presentan una alta intensidad de fluorescencia en el núcleo vegetativo (Figura 20 de la sección Resultados) e independizar el análisis de acúmulos citoplasmáticos del observador y en segundo lugar, por la cantidad de imágenes que se obtuvieron para dicho análisis. Esta sección del trabajo fue realizada en colaboración con la Dra. Lorena Sigaut y la Dra. Lia Pietrasanta del Centro de Microscopías Avanzadas, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina.

### 6.1. Rutina de detección de acúmulos citoplasmáticos

Se realizó el análisis de las imágenes de las líneas que poseen el sistema MS2 (MCP-GFP, SKS14-MS2 y AT59-MS2) mediante una rutina automatizada desarrollada en MATLAB. A partir de la imagen de un plano de la zona media de un grano de polen (Figuras 10 A y B) obtenida por microscopía confocal, se le aplicó primeramente una máscara que permitió discriminar aquellos píxeles que se encontraban saturados y que formaban parte del núcleo (Figura 10C). Con el fin de hacer más clara la visualización de acúmulos localizados en el citoplasma, se aplicó una grilla de 49 cuadros, de 37 por 37 píxeles cada uno, y dentro de cada cuadro se determinó la media y el desvío estándar de la intensidad de fluorescencia; este primer paso se realizó para independizarse de la alta intensidad de fluorescencia observada en

el núcleo vegetativo. A continuación esta grilla de 49 cuadros se movió 20 píxeles hacia la derecha y abajo y se realizó una nueva determinación; esta segunda grilla se aplicó para independizarse del efecto borde de los cuadros. Los píxeles adyacentes que fueron mayores en tres desvíos estándar con respecto a la media de intensidad de fluorescencia de cada cuadro se agruparon dando lugar a un único acúmulo; aquellos detectados con la primera grilla se marcaron en rojo, mientras que los que se detectaron con la segunda se marcaron en verde (Figura 10D). Seguidamente se procedió a analizar nuevamente aquellos acúmulos formados por un número de píxeles de 5 a 30. El análisis final consistió en determinar la media de intensidad de fluorescencia de un nuevo cuadro de 40 por 40 píxeles en donde el acúmulo en estudio se encuentra en el centro del mismo y corroborar si el mismo cumple con el requisito de ser mayor en tres desvíos estándar con respecto a la media de intensidad de fluorescencia. Las imágenes de este análisis final corresponden a los paneles izquierdo y central de la figura 10E, mientras que en el panel derecho se observa la imagen del grano de polen (sin máscara en el núcleo) con el acúmulo detectado marcado.



**Figura 10** – Análisis de un grano de polen de la línea SKS14-MS2 con la rutina MATLAB de detección de acúmulos. En el panel superior se observa la imagen del grano de polen en estudio con la región saturada del núcleo y una imagen DIC del mismo grano (paneles A y B). En el panel C se aplicó una máscara que elimina el núcleo vegetativo para una mejor visualización del citoplasma y los posibles acúmulos citoplasmáticos detectados, en rojo los detectados por la primera grilla y en verde los detectados por la segunda (panel D). En el panel izquierdo de la parte E se observa el zoom del cuadro en el cual se realiza el análisis final, el panel central es la misma imagen pero se aplica una máscara en la que se detallan los píxeles detectados como parte del

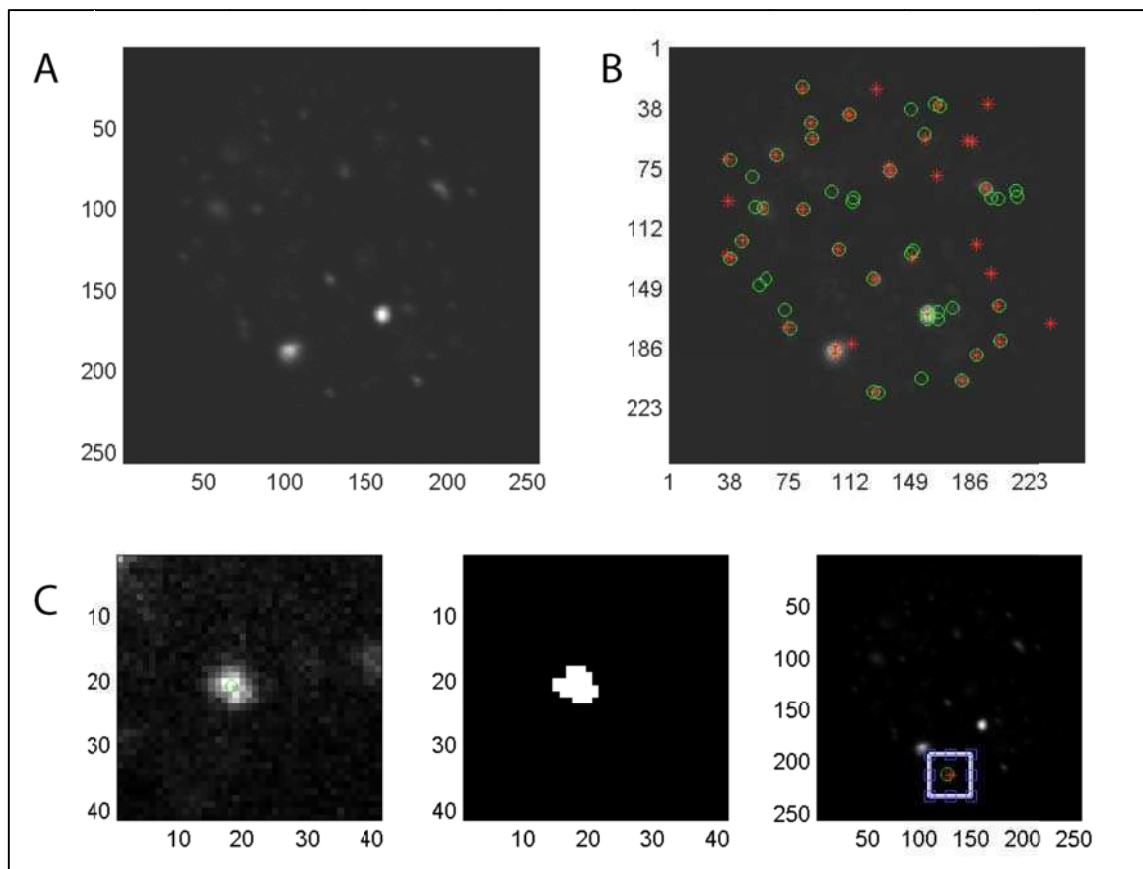


acúmulo y en el panel derecho se muestra la detección de un acúmulo citoplasmático que posee un tamaño de 15 píxeles.

Los resultados obtenidos son almacenados en un archivo *.txt* en donde se informan las coordenadas de localización del centro del acúmulo detectado en el plano x e y, y el tamaño del acúmulo en píxeles, entre otros parámetros. El número de acúmulos citoplasmáticos se cuantificó en las líneas MCP-GFP control, SKS14-MS2 y AT59-MS2.

## 6.2. Rutina de detección de cuerpos

El análisis de detección de cuerpos de procesamiento y gránulos de estrés se realizó con la misma rutina detallada en la sección 6.1 pero, dado que el tamaño de los cuerpos es mayor, el parámetro utilizado como rango de píxeles fue entre 5 y 80 píxeles (Figura 11).



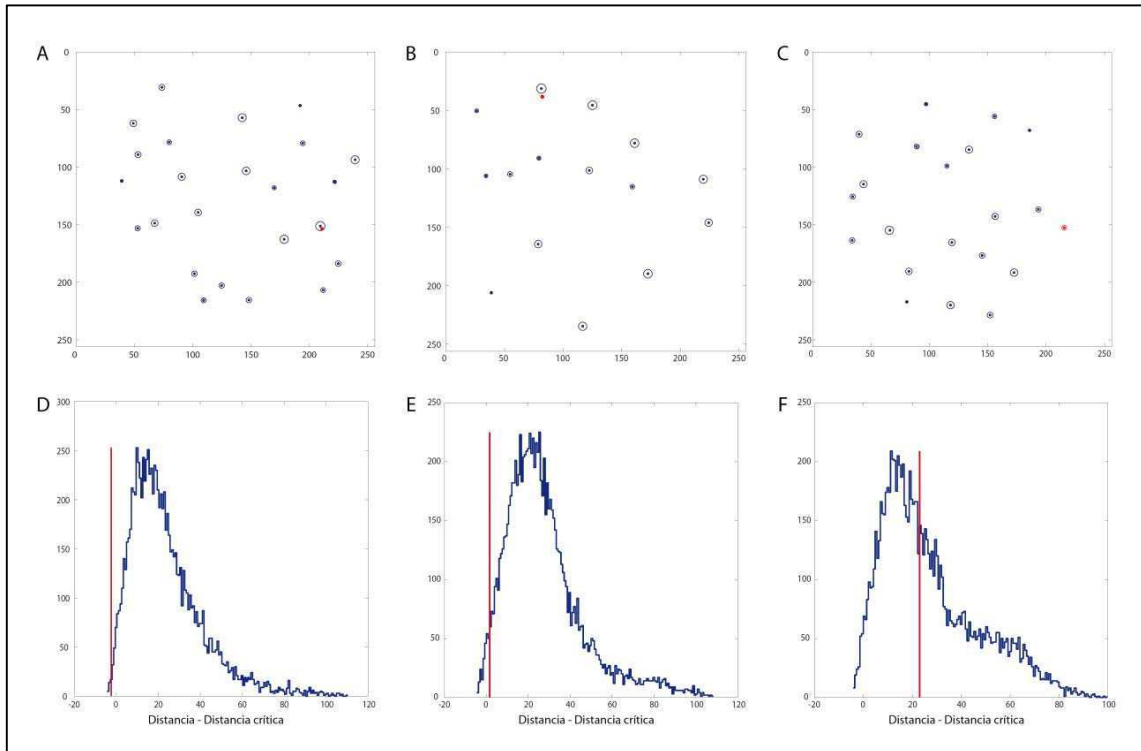
**Figura 11** – Análisis de un grano de polen de la línea VCS-RFP con la rutina de detección de cuerpos. En el panel superior se observa la imagen del grano de polen en estudio (A) y los posibles acúmulos citoplasmáticos

detectados por las dos grillas, en rojo se marcan los de la primera y en verde los de la segunda grilla (B). En el panel izquierdo de la parte C se observa el zoom del cuadro en el que se realiza el análisis final, el panel central es la misma imagen pero se aplica una máscara en la que se detallan los píxeles detectados como parte del acúmulo y en el panel derecho se muestra la detección de un acúmulo citoplasmático que posee un tamaño de 29 píxeles.

Los resultados obtenidos son almacenados en un archivo *.txt* en donde se informan las coordenadas de localización del centro del cuerpo detectado en el plano x e y, y el tamaño del acúmulo en píxeles, entre otros parámetros. El número de cuerpos de procesamiento y gránulos de estrés se cuantificó en las líneas VCS-RFP, DCP1-RFP y ATX-2-RFP.

### **6.3. Rutina de co-localización**

Para llevar a cabo los estudios de co-localización se desarrolló una rutina que se basa en cruzar los datos obtenidos en formato *.txt* de las rutinas de detección de acúmulos citoplasmáticos y de detección de cuerpos. Luego se analizan las distancias entre el centro del acúmulo citoplasmático detectado y el centro de los cuerpos marcados por las proteínas de cuerpos de procesamiento o gránulos de estrés. Teniendo en cuenta el área y la localización de los acúmulos y cuerpos, y asumiendo que la forma de los mismos en un plano confocal es aproximable a un círculo, se pudieron determinar los radios y las distancias entre los mismos para finalmente determinar si co-localizan, si se encuentran cercanos o si están distantes. Los resultados obtenidos se separaron en dichas tres categorías, utilizándose el parámetro “distancia crítica” definido como la suma de los radios del acúmulo y del cuerpo en cuestión. Para la categoría I (“co-localizan”) que corresponde a co-localización (Figura 12A), la distancia entre el acúmulo y el cuerpo es menor a la distancia crítica; la categoría II (“cercanos”) corresponde al caso en el que la distancia es mayor a la distancia crítica pero menor a su doble (Figura 12B) mientras que la categoría III (“distantes”) representa los casos cuando la distancia entre el acúmulo y el cuerpo es mayor a por lo menos dos veces la distancia crítica (Figura 12C). En la figura 12 se muestra un ejemplo correspondiente a cada una de las categorías y el análisis estadístico llevado adelante para establecer la probabilidad de obtener una co-localización por azar.



**Figura 12 – Categorización de co-localización.** Ejemplos para cada una de las tres categorías. Los paneles superiores muestran la ubicación y el área del acúmulo (en rojo) y los cuerpos de procesamiento (en azul). Los paneles inferiores indican el análisis de *shuffling* para cada uno de los ejemplos. La línea azul corresponde al número de veces que el acúmulo y el cuerpo se encuentran a determinada distancia por azar y la línea roja indica la diferencia entre la distancia obtenida por la rutina de co-localización y la distancia crítica. Los paneles A y D corresponden a la categoría I de co-localización (“co-localizan”). Los paneles B y E corresponden a la categoría II (“cercanos”), en la que la distancia es mayor a la distancia crítica pero menor a su doble. Los paneles C y F corresponden a la categoría III (“distantes”) en la que el acúmulo y el cuerpo no están co-localizando ni se encuentran cerca. p valor 0,0029 (D), p valor 0,0246 (E) y p valor 0,5229 (F).

En los ejemplos de la figura podemos visualizar en rojo al acúmulo citoplasmático detectado por la rutina de detección de acúmulo citoplasmático y en azul a los cuerpos detectados por la rutina de detección de cuerpos. Podemos observar la diferencia entre las tres categorías mencionadas previamente. En el panel inferior se llevó adelante el análisis de *shuffling* para cada una de las imágenes analizadas. El mismo consistió en iterar 10.000 veces la localización del acúmulo citoplasmático detectado y determinar de esta manera cual es la probabilidad de que se encuentre a una distancia igual a la detectada por la rutina de co-localización de algún cuerpo. En los gráficos obtenidos se observa cual es el número de veces que el acúmulo detectado y el cuerpo se encuentran a una determinada distancia solamente

por azar. En el eje x, cuando se grafica la diferencia entre la distancia y la distancia crítica podemos discriminar las tres categorías; cuando esta diferencia es menor a cero corresponde a la categoría I, cuando se encuentra entre 0 y 5 aproximadamente corresponde a la categoría II y cuando es mayor a 5 corresponde a la categoría III. En el ejemplo mostrado en el gráfico de la izquierda (“co-localizan”) la línea roja, que indica la diferencia entre la distancia obtenida por la rutina de co-localización y la distancia crítica, se encuentra a la izquierda de todos los puntos de la curva (en azul) que muestra los casos en los cuales el acúmulo y el cuerpo se encuentran a determinada distancia por azar. En cambio en el gráfico de la derecha (“distantes”) el máximo de dicha curva (en azul) se encuentra a la izquierda de la línea roja respectiva.

## 7. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los resultados fue realizado usando el programa *GraphPad Prism versión 5.00* (GraphPad Software, La Jolla, California, EEUU).

Los resultados obtenidos en todos los experimentos se muestran como puntos que indican la dispersión de los datos. En todos los casos que se realiza estadística se cumplen los supuestos necesarios. Todos los experimentos fueron repetidos por lo menos tres veces. Las diferencias significativas se calcularon en todos los casos con el análisis estadístico Mann-Whitney test. En todos los casos las diferencias se indican en el texto o leyenda de las figuras.

# CAPITULO I

## Caracterización de Cuerpos de Cajal (CBs) durante el desarrollo del grano de polen de *Arabidopsis thaliana*

---

### Introducción

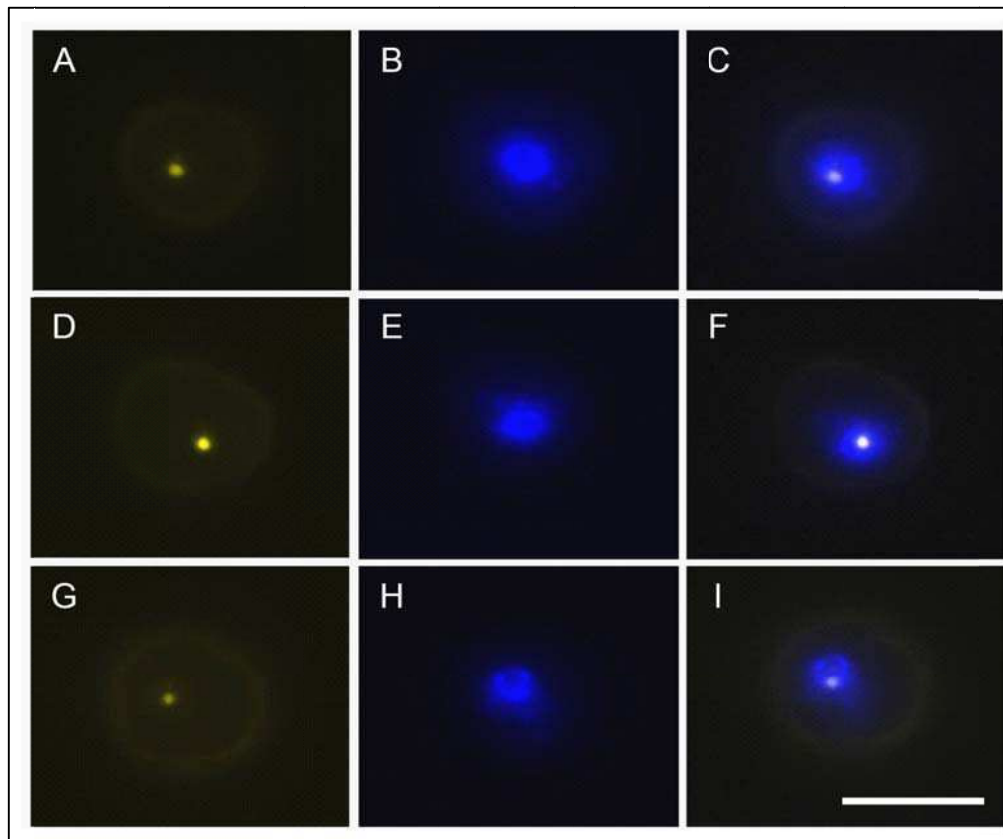
Los cuerpos de Cajal (CBs) son organelas subnucleares ubicuas encontradas en células animales y vegetales. Los CBs de tabaco y *Arabidopsis* son estructuras dinámicas y heterogéneas. Se mueven a través del nucleoplasma, se fusionan entre si y entran y salen del nucléolo (Boudonck et al., 1999). Su número cambia a lo largo de la diferenciación y el ciclo celular y con la actividad metabólica de la célula. Estos cuerpos estarían involucrados en la maduración y transporte de snRNP y snoRNP (Boudonck et al., 1999).

La estructura y la formación de los CBs son dependientes de coilina, proteína ampliamente utilizada para la marcación de dichos cuerpos. Se han realizado estudios con mutantes que carecen de CBs sin mayores efectos en el crecimiento y desarrollo de las plantas (Collier et al., 2006). Esto estaría indicando que los cuerpos de Cajal no son absolutamente requeridos pero el hecho de que se hayan conservado a lo largo de la evolución en las diferentes especies indica una selección ventajosa, quizás aumentando la eficiencia de algún proceso.

## Resultados

### Caracterización de cuerpos de Cajal (CBs) durante el desarrollo del polen y el crecimiento del tubo polínico

Para examinar la dinámica de los CBs durante el desarrollo del polen expresamos el gen de la proteína coilina, marcadora de dichos cuerpos, fusionada al de la proteína fluorescente YFP bajo la regulación del promotor coilina de *Arabidopsis* (*pcoilina-coilina-YFP*) en el fondo genético salvaje, Col-0 (Fang y Spector, 2007). En primer lugar, estudiamos cómo varían el número y tamaño de los CBs a lo largo de los distintos estadios de desarrollo del grano de polen. Comenzamos estudiando la localización de los mismos en microesporas unicelulares. En la Figura 13 podemos visualizar el patrón de expresión de la proteína coilina durante este estadio.

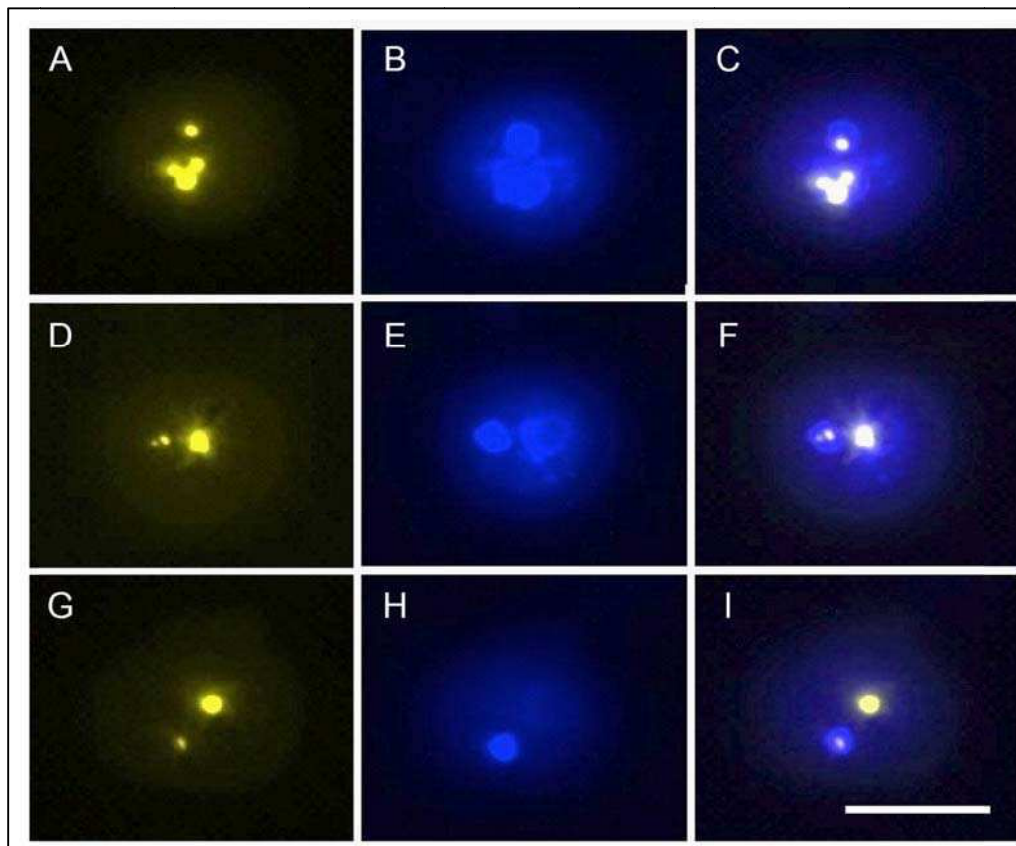


**Figura 13** – Imágenes representativas de microesporas unicelulares (MU) de múltiples flores de 10 plantas independientes que poseen la construcción *pcoilina-coilina-YFP*. Paneles A, D y G corresponden a la

fluorescencia de YFP, paneles B, E y H a la tinción con DAPI y paneles C, F e I corresponden a la superposición de las figuras anteriores. Las imágenes fueron tomadas en un microscopio de fluorescencia. Más de 100 microesporas fueron contadas. Barra de tamaño, 10  $\mu\text{m}$ .

Como podemos observar en la figura 13, la proteína *coilina-YFP* se localiza como un único acúmulo en núcleo de microesporas unicelulares (paneles C, F e I) con un porcentaje de incidencia del patrón del 100%.

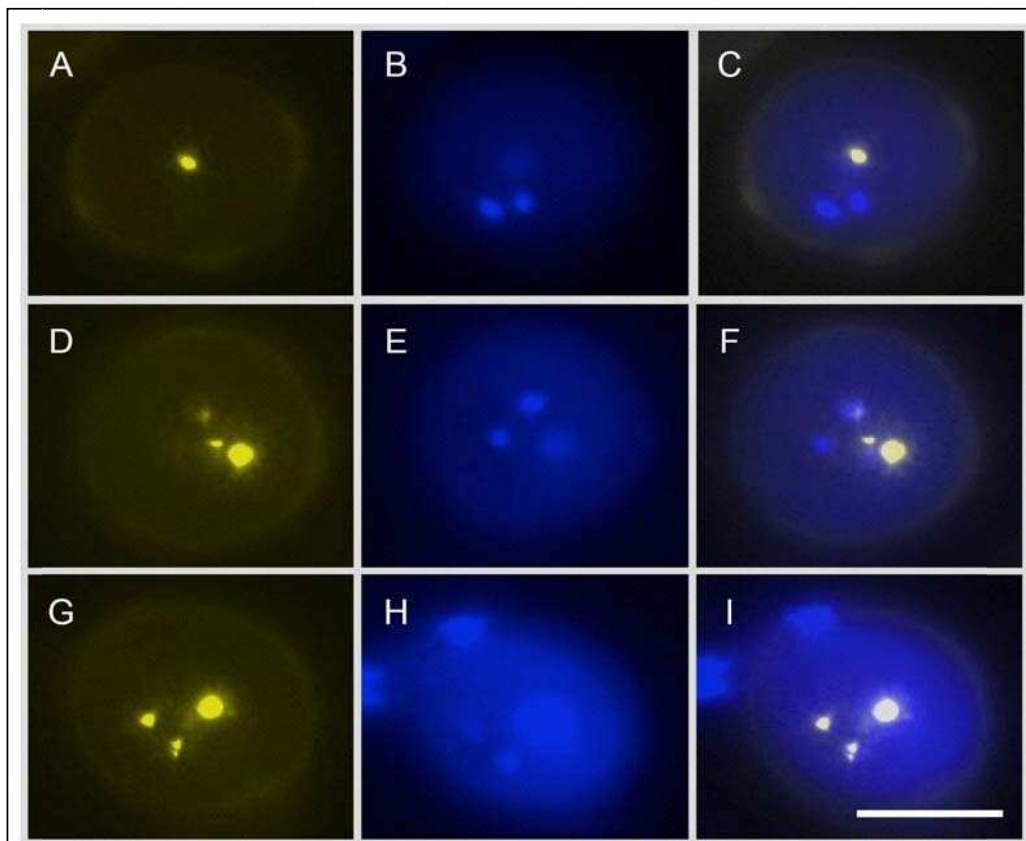
Siguiendo con la caracterización de la expresión de *coilina* en los distintos estadios del desarrollo del grano de polen, procedimos a analizar cómo es la expresión de dicha proteína en polen bicelular. Las imágenes representativas obtenidas para cada uno de los patrones de expresión de la proteína *coilina* se muestran en los diferentes paneles de la figura 14.



**Figura 14** – Imágenes representativas de polen bicelular (PB) de múltiples flores de 10 plantas independientes que poseen la construcción *pcoilina-coilina-YFP*. Paneles A, D y G corresponden a la fluorescencia de YFP, paneles B, E y H a la tinción con DAPI y paneles C, F e I a la superposición de las figuras anteriores. Las imágenes fueron tomadas en microscopio de fluorescencia. Por lo menos 100 granos de polen fueron contados. Barra de tamaño, 10  $\mu\text{m}$ .

En granos de polen bicelulares, dependiendo de la expresión de la proteína coilina en los núcleos vegetativo y generativo, identificamos tres patrones (Figura 14). En el panel superior (figuras A-C) se muestran múltiples acúmulos intensos en el núcleo de la célula vegetativa (NCV) y un único acúmulo menos intenso en el núcleo de la célula generativa (NCG). Este patrón mostró un porcentaje de incidencia del 45%. En el panel central (figuras D-F) encontramos un segundo patrón con un acúmulo de mayor tamaño en el NCV y dos o más acúmulos pequeños en el NCG (27% de incidencia). Finalmente en el panel inferior (figuras G-I) se observa el tercer patrón el cual presenta un acúmulo de mayor tamaño en el NCV y un único acúmulo más pequeño en el NCG, con un 28% de los granos de polen bicelulares analizados.

A continuación analizamos los patrones de expresión en polen tricelular. Las imágenes representativas obtenidas para cada uno de los patrones se detallan en la Figura 15.



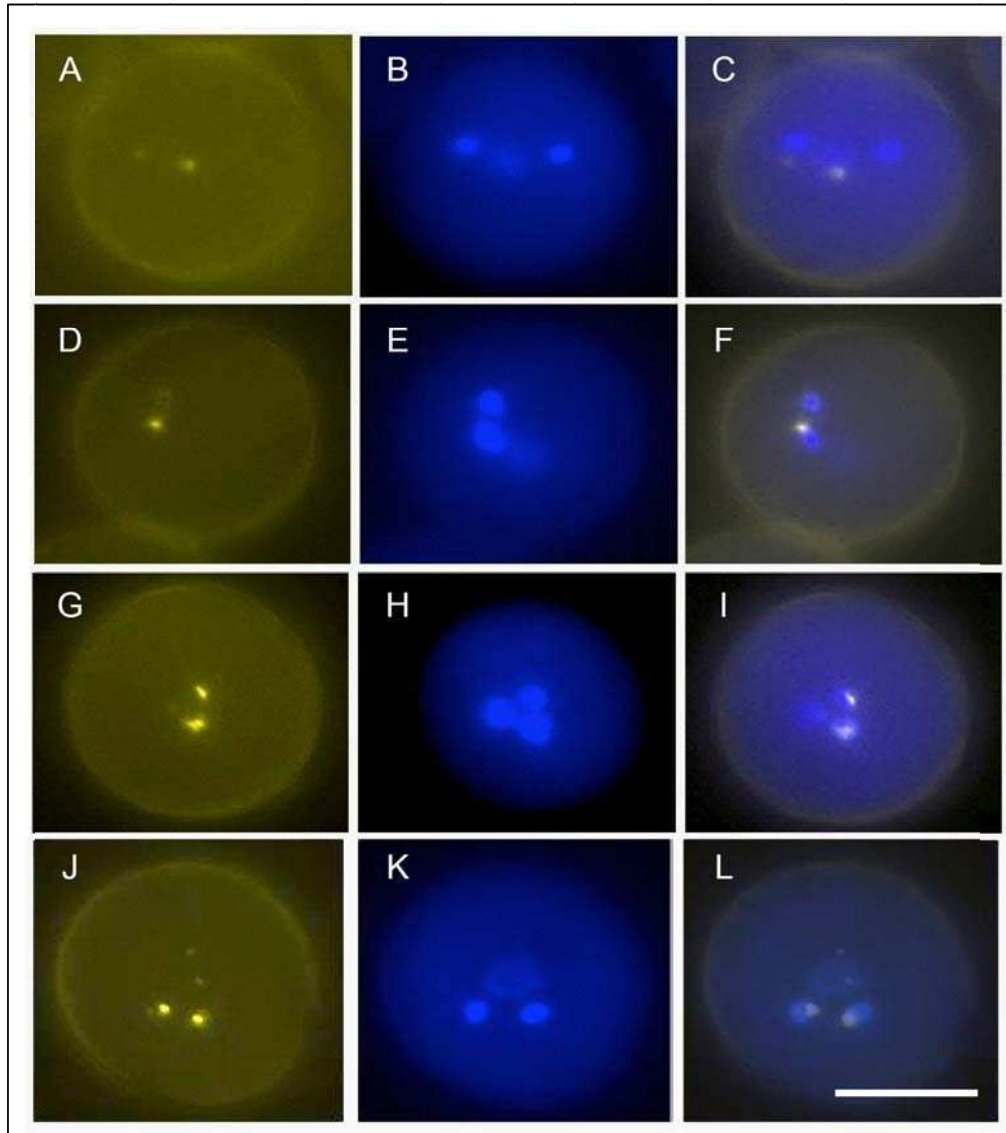
**Figura 15** – Imágenes representativas de polen tricelular (PT) de múltiples flores de 10 plantas independientes que poseen la construcción *pcoilina-coilina-YFP*. Paneles A, D y G corresponden a la fluorescencia de YFP, paneles B, E y H tinción con DAPI y paneles C, F e I corresponden a la superposición de las figuras anteriores.



Las imágenes fueron tomadas en microscopio de fluorescencia. Por lo menos 100 granos de polen fueron contados. Barra de tamaño, 10  $\mu\text{m}$ .

Como se observa en la Figura 15 nuevamente clasificamos las imágenes en tres patrones de expresión de la proteína coilina en el estadio de polen tricelular. En el panel superior (figuras A-C) se muestra el primer patrón, en el que se observa un único acúmulo en el NCV, representando un 19% del total de granos de polen tricelulares analizados. Por otro lado, en el panel central (figuras D-F) observamos que el 49% de los granos de polen tricelulares presentan múltiples acúmulos intensos en el NCV y un único acúmulo menos intenso en uno de los núcleos de célula espermática (NCE). Finalmente en el panel inferior (figuras G-I) observamos el tercer patrón que corresponde a un único gran acúmulo en el NCV con acúmulos más pequeños en ambos NCE; este patrón se observa en el 32% de los granos de polen tricelulares analizados.

Finalmente, analizamos los diferentes patrones de expresión en polen maduro. En la Figura 16 se detallan los cuatro patrones de expresión encontrados en polen maduro. Los porcentajes de incidencia de cada uno de los patrones fueron calculados por la combinación de los resultados obtenidos de plantas T1 y de múltiples flores de cuatro plantas T3 isogénicas (usadas en la Figura 17). En el panel superior (figuras A-C) se observa el primer patrón con un único acúmulo en el NCV y un acúmulo en solo uno de los NCE; entre el 38 y el 48% de los granos de polen maduros presentan este patrón. El siguiente panel (figuras D-F) muestra el segundo patrón en el que se observa el NCV sin señal y un único acúmulo en solo un NCE, presente entre el 9 y el 17% de los granos de polen maduros. El tercer panel (figuras G-I) no presenta señal en el NCV y se observa un único acúmulo en ambos NCE, representando un 22-31% de los granos. Finalmente, el panel inferior (figuras J-L) presenta el patrón con más de un acúmulo en el NCV y un único acúmulo en ambos NCE; entre el 10 y el 17% de los granos de polen maduros presenta este patrón.

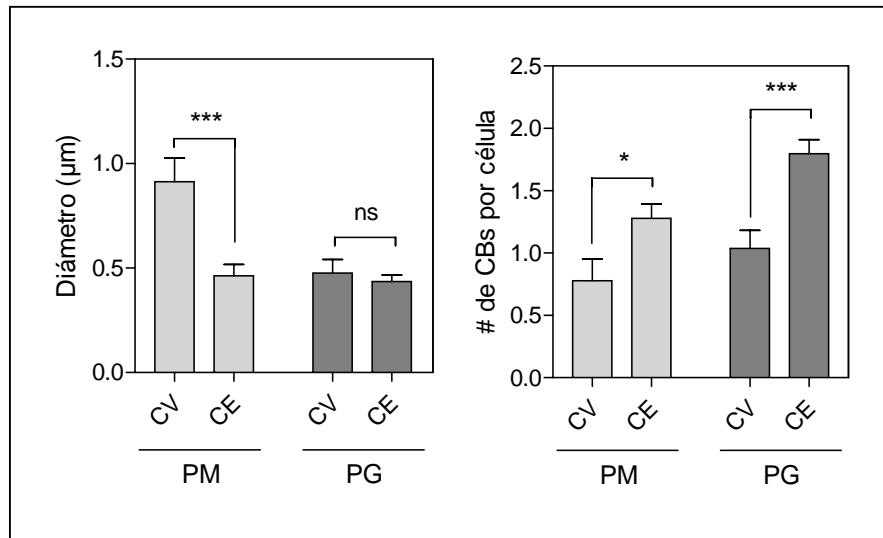


**Figura 16** – Imágenes representativas de polen maduro (PM) de múltiples flores de 20 plantas independientes que poseen la construcción *pcoilina-coilina-YFP*. Paneles A, D, G y J corresponden a la fluorescencia de YFP, paneles B, E, H y K tinción con DAPI y paneles C, F, I y L corresponden a la superposición de las figuras anteriores. Las imágenes fueron tomadas en microscopio de fluorescencia. Por lo menos 100 granos de polen fueron contados. Barra de tamaño, 10  $\mu\text{m}$ .

A partir del análisis de los CBs realizado en los distintos estadios de desarrollo del grano de polen podemos observar que en polen maduro la intensidad de fluorescencia es menor que en estadios tempranos de desarrollo; esto es congruente con los niveles de expresión de coilina en diferentes microarreglos, que muestran altos niveles en microesporas unicelulares y en polen bicelular y niveles basales en polen tricelular y maduro (Honys y Twell, 2004) y nula

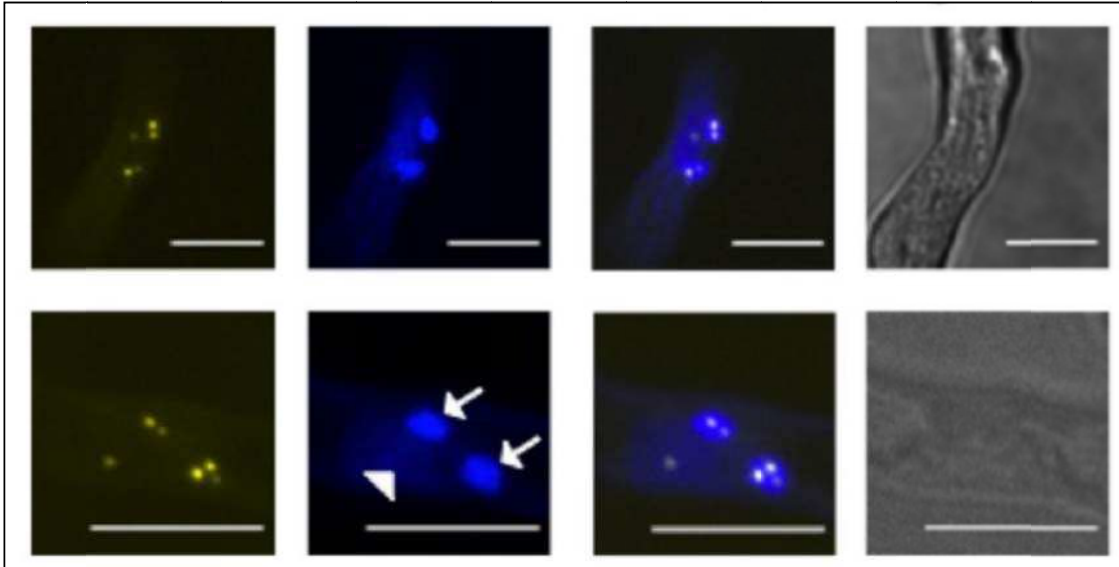
expresión en células espermáticas (Borges et al., 2008). Esto sugiere que la señal de coilina observada en el NCE podría derivar de la expresión residual producida durante estadios tempranos del desarrollo del polen.

Con el fin de analizar cómo varía la dinámica de los CBs a lo largo de la germinación del polen, cuantificamos el número y tamaño de los mismos en polen maduro y tubos polínicos (Figura 17).



**Figura 17** – El tamaño y el número de CBs varían en célula vegetativa y células espermáticas de polen maduro y germinado. Comparación del diámetro (panel izquierdo) y número (panel derecho) de CBs en núcleo de células vegetativas (CV) y células espermáticas (CE) de polen maduro (PM) y polen germinado (PG). Entre 50 y 100 núcleos de granos de polen y tubos polínicos fueron analizados. Las barras representan media  $\pm$  error estándar. Los valores son diferentes significativamente con  $p < 0,05$  (t-test student con dos colas). ns = no significativo.

Se observa que en polen maduro los CBs tienen un tamaño mayor en el NCV que en el NCE. Sin embargo, encontramos más cuerpos en el NCE que en el NCV. El menor número de CBs pero de mayor tamaño en el NCV se correlaciona con cuerpos de menores tamaños pero más frecuentes en el NCE. En tubos polínicos, aunque se mantuvo la diferencia en el número de cuerpos en el NCV y NCE, no hubo cambios en el diámetro de los mismos. En la Figura 18 se muestran tubos polínicos representativos de los resultados obtenidos en el análisis.



**Figura 18** – Imágenes representativas de polen germinado adquiridas con microscopio confocal. La primera columna corresponde a la fluorescencia de YFP, la segunda tinción con DAPI, la tercera columna corresponde a la superposición de las figuras anteriores y la cuarta columna corresponde a luz blanca. Las flechas indican el núcleo de las células espermáticas (NCE) mientras que la punta de flecha indica el núcleo de la célula vegetativa (NCV). Barra de tamaño, 10  $\mu\text{m}$ .

En conjunto, estos resultados indican que en tubos polínicos hubo una reducción en el tamaño de los CBs en el NCV sin un aumento en su número (Figura 17), sugiriendo que hay una menor necesidad de CBs en la célula vegetativa luego de la germinación del polen. Por otro lado, en polen maduro y germinado, las células espermáticas tienen en promedio 1,6 y 1,7 veces más CBs que la célula vegetativa, respectivamente. Además, el NCE de tubos polínicos posee más cuerpos que el núcleo de células espermáticas de polen maduro (Figura 18). Considerando que los cuerpos de Cajal son más numerosos en células de mayor actividad (Cioce y Lamond, 2005), esto sugiere que las células espermáticas en tubos polínicos se encuentran más activas transcripcionalmente que las células espermáticas de polen maduro. Nuestros resultados además sugieren que los cuerpos de Cajal responden durante el desarrollo del polen a las diferentes necesidades fisiológicas de los diferentes tipos de células gametofíticas masculinas.

## Discusión

### **Los cuerpos de Cajal (CBs) están regulados durante el desarrollo del grano de polen y el crecimiento del tubo polínico en *Arabidopsis thaliana***

Los cuerpos de Cajal son estructuras subnucleares ampliamente extendidas en eucariotas. En *Arabidopsis* se caracterizan por ser estructuras esféricas y en general se encuentran en asociación con el nucléolo. El número de CBs se encuentra regulado durante el desarrollo y además cambia durante el ciclo celular. Su posible función estaría relacionada con la regulación de ARN, a pesar de que se obtuvieron mutantes que no poseen CBs y son completamente normales y viables.

Todavía está en debate si la regulación en la expresión de genes requiere de la variación en la dinámica de CBs (Strzelecka et al., 2010). Para investigar si el número y el tamaño de los CBs varía durante las divisiones y diferenciaciones celulares que ocurren durante el desarrollo del polen, utilizamos polen de *Arabidopsis thaliana*. Mostramos que la distribución celular de CBs varía en los diferentes estadios de desarrollo del polen. Además, el número y el tamaño de los CBs varían entre las células espermáticas y la vegetativa de polen maduro y germinado. Sugerimos que estas variaciones en el número y tamaño ocurren para responder a cambios en la expresión de genes a través del desarrollo y la germinación del polen.

El hecho que los CBs sean más numerosos en células de mayor actividad (Cioce y Lamond, 2005), sugiere que células espermáticas en tubos polínicos se encuentran más activas transcripcionalmente que células espermáticas de polen maduro. Nuestros resultados además sugieren que los CBs responden durante el desarrollo del polen a las diferentes necesidades fisiológicas de los diferentes tipos de células gametofíticas masculinas.

# CAPITULO II

## Estudio de la regulación de genes tardíos en polen maduro de *Arabidopsis thaliana*

---

### Introducción

El desarrollo del grano de polen se caracteriza por presentar dos grupos de genes que se diferencian por su regulación a nivel transcripcional. Los genes tempranos se expresan a partir del estadio de microespora y su abundancia decrece antes de la maduración del polen, mientras que los genes tardíos, que se expresan luego de la mitosis I, se acumulan hasta la maduración del polen, creando un *pool* estable de ARNm que serían esenciales para la germinación y el crecimiento temprano del tubo polínico. Se han descrito algunos genes tardíos, como el gen *NTP303* de tabaco y los genes *LAT59* y *LAT52* de tomate, cuya transcripción y/o traducción son reguladas diferencialmente durante el desarrollo del grano de polen. Para los genes *NTP303*, *LAT59* y *LAT52* se observó que la regulación está dada por la región 5'UTR de dichos genes.

Los cuerpos de procesamiento (PBs) y los gránulos de estrés (SGs) son estructuras citoplasmáticas cuya función está relacionada con la regulación del ARNm. Los PBs son agregados citoplasmáticos de proteínas involucrados en la degradación y arresto de la traducción de los ARNm. Los SGs son agregados citoplasmáticos de silenciamiento de ARNm que contienen transcritos que son excluidos transitoriamente del *pool* activo de traducción. Ambas estructuras son inducidas por estrés pero son reguladas por distintos eventos de señalización, y cada uno puede existir de manera independiente del otro.

## Resultados

### **Análisis de localización de genes tardíos en granos de polen maduros de *Arabidopsis thaliana***

El grupo de genes tardíos se caracteriza por presentar su expresión durante los estadios finales del desarrollo del polen anteriores a la germinación del polen. Del estudio de sus proteínas se ha determinado que algunos de estos genes tardíos se traducen durante el desarrollo del polen (por ejemplo LAT52) mientras que para otros genes sus proteínas están presentes luego de la germinación (por ejemplo LAT59 y NTP303).

Los genes *LAT59* de tomate (Curie y McCormick, 1997) y *NTP303* de tabaco (Hulzink et al., 2002) se expresan durante el desarrollo tardío del grano de polen pero sus respectivas proteínas se presentan en los estadios finales del desarrollo y germinación del grano de polen o se sintetizan sólo cuando el polen comienza a germinar, respectivamente (Curie y McCormick, 1997; Wittink et al., 2000). En dicha regulación post-transcripcional se encuentran involucradas las respectivas regiones 5'UTR de estos genes (Curie y McCormick, 1997; Hulzink et al., 2002). Con el objetivo general de estudiar de qué manera se lleva a cabo dicho mecanismo regulatorio, decidimos trabajar con los putativos ortólogos de estos dos genes en *Arabidopsis thaliana*. El gen *AT59* (At1g14420) de *Arabidopsis* ya ha sido descrito previamente como el ortólogo de *LAT59* (Kulikauskas y McCormick, 1997); para el gen *NTP303* nos focalizamos en la familia denominada *SKU5 similar* con 18 miembros en *Arabidopsis* entre los cuales se encontraría el ortólogo de *NTP303*. En primer lugar, determinamos que solamente los genes *SKS11*, *SKS12*, *SKS13* y *SKS14* presentan expresión en polen; luego analizamos la estructura de sus regiones 5'UTRs. Utilizando el programa *RNAdraw v1.1* (Matzura y Wennborg, 1996) estudiamos dichas estructuras y las energías libres de las regiones 5'UTRs de estos 4 genes en comparación al gen *NTP303*. Los valores de energía libre obtenidos se detallan en la tabla 6.

Gen	$\Delta G$ (kJ/mol)
<i>NTP303</i>	-111,877
<i>SKS11</i>	-53,0912
<i>SKS12</i>	-38,4367
<i>SKS13</i>	-79,3018
<i>SKS14</i>	-104,549

**Tabla 6** – Valores de energía libre de las estructuras de las regiones 5'UTRs de los genes detallados. Para determinar los mismos se utilizó el programa *RNAdraw*.

A partir de los valores de las energías libres obtenidas para las estructuras de las regiones 5'UTRs de los diferentes genes elegimos al gen *SKS14* (At1g55560) como el ortólogo putativo del gen *NTP303* de tabaco ya que en comparación sus valores son los más similares al gen de tabaco.

Nuestra hipótesis de trabajo es que los ARNm *at59* y *skS14* de *Arabidopsis thaliana* se acumularían en cuerpos citoplasmáticos (PBs o SGs) durante la maduración del grano de polen a la espera de la germinación que es cuando se produciría su traducción. Por ello, nos propusimos estudiar la localización de estos ARNm almacenados en polen maduro de *Arabidopsis thaliana* utilizando el sistema MS2, detallado en la sección 3.4 de Materiales y Métodos.

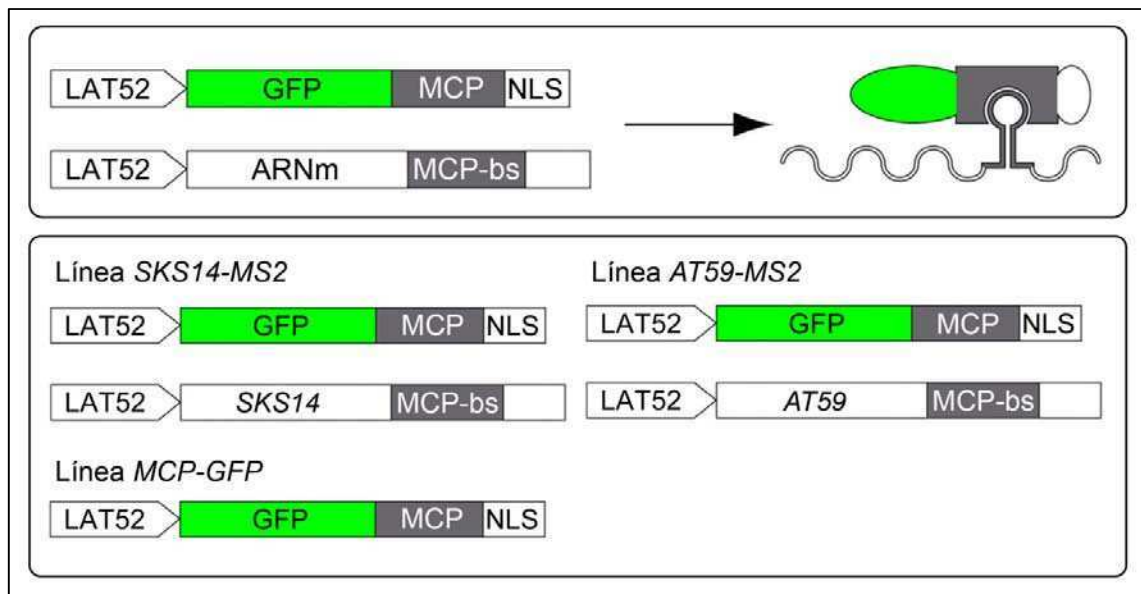
### **Estudio de seguimiento de ARNm en polen maduro de *Arabidopsis thaliana***

El sistema MS2 es un método ampliamente utilizado para estudiar la localización de transcriptos; presenta la gran ventaja que permite seguir los ARNm de interés de manera específica y en tiempo real (sección 3.4.1 de Materiales y Métodos).

Como se detalló previamente en la sección 3.4.2 de Materiales y Métodos y como se muestran en la Figura 19, se realizaron las construcciones con el fin de rastrear los ARNm de los genes *SKS14* y *AT59* de *Arabidopsis thaliana*. El sistema MS2 basa su fortaleza en la fuerte asociación de la proteína de la cápside del bacteriófago MS2 (MCP) con el codón de



inicio de la replicación del mismo (MCP-bs, sitio de unión de la proteína MCP tomado de sus siglas en inglés *binding site*). Las construcciones se realizaron utilizando el promotor fuerte de polen LAT52. Todos los estudios se realizaron en polen maduro, que es cuando los ARNm se encontrarían almacenados antes de ser traducidos, tal como se detalló en la Introducción. Además trabajamos agregando puromicina, un inhibidor de la traducción que actúa desensamblando los ribosomas y liberando los transcritos al citoplasma, favoreciendo así la formación de los acúmulos citoplasmáticos.

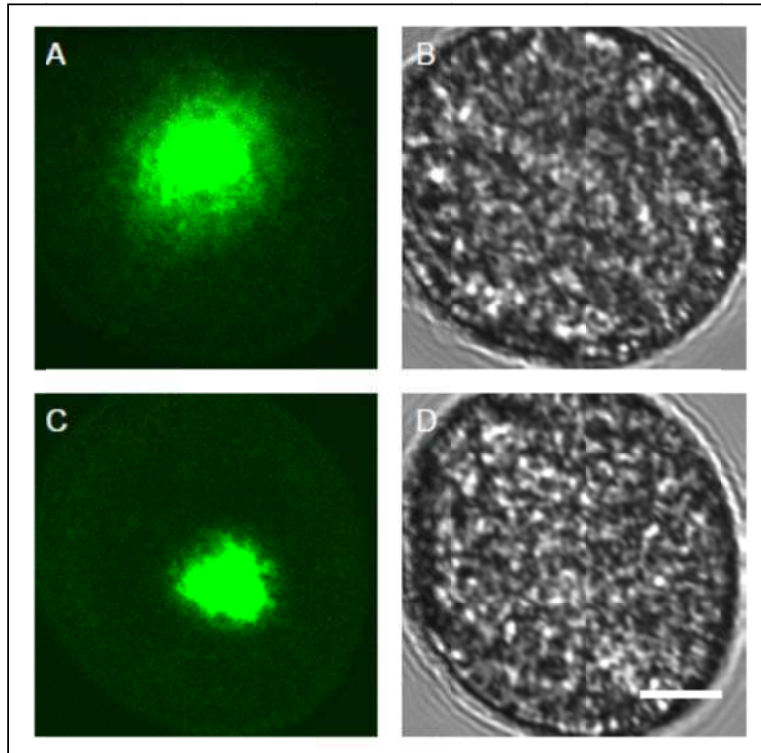


**Figura 19** – Seguimiento de ARNm mediante el sistema MS2. En el panel superior se presentan las construcciones necesarias para seguir el ARNm en estudio por la fluorescencia de GFP y mediante la fuerte asociación de la proteína MCP con los *loops* de ARN representados en la figura como MCP-bs. En el panel inferior se detallan las construcciones realizadas en esta tesis para seguir los ARNm *skt14* (*SKS14-MS2*) y *at59* (*AT59-MS2*) y la línea control sin ARNm (*MCP-GFP*).

Todas las líneas en las que se estudia la localización de los mensajeros se basaron en la expresión de las dos construcciones mostradas en el panel superior de la Figura 19, la que posee la proteína MCP fusionada a GFP y la señal de localización nuclear (NLS), y la construcción que posee el ARNm en estudio fusionado a la zona de unión de MCP. Por otro lado, la línea control solo posee el vector con la proteína MCP fusionada a GFP y NLS.

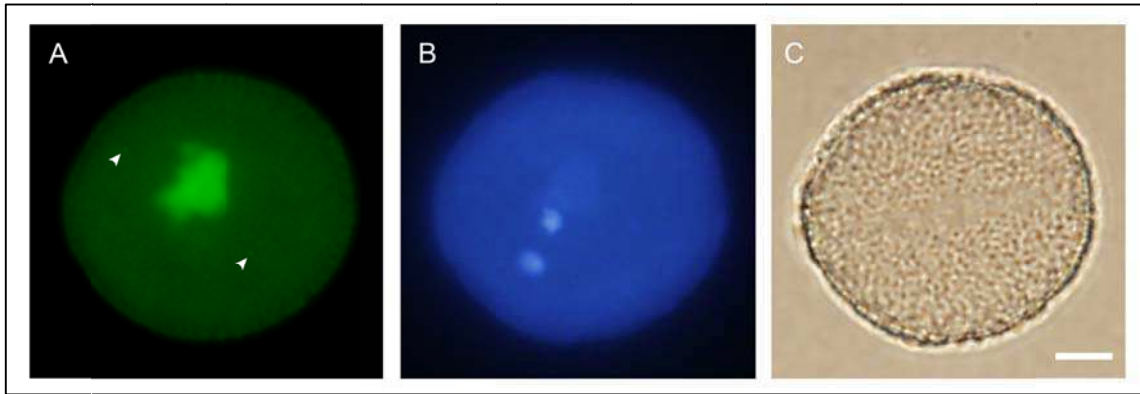
En la Figura 20 se muestran imágenes representativas de la línea control *MCP-GFP*. Se observa una fuerte intensidad de fluorescencia solamente en el núcleo vegetativo del grano de

polen. Esto corresponde a la proteína MCP-GFP que cuando no se encuentra unida a los *loops* de MS2, se localiza en el núcleo debido a la NLS; este resultado se puede observar también para todas las líneas en las que se estudian los ARNm *skt14* y *at59*.



**Figura 20** – Imágenes de microscopía confocal representativas de la línea control *MCP-GFP*. Las figuras A y C corresponden a la fluorescencia de GFP y las figuras B y D corresponden a luz blanca. Barra de tamaño, 5 µm.

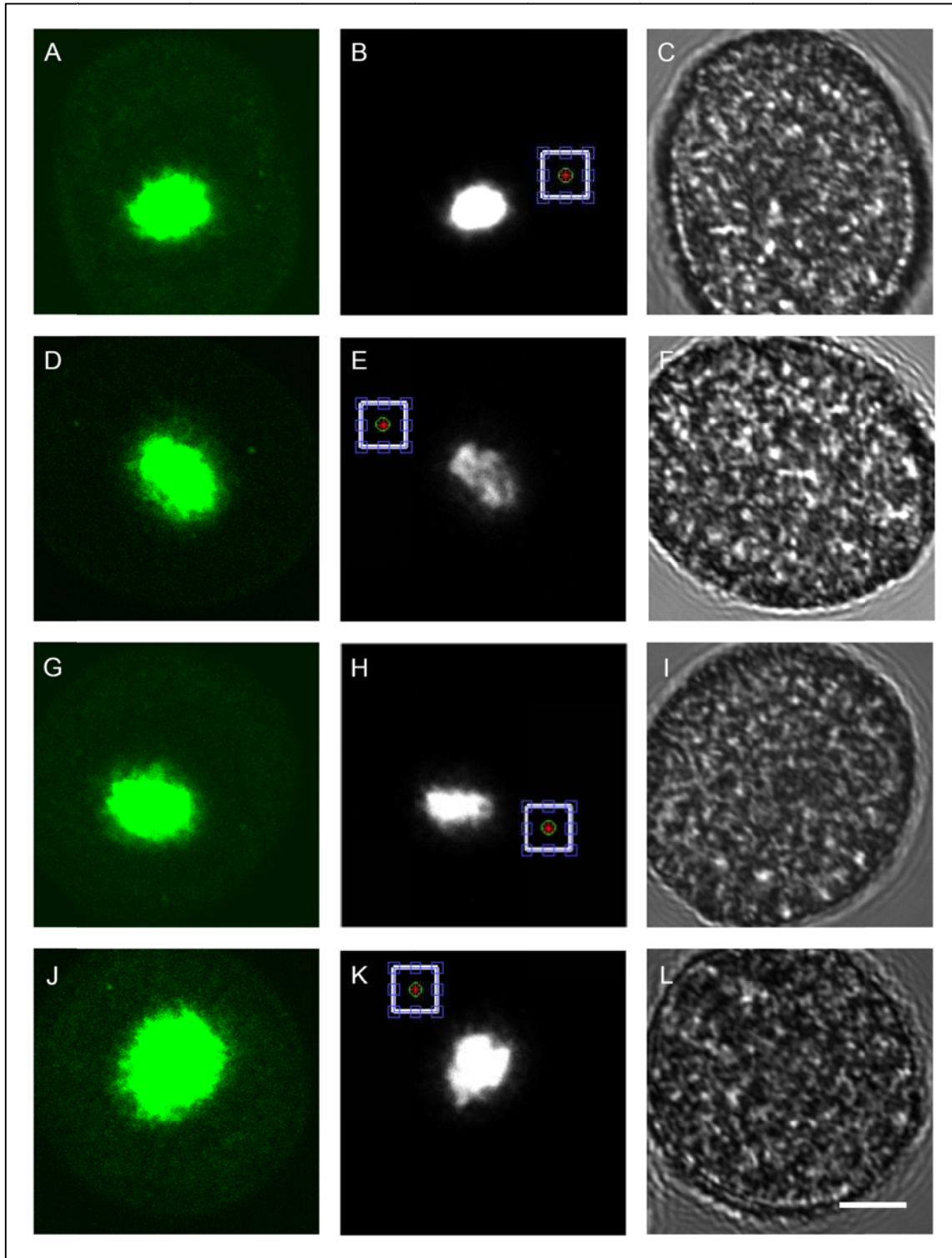
A continuación procedimos a estudiar la localización celular de los ARNm con las construcciones *pLAT52-MCP-GFP / pLAT52-skt14-MS2-12X (SKS14-MS2)* y *pLAT52-MCP-GFP / pLAT52-at59-MS2-12X (AT59-MS2)*. En la Figura 21 podemos observar una imagen de microscopía de epifluorescencia con una alta intensidad de fluorescencia correspondiente a la proteína MCP-GFP concentrada en el núcleo vegetativo y señales puntiformes localizadas de manera dispersa en el citoplasma que corresponderían a los acúmulos citoplasmáticos del ARNm *skt14*, marcados con puntas de flecha en el panel A de la figura.



**Figura 21** – Imágenes de microscopía de epifluorescencia representativas de la línea *SKS14-MS2*. La figura A corresponde a la localización de *SKS14-MS2*, la B representa la tinción con DAPI y la C corresponde a luz blanca. Las puntas de flecha en el panel A indican la posible localización focalizada del ARNm *sksl4* en el citoplasma. Barra de tamaño, 5  $\mu\text{m}$ .

Dado que la sobreexpresión de la proteína MCP-GFP genera una alta intensidad de fluorescencia en el núcleo, haciendo difícil la visualización directa de los acúmulos en el citoplasma, y también para independizarnos del análisis del observador, procedimos a desarrollar el análisis de detección de acúmulos citoplasmáticos de manera automatizada por el *software* MATLAB. El análisis detallado de la rutina de detección de acúmulos citoplasmáticos se detalla en la sección 6.1 de Materiales y Métodos. Las imágenes han sido saturadas en el núcleo para poder visualizar mejor el citoplasma, lugar donde esperamos encontrar a los acúmulos con los ARNm en estudio.

En la Figura 22 se muestran imágenes representativas de dos líneas independientes de *SKS14-MS2* y el resultado de detección de acúmulos citoplasmáticos generado por MATLAB.

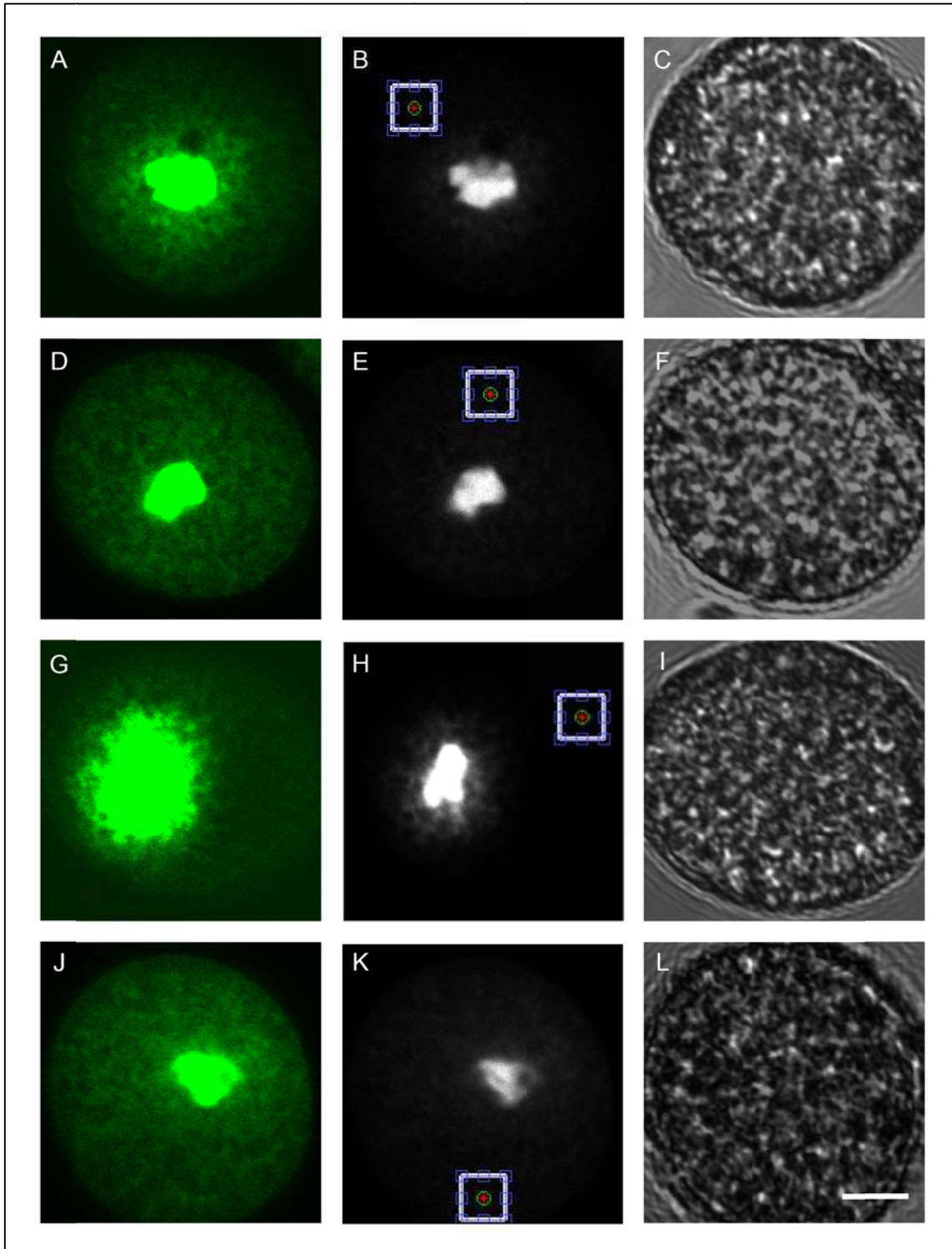


**Figura 22** - Imágenes de microscopía confocal representativas de *SKS14-MS2*. Se muestran dos granos de polen de cada una de las líneas independientes, paneles A-F corresponden a la línea *SKS14 3-2* y paneles G-L corresponden a la línea *SKS14 6-3*. Las figuras del panel izquierdo corresponden a la línea *SKS14-MS2*, las figuras del panel central corresponden al resultado generado por la rutina de detección de acúmulos

citoplasmáticos, en rojo y verde se indica la localización de los acúmulos detectados, y las figuras del panel derecho corresponden a luz blanca. Barra de tamaño, 5  $\mu\text{m}$ .

En la Figura 22 se observa la detección de un acúmulo citoplasmático (indicado con un punto rojo y un círculo verde) para cada uno de los cuatro granos de polen presentados. A partir del análisis automatizado por MATLAB pudimos determinar la presencia de acúmulos citoplasmáticos, indicando que el ARNm *skt14* se encuentra localizado en dichos acúmulos en polen maduro. Esta rutina se basa en determinar la media de intensidad de fluorescencia y se seleccionan aquellos conjuntos de píxeles que sean mayores a la media en tres veces el desvío estándar. En todos los casos observamos la alta intensidad de fluorescencia en el núcleo vegetativo debido a la proteína MCP-GFP que se encuentra libre.

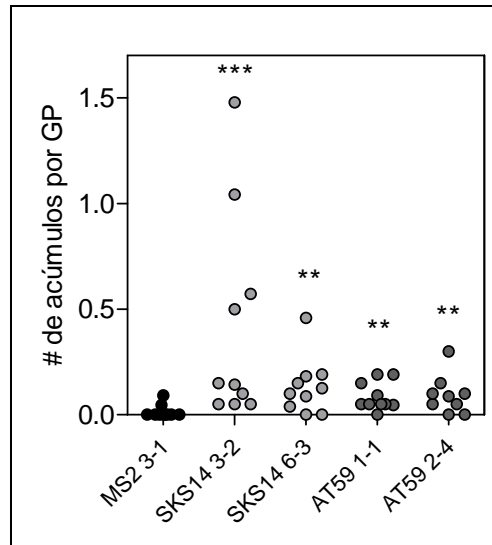
Seguidamente, procedimos a estudiar de la misma manera al ARNm del gen *AT59*. En la Figura 23 se muestran imágenes representativas de dos líneas independientes y el resultado de detección de acúmulos citoplasmáticos generado por MATLAB. Como se describió previamente, observamos para *at59* la presencia de un acúmulo citoplasmático en cada uno de los granos de polen presentados, indicados en el panel central de la figura. El ARNm *at59* presenta un comportamiento de localización en acúmulos citoplasmáticos similar a las líneas de seguimiento de *skt14*.



**Figura 23** - Imágenes de microscopía confocal representativas de *AT59-MS2*. Se muestran dos granos de polen de cada una de las líneas independientes; los paneles A-F corresponden a la línea AT59 1-1 y paneles G-L corresponden a la línea AT59 2-4. Las figuras del panel izquierdo corresponden a *AT59-MS2*, las figuras del panel central corresponden al resultado generado por la rutina de detección de acúmulos citoplasmáticos, en rojo

y verde se indican los acúmulos detectados, y las figuras del panel derecho corresponden a luz blanca. Barra de tamaño, 5  $\mu\text{m}$ .

La aplicación de esta rutina de detección de acúmulos citoplasmáticos nos permitió validar y cuantificar la presencia de los mismos. En la Figura 24 se muestra su cuantificación.



**Figura 24** - Cuantificación de acúmulos citoplasmáticos. En el gráfico se encuentran presentadas la línea control *MCP-GFP* (MS2 3-1, puntos negros), las líneas independientes de *SKS14-MS2* (SKS14 3-2 y SKS14 6-3, puntos gris claro) y las líneas independientes de *AT59-MS2* (AT59 1-1 y AT59 2-4, puntos gris oscuro). Los puntos representan la dispersión de los datos para N=10. Análisis estadístico Mann-Whitney test. Los valores son diferentes significativamente con  $p < 0,01$ .

A partir de la validación y cuantificación de los acúmulos citoplasmáticos encontramos diferencias significativas en el número de acúmulos por grano de polen tanto para el ARNm *sksl4* como para el ARNm *at59* con respecto a la línea control. En promedio encontramos acúmulos en el citoplasma en la mitad de los granos de polen analizados de la línea SKS14 3-2, mientras que para la línea SKS14 6-3 encontramos acúmulos en uno de cada ocho granos de polen estudiados. El número de granos de polen conteniendo acúmulos citoplasmáticos fue menor cuando analizamos al ARNm *at59*, siendo de uno cada diez acúmulos por grano de polen para ambas líneas independientes de *AT59-MS2* (AT59 1-1 y AT59 2-4).

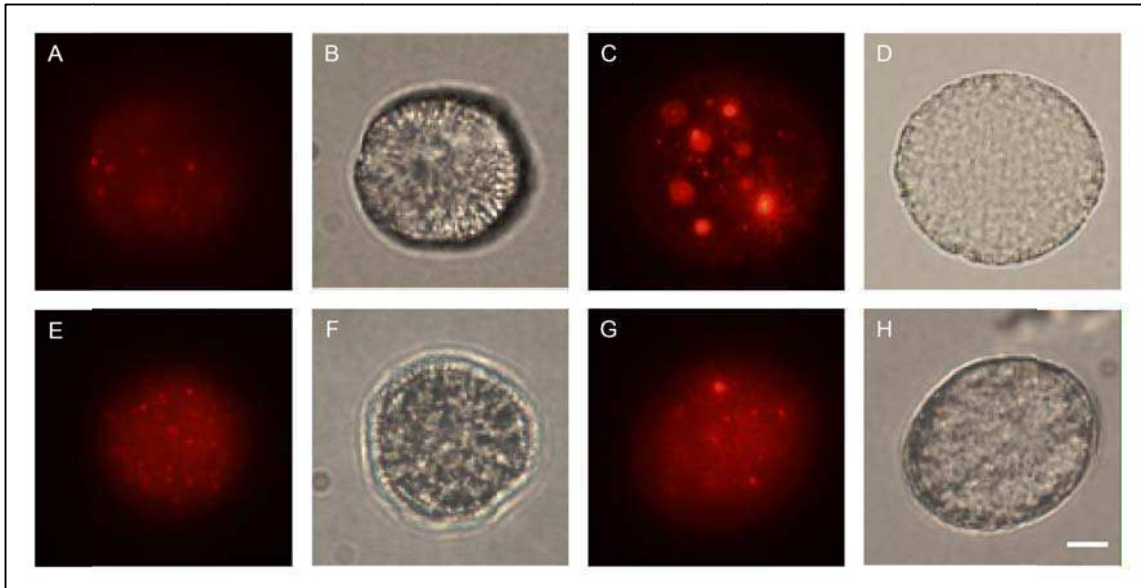
Por medio de este análisis determinamos que los ARNm *sksl4* y *at59* se encuentran localizados en acúmulos citoplasmáticos en polen maduro. Posteriormente comenzamos a estudiar la localización de dichos acúmulos, si se encuentran localizados o no en alguna estructura citoplasmática relacionada con la regulación de la traducción como son los cuerpos de procesamiento y los gránulos de estrés.

### **Marcación de cuerpos de procesamiento (PBs) y gránulos de estrés (SGs) en polen maduro**

Con el objetivo de estudiar más en detalle la localización de los acúmulos citoplasmáticos validados previamente, decidimos llevar a cabo un análisis de co-localización mediante cruces entre las líneas que expresan el sistema MS2 y líneas transgénicas que presenten la marcación de cuerpos de procesamiento (PBs) y gránulos de estrés (SGs) a través de la expresión de sus respectivas proteínas estructurales fusionadas a RFP.

Para estudiar los PBs elegimos dos proteínas estructurales que han sido caracterizadas como componentes de los mismos en *Arabidopsis thaliana*; ellas son VCS, homóloga de la proteína humana Hedls y que actúa en la interacción entre las proteínas DCP1 y DCP2 en humanos (Goeres et al., 2007), y DCP1, homóloga de la proteína DCP1a en humanos y relacionada con la remoción del *cap* de los ARNm (Maldonado-Bonilla, 2014). Como se detalló en la sección 3.5 de Materiales y Métodos realizamos las construcciones que permiten visualizar estas proteínas marcadoras de PBs mediante fluorescencia de RFP. En la Figura 25 se muestran imágenes representativas de granos de polen que expresan las proteínas VCS y DCP1.



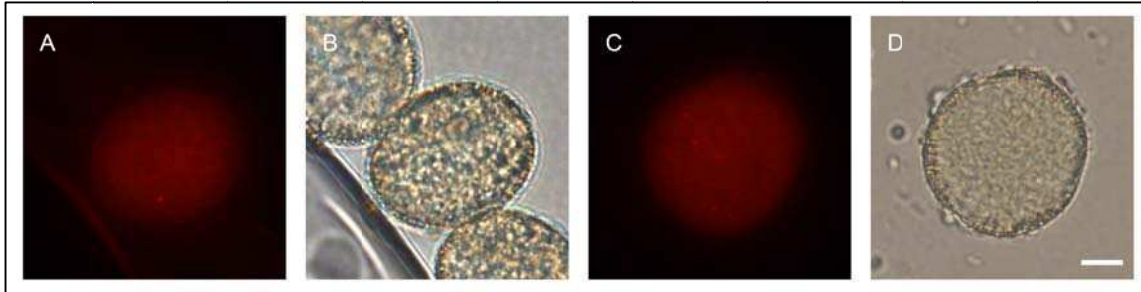


**Figura 25** - Imágenes de microscopía de epifluorescencia representativas de *VCS-RFP* (panel superior) y *DCPI-RFP* (panel inferior). Las figuras A y E corresponden a las líneas en condiciones normales, las figuras C y G corresponden a las líneas con tratamiento de puromicina 50 µg/ml. Las figuras B, F, D y H corresponden a imágenes con luz blanca. Las imágenes fueron tomadas con un objetivo de 100X. Barra de tamaño, 5 µm.

En condiciones normales podemos observar tanto para *VCS-RFP* como *DCPI-RFP* (paneles A y E respectivamente) la presencia de cuerpos en el citoplasma, visualizados como puntos brillantes por la fluorescencia de RFP. Más aún, con el agregado de puromicina observamos un aumento en el tamaño y en el número de estos cuerpos; este efecto se ve más marcado en la línea *VCS-RFP* (panel C), en donde aumentan en número y tamaño, mientras que en la línea *DCPI-RFP* se observa sólo un leve aumento de tamaño de dichos cuerpos (panel G). Este cambio en la morfología de los cuerpos está dado por la inhibición de la traducción causada por puromicina que incrementa el número de transcritos en el citoplasma; debido a que los PBs están relacionados con el procesamiento de transcritos, ya sea en su decaimiento o reinicio de la traducción, es por ello que se evidencia un aumento tanto en número como en tamaño de los mismos.

Por otro lado, realizamos construcciones similares para marcar una proteína marcadora de SGs; la proteína seleccionada fue ATX-2, relacionada con la vía de procesamiento de ARN y la regulación de la traducción (Weber et al., 2008); la misma se fusionó a RFP y en la sección 3.5 de Materiales y Métodos se detalla el procedimiento de generación de la construcción. En

la Figura 26 se observan imágenes representativas de granos de polen que expresan *ATX-2-RFP*.

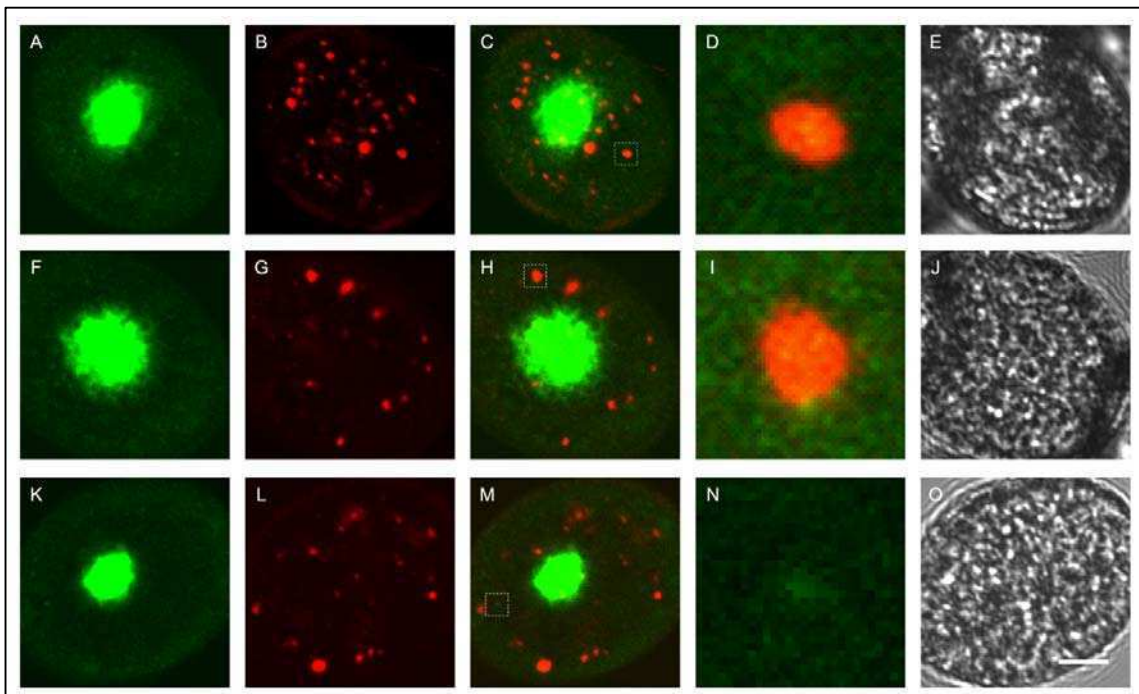


**Figura 26** - Imágenes de microscopía de epifluorescencia representativas de *ATX-2-RFP*. La figura A corresponde a la línea en condiciones normales, la figura C corresponde a la línea con tratamiento de puromicina 50 µg/ml, las figuras B y D corresponden a luz blanca. Las imágenes fueron tomadas con un objetivo de 100X. Barra de tamaño, 5 µm.

El resultado del análisis de gránulos de estrés es similar al obtenido para los cuerpos de procesamiento, pero en este caso observamos un menor número de cuerpos y una mayor intensidad de fluorescencia como fondo del grano de polen; esto estaría indicando que estas proteínas en condiciones normales se encuentran en mayor medida dispersas en el citoplasma (panel A). En particular en el panel A podemos distinguir que la dispersión de la fluorescencia es específica dado que se muestran tres granos de polen, siendo sólo uno de ellos portador de la construcción *ATX-2-RFP*. Sin embargo, con el agregado de puromicina observamos una disminución en la fluorescencia del fondo de los granos de polen y un aumento concomitante en el número de focos brillantes localizados en el citoplasma (panel C). Este resultado estaría indicando que en presencia de un mayor número de transcritos libres en el citoplasma por acción de la droga, se promueve la formación de gránulos de estrés para almacenar estos transcritos hasta que se supere la situación de estrés y una vez superado el mismo, los transcritos sean liberados para continuar con su traducción.

## Estudios de co-localización de acúmulos citoplasmáticos y cuerpos de procesamiento (PBs) en polen maduro

Para llevar a cabo los estudios de co-localización, realizamos cruza de las líneas de seguimiento de los ARNm *skt14* y *at59*, con las líneas marcadoras de cuerpos de procesamiento. Trabajamos con dos líneas independientes de la generación T3 de las cruza *SKS14-MS2* y *VCS-RFP*, denominadas A1 y A5, homocigotas para ambos transgenes. En la Figura 27 se observan imágenes representativas de tres granos de polen pertenecientes a las dos líneas independientes.



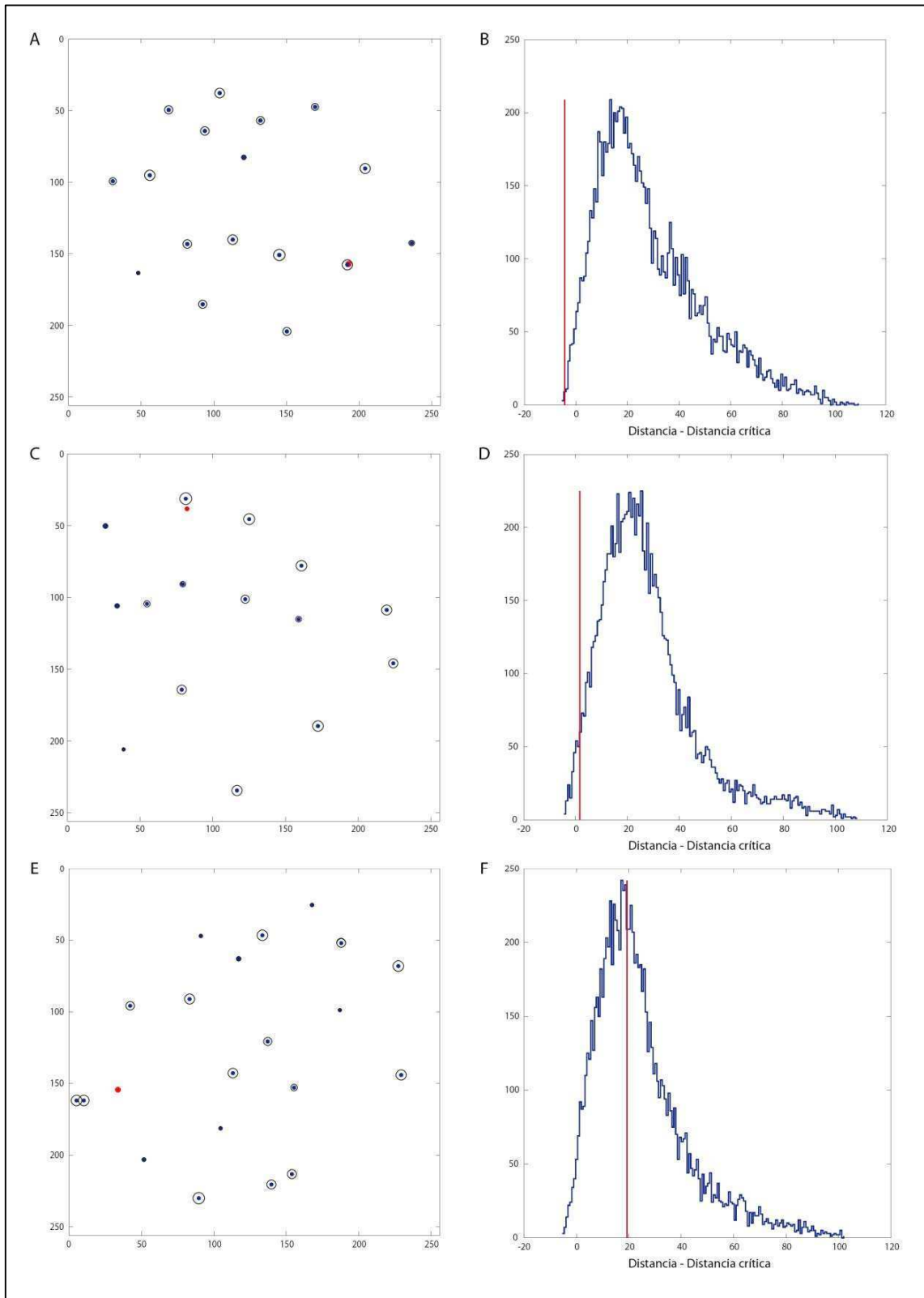
**Figura 27** - Imágenes de microscopía confocal representativas de la línea *SKS14-MS2 VCS-RFP*. Se muestra un grano de polen para cada una de las categorías (panel superior: co-localizan (I), panel central: cercanos (II) y panel inferior: distantes (III)). Las figuras A, F y K corresponden a la localización de acúmulos de la línea *SKS14-MS2*, las figuras B, G y L corresponden a la localización de la proteína VCS, las figuras C, H y M presentan la superposición de *SKS14-MS2* y *VCS-RFP*, las figuras D, I y N corresponden a un zoom 10X de la región marcada en C, H y M respectivamente y las figuras E, J y O corresponden a luz blanca. Barra de tamaño, 5  $\mu$ m.

Procedimos a llevar a cabo el siguiente análisis para las cruces *SKS14-MS2* con *VCS-RFP*. En primer lugar, analizamos las imágenes correspondientes a *SKS14-MS2* con la rutina de detección de acúmulos citoplasmáticos; una vez que validamos dichos acúmulos, procedimos a analizar las imágenes correspondientes a *VCS-RFP* con la rutina de detección de cuerpos (ver sección 6.2 de Materiales y Métodos). Finalmente, confirmamos si existía superposición utilizando la rutina de co-localización. Como se detalló previamente en la sección 6.3 de Materiales y Métodos, dividimos los resultados de co-localización en tres categorías: “co-localizan” (categoría I), cuando hay solapamiento entre el acúmulo detectado para el ARNm y la proteína en estudio, indicando una posible interacción directa entre el ARNm y dicha proteína (Figura 27A-E, panel superior); “cercanos” (categoría II), cuando el ARNm se encuentra a una distancia mayor a la distancia crítica pero menor a su doble; de esta manera estaríamos incluyendo a los acúmulos de ARNm que se encontrarían en PBs pero posiblemente estén interactuando con alguna otra proteína de los cuerpos diferente a las analizadas (Figura 27F-J, panel central) y “distantes” (categoría III), cuando la distancia entre el ARNm y la proteína se encuentra a una distancia crítica mayor a su doble, por lo que el ARNm no se encuentra formando parte de dichos cuerpos citoplasmáticos (Figura 27K-O, panel inferior). Esta categorización fue tomada de un estudio de co-localización realizado en células animales con proteínas de PBs como DCP1a y Hedls y proteínas pertenecientes a focos sinápticos como XRN1 en relación al componente pre-sináptico sinapsina (Luchelli et al., 2015). Este análisis es adecuado ya que los cuerpos citoplasmáticos en general y en particular los PBs y los SGs son estructuras altamente dinámicas que se encuentran en constante ensamblado y desensamblado de sus componentes proteicos.

Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto, procedimos a categorizar los resultados obtenidos. En el zoom del panel de la Figura 27D podemos observar la perfecta co-localización entre un acúmulo citoplasmático detectado y uno de los PBs marcado por la proteína VCS, sugiriendo una interacción entre el ARNm *sksl4* y VCS. En el zoom del panel central (Figura 27I), se encuentra ejemplificada la categoría II (cercanos) en donde se observa la posición de un cuerpo de procesamiento marcado mediante *VCS-RFP* y en el borde inferior y adyacente a dicha proteína, la posición de un acúmulo citoplasmático marcado mediante GFP. Finalmente, en el zoom del panel inferior (Figura 27N) encontramos un acúmulo citoplasmático detectado mediante la rutina de MATLAB pero sin proteínas VCS marcadas en la cercanía, el cual fue clasificado en la categoría III (distantes).

Mediante la rutina de co-localización pudimos validar y cuantificar los resultados para cada una de las categorías. En la Figura 28 se muestran los resultados obtenidos de la rutina de co-localización para los granos de polen de la cruz *SKS14-MS2* y *VCS-RFP*, de los cuales uno de cada categoría se muestra en la Figura 27.

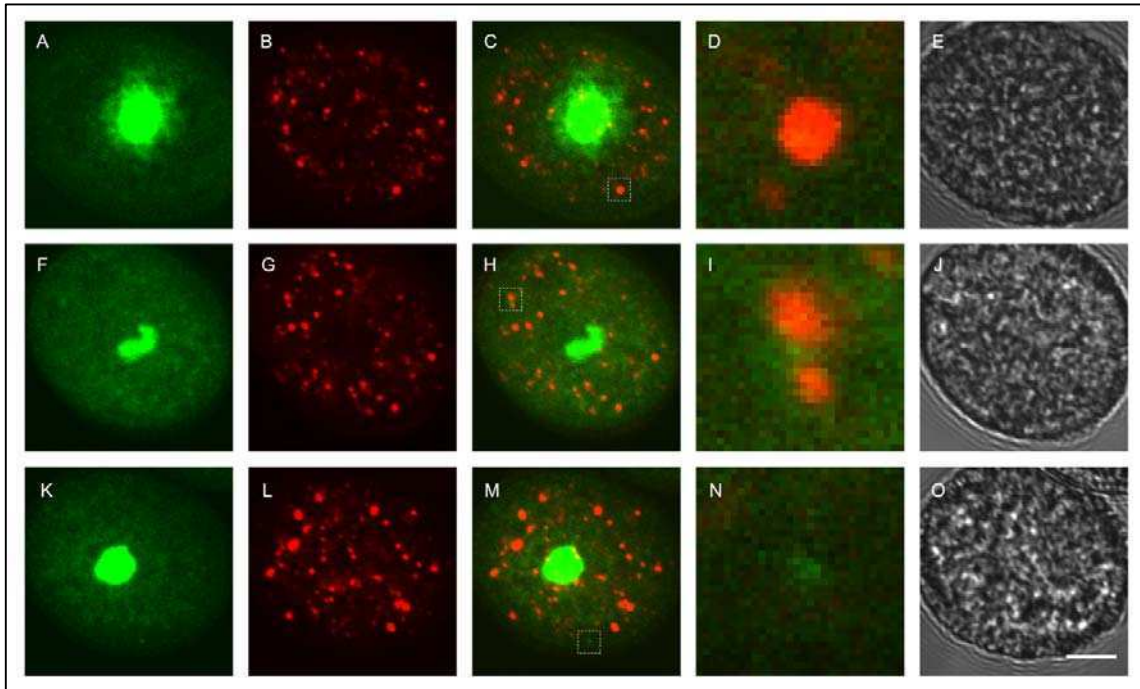
A partir de la utilización de la rutina de co-localización hemos validado los resultados obtenidos categorizando los diferentes eventos. Sin embargo, teniendo en cuenta que la rutina de detección de cuerpos valida varios PBs (representados en el panel izquierdo de la Figura 28 con puntos azules) existe la posibilidad de que los resultados de co-localización o cercanía provengan solo por azar. Para evaluar esta posibilidad, aplicamos una rutina de *shuffling*, en donde la posición del acúmulo citoplasmático de nuestro ARNm detectado (en rojo en las Figuras 28 A, C y E) itera 10.000 veces a través del área de la imagen y de esta manera se determina de manera estadística cual es la probabilidad de que el acúmulo y la señal de PBs se encuentren a determinada distancia solamente por azar (detallado en la sección 6.3 de Materiales y Métodos). Para los tres ejemplos mostrados en la Figura 28 pudimos determinar los p valores de este evento y obtuvimos, para cada caso, los gráficos mostrados en los paneles B, D y F; el panel A presentó un p valor de 0,0002, mientras que el panel C presentó un p valor de 0,0269, indicando que la mínima distancia a la que se encuentra el acúmulo y la señal de la proteína VCS más cercana es en ambos casos estadísticamente significativa con p valor menor a 0,05. Por otro lado, el ejemplo del panel E presenta un p valor de 0,4604 siendo no significativa la mínima distancia entre el acúmulo y la señal de la proteína. A partir de los resultados obtenidos para cada una de las categorías pudimos, mediante la rutina de *shuffling*, descartar la posibilidad de que el acúmulo citoplasmático y la señal de PBs se encuentren co-localizando o cercanos simplemente por azar. Además a partir del análisis de *shuffling* pudimos validar las tres categorías detalladas previamente. Los p valores de la categoría I fueron menores a 0,01, los de la categoría II menores a 0,05 y finalmente los de la categoría III resultaron no significativos.



**Figura 28** – Resultados obtenidos del análisis realizado mediante la rutina de co-localización para los granos de polen mostrados en la Figura 27. Paneles A y B corresponden a la categoría I (co-localizan, grano de polen presentado en el panel superior de la Fig. 27), paneles C y D a la categoría II (cercanos, grano de polen

presentado en el panel central de la Fig. 27) y los paneles E y F a la categoría III (distantes, grano de polen presentado en el panel inferior de la Fig. 27). En el panel izquierdo se presenta en rojo la posición del centro y el área del acúmulo citoplasmático detectado por la rutina de detección de acúmulos y en azul se representa la posición del centro y el área de los cuerpos de procesamiento detectados por la rutina de detección de cuerpos. En el panel derecho se muestra la probabilidad (línea roja) de que el acúmulo citoplasmático se encuentre a determinada distancia respecto al cuerpo más cercano solo por azar y el número de veces que el acúmulo y el cuerpo se encuentran a determinada distancia (línea azul).

A continuación procedimos a estudiar la co-localización en la generación T3 de dos líneas independientes para la cruce de *SKS14-MS2* con *DCP1-RFP* (B2 y B6), siendo DCP1 otra proteína marcadora de cuerpos de procesamiento. Nuevamente, los resultados obtenidos a partir de la rutina de co-localización nos permitieron dividirlos en las tres categorías definidas previamente. En la Figura 29 se muestra un grano de polen representativo para cada una de ellas. En el panel superior (A-E) se observa un grano de polen que presenta co-localización entre el acúmulo citoplasmático y la proteína DCP1-RFP. En el panel central (F-J) se muestra un grano de polen ejemplo para la categoría II, encontrando al acúmulo en la cercanía de la proteína DCP1 pero sin solapamiento. En el zoom del panel I podemos observar la presencia de dos cuerpos de procesamiento marcados mediante la proteína DCP1-RFP y la localización del acúmulo citoplasmático en medio de ellos, indicando que el ARNm *sksl4* podría estar interactuando con alguna otra proteína perteneciente a dichos cuerpos. Finalmente en el panel inferior (K-O) se observa un grano de polen que representa a la categoría III entre el acúmulo y la proteína DCP1, en donde el acúmulo citoplasmático detectado no presenta marca de DCP1 en la cercanía.



**Figura 29** - Imágenes de microscopía confocal representativas de la línea *SKS14-MS2 DCP1-RFP*. Se muestra un grano de polen de cada una de las categorías (panel superior: co-localizan (I), panel central: cercanos (II) y panel inferior: distantes (III)). Las figuras A, F y K corresponden a la localización de acúmulos de la línea *SKS14-MS2*, las figuras B, G y L corresponden a la localización de la proteína *DCP1*, las figuras C, H y M presentan la superposición de *SKS14-MS2* y *DCP1-RFP*, las figuras D, I y N corresponden a un zoom 10X de la región marcada en C, H y M respectivamente y las figuras E, J y O corresponden a luz blanca. Barra de tamaño, 5  $\mu\text{m}$ .

Nuevamente, realizamos el análisis de *shuffling* para los acúmulos citoplasmáticos representados en la Figura 29 obteniendo los siguientes p valores. El grano de polen que pertenece a la categoría I presenta un p valor de 0,0037, el de la categoría II, un p valor de 0,0157 y el grano de polen correspondiente a la categoría III un p valor de 0,6737. Esto indica que las distancias encontradas en los granos de polen que representan a las categorías I y II son significativas estadísticamente con p valor menor a 0,05, mientras que las distancias encontradas para el grano de polen correspondiente a la categoría III no fueron significativas.

A partir de los resultados obtenidos de las rutinas de co-localización para las líneas *SKS14-MS2 VCS-RFP* y *SKS14-MS2 DCP1-RFP* se procedió a cuantificar los mismos y éstos se presentan en la Tabla 7.



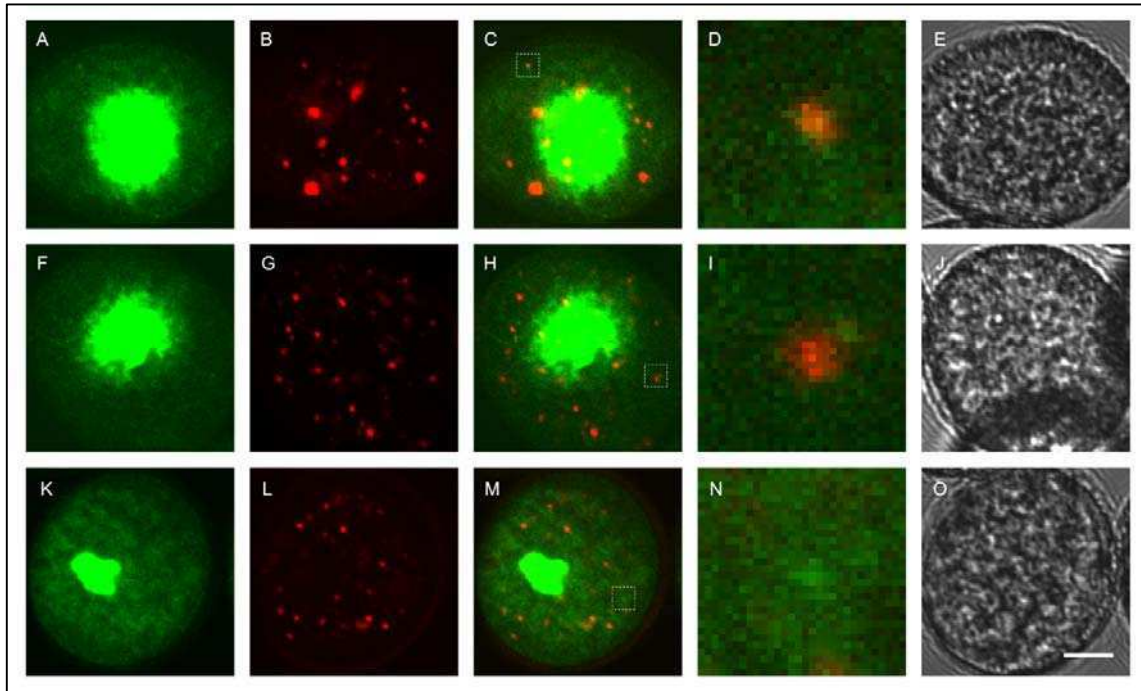
ARNm/proteína	Línea	Co-localización (%)	Cercanos (%)	N
SKS14-VCS	A1	19,6	6,5	46
	A5	21,4	16,7	42
SKS14-DCP1	B2	23,8	0	21
	B6	20	10	30

**Tabla 7** - Cuantificación del porcentaje de co-localización. En la tabla se encuentran presentadas dos líneas independientes de la cruce SKS14-MS2 VCS-RFP (SKS14-VCS, A1 y A5) y dos líneas independientes de la cruce SKS14-MS2 DCP1-RFP (SKS14-DCP1, B2 y B6). La tercera columna corresponde al porcentaje de co-localización de la categoría I, la cuarta columna corresponde al porcentaje de cercanía de la categoría II y en la quinta se detalla el número de acúmulos citoplasmáticos analizados.

Como podemos observar en la tabla, para la proteína VCS, el porcentaje de co-localización con los acúmulos del ARNm *skt14* pertenecientes a la categoría I varía de 19,6-21,4%, mientras que cuando analizamos la co-localización entre los acúmulos y la proteína DCP1, encontramos un porcentaje similar que varía del 20-23,8%. Por otro lado, cuando analizamos el porcentaje de co-localización de los granos correspondientes a la categoría II observamos que varía entre 6,5 y 16,7% para las líneas *SKS14-VCS*, mientras que para las que expresan la proteína DCP1 muestra una variación mayor (de 0-10%). Estos resultados indican que el ARNm *skt14* se encontraría co-localizando tanto con la proteína VCS como con la proteína DCP1, ya que obtuvimos porcentajes de co-localización similares. Por otro lado, cuando analizamos los porcentajes obtenidos para la categoría II, obtenemos valores menores en comparación a la categoría I, lo que estaría indicando que el ARNm se encontraría co-localizando en menor medida con alguna otra proteína de los PBs. Como se mencionó previamente, dichos cuerpos son altamente dinámicos lo cual sugiere que estos resultados solo representan la localización de un acotado número de acúmulos citoplasmáticos. Otros acúmulos de ARNm podrían estar co-localizando con otras proteínas marcadoras de PBs o proteínas que integran otros cuerpos citoplasmáticos.

Siguiendo con la línea en estudio procedimos a realizar los mismos análisis para el ARNm *at59* con las proteínas marcadoras de cuerpos de procesamiento VCS y DCP1. Para esto llevamos a cabo cruces entre las líneas *AT59-MS2* y *VCS-RFP*. En la Figura 30 se muestran imágenes representativas pertenecientes a dos líneas independientes homocigotas para ambos

transgenes de la generación T3 de las cruzas (A2 y A14), que muestran cada una de las categorías de co-localización detalladas previamente.

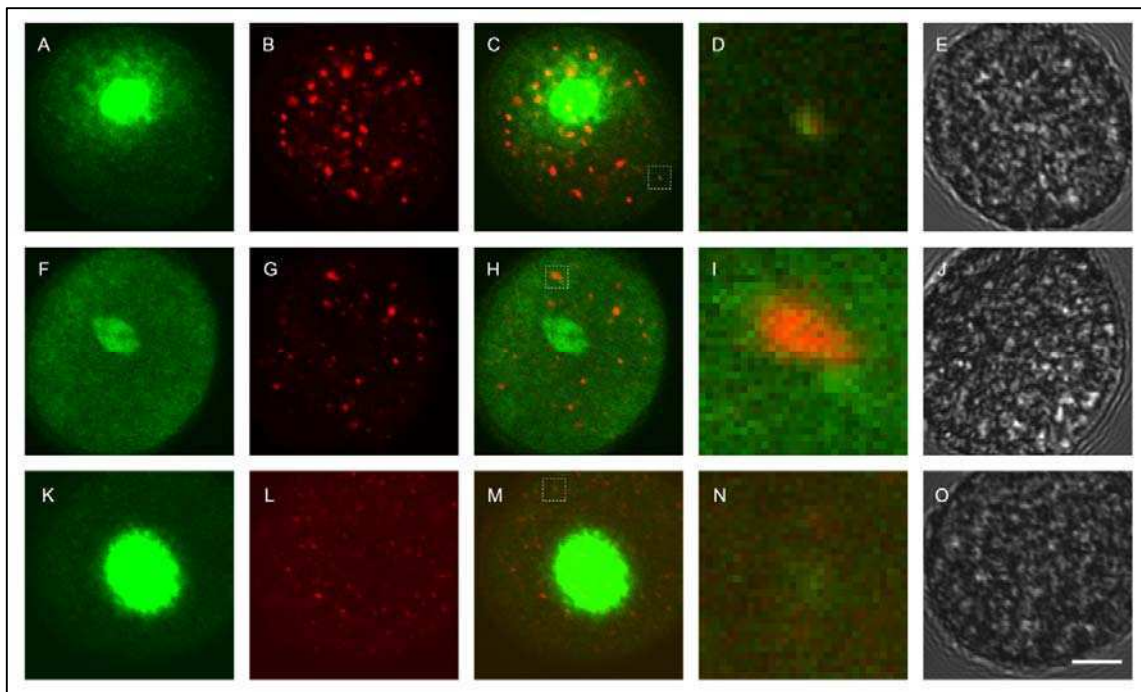


**Figura 30** - Imágenes de microscopía confocal representativas de la línea *AT59-MS2 VCS-RFP*. Se muestra un grano de polen de cada una de las categorías (panel superior: co-localizan, panel central: cercanos y panel inferior: distantes). Las figuras A, F y K corresponden a la localización de acúmulos de la línea *AT59-MS2*, las figuras B, G y L corresponden a la localización de la proteína VCS, las figuras C, H y M presentan la superposición de *AT59-MS2* y *VCS-RFP*, las figuras D, I y N corresponden a un zoom 10X de la región marcada en C, H y M respectivamente y las figuras E, J y O corresponden a luz blanca. Barra de tamaño, 5  $\mu$ m.

Como se puede observar en la Figura 30 obtuvimos resultados para *at59* similares a *skt14*, para cada una de las categorías de co-localización. En el zoom de la Figura 30D podemos observar la perfecta co-localización entre el acúmulo citoplasmático y la proteína VCS (p valor = 0,0021 obtenido con la rutina de *shuffling*). En el zoom de la Figura 30I observamos un ejemplo de la categoría II (cercanos); en este caso observamos a la proteína VCS indicando la localización de PBs, marcado en rojo, y el acúmulo citoplasmático se encuentra adyacente al mismo en el borde superior derecho (p valor = 0,0394 obtenido por la rutina de *shuffling*). Finalmente en el zoom de la Figura 30N encontramos un acúmulo citoplasmático que no presenta ninguna señal de VCS en la cercanía (p valor = 0,6771 obtenido por la rutina de *shuffling*). Nuevamente observamos que para las categorías I y II las distancias entre el

acúmulo citoplasmático y la proteína marcadora de cuerpo de procesamiento más cercana fueron estadísticamente significativas mientras que no fue así para la categoría III.

A continuación realizamos el mismo análisis para el ARNm *at59* con la proteína DCP1, marcadora también de PBs. Estudiamos dos líneas independientes homocigotas para ambos transgenes de la generación T3 de las cruzas entre el ARNm y la proteína (B16 y B17). En la Figura 31 se presenta un ejemplo de co-localización para cada una de las tres categorías.



**Figura 31** - Imágenes de microscopía confocal representativas de la línea *AT59-MS2 DCP1-RFP*. Se muestra un grano de polen de cada una de las categorías (panel superior: co-localizan, panel central: cercanos y panel inferior: distantes). Las figuras A, F y K corresponden a la localización de acúmulos de la línea *AT59-MS2*, las figuras B, G y L corresponden a la localización de la proteína DCP1, las figuras C, H y M presentan la superposición de *AT59-MS2* y *DCP1-RFP*, las figuras D, I y N corresponden a un zoom 10X de la región marcada en C, H y M respectivamente y las figuras E, J y O corresponden a luz blanca. Barra de tamaño, 5  $\mu\text{m}$ .

En la Figura 31 se muestra un grano de polen como ejemplo de cada una de las categorías. En el zoom de la Figura 31D podemos observar la co-localización entre el acúmulo citoplasmático y DCP1. En el zoom de la Figura 31I se muestra un grano de polen representante de la categoría II (cercanos), en el que observamos un cuerpo de procesamiento

marcado por DCP1 y un acúmulo citoplasmático del ARNm *at59* localizado en la región inferior derecha adyacente al cuerpo. Por último en el zoom de la Figura 31N observamos un acúmulo citoplasmático que no presenta proteína DCP1 marcadora de PBs en la cercanía. Las distancias a las que se encuentran los acúmulos y la proteína fueron validadas mediante el análisis de *shuffling*, obteniéndose p valores de 0,0027 y 0,05 para los granos de polen de los paneles D e I, respectivamente, mientras que para el grano de polen del panel N se obtuvo un p valor de 0,7926, siendo no significativo.

Resumiendo, mediante las cruza del ARNm *at59* con las proteínas VCS y DCP1 obtuvimos resultados similares de co-localización a los obtenidos con el ARNm *skt14*. Esto sugiere que el ARNm *at59* estaría interactuando con las proteínas estructurales VCS y DCP1 de PBs al igual que *skt14*.

Por medio de la rutina de co-localización pudimos validar y cuantificar los porcentajes de co-localización entre las líneas *AT59-MS2 VCS-RFP* y *AT59-MS2 DCP1-RFP*; los mismos se representan en la Tabla 8.

ARNm/proteína	Línea	Co-localización (%)	Cercanos (%)	N
AT59-VCS	A2	13	9,5	63
	A14	14,3	11,4	35
AT59-DCP1	B16	11,4	11,4	35
	B17	8,8	0	34

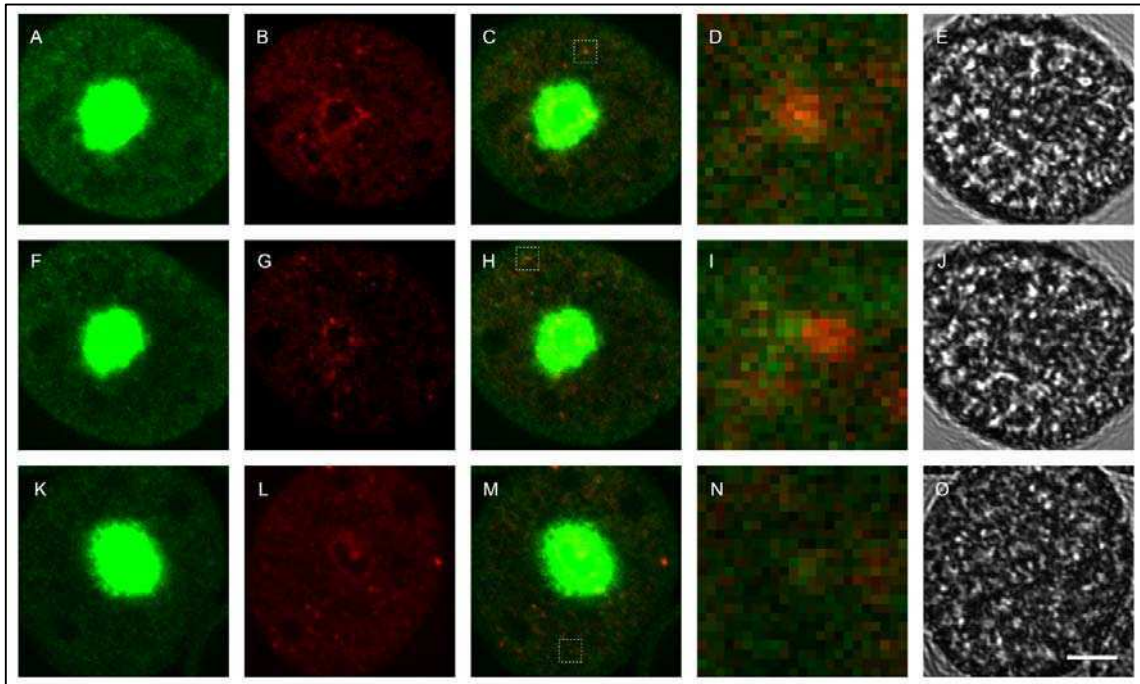
**Tabla 8** - Cuantificación del porcentaje de co-localización. En la tabla se encuentran presentadas dos líneas independientes de la cruce *AT59-MS2 VCS-RFP* (AT59-VCS, A2 y A14) y dos líneas independientes de la cruce *AT59-MS2 DCP1-RFP* (AT59-DCP1, B16 y B17). La tercera columna corresponde al porcentaje de co-localización de la categoría I, la cuarta columna corresponde al porcentaje de cercanía de la categoría II y en la quinta se detalla el número de acúmulos citoplasmáticos analizados.

A partir del análisis realizado entre el ARNm *at59* y las proteínas marcadoras de cuerpos de procesamiento podemos observar que la co-localización para la categoría I varía de 13-14,3% para la línea que posee la proteína marcadora VCS, mientras que la línea marcada con DCP1 presenta una variación de 8,8-11,4%. Cuando analizamos los datos obtenidos para la categoría II observamos un porcentaje de co-localización que varía de 9,5-11,4% para la línea

AT59-VCS, mientras que para la línea que expresa la proteína DCP1 observamos un porcentaje del 11,4% para una de las líneas independientes (B16) mientras que para la otra (B17) no se encontraron granos de polen dentro de esta categoría. A pesar de que los porcentajes de co-localización, en general, son menores para el ARNm *at59* con respecto a los obtenidos para el ARNm *skl4*, observamos que muestran la misma tendencia, obteniendo un mayor porcentaje de co-localización para las líneas que expresan VCS con respecto a aquellas que marcan DCP1. Por lo tanto, estos resultados sugieren que el ARNm *at59* posee un menor grado de co-localización con las proteínas componentes de PBs, VCS y DCP1, en comparación al ARNm *skl4*. Un resultado similar se obtiene cuando comparamos los porcentajes de co-localización de las dos categorías, ya que obtenemos valores similares tanto para la interacción directa como para la interacción a través de otra proteína componente de cuerpos de procesamiento. En conjunto, estos resultados sugieren que el ARNm *skl4* se encuentra localizando en mayor medida con VCS y DCP1, mientras que el ARNm *at59* tendría preferencia por otra/s proteína/s perteneciente a PBs o por otra estructura citoplasmática de almacenamiento.

### **Estudios de co-localización de acúmulos citoplasmáticos y gránulos de estrés (SGs) en polen maduro**

Seguidamente procedimos a estudiar la co-localización entre los acúmulos citoplasmáticos y los gránulos de estrés de la misma manera que se llevó a cabo el estudio con los cuerpos de procesamiento. Para esto generamos líneas que contienen el sistema MS2 con el ARNm *skl4* con la proteína de fusión *ATX-2-RFP* para visualizar los SGs. Realizamos el estudio en dos líneas independientes heterocigotas para el transgen *ATX-2-RFP* y homocigotas para la marcación del ARNm de la generación T2 de las cruas obtenidas. En la Figura 32 se muestran imágenes representativas pertenecientes a cada una de las categorías de co-localización detalladas previamente.



**Figura 32** - Imágenes de microscopía confocal representativas de la línea *SKS14-MS2 ATX-2-RFP*. Se muestra un grano de polen de cada una de las categorías (panel superior: co-localizan, panel central: cercanos y panel inferior: distantes). Las figuras A, F y K corresponden a la localización de acúmulos de la línea *SKS14-MS2*, las figuras B, G y L corresponden a la localización de la proteína *ATX-2*, las figuras C, H y M presentan la superposición de *SKS14-MS2* y *ATX-2-RFP*, las figuras D, I y N corresponden a un zoom 10X de la región marcada en C, H y M respectivamente y las figuras E, J y O corresponden a luz blanca. Barra de tamaño, 5  $\mu$ m.

En la Figura 32 se muestran tres granos de polen representativos de la línea *SKS14-MS2 ATX-2-RFP*. Podemos observar, en primer lugar, que el número de SGs es menor (Figuras 32B, G y L) en comparación con la de PBs observada anteriormente; sin embargo, fue posible llevar a cabo los estudios de co-localización del ARNm *sksl4* con la proteína *ATX-2*. En el zoom de la Figura 32D observamos co-localización, con un p valor de 0,0002. Por otro lado, en la Figura 32I, se observa un acúmulo citoplasmático y adyacente en su borde derecho se encuentra localizada la proteína *ATX-2-RFP*, obteniendo un p valor de 0,0036. Finalmente en la Figura 32N, se observa un acúmulo citoplasmático que no se encuentra cercano a la proteína *ATX-2* (p valor 0,2214). A partir de los p valores obtenidos para las distancias utilizando la rutina de *shuffling* podemos determinar que las distancias son significativas para las categorías I y II, siendo no significativa para la categoría III.

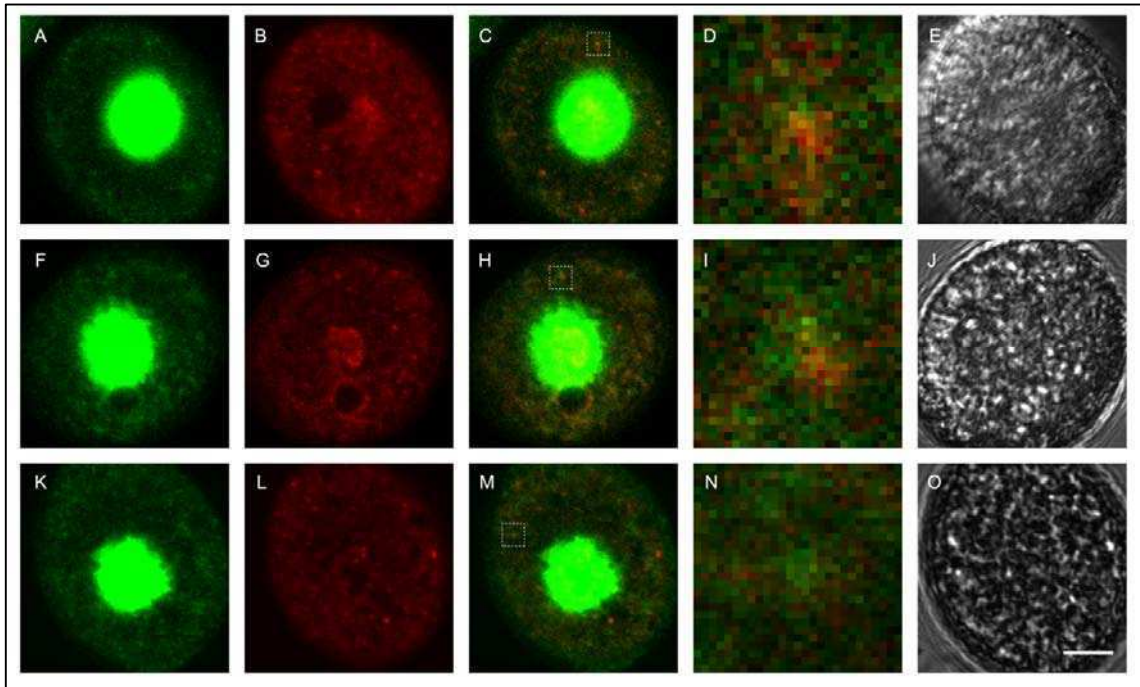
Finalmente, procedimos a cuantificar los porcentajes de co-localización de la línea *SKS14-ATX-2* y se detallan a continuación en la Tabla 9.

ARNm/proteína	Línea	Co-localización (%)	Cercanos (%)	N
SKS14-ATX-2	G2	3,9	2,9	102
	G5	13,6	3,7	81

**Tabla 9** - Cuantificación del porcentaje de co-localización. En la tabla se encuentran presentadas dos líneas independientes de la cruce *SKS14-MS2 ATX-2-RFP* (SKS14-ATX-2, G2 y G5). La tercera columna corresponde al porcentaje de co-localización de la categoría I, la cuarta columna corresponde al porcentaje de cercanía de la categoría II y en la quinta se detalla el número de acúmulos citoplasmáticos analizados.

Como podemos observar a partir de los resultados mostrados en la Tabla 9 los porcentajes de co-localización obtenidos para el ARNm *skl4* con la proteína de SGs son menores que los que se obtuvieron con VCS y DCP1. De todas maneras se obtiene un porcentaje de co-localización entre el ARNm *skl4* y la proteína ATX-2 que varía entre 3,9-13,6%, mientras que para los que se encuentran cercanos fluctúa entre 2,9-3,7%. Estos resultados, en comparación a los obtenidos en la sección anterior, nos estarían indicando que el ARNm *skl4* se localizaría con mayor predominancia en estructuras del tipo PBs que contengan a las proteínas VCS y DCP1, que en gránulos de estrés en los cuales se localice ATX-2.

De la misma manera llevamos a cabo un análisis similar para el ARNm *at59* y la proteína ATX-2 a través de la obtención de dos líneas independientes heterocigotas para ambos transgenes de la generación T2 de las cruces de *AT59-MS2* con *ATX-2-RFP*. A continuación, en la Figura 33, se muestra una imagen representativa para cada una de las categorías de co-localización detalladas previamente.



**Figura 33** - Imágenes de microscopía confocal representativas de la línea *AT59-MS2 ATX-2-RFP*. Se muestra un grano de polen de cada una de las categorías (panel superior: co-localizan, panel central: cercanos y panel inferior: distantes). Las figuras A, F y K corresponden a la localización de acúmulos de la línea *AT59-MS2*, las figuras B, G y L corresponden a la localización de la proteína *ATX-2*, las figuras C, H y M presentan la superposición de *AT59-MS2* y *ATX-2-RFP*, las figuras D, I y N corresponden a un zoom 10X de la región marcada en C, H y M respectivamente y las figuras E, J y O corresponden a luz blanca. Barra de tamaño, 5  $\mu$ m.

En la Figura 33 podemos observar una imagen representativa de cada una de las categorías de co-localización detalladas previamente. En el panel superior se muestra la co-localización entre el ARNm *at59* y la proteína *ATX-2*. La Figura 33D muestra la perfecta co-localización entre el ARNm *at59* y *ATX-2*, con un p valor de 0,001. Por otro lado, en el panel central observamos un ejemplo de la categoría II. En el zoom de la Figura 33I podemos observar que el acúmulo citoplasmático se encuentra en la zona superior y adyacente a la proteína *ATX-2-RFP* con un p valor de 0,0069. Finalmente, en el panel inferior se muestra un grano de polen representativo de la categoría III donde el acúmulo citoplasmático no se encuentra ni co-localizando ni cercano a la proteína *ATX-2* (p valor 0,6063 obtenido por la rutina de *shuffling*). Resumiendo, determinamos que las distancias obtenidas para las categorías I y II son significativas con p valor menor a 0,05, mientras que no se obtuvo un valor significativo para el ejemplo de la categoría III.



Finalmente, a partir de los análisis desarrollados para estudiar la co-localización o cercanía del ARNm *at59* con la proteína ATX-2 procedimos a cuantificarlos, obteniendo los resultados que se detallan en la Tabla 10.

ARNm/proteína	Línea	Co-localización (%)	Cercanos (%)	N
AT59-ATX-2	G1	3,2	3,2	31
	G6	6	0	16

**Tabla 10** - Cuantificación del porcentaje de co-localización. En la tabla se encuentran presentadas dos líneas independientes de la cruce *AT59-MS2 ATX-2-RFP* (AT59-ATX-2, G1 y G6). La tercera columna corresponde al porcentaje de co-localización de la categoría I, la cuarta columna corresponde al porcentaje de cercanía de la categoría II y en la quinta se detalla el número de acúmulos citoplasmáticos analizados.

En la Tabla 10 podemos observar que el porcentaje de co-localización obtenido para el análisis entre la proteína ATX-2 y el ARNm *at59* varía de 3,2-6%, mientras que el porcentaje de la categoría II (cercanos) es del 3,2% para la línea G1, para la línea G6 no se encontró ningún acúmulo para esta categoría.

En conjunto, pudimos determinar que los porcentajes de co-localización y cercanía obtenidos para el análisis entre los ARNm *sksl4* y *at59* y la proteína ATX-2 son menores en comparación con los resultados obtenidos para las proteínas VCS y DCP1 sugiriendo que ambos ARNm se localizarían con mayor preferencia en estructuras del tipo PBs que contengan a VCS y DCP1, que en gránulos de estrés con ATX-2.

La variación en los valores obtenidos podría deberse al constante dinamismo que existe entre la formación de cuerpos de procesamiento, gránulos de estrés, degradación de los ARNm y reinicio de la traducción, como fue explicado en la introducción.

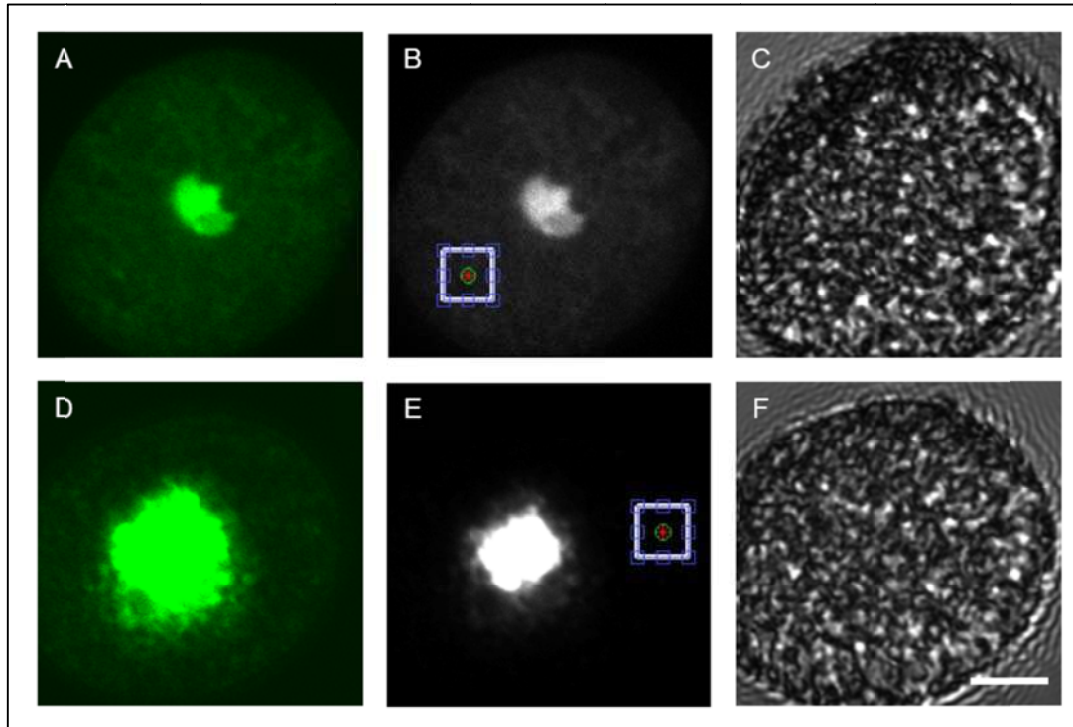
### **Análisis de localización de los ARNm en polen maduro de plantas mutantes simples de inserción de ADN-T para los genes *VCS* y *DCP1* de cuerpos de procesamiento (PBs)**

A partir de los estudios de co-localización de los acúmulos citoplasmáticos con determinadas proteínas pertenecientes a PBs, concluimos que tanto los acúmulos del ARNm *skl4* como de *at59* co-localizan en parte con dichos cuerpos; esto se produciría a través de interacciones con las proteínas *VCS* y *DCP1* (de acuerdo a los resultados obtenidos por la categoría I) o con alguna otra proteína de PBs (categoría II).

A continuación, nos propusimos estudiar si *VCS* y *DCP1* son realmente necesarias para la localización de estos acúmulos citoplasmáticos en cuerpos de procesamiento. Nuestra hipótesis es que la ausencia de alguna de estas proteínas afectaría en parte la localización de los ARNm en acúmulos citoplasmáticos.

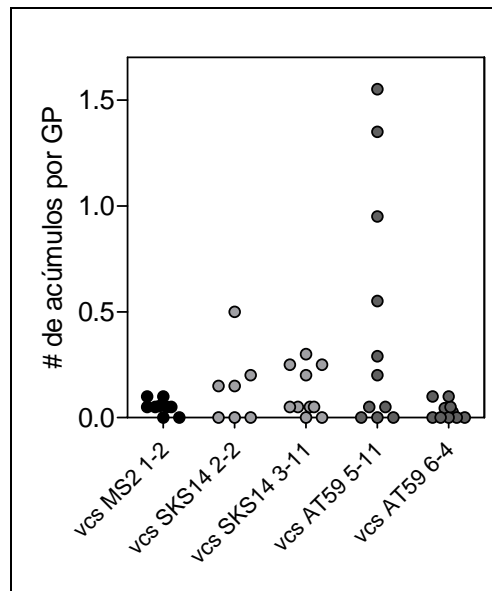
Para esto, primero, obtuvimos líneas mutantes homocigotas simples de inserción de ADN-T para los genes *VCS* y *DCP1*, como se detalla en la sección 2.3 de Materiales y Métodos. Luego, dichas líneas homocigotas fueron transformadas con las construcciones *SKS14-MS2* o *AT59-MS2* (ver sección 3.6 de Materiales y Métodos). Obtuvimos dos líneas independientes homocigotas de la generación T3 para la línea *vcs-SKS14-MS2* y una para *dcp1-SKS14-MS2*, que poseen la construcción de seguimiento del ARNm *skl4* y la inserción en los genes *VCS* y *DCP1*, respectivamente. Por otro lado, obtuvimos dos líneas independientes homocigotas de la generación T3 para *vcs-AT59-MS2* y dos líneas para *dcp1-AT59-MS2*, que contienen el seguimiento del ARNm *at59* en líneas que carecen de los genes *VCS* y *DCP1* respectivamente. Además obtuvimos las líneas control *vcs-MCP-GFP* y *dcp1-MCP-GFP*.

En la Figura 34 se presentan imágenes representativas de las líneas mutantes simples de inserción de ADN-T para el gen *VCS*, tanto para el estudio de localización del ARNm *skl4* como para *at59*.



**Figura 34** - Imágenes de microscopía confocal representativas de las líneas *vcs-SKS14-MS2* y *vcs-AT59-MS2*. Se muestra un grano de polen de cada una de las líneas, *vcs-SKS14-MS2* en el panel superior y *vcs-AT59-MS2* en el panel inferior. Las figuras A y D muestran la fluorescencia del sistema MS2, las figuras B y E corresponden a la localización del acúmulo citoplasmático detectado por la rutina de MATLAB de detección de acúmulos (en rojo y verde) y las figuras C y F corresponden a luz blanca. Barra de tamaño, 5  $\mu\text{m}$ .

Procedimos a analizar los resultados obtenidos para las líneas *vcs-MCP-GFP*, *vcs-SKS14-MS2* y *vcs-AT59-MS2* mediante el análisis automatizado por MATLAB con la rutina de detección de acúmulos citoplasmáticos. En la Figura 34 podemos observar un grano de polen representativo para las líneas del ARNm *skl4* y para ARNm *at59*. Se muestra la detección de un acúmulo por cada grano de polen (Figura 34B para *skl4* y Figura 34E para *at59*). El uso de esta rutina nos permitió validar y cuantificar los resultados obtenidos tanto para la línea control como para las líneas de ARNm en el fondo genético donde la proteína VCS se encuentra ausente (Figura 35).

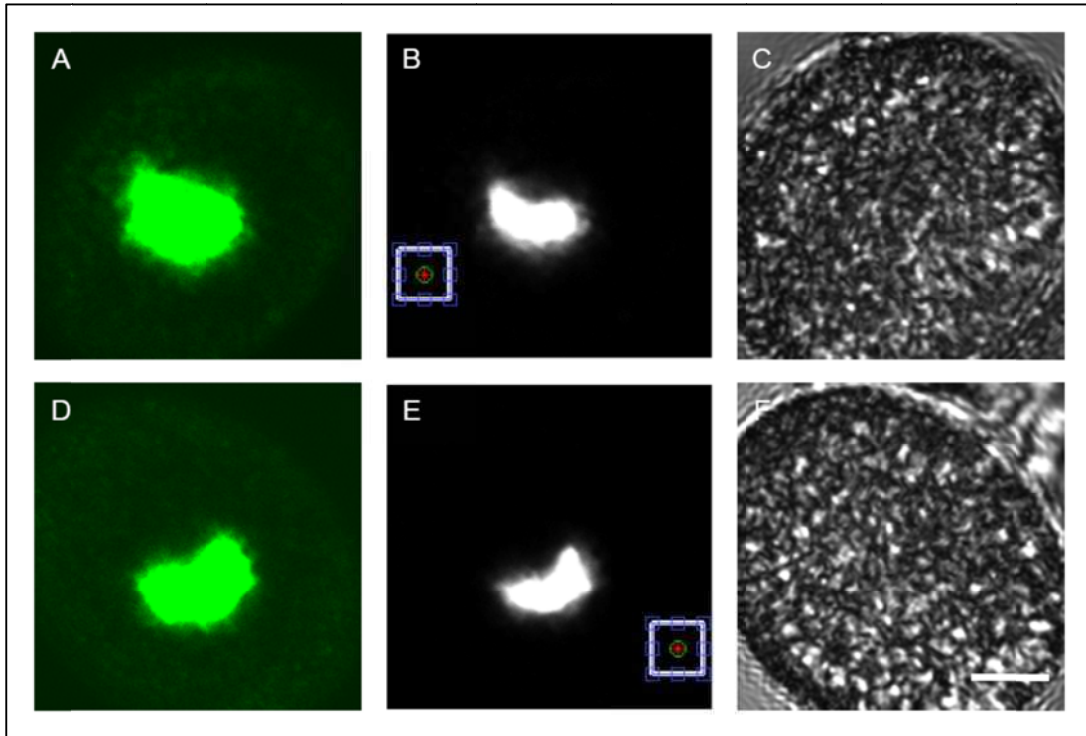


**Figura 35** - Cuantificación de acúmulos citoplasmáticos en líneas homocigotas con simple inserción de ADN-T en el gen *VCS*. En el gráfico se encuentran presentadas la línea control *vcs-MCP-GFP* (*vcs* MS2 1-2, puntos negros), las líneas independientes *vcs-SKS14-MS2* (*vcs* SKS14 2-2 y *vcs* SKS14 3-11, puntos gris claro) y las líneas independientes *vcs-AT59-MS2* (*vcs* AT59 5-11 y *vcs* AT59 6-4, puntos gris oscuro). Los puntos representan la dispersión de los datos para N=7-10. Análisis estadístico Mann-Whitney test. Las diferencias no son significativas.

La cuantificación de la detección de los acúmulos citoplasmáticos en la mutante *vcs*, determinó que para las líneas *sksl4* y *at59* analizadas los resultados fueron estadísticamente no significativos comparados con la línea control. Esto podría explicarse a que la falta de la proteína VCS podría estar afectando de modo general la formación de los cuerpos de procesamiento; de hecho se han obtenido mutantes heterocigotas simples de inserción que afectan el desarrollo general de las plantas, siendo imposible obtener mutantes homocigotas ya que dichas plantas son letales embrionarias (Goeres et al., 2007). Estos resultados sugieren que es necesaria la presencia de VCS para la formación de acúmulos citoplasmáticos que contengan a los ARNm *sksl4* y *at59*. Falta probar si es un efecto directo sobre los ARNm o si es un efecto que afecta a la formación de los cuerpos de procesamiento de manera global.

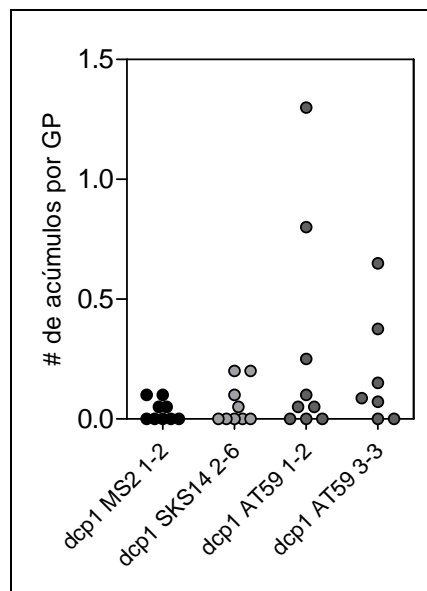
A continuación procedimos a estudiar de la misma manera cómo varía la formación de acúmulos citoplasmáticos de ambos ARNm cuando la proteína DCP1 no se encuentra presente. Llevamos a cabo el análisis de la línea control *dcp1-MCP-GFP*, y de las líneas *dcp1-SKS14-MS2* y *dcp1-AT59-MS2*. En la Figura 36 se presenta un grano de polen

representativo de la línea de seguimiento del ARNm *skt14* (panel superior) y del ARNm *at59* (panel inferior).



**Figura 36** - Imágenes de microscopía confocal representativas de las líneas *dcp1-SKS14-MS2* y *dcp1-AT59-MS2*. Se muestra un grano de polen de cada una de las líneas, *dcp1-SKS14-MS2* en el panel superior y *dcp1-AT59-MS2* en el panel inferior. Las figuras A y D muestran la fluorescencia del sistema MS2, las figuras B y E corresponden a la localización del acúmulo citoplasmático detectado (en rojo y verde) y las figuras C y F corresponden a luz blanca. Barra de tamaño, 5  $\mu\text{m}$ .

Procedimos a estudiar de la misma manera que anteriormente la detección de acúmulos citoplasmáticos a través de la rutina de MATLAB, en la línea control y en las líneas de seguimiento de ARNm. En los paneles B y E de la Figura 36 podemos observar la detección de un acúmulo citoplasmático para los ARNm *skt14* y *at59*, respectivamente, marcados con un punto rojo y verde. Los resultados del análisis automatizado por MATLAB para las diferentes líneas, se detallan en la Figura 37.



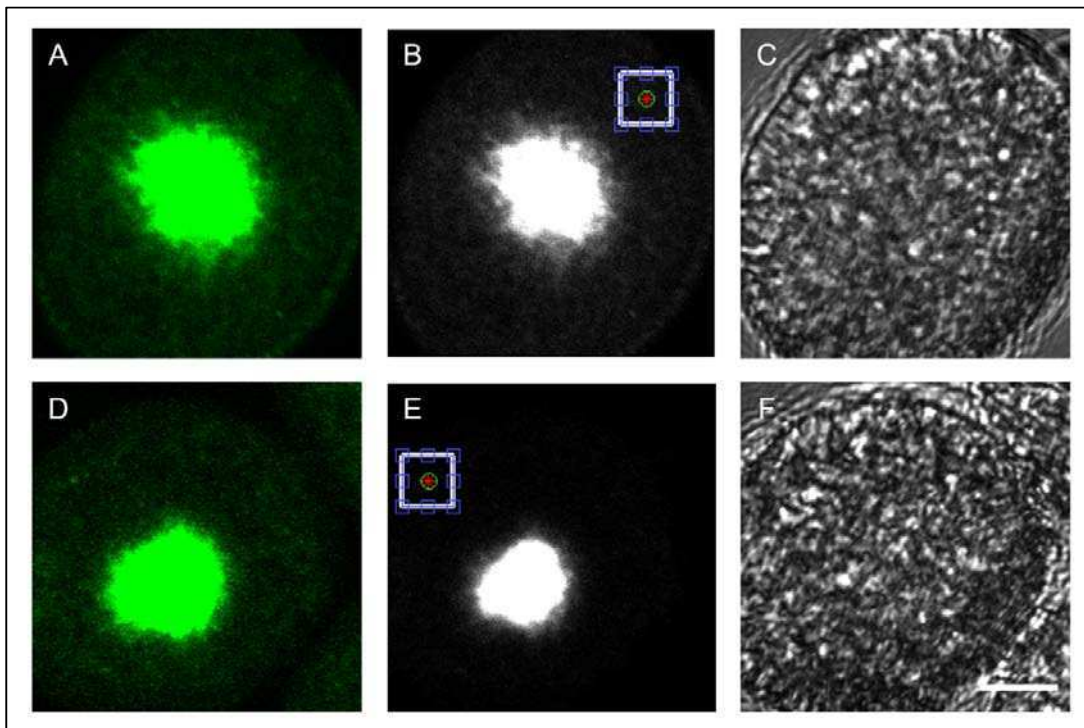
**Figura 37** - Cuantificación de acúmulos citoplasmáticos en líneas homocigotas con simple inserción de ADN-T en el gen *DCP1*. En el gráfico se encuentran presentadas la línea control *dcp1-MCP-GFP* (*dcp1* MS2 1-2, puntos negros), la línea independiente *dcp1-SKS14-MS2* (*dcp1* SKS14 2-6, puntos gris claro) y las líneas independientes *dcp1-AT59-MS2* (*dcp1* AT59 1-2 y *dcp1* AT59 3-3, puntos gris oscuro). Los puntos representan la dispersión de los datos para N=7-9. Análisis estadístico Mann-Whitney test. Las diferencias no son significativas.

El resultado obtenido de la cuantificación del número de acúmulos citoplasmáticos por grano de polen en el fondo genético sin proteína DCP1, fue similar al observado para *VCS*, siendo no significativas las diferencias obtenidas entre las líneas de seguimiento de ARNm en comparación con la línea control. Está demostrado por ensayos de co-inmunoprecipitación y localización subcelular que las proteínas *VCS*, *DCP1* y *DCP2* interactúan de manera directa formando un complejo *in vivo* (Xu et al., 2006). Teniendo esto en cuenta, no descartamos la posibilidad que la falta de una de estas proteínas afecte de manera global la formación de los PBs.

Este resultado nos estaría indicando, nuevamente, que a pesar que los porcentajes de co-localización entre dichos ARNm con la proteína DCP1 no fueron elevados, es necesaria la presencia de DCP1 para la formación de acúmulos citoplasmáticos que involucren a los ARNm *skl4* y *at59*.

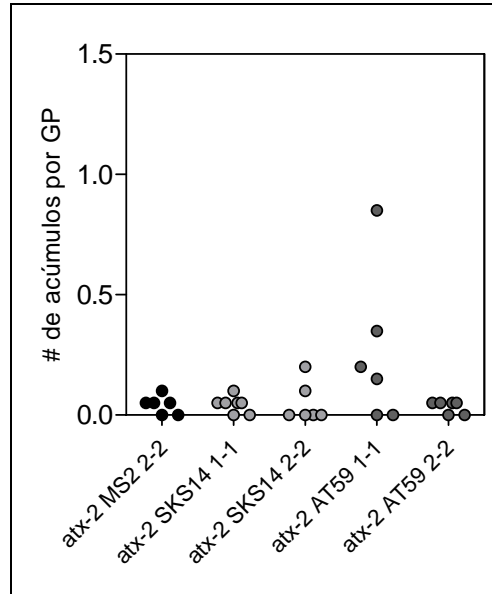
### Análisis de localización de los ARNm en polen maduro de plantas mutantes simples de inserción de ADN-T para el gen *ATX-2* de gránulos de estrés (SGs)

A continuación, nos focalizamos en estudiar la presencia de acúmulos citoplasmáticos para los ARNm *sks14* y *at59* en líneas que no contengan la proteína *ATX-2*, marcadora de gránulos de estrés. Para esto procedimos a transformar líneas de plantas homocigotas con inserción simple de ADN-T en el gen *ATX-2*. Llevamos a cabo el análisis con la línea control *atx-2-MCP-GFP*, dos líneas independientes para *atx-2-SKS14-MS2* y *atx-2-AT59-MS2*. En la Figura 38 se muestra la presencia de un acúmulo citoplasmático representativo de la línea *atx-2-SKS14-MS2* (panel superior) y de la línea *atx-2-AT59-MS2* (panel inferior).



**Figura 38** - Imágenes de microscopía confocal representativas de las líneas *atx-2-SKS14-MS2* y *atx-2-AT59-MS2*. Se muestra un grano de polen de cada una de las líneas, *atx-2-SKS14-MS2* en el panel superior y *atx-2-AT59-MS2* en el panel inferior. Las figuras A y D muestran la fluorescencia del sistema MS2, las figuras B y E corresponden a la localización del acúmulo citoplasmático detectado (en rojo y verde) y las figuras C y F corresponden a luz blanca. Barra de tamaño, 5  $\mu\text{m}$ .

De la misma manera detallada previamente, a partir de los resultados obtenidos procedimos a cuantificar los mismos. En la Figura 39 se muestran los resultados de presencia de acúmulos citoplasmáticos obtenidos para cada una de las líneas que carecen de *ATX-2*.



**Figura 39** - Cuantificación de acúmulos citoplasmáticos en líneas homocigotas con simple inserción de ADN-T en el gen *ATX-2*. En el gráfico se encuentran presentadas la línea control *atx-2-MCP-GFP* (*atx-2 MS2 2-2*, puntos negros), las líneas independientes *atx-2-SKS14-MS2* (*atx-2 SKS14 1-1* y *atx-2 SKS14 2-2*, puntos gris claro) y las líneas independientes *atx-2-AT59-MS2* (*atx-2 AT59 1-1* y *atx-2 AT59 2-2*, puntos gris oscuro). Los puntos representan la dispersión de los datos para N=6-7. Análisis estadístico Mann-Whitney test. Las diferencias no son significativas.

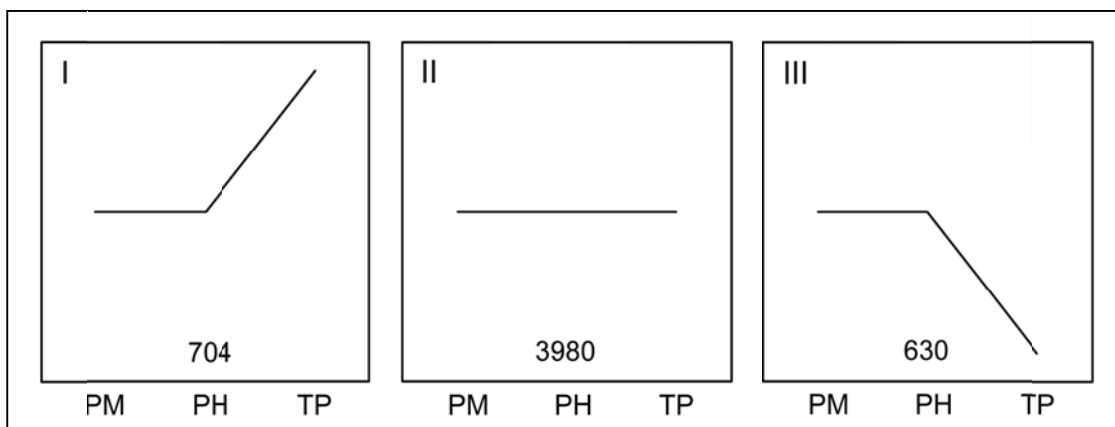
La Figura 39 muestra que la proteína *ATX-2* sería necesaria para la formación de los acúmulos citoplasmáticos de ambos ARNm, dado que no se obtuvieron diferencias significativas en el número de acúmulos citoplasmáticos detectados en las líneas de seguimiento de los ARNm *skt14* y *at59* con respecto a la línea control.

Estos resultados de análisis de formación de acúmulos citoplasmáticos en líneas que no poseen proteínas estructurales de cuerpos de procesamiento o gránulos de estrés estarían indicando que a pesar que los porcentajes de co-localización entre los mismos fueron bajos (entre el 10-20%), estas proteínas serían necesarias para que se establezca la correcta localización de los acúmulos en estructuras focalizadas en el citoplasma.



## Discusión

El arreglo genómico de *Arabidopsis thaliana* ATH1, que posee 22.591 *sets* de muestras con una cobertura del genoma de *Arabidopsis* del 73,6%, fue utilizado para estudiar la dinámica de transcripción durante los estadios del desarrollo del grano de polen así como también estadios posteriores como polen germinado y tubo polínico en crecimiento. En uno de dichos estudios (Bock et al., 2006), los microarreglos fueron hibridados con ARNc correspondiente a los estadios de polen maduro (PM), polen hidratado (PH) y tubo polínico germinado *in vitro* (TP). Se identificaron 5640 transcritos, y los mismos fueron clasificados en 9 grupos dependiendo de la co-regulación de los genes en estos 3 estadios (Wang et al., 2008). En la Figura 40 se presenta la expresión de transcritos correspondientes a los 3 grupos más representativos.



**Figura 40** – Los 5640 genes fueron distribuidos en 9 grupos de acuerdo a sus niveles de expresión en los tres estadios. Se muestran los tres grupos más representativos. Debajo de cada gráfico se indica el número de genes correspondiente a cada grupo. PM: Polen maduro; PH: Polen hidratado; TP: Tubo polínico. Adaptado de Wang et al., 2008.

Esta clasificación de los genes en grupos dependiendo de su expresión en los diferentes estadios del grano de polen y tubo polínico propone la existencia de un proceso regulatorio a lo largo del desarrollo del mismo que permite que determinados grupos de genes se expresen en mayor medida en estadios específicos. Todos los genes de estos tres grupos son genes tardíos, los cuales se caracterizan por expresarse en los estadios finales del desarrollo del

grano de polen. De acuerdo a la clasificación realizada por Wang y colaboradores, los genes tardíos *sks14* y *at59* de *Arabidopsis* se encuentran dentro del grupo II (Wang et al., 2008), los cuales no muestran variación en su expresión a lo largo de los tres estadios (Figura 40); en principio se hubiera esperado que *sks14* y *at59* pertenecieran al grupo III mostrando una reducción de sus niveles en el estadio de tubo polínico debido a la síntesis de sus respectivas proteínas. La detección de *sks14* y *at59* en el estadio de TP podría también explicarse debido a un remanente del ARNm del estadio de PM o también podría haber nueva síntesis de ARNm produciendo un equilibrio entre transcripción y traducción. De todas maneras, sería necesario correlacionar estos datos del transcriptoma con estudios proteicos de los genes de los diferentes grupos y comparar las expresiones de transcritos y proteínas a lo largo de los diferentes estadios del grano de polen y tubo polínico.

### **Los ARNm *sks14* y *at59* se localizan en acúmulos citoplasmáticos en granos de polen maduros**

En trabajos previos se estudió la regulación de los genes *LAT59* y *NTP303* de tomate y tabaco, respectivamente. Se demostró que estos genes tardíos se expresan durante los estadios finales del desarrollo del grano de polen pero sus proteínas recién están presentes luego de que el grano de polen germina (Curie y McCormick, 1997; Hulzink et al., 2002).

Llevando a cabo ensayos de actividad de luciferasa, Hulzink y colaboradores demostraron que la región 5'UTR del gen *NTP303* activa la traducción del ARNm *ntp303* luego de la germinación actuando como un elemento autónomo independiente del promotor, la región codificante y la región 3'UTR. Determinaron que dos regiones específicas de la región 5'UTR, distribuidas en dos *loops*, son esenciales para producir este aumento en la traducción (Hulzink et al., 2002). Por otro lado, se observó que las secuencias de la región 5'UTR del gen *LAT59* inhiben parcialmente la traducción del ARNm hasta que el grano de polen comienza a germinar que es justamente cuando se acumula la proteína LAT59 (Curie y McCormick, 1997). Además, se demostró que otros transcritos pertenecientes a este grupo tardío de genes también se regulan por secuencias en su región 5'UTR. Por ejemplo, el gen *LAT52* también posee activadores traduccionales en su región 5'UTR que aumentan la síntesis de la proteína LAT52 específicamente en este caso en estadios tardíos del desarrollo

del grano de polen, aunque no se descarta que haya inhibidores de la traducción actuando en estadios más tempranos (Bate et al., 1996).

La regulación de la traducción de todos estos transcritos por parte de la región 5'UTR es similar a la observada en otros procesos reproductivos de animales y otros sistemas de plantas. Algunos ejemplos son el aumento en la traducción de transcritos durante la espermatogénesis en ratón (Gu y Hecht, 1996; Nayernia et al., 1994; Schäfer et al., 1993) y desarrollo de ovocitos de *Drosophila* (Lasko, 1999). La eficiencia en la regulación de la traducción por estos factores activadores o inhibidores proveería un mecanismo fino que permite expresar la proteína en determinados estadios del desarrollo, en este caso, del grano de polen, de manera más rápida ya que no hace falta que ocurra la transcripción génica. No se descarta la posibilidad que haya otros genes de polen regulados de la misma manera, aunque para estudiarlo sería necesario hacer primero un análisis bioinformático y de las estructuras de las regiones 5'UTR para luego estudiarlos de manera individual. Los resultados obtenidos en estos trabajos resaltan la importancia en la regulación de la traducción de los genes de polen modulando en qué momento del desarrollo y del crecimiento del tubo polínico se expresan estas proteínas.

En esta tesis, nos focalizamos en estudiar la regulación post-transcripcional de los genes ortólogos de *LAT59* y *NTP303* como ejemplo de dos genes tardíos que expresarían sus proteínas luego que el grano de polen germina. Estudiamos al gen *AT59*, ortólogo en *Arabidopsis* del gen *LAT59* de tomate, y a *SKS14* como el putativo gen ortólogo en *Arabidopsis* del gen *NTP303* de tabaco. Tal como se explicó anteriormente, nuestra hipótesis es que los ARNm *at59* y *skS14* de *Arabidopsis thaliana* se acumularían en cuerpos citoplasmáticos durante la maduración del grano de polen a la espera de la germinación que es cuando se produciría su traducción.

Con el objetivo de analizar la localización de los ARNm llevamos a cabo estudios de seguimiento de los mismos usando el sistema MS2 descrito por Weil y colaboradores. Mediante el uso de una rutina desarrollada en MATLAB validamos y cuantificamos el número y la posición de los acúmulos citoplasmáticos que contienen a los ARNm en estudio en granos de polen maduro. Los acúmulos se encuentran localizados en el citoplasma del grano de polen y en un promedio de uno cada cuatro granos de polen analizados para el ARNm *skS14* y de uno cada diez granos de polen para el ARNm *at59*. La variación en el número de acúmulos citoplasmáticos observada entre ambos ARNm podría deberse a que estos genes de *Arabidopsis* se estén regulando a nivel traduccional de manera similar a sus

ortólogos en tabaco y tomate; en el caso de *NTP303* se propone que actúan factores activadores de la traducción sobre la región 5'UTR una vez que el grano de polen comienza a germinar, mientras que, en contraste, para el gen *LAT59* actuarían factores inhibitorios en estadios más tempranos del desarrollo, activándose la expresión de su proteína por liberación de los mismos a partir del estadio de polen maduro. Tanto la diferencia que existe en la regulación traduccional para *NTP303* y *LAT59*, como las diferencias observadas en la presencia de las proteínas *NTP303* y *LAT59* en los estadios de polen maduro y tubo polínico, podrían estar afectando el momento en el que los transcritos son liberados de los acúmulos citoplasmáticos para ser traducidos y éstos podrían ser algunos de los motivos por el que observamos diferencias en el número de acúmulos.

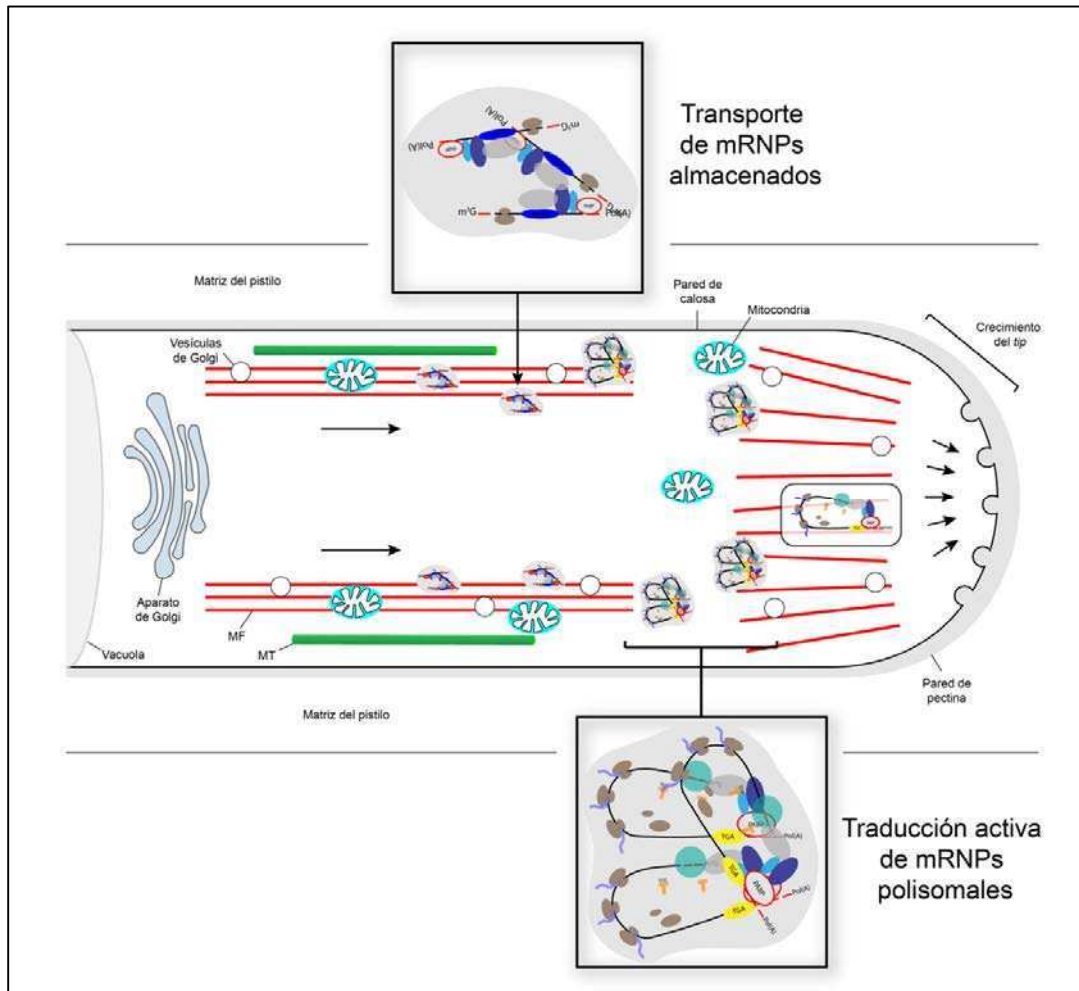
La determinación la llevamos a cabo en presencia de puomicina que inhibe la traducción a través del desensamblado de los polisomas y posterior liberación de los transcritos al citoplasma. Las diferencias en el número de acúmulos citoplasmáticos por grano de polen dieron estadísticamente significativas para las líneas que contienen los dos ARNm con respecto a la línea control. Estos acúmulos citoplasmáticos servirían como sitios donde los ARNm se localizan y almacenan esperando ser traducidos. De todos modos, es necesario corroborar si los genes *AT59* y *SKS14* se regulan de la misma manera que los de tomate y tabaco.

### **Los acúmulos citoplasmáticos de los ARNm *skS14* y *at59* co-localizan con proteínas pertenecientes a cuerpos de procesamiento (PBs) y gránulos de estrés (SGs)**

A pesar de que la mayoría de los ARNm son traducidos inmediatamente después de ser transcritos, algunos son redireccionados para ser almacenados e inactivados de la traducción en diferentes clases de partículas ribonucleoproteicas del mensajero (mRNP), gránulos de estrés (SGs) o enviados a cuerpos de procesamiento (PBs) (Hafidh et al., 2011). Los SGs y PBs son sitios activos de procesamiento de mRNP en eucariotas. Los SGs son gránulos de ARN y proteínas altamente regulados en la represión de la traducción predominantemente en respuesta a estrés. Por otro lado, los PBs son sitios de degradación de ARNm promovido por la deadenilación de la cola poliA, silenciamiento de genes mediados por ARN y represión de la traducción.

Honys y colaboradores estudiaron la localización del ARNm *ntp303* durante los diferentes estadios del desarrollo del grano de polen (Honys et al., 2000). En dicho trabajo analizaron la presencia de dicho ARNm en distintas fracciones polisomales, post-polisomales enriquecidas con mRNP y una fracción de partículas resistentes al tratamiento con EDTA/Puromicina que co-sedimenta con polisomas, denominada EPPs (Honys et al., 2000). Los autores proponen que estos complejos EPPs son formados de manera gradual durante el desarrollo por ensamblado inicial de partículas de mRNPs seguido por la asociación de monómeros de mRNPs. En primer lugar, el ARNm sintetizado sería liberado del núcleo en la forma de mRNPs. En el estadio de polen bicelular el ARNm *ntp303* es distribuido entre los polisomas y los EPPs. Todos los polisomas asociados a *ntp303* son formados durante este estadio y son silenciados traduccionalmente. Los EPPs son propuestos como compartimentos de almacenamiento a largo plazo por la agregación de mRNPs de *ntp303* individuales, probablemente con otras proteínas. Durante el estadio de polen tricelular, los polisomas asociados al ARNm todavía se encuentran presentes en la célula vegetativa pero sin aumentar sus niveles. El ARNm *ntp303* sintetizado en este punto se mantiene en la forma transitoria de mRNPs “libres” con una pequeña porción combinada en EPPs. En el período final de la maduración, se completa la síntesis del ARNm *ntp303*, con una redistribución masiva del ARNm desde mRNPs “libres” y polisomas a EPPs.

La composición de las partículas EPPs consiste en un conjunto de ARNm que son almacenados y silenciados traduccionalmente en los estadios tempranos del desarrollo y se movilizan en los distintos procesos de maduración del grano de polen. Algunos de los mensajeros almacenados son traducidos de manera masiva en los estadios tardíos del desarrollo del polen y/o transportados al *tip* del tubo polínico para luego ser traducidos (ver Figura 41).



**Figura 41** - Los mRNPs almacenados son importantes para el crecimiento del tubo polínico. Los ARNm almacenados en forma de mRNPs (o EPPs) proveen control a nivel dinámico y espacial de la expresión de los genes durante el desarrollo del tubo polínico. Las partículas de almacenamiento secuestradas son llevadas a la región del *tip* (sitio de crecimiento) a través de un entramado de microtúbulos (MT) y microfilamentos (MF) y enviadas al sitio de traducción activa. Adaptado de Hafidh et al., 2011.

Los mRNPs secuestrados pueden ser agregados en PBs para ser procesados para degradación y reciclaje o enviados nuevamente al citoplasma para ser traducidos. Ocasionalmente en condiciones de estrés, tal como podría ser la deshidratación que sufre el grano de polen al final de su maduración, los mRNPs podrían ser ensamblados en SGs y secuestrados de la traducción. Un intercambio activo de los mRNPs entre PBs, SGs y mRNP polisomal podría promover la regulación de la expresión de los genes durante los estadios más tardíos del desarrollo del grano de polen.

Para estudiar cuál era la localización de estos acúmulos citoplasmáticos que contienen a los ARNm *sksl4* y *at59*, procedimos a realizar la fusión de proteínas marcadoras de cuerpos de procesamiento (VCS y DCP1) y gránulos de estrés (ATX-2) con la proteína fluorescente RFP. A través de estas construcciones observamos dichos cuerpos en el citoplasma de los granos de polen maduros. Con el agregado de puomicina observamos un aumento en el tamaño de dichos cuerpos y un aumento en su número, lo que indicaría que dichos cuerpos son formados por los ARNm que salen del ciclo de traducción y se localizan en los PBs y/o SGs (Eulalio et al., 2007), favoreciendo el aumento de su tamaño.

Con el objetivo de analizar la co-localización entre los ARNm y los PBs obtuvimos líneas que contienen las construcciones tanto para el seguimiento de los ARNm como la marcación de proteínas de PBs. A partir de los resultados obtenidos decidimos dividir los mismos en tres categorías: I) “co-localizan”, si la señal correspondiente al acúmulo citoplasmático y al cuerpo se superponen; II) “cercanos”, si están próximos a una distancia no superior a dos veces la suma de los radios y III) “distantes” si se encuentran alejados. Esta categorización la realizamos utilizando una rutina desarrollada en MATLAB basándonos en el trabajo donde se analizan proteínas de PBs y proteínas pertenecientes a focos sinápticos en relación a la proteína sinapsina (Luchelli et al., 2015).

Demostramos que el ARNm *sksl4* se localiza en cuerpos de procesamiento por co-localización directa con ambas proteínas marcadoras, VCS y DCP1, en promedio en uno de cada cinco acúmulos detectados; el hecho de haber obtenido resultados similares para VCS y DCP1 sugiere que los acúmulos de *sksl4* no tienen preferencia por alguna de las dos proteínas en particular. Este resultado está de acuerdo con el reporte de que las proteínas VCS, DCP1 y DCP2 forman parte de un mismo complejo proteico por interacción directa entre sí (Xu et al., 2006). Los valores hallados para la categoría cercanos (uno de cada diez acúmulos detectados), indica que el ARNm *sksl4* interactuaría con alguna otra proteína de PBs; es decir que se localizarían en cuerpos de procesamiento pero no por interacción con VCS o DCP1. Este valor resultó menor al obtenido para la categoría de co-localización lo que indicaría que el ARNm *sksl4* tendría preferencia por VCS y/o DCP1. De todas maneras, para completar dicho análisis, sería necesario estudiar la co-localización de *sksl4* con otras proteínas marcadoras de PBs tales como DCP2, DCP5, y XRN4, entre otras.

Por el contrario para el ARNm *at59* observamos valores de co-localización o cercanía con PBs más bajos en comparación a los de *sksl4*; los valores de co-localización son similares entre VCS y DCP1, sugiriendo nuevamente que *at59* interactuaría con ambas proteínas de

manera similar. En este caso el hecho de haber obtenido para la categoría II de cercanos un porcentaje similar al de co-localización, estaría indicando que *at59* no tendría preferencia de co-localización con alguna proteína en particular. De igual manera, sería necesario realizar un análisis más detallado para determinar si *at59* se co-localiza con alguna otra proteína perteneciente a cuerpos de procesamiento o a otro cuerpo citoplasmático relacionado.

Por otro lado, estudiamos la localización de dichos ARNm en relación a gránulos de estrés. Para esto llevamos a cabo la generación de líneas que poseen el seguimiento de los ARNm con proteínas pertenecientes a SGs como ATX-2. A partir del análisis de estas líneas demostramos que el ARNm *skt14* se encuentra co-localizando con ATX-2 en aproximadamente uno de cada diez acúmulos citoplasmáticos detectados, mientras que el porcentaje de cercanía entre ellos es aún menor (uno de cada treinta acúmulos detectados). Estos resultados estarían indicando que a pesar del porcentaje bajo de co-localización entre ATX-2 y *skt14*, éste tendría mayor preferencia de co-localización con ATX-2 que con otra proteína de SGs. Cuando analizamos el ARNm *at59* encontramos porcentajes de co-localización de uno de cada veinte acúmulos detectados y de cercanía de uno de cada treinta para una de las líneas y ninguno para la otra. Dado que los porcentajes obtenidos para ambas categorías son bajos cabe la posibilidad que este ARNm se encuentre interactuando con otra proteína de SGs. Para continuar con este análisis es necesario analizar la localización de ambos ARNm con otras proteínas componentes de SGs como son UBPI, RBP47, entre otras. Por otro lado, no descartamos la posibilidad que estos ARNm se encuentren localizando en alguna otra estructura relacionada con el procesamiento de ARN diferente a los PBs y SGs.

Resumiendo, proponemos que transcritos de genes del grupo tardío con una regulación similar a *ntp303*, se localizarían en polen maduro en acúmulos citoplasmáticos relacionados con cuerpos de procesamiento, gránulos de estrés o alguna otra estructura citoplasmática, para ser, en el momento de la germinación, liberados al citoplasma y traducidos. Dado que el crecimiento del tubo polínico es un proceso que debe ocurrir de forma rápida y coordinada, es importante que este grupo de transcritos se encuentre listo para ser traducido cuando comienza el crecimiento del tubo polínico.



### **Los ARNm *at59* y *sk514* no se localizan en acúmulos citoplasmáticos en polen de mutantes nulas para los genes *VCS*, *DCP1* y *ATX-2***

Considerando que los acúmulos citoplasmáticos correspondientes a los ARNm *sk514* y *at59* co-localizan con las proteínas de cuerpos de procesamiento VCS y DCP1 y de gránulos de estrés ATX-2, procedimos a analizar si estas proteínas eran necesarias para dicha localización. Para esto utilizamos plantas que poseen una inserción simple de ADN-T en los genes *VCS*, *DCP1* y *ATX-2* juntamente con las construcciones marcadoras de los ARNm *sk514* y *at59*. Llevamos adelante el mismo análisis de cuantificación y validación de los acúmulos citoplasmáticos. Demostramos que las diferencias entre las líneas y sus respectivos controles no son significativas, sugiriendo que dichos ARNm en principio necesitarían de la presencia de estas proteínas para formar dichos acúmulos en el citoplasma del grano de polen. De todas maneras no descartamos la posibilidad que la falta de alguna de estas proteínas pudiera estar afectando de un modo general la formación de los PBs o SGs; esta idea se ve reforzada por el hecho de que las mutantes simples de inserción para el gen *vcs* tienen afectado el desarrollo global de las plantas siendo letales embrionarias (Goeres et al., 2007). Proponemos transformar líneas mutantes simples de inserción (por ejemplo la mutante *vcs*) con otra proteína de PBs (por ejemplo DCP1) fusionadas a una proteína fluorescente, de manera de ver si la falta de una de estas proteínas afecta la localización de las demás proteínas de PBs.

El análisis de la localización de los ARNm tardíos *sk514* y *at59*, es una primera aproximación para entender cómo se desarrolla la regulación transcripcional durante el desarrollo del grano de polen. Las enzimas ascorbato oxidasas y pectato liasas en polen, productos proteicos de los genes *ntp303* y *lat59* respectivamente, se encuentran involucradas en el crecimiento del tubo polínico tanto para desestabilizar las uniones peptídicas y ayudar a construir la pared como así también para facilitar la penetración del tubo a través de la matriz rica en pectinas en el pistilo. Por este motivo, la expresión de estas enzimas debe ser altamente regulada.

Otro factor que podría influenciar esta regulación está relacionado con la estabilidad de los ARNm; Ylstra y colaboradores determinaron la presencia de un grupo de ARNm de polen que posee una gran estabilidad en polen pero no así en células somáticas (Ylstra y McCormick, 1999). Estos ARNm tendrían una estabilidad mayor que sus respectivas

proteínas durante el desarrollo del grano de polen. Podemos hipotetizar que dicho aumento en la estabilidad se debería a que estos ARNm se acumularían en focos citoplasmáticos conjuntamente, aunque sea en parte, con PBs y/o con SGs.

# Conclusiones finales

---

Este trabajo de tesis tuvo como objetivo general aportar resultados acerca de los mecanismos moleculares de la regulación transcripcional y traduccional durante el desarrollo del grano de polen de *Arabidopsis thaliana*. En el primer capítulo caracterizamos cuerpos que se encuentran relacionados con la regulación de ARN, como son los cuerpos de Cajal (CBs). En el segundo capítulo nos focalizamos en estudiar dos ARNm pertenecientes al grupo de genes tardíos que se encuentran regulados en los estadios finales del desarrollo del grano de polen. Finalmente analizamos si los cuerpos de procesamiento (PBs) y/o gránulos de estrés (SGs) se encuentran involucrados en la regulación de dichos ARNm.

En el capítulo I, caracterizamos la variación en número y tamaño de CBs, involucrados en el procesamiento de snRNPs y snoRNPs, en los diferentes estadios del desarrollo del grano de polen. Determinamos que una vez que el grano de polen comienza a germinar, el número de CBs en células espermáticas aumenta pero no así su tamaño, a diferencia de lo que ocurre en célula vegetativa en donde no se observan diferencias en número y tamaño durante el mismo período. Sugerimos que estas variaciones en el número y tamaño ocurren para responder a cambios en la expresión de genes a través del desarrollo y la germinación del polen. El hecho de que la presencia de un mayor número de CBs está relacionada con células que poseen mayor actividad indica que las células espermáticas son más activas transcripcionalmente.

En el capítulo II, estudiamos la localización de los ARNm *skt14* y *at59* en polen maduro de *Arabidopsis thaliana*. A partir del seguimiento de los transcritos utilizando el sistema MS2, pudimos observarlos localizados como acúmulos discretos en el citoplasma. A continuación estudiamos si estos acúmulos se encuentran formando parte de alguna estructura o libres en el citoplasma; para llevarlo a cabo caracterizamos los cuerpos citoplasmáticos relacionados con la regulación de ARN, como son PBs y SGs. Estos se muestran en granos de polen maduros como focos puntuales localizados en el citoplasma. Utilizando proteínas estructurales fusionadas a RFP, observamos además un aumento en tamaño y a veces en número de los mismos cuando aplicamos puromicina.

Luego estudiamos si los ARNm *skt14* y *at59* se encuentran formando parte o no de los PBs y SGs. Esto fue llevado a cabo mediante análisis de co-localización de los ARNm y proteínas estructurales de dichos cuerpos citoplasmáticos. Determinamos que entre 10-20% de los

acúmulos citoplasmáticos formados por los ARNm *sksl4* y *at59* se encuentran co-localizando con las proteínas de PBs, VCS y DCP1 y que entre el 5-15% se encuentran cercanos a dichas proteínas. Este resultado sugiere que los ARNm formarían parte de los PBs pero a través de la interacción con otra/s proteína/s de dichos cuerpos. Cuando realizamos el mismo análisis pero con ATX-2, proteína de SGs, encontramos porcentajes de co-localización (3-14%) y cercanía (3%) menores. Estos resultados, en conjunto, sugieren que tanto para PBs como SGs, estos ARNm se localizarían en ambas estructuras citoplasmáticas, en mayor medida en PBs, aunque sin preferencia de interacción con alguna/s proteína/s en particular.

Finalmente, analizamos la localización de los acúmulos citoplasmáticos formados por los ARNm en líneas mutantes para dichas proteínas de PBs y SGs. Para todos los casos, hallamos que dichas proteínas serían necesarias para la localización de los ARNm en los acúmulos de polen.

Los resultados obtenidos en esta tesis son un aporte importante para entender los mecanismos a nivel transcripcional y traduccional involucrados en los diferentes estadios del desarrollo del grano de polen. Proponemos que durante los estadios finales del desarrollo del grano de polen, los ARNm se almacenan en cuerpos citoplasmáticos listos para ser traducidos cuando el polen germine. De esta manera el polen germinado no tiene que esperar por la transcripción de los genes necesarios y puede crecer de forma rápida y efectiva a través de los tejidos femeninos para llevar las células espermáticas hacia el óvulo.

# Bibliografía

---

- Alonso, J.M., and Stepanova, A.N. (2003). T-DNA Mutagenesis in Arabidopsis. *Methods Mol. Biol.* *236*, 177–187.
- Anderson, P., and Kedersha, N. (2002). Stressful initiations. *J. Cell Sci.* *115*, 3227–3234.
- Bate, N., Spurr, C., Foster, G.D., and Twell, D. (1996). Maturation-specific translational enhancement mediated by the 5'-UTR of a late pollen transcript. *Plant J.* *10*, 613–623.
- Berger, F., Hamamura, Y., Ingouff, M., and Higashiyama, T. (2008). Double fertilization - caught in the act. *Trends Plant Sci.* *13*, 437–443.
- Bertrand, E., Chartrand, P., Schaefer, M., Shenoy, S.M., Singer, R.H., and Long, R.M. (1998). Localization of ASH1 mRNA particles in living yeast. *Mol. Cell* *2*, 437–445.
- Boavida, L.C., and McCormick, S. (2007). Temperature as a determinant factor for increased and reproducible in vitro pollen germination in Arabidopsis thaliana. *Plant J.* *52*, 570–582.
- Boavida, L.C., Becker, J.D., and Feijó, J. a. (2005a). The making of gametes in higher plants. *Int. J. Dev. Biol.* *49*, 595–614.
- Boavida, L.C., Vieira, A.M., Becker, J.D., and Feijó, J. a. (2005b). Gametophyte interaction and sexual reproduction: How plants make a zygote. *Int. J. Dev. Biol.* *49*, 615–632.
- Boavida, L.C., Borges, F., Becker, J.D., and Feijó, J.A. (2011). Whole Genome Analysis of Gene Expression Reveals Coordinated Activation of Signaling and Metabolic Pathways during Pollen-Pistil Interactions in Arabidopsis. *Plant Physiol.* *155*, 2066–2080.
- Bock, K.W., Honys, D., Ward, J.M., Padmanaban, S., Nawrocki, E.P., Hirschi, K.D., Twell, D., and Sze, H. (2006). Integrating Membrane Transport with Male Gametophyte Development and Function through Transcriptomics. *Plant Physiol.* *140*, 1151–1168.
- Borg, M., and Twell, D. (2011). Pollen: Structure and Development. eLS. John Wiley Sons Ltd, Chichester. 1–11.
- Borg, M., Brownfield, L., and Twell, D. (2009). Male gametophyte development: A molecular perspective. *J. Exp. Bot.* *60*, 1465–1478.
- Borges, F., Gomes, G., Gardner, R., Moreno, N., McCormick, S., Feijó, J.A., and Becker, J.D. (2008). Comparative transcriptomics of Arabidopsis sperm cells. *Plant Physiol.* *148*, 1168–1181.
- Boudonck, K., Dolan, L., and Shaw, P.J. (1999). The movement of coiled bodies visualized in living

- plant cells by the green fluorescent protein. *Mol. Biol. Cell* *10*, 2297–2307.
- Brown, S.M., and Crouch, M.L. (1990). Characterization of a gene family abundantly expressed in *Oenothera organensis* pollen that shows sequence similarity to polygalacturonase. *Plant Cell* *2*, 263–274.
- Buchan, J.R., and Parker, R. (2009). Eukaryotic Stress Granules: The Ins and Outs of Translation. *Mol. Cell* *36*, 932–941.
- Cioce, M., and Lamond, A.I. (2005). Cajal bodies: a long history of discovery. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *21*, 105–131.
- Collier, S., Pendle, A., Boudonck, K., Van Rij, T., Dolan, L., and Shaw, P. (2006). A distant coilin homologue is required for the formation of cajal bodies in *Arabidopsis*. *Mol. Biol. Cell* *17*, 2942–2951.
- Curie, C., and McCormick, S. (1997). A strong inhibitor of gene expression in the 5' untranslated region of the pollen-specific LAT59 gene to tomato. *Plant Cell* *9*, 2025–2036.
- Eulalio, A., Behm-Ansmant, I., and Izaurralde, E. (2007). P bodies: at the crossroads of post-transcriptional pathways. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *8*, 9–22.
- Fang, Y., and Spector, D.L. (2007). Identification of nuclear dicing bodies containing proteins for microRNA biogenesis in living *Arabidopsis* plants. *Curr. Biol.* *17*, 818–823.
- Gall, J.G. (2003). The centennial of the Cajal body. *Nat Rev Mol Cell Biol* *4*, 975–980.
- Gallie, D.R., Ling, J., Niepel, M., Morley, S.J., and Pain, V.M. (2000). The role of 5'-leader length, secondary structure and PABP concentration on cap and poly(A) tail function during translation in *Xenopus* oocytes. *Nucleic Acids Res.* *28*, 2943–2953.
- Goeres, D.C., Van Norman, J.M., Zhang, W., Fauver, N. a, Spencer, M. Lou, and Sieburth, L.E. (2007). Components of the *Arabidopsis* mRNA decapping complex are required for early seedling development. *Plant Cell* *19*, 1549–1564.
- Gu, W., and Hecht, N.R. (1996). Translation of a testis-specific Cu/Zn superoxide dismutase (SOD-1) mRNA is regulated by a 65-kilodalton protein which binds to its 5' untranslated region. *Mol. Cell. Biol.* *16*, 4535–4543.
- Hafidh, S., Čapková, V., and Honys, D. (2011). Safe keeping the message: MRNP complexes tweaking after transcription. In *Advances in Experimental Medicine and Biology*, pp. 118–136.
- Hamada, S., Ishiyama, K., Choi, S., Wang, C., Singh, S., Kawai, N., Franceschi, V.R., and Okita, T.W. (2003). The transport of prolamine RNAs to prolamine protein bodies in living rice endosperm cells. *Plant Cell* *15*, 2253–2264.

- Honys, D., and Twell, D. (2004). Transcriptome analysis of haploid male gametophyte development in *Arabidopsis*. *Genome Biol.* 5, R85.
- Honys, D., Combe, J.P., Twell, D., and Capková, V. (2000). The translationally repressed pollen-specific ntp303 mRNA is stored in non-polysomal mRNPs during pollen maturation. *Sex. Plant Reprod.* 13, 135–144.
- Hulzink, R.J.M., Groot, P.F.M. De, Croes, A.F., Quaedvlieg, W., Twell, D., Wullems, G.J., and Herpen, M.M.A. Van (2002). The 5'-Untranslated Region of the ntp303 Gene Strongly Enhances Translation during Pollen Tube Growth, But Not during Pollen Maturation. *Plant Physiol.* 129, 342–353.
- Kedersha, N., Cho, M.R., Li, W., Yacono, P.W., Chen, S., Gilks, N., Golan, D.E., and Anderson, P. (2000). Dynamic shuttling of TIA-1 accompanies the recruitment of mRNA to mammalian stress granules. *J. Cell Biol.* 151, 1257–1268.
- Kedersha, N., Stoecklin, G., Ayodele, M., Yacono, P., Lykke-Andersen, J., Fritzler, M.J., Scheuner, D., Kaufman, R.J., Golan, D.E., and Anderson, P. (2005). Stress granules and processing bodies are dynamically linked sites of mRNP remodeling. *J. Cell Biol.* 169, 871–884.
- Kulikauskas, R., and McCormick, S. (1997). Identification of the tobacco and *Arabidopsis* homologues of the pollen-expressed LAT59 gene of tomato. *Plant Mol. Biol.* 34, 809–814.
- Lambermon, M.H.L., Simpson, G.G., Kirk, D.Aw., Hemmings-Mieszczak, M., Klahre, U., and Filipowicz, W. (2000). UBP1, a novel hnRNP-like protein that functions at multiple steps of higher plant nuclear pre-mRNA maturation. *EMBO J.* 19, 1638–1649.
- Lasko, P. (1999). RNA sorting in *Drosophila* oocytes and embryos. *FASEB J* 13, 421–433.
- Li, C.F., Pontes, O., El-Shami, M., Henderson, I.R., Bernatavichute, Y. V., Chan, S.W.L., Lagrange, T., Pikaard, C.S., and Jacobsen, S.E. (2006). An ARGONAUTE4-Containing Nuclear Processing Center Colocalized with Cajal Bodies in *Arabidopsis thaliana*. *Cell* 126, 93–106.
- Lionnet, T., Czaplinski, K., Darzacq, X., Shav-Tal, Y., Wells, A.L., Chao, J. a, Park, H.Y., de Turris, V., Lopez-Jones, M., and Singer, R.H. (2011). A transgenic mouse for in vivo detection of endogenous labeled mRNA. *Nat. Methods* 8, 165–170.
- Liu, J., Wu, Z., Nizami, Z., Deryusheva, S., Rajendra, T., Beumer, K., Gao, H., Matera, A., Carroll, D., and Gall, J. (2009). Coilin is essential for Cajal body organization in *Drosophila melanogaster*. *Mol Biol Cell.* 20, 1661–1670.
- Luchelli, L., Thomas, M.G., and Boccaccio, G.L. (2015). Synaptic control of mRNA translation by reversible assembly of XRN1 bodies. *J. Cell Sci.* 1542–1554.
- Ma, L., Sun, N., Liu, X., Jiao, Y., Zhao, H., and Deng, X.W. (2005). Organ-Specific Expression of

- Arabidopsis Genome during Development. *Plant Physiol.* 138, 80–91.
- Maldonado-Bonilla, L.D. (2014). Composition and function of P bodies in *Arabidopsis thaliana*. *Front. Plant Sci.* 5, 201.
- Matzura, O., and Wennborg, A. (1996). RNAdraw: an integrated program for RNA secondary structure calculation and analysis under 32-bit Microsoft Windows. *Comput Appl Biosci* 12, 247–249.
- Mccormick, S. (2004). Control of male gametophyte development. *Plant Cell* 16 *Suppl*, S142–S153.
- Mu, J.H., Stains, J.P., and Kao, T. (1994). Characterization of a pollen-expressed gene encoding a putative pectin esterase of *Petunia inflata*. *Plant Mol. Biol.* 25, 539–544.
- Muschietti, J., Dircks, L., Vancanneyt, G., and McCormick, S. (1994). LAT52 protein is essential for tomato pollen development: Pollen expressing antisense LAT52 RNA hydrates and germinates abnormally and cannot achieve fertilization. *Plant J.* 6, 321–328.
- Nayernia, K., Reim, K., Oberwinkler, H., and Engel, W. (1994). Diploid expression and translational regulation of rat acrosin gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 202, 88–93.
- Niogret, M.F., Dubald, M., Mandaron, P., and Mache, R. (1991). Characterization of pollen polygalacturonase encoded by several cDNA clones in maize. *Plant Mol. Biol.* 17, 1155–1164.
- Pina, C., Pinto, F., Feijó, J.A., and Becker, J.D. (2005). Gene Family Analysis of the Arabidopsis Pollen Transcriptome Reveals Biological Implications for Cell Growth, Division Control, and Gene Expression Regulation. *Plant Physiol.* 138, 744–756.
- Qin, Y., Leydon, A.R., Manziello, A., Pandey, R., Mount, D., Denic, S., Vasic, B., Johnson, M. a., and Palanivelu, R. (2009). Penetration of the stigma and style elicits a novel transcriptome in pollen tubes, pointing to genes critical for growth in a pistil. *PLoS Genet.* 5.
- Querido, E., and Chartrand, P. (2008). Using fluorescent proteins to study mRNA trafficking in living cells. *Methods Cell Biol.* 85, 273–292.
- Rogers, H.J., and Lonsdale, D.M. (1992). Genetic manipulation of male sterility for the production of hybrid seed. *Plant Growth Regul.* 11, 21–26.
- Rogers, H.J., Harvey, A., and Lonsdale, D.M. (1992). Isolation and characterization of a tobacco gene with homology to pectate lyase which is specifically expressed during microsporogenesis. *Plant Mol. Biol.* 20, 493–502.
- Rutley, N., and Twell, D. (2015). A decade of pollen transcriptomics. *Plant Reprod.* 28, 73–89.
- Sambade, A., Brandner, K., Hofmann, C., Seemanpillai, M., Mutterer, J., and Heinlein, M. (2008). Transport of TMV movement protein particles associated with the targeting of RNA to plasmodesmata. *Traffic* 9, 2073–2088.



- Schäfer, M., Börsch, D., Hülster, A., and Schäfer, U. (1993). Expression of a gene duplication encoding conserved sperm tail proteins is translationally regulated in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Cell. Biol.* *13*, 1708–1718.
- Schrauwen, J., Derksen, J., Knuiman, B., Wittink, F., and Wullems, G.J. (1999). The location of the pollen-specific NTP303 protein. In *Anther and Pollen SE - 10*, C. Clément, E. Pacini, and J.-C. Audran, eds. (Springer Berlin Heidelberg), pp. 113–118.
- Sheth, U., and Parker, R. (2003). Decapping and decay of messenger RNA occur in cytoplasmic processing bodies. *Science* *300*, 805–808.
- Strzelecka, M., Oates, A.C., and Neugebauer, K.M. (2010). Dynamic control of Cajal body number during zebrafish embryogenesis. *Nucleus* *1*, 96–108.
- Thomas, M.G., Loschi, M., Desbats, M.A., and Boccaccio, G.L. (2011). RNA granules: the good, the bad and the ugly. *Cell. Signal.* *23*, 324–334.
- Twell, D. (1994). The diversity and regulation of gene expression in the pathway of male gametophyte development. In *Molecular and Cellular Aspects of Plant Reproduction*, (Cambridge University Press), pp. 83–136.
- Twell, D. (2006). A blossoming romance: gamete interactions in flowering plants. *Nat Cell Biol* *8*, 14–16.
- Twell, D. (2011). Male gametogenesis and germline specification in flowering plants. *Sex. Plant Reprod.* *24*, 149–160.
- Twell, D., Klein, T.M., Fromm, M.E., and McCormick, S. (1989). Transient Expression of Chimeric Genes Delivered into Pollen by Microprojectile Bombardment I. *Plant Physiol.* *91*, 1270–1274.
- Ursin, V.M., Yamaguchi, J., and McCormick, S. (1989). Gametophytic and sporophytic expression of anther-specific genes in developing tomato anthers. *Plant Cell* *1*, 727–736.
- Wakeley, P.R., Rogers, H.J., Rozycka, M., Greenland, A.J., and Hussey, P.J. (1998). A maize pectin methylesterase-like gene, ZmC5, specifically expressed in pollen. *Plant Mol. Biol.* *37*, 187–192.
- Walker, M.P., Tian, L., and Matera, G. a. (2009). Reduced viability, fertility and fecundity in mice lacking the Cajal body marker protein, coilin. *PLoS One* *4*, e6171.
- Wang, Y., Zhang, W.-Z., Song, L.-F., Zou, J.-J., Su, Z., and Wu, W.-H. (2008). Transcriptome analyses show changes in gene expression to accompany pollen germination and tube growth in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* *148*, 1201–1211.
- Weber, C., Nover, L., and Fauth, M. (2008). Plant stress granules and mRNA processing bodies are distinct from heat stress granules. *Plant J.* *56*, 517–530.

- Weil, T.T., Parton, R.M., and Davis, I. (2010). Making the message clear: visualizing mRNA localization. *Trends Cell Biol.* *20*, 380–390.
- Wing, R.A., Yamaguchi, J., Larabell, S.K., Ursin, V.M., and McCormick, S. (1989). Molecular and genetic characterization of two pollen-expressed genes that have sequence similarity to pectate lyases of the plant pathogen *Erwinia*. *Plant Mol. Biol.* *14*, 17–28.
- Wittink, F.R.A., Knuiman, B., Derksen, J., Vera, Č., Twell, D., Schrauwen, J.A.M., and Wullems, G.J. (2000). The pollen-specific gene Ntp303 encodes a 69-kDa glycoprotein associated with the vegetative membranes and the cell wall. *276–284*.
- Xu, J., and Chua, N.-H. (2009). Arabidopsis decapping 5 is required for mRNA decapping, P-body formation, and translational repression during postembryonic development. *Plant Cell* *21*, 3270–3279.
- Xu, J., Yang, J.-Y., Niu, Q.-W., and Chua, N.-H. (2006). Arabidopsis DCP2, DCP1, and VARICOSE form a decapping complex required for postembryonic development. *Plant Cell* *18*, 3386–3398.
- Ylstra, B., and McCormick, S. (1999). Analysis of mRNA stabilities during pollen development and in BY2 cells. *Plant J.* *20*, 101–108.
- Zhang, F., and Simon, A.E. (2003). A novel procedure for the localization of viral RNAs in protoplasts and whole plants. *Plant J.* *35*, 665–673.
- Zhang, X., Henriques, R., Lin, S.-S., Niu, Q.-W., and Chua, N.-H. (2006). Agrobacterium-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* using the floral dip method. *Nat. Protoc.* *1*, 641–646.
- Zheng, D., Ezzeddine, N., Chen, C.-Y.A., Zhu, W., He, X., and Shyu, A.-B. (2008). Deadenylation is prerequisite for P-body formation and mRNA decay in mammalian cells. *J. Cell Biol.* *182*, 89–101.