

UCH - FC  
MAG - B  
0837  
c.1



UNIVERSIDAD DE CHILE - FACULTAD DE CIENCIAS - ESCUELA DE POSTGRADO

**“El tráfico mediado por clatrina impacta el  
proceso de configuración vacuolar en  
*Arabidopsis thaliana*.”**

Tesis entregada a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de  
los requisitos para optar al grado de

**Magister en Ciencias Biológicas**  
por:

**CLAUDIO JAVIER OSORIO NAVARRO**

Director de tesis: **Dra. Lorena Norambuena Morales**

Diciembre de 2017  
Santiago – Chile

ESCUELA DE POSTGRADO – FACULTAD DE CIENCIAS – UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACIÓN

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que la Tesis de Magister, presentada por el

Sr. Claudio Javier Osorio Navarro

“El tráfico mediado por clatrina impacta el proceso de configuración vacuolar en Arabidopsis thaliana.”

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Biológicas en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 22 de Noviembre de 2017

Director Tesis:

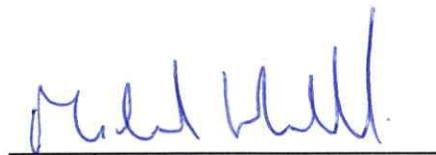
Dra. Lorena Norambuena Morales



Comisión Revisora y Evaluadora

Presidente Comisión:

Dr. Michael Handford



Dr. Marco Tulio Nuñez



*Dedicada a mi abuela Ori, sin proponérselo alimentó e incentivó mi curiosidad desde que tengo memoria. Jamás lo voy a dejar de agradecer. Con todo el cariño del mundo.*

## BIOGRAFÍA



Mi nombre es Claudio Javier Osorio Navarro. Hace 27 años llegué al mundo. Nací en Bulnes. Dónde queda Bulnes, en este momento es un poco tedioso de definir, hasta hace unos meses en la región del Biobío, ahora reubicada en la nueva región de Ñuble, pero en la práctica (a esta fecha) la región de Ñuble aún no existe, por tanto cerraremos el caso mencionando que Bulnes queda al sur de Santiago, lo que para muchos santiaguinos es una explicación suficiente. La familia a la que pertenezco es bastante grande, pero nuestro núcleo más íntimo está formado por mis padres Jacqueline y Claudio, mis abuelas Carmen y Oriana, mis hermanas Carolina y Paula, y los más pequeños, Lucas, Emilia, Antonia y Consuelo. En términos cronológicos desarrollé mi educación básica y media entre las ciudades de Bulnes y Chillán. En 2007 me trasladé a Santiago donde cursé el programa de Bachillerato, Ingeniería en Biotecnología Molecular y el Magister en Ciencias Biológicas en la Universidad de Chile. He tenido una vida buena y feliz, y doy constantemente gracias por ello.

## AGRADECIMIENTOS

Al cierre de esta etapa, agradezco, con toda la fuerza que puedo transmitir la palabra escrita, en primer lugar, a mis padres, Jacqueline y Claudio, por ser incondicionales en todos mis caminos y en todas las decisiones que subyacen. Por participar de mi vida firmemente con palabras y hechos, por ser ejemplo y por ser testimonio. A Sara, por permitirme ser parte de su vida, por enriquecer y llenar de felicidad mi mundo, por ser mi apoyo y fortaleza. A quienes desde la familia están siempre pendientes, atentos y prestos a enviar sus mejores energías, mover montañas si fuera el caso y celebrar cuando es meritorio. Particularmente, a mis hermanas, Carolina y Paula, mis abuelas, Carmen y Oriana, a las tía Carmen Gloria y Marcia, mis primas Toti, Nani, Ange y Maira. A mi sobrina Emilia, que sin lugar a dudas es una luz en todas nuestras vidas. A ustedes mis infinitos agradecimientos y todo mi amor.

A los grandes y perennes amigos Vale y Julito. A los que están desde que me alcanza la memoria, Cristofer y Jesica. A los santiaguinos, Ceci y Ana, Nico, Anita y Carito, Carlitos y Mili. A todos, muchas muchísimas gracias.

Agradezco a la profe Lore por guiarme a la investigación. Por brindarme constantemente oportunidades en el marco de la ciencia y confiar en mis ideas dentro del laboratorio. Al team LNM por cada discusión académica y por cada momento de distensión, desinteresadamente formaron la piedra angular de mi desempeño laboral post lab. Además, agradecer a todos los miembros del CBMV quienes son también parte importante en mi formación.

Ha sido una etapa absolutamente constructiva, con altos y bajos (como técnicamente todo en la vida) pero al final del día el balance me dicta que fue una etapa feliz, y eso es impagable.

## **FINANCIAMIENTO**

El desarrollo de esta tesis se sustenta en la beca CONICYT de Magister Nacional (CONICYTPCHA/MagísterNacional/2014-22140480).

Esta Tesis de Magister contó con el apoyo del Proyecto FONDECYT 1120289 que tuvo como Jefe de Proyecto a la Dra. Lorena Beatriz Norambuena Morales.

## Índice

<b>Listado de Figuras</b>	<b>iii</b>
<b>Listado de Tablas</b>	<b>vi</b>
<b>Abreviaturas utilizadas</b>	<b>v</b>
<b>Resumen</b>	<b>vi</b>
<b>Abstract</b>	<b>viii</b>
<b>INTRODUCCION</b>	<b>1</b>
<b>1.1.- Establecimiento de la Vacuola Central</b>	<b>1</b>
1.1.1.- La vacuola forma parte del Sistema de Endomembranas de la célula vegetal.	2
1.1.2.- Biogénesis vacuolar	3
1.1.3.- Proceso de configuración de la Vacuola Central	5
<b>1.2.- La Vacuola Central impacta el crecimiento celular</b>	<b>7</b>
<b>1.3.- Endocitosis Mediada por Clatrina y su relación con la biogénesis de vacuola</b>	<b>8</b>
1.3.1.- Aspectos generales de la Endocitosis Mediada por Clatrina	8
1.3.2.- Tráfico mediado por clatrina en células vegetales	10
1.3.3.- El tráfico mediado por clatrina y su papel en la biogénesis de organelos líticos	10
<b>HIPOTESIS</b>	<b>13</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>13</b>
<b>3.1.- Objetivo general</b>	<b>13</b>
<b>3.2.- Objetivos específicos</b>	<b>13</b>
<b>MATERIALES Y METODOS</b>	<b>14</b>
<b>4.1.- Material vegetal: plantas de Arabidopsis utilizadas</b>	<b>14</b>
<b>4.2.- Esterilización de semillas de Arabidopsis</b>	<b>14</b>
4.2.1.- Protocolo de esterilización de semillas con etanol	15
4.2.2.- Protocolo de exposición de semillas a gas cloro	15
<b>4.3.- Estratificación de semillas de Arabidopsis</b>	<b>16</b>
<b>4.4.- Condiciones de cultivo y crecimiento de plántulas de Arabidopsis</b>	<b>16</b>
<b>4.5.- Estudio del tráfico endocítico desde la Membrana Plasmática y endosomas</b>	<b>17</b>
<b>4.6.- Cuantificación de la internalización de FM4-64 en células epidérmicas de la punta de la raíz de Arabidopsis</b>	<b>18</b>
<b>4.7.- Estudio de la configuración vacuolar en la raíz de Arabidopsis</b>	<b>20</b>
<b>4.8.- Estudio de la condición ácida del lumen vacuolar</b>	<b>21</b>
<b>4.9.- Delimitación exclusiva de la Membrana Plasmática en células de la epidermis de la raíz de Arabidopsis a través de FM4-64.</b>	<b>21</b>
<b>4.10.- Tratamientos de plántulas de Arabidopsis con drogas que perturban el tráfico vesicular o que gatillan la expresión de un gen de interés en plántulas transgénicas.</b>	<b>22</b>
4.10.1.- Tratamientos agudos	23
4.10.2.- Tratamientos crónicos	24
<b>4.11.- Análisis morfológico del largo de raíz principal de líneas de Arabidopsis</b>	<b>24</b>
<b>4.12.- Estudio del tráfico entre MP y la Vacuola en células epidérmicas de la raíz de Arabidopsis</b>	<b>25</b>

4.13.- Extracción de RNA de raíces de plántulas de Arabidopsis de 10 días post siembra	27
4.14.- Síntesis de DNA complementario a RNA (cDNA) a partir del RNA extraído de raíces de Arabidopsis de 10 días post siembra	27
4.15.- Estudio de los niveles de transcritos de los genes que codifican los principales componentes estructurales de la maquinaria de clatrina.	28
4.16.- Análisis de la localización subcelular de la Cadena Pesa de Clatrina (CHC; Clathrin Heavy Chain) mediante InmunoFluorescencia (IF) en la epidermis de la raíz de Arabidopsis.	30
4.16.1.- Fijación de tejido	30
4.16.2.- Digestión de la pared celular	31
4.16.3.- Permeabilización de las membranas celulares	31
4.16.4.- Inmunofluorescencia	31
4.16.5.- Montaje del tejido	32
<b>RESULTADOS</b>	
5.1.- Sacarosa promueve la internalización de MP en células epidermales de la raíz de Arabidopsis.	33
5.2.- Sacarosa impacta el proceso de configuración vacuolar en la raíz de Arabidopsis.	37
5.3.- Sacarosa impacta el crecimiento celular y el crecimiento de la raíz principal en Arabidopsis.	43
5.4.- Sacarosa incrementa los niveles de CLC2-GFP en compartimentos intracelulares y en la MP.	47
5.5- Sacarosa modula diferencialmente los componentes de la maquinaria de la Endocitosis Mediada por Clatrina (EMC)	54
5.6.- Tirfostina A23 (TyrA23) altera el proceso de configuración vacuolar en la epidermis de la raíz de Arabidopsis.	61
5.7.- La exposición crónica a TyrA23 altera simultáneamente el proceso de configuración vacuolar y el crecimiento de la raíz principal en la epidermis de la raíz de Arabidopsis.	70
5.8.- La interferencia con la formación del triskelion de clatrina impacta el proceso de configuración vacuolar en células de la epidermis de la raíz de Arabidopsis.	79
5.9.- La inducción de la endocitosis mediada por sacarosa acelera el tráfico entre la MP y la vacuola.	88
5.10.- Sacarosa modula los niveles de las RAB GTPasas ARA6 y ARA7.	92
<b>DISCUSIÓN</b>	97
6.1.- Sacarosa es un regulador de la EMC en la epidermis de la raíz de Arabidopsis	97
6.2.- El tráfico dependiente de clatrina impacta la complejidad estructural de la vacuola.	102
6.3.- El proceso de configuración vacuolar requiere del tráfico mediado por clatrina	106
6.4.- El proceso de configuración vacuolar requiere del tráfico endosomal entre la MP y la vacuola.	108
<b>CONCLUSIONES</b>	111
<b>PROYECCIONES</b>	112
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	113

## Listado de Figuras

<b>Figura 1.</b> Dinámica de internalización del trazador FM4-64.	18
<b>Figura 2.</b> Medición de la endocitosis de FM4-64.	19
<b>Figura 3.</b> Diseño experimental para el tratamiento de drogas en plántulas de Arabidopsis.	23
<b>Figura 4.</b> Estrategia para analizar cinética de internalización de membrana entre MP y la vacuola.	26
<b>Figura 5.</b> La presencia de sacarosa en el medio de cultivo estimula la internalización del trazador endocítico FM4-64.	36
<b>Figura 6.-</b> Sacarosa impacta etapas tempranas del proceso de configuración vacuolar a lo largo del eje de crecimiento de la raíz.	42
<b>Figura 7.</b> Sacarosa actúa como regulador positivo del crecimiento en la raíz principal de Arabidopsis.	47
<b>Figura 8.</b> Sacarosa incrementa los niveles de CLC2-GFP en atricoblastos y tricoblastos de la epidermis de la raíz de Arabidopsis.	49
<b>Figura 9.</b> Sacarosa modula los niveles y distribución de CLC2-GFP en células de la epidermis de la raíz.	53
<b>Figura 10.</b> La disponibilidad de sacarosa en el medio de cultivo de plántulas de Arabidopsis no afecta niveles de CHC y no promueve cambios transcripcionales de los componentes del triskelion de clatrina.	56
<b>Figura 11.</b> La disponibilidad de sacarosa en el medio de cultivo de plántulas de Arabidopsis modula los niveles y distribución de $\mu$ 2-YFP.	59
<b>Figura 12.</b> Tyrfoestina A23 (TyrA23) modula de manera dosis y temporalmente dependiente la configuración vacuolar en células de la zona de elongación de la raíz primaria.	64
<b>Figura 13.</b> Tyrfoestina A23 (TyrA23) disminuye la complejidad del lumen vacuolar.	67
<b>Figura 14.</b> Tyrfoestina A23 (TyrA23) cambia la distribución de CLC2-GFP.	69
<b>Figura 15.</b> Tyrfoestina A23 (TyrA23) restringe el crecimiento de la raíz principal de Arabidopsis.	71
<b>Figura 16.</b> La exposición crónica a Tyrfoestina A23 (TyrA23) altera el proceso de configuración vacuolar en la raíz de Arabidopsis.	76
<b>Figura 17.</b> Tyrfoestina A23 (TyrA23) promueve la biogénesis de bulbs de vacuola en células de la epidermis de la raíz de Arabidopsis.	78
<b>Figura 18.</b> La inducción del dominio hub altera el proceso de configuración vacuolar en la raíz de Arabidopsis.	83
<b>Figura 19.</b> La pérdida de función de CLC2 y CLC3 impacta negativamente el proceso de configuración vacuolar.	87
<b>Figura 20.</b> La presencia de sacarosa incrementa la velocidad con que el trazador FM4-64 es internalizado entre la Membrana Plasmática (MP) y la vacuola.	91
<b>Figura 21.</b> Los niveles intracelulares de ARA6 y ARA7 disminuyen en presencia de sacarosa.	95

## **Listado de Tablas**

<b>Tabla I.</b> Lista de partidores usados para el análisis de transcrito mediante RT-qPCR los genes que codifican los principales componentes estructurales de la maquinaria de clatrina.	30
<b>Tabla II.</b> Configuración vacuolar en presencia y ausencia de sacarosa.	40
<b>Tabla III.</b> Configuración vacuolar bajo exposición crónica al inhibidor de la EMC TyrA23.	75
<b>Tabla IV.</b> Configuración vacuolar en la línea HUB1a inducida por H-TAM.	82
<b>Tabla V.</b> Principales características del proceso de configuración vacuolar en la línea clc2cl3 comparado a la línea silvestre.	86

**Abreviaturas utilizadas**

ADAPTADOR PROTEIN2	AP2
Aparato de Golgi	GA
Arabidopsis thaliana	Arabidopsis
Brefeldina A	BFA
Buffer Fosfato Salino	PBS
CLATHRIN LIGHT CHAIN1	CLC1
CLATHRIN LIGHT CHAIN2	CLC2
CLATHRIN LIGHT CHAIN3	CLC3
CLATHRIN HEAVY CHAIN1	CHC1
CLATHRIN HEAVY CHAIN2	CHC2
Columbia-0	Col-0
Compartimiento Pre-vacuolar/Endosomas Tardíos/ Compartimientos Multivesiculares	PVC/LE/MVB
Dimethyl sulfoxide	DMSO
Endocitosis Mediada por Clatrina	EMC
Endosomales	E
Endosomas Tempranos/ Red Trans-Golgi	TGN/EE
N-(3-Triethylammoniumpropyl)-4-(4-(Dibutylamino) Styryl) Pyridinium Dibromide	FM1-43
N-(3-Triethylammoniumpropyl)-4-(6-(4-(Diethylamino) Phenyl) Hexatrienyl) Pyridinium Dibromide	FM4-64
GREEN FLUORESCENT PROTEIN	GFP
H <sup>+</sup> -ATPase	V-ATPase
H <sup>+</sup> -PPase	V-PPase
Medio de Cultivo Líquido	MCL
Medio de Cultivo Sólido	MCS
Membrana Plasmática	MP
ácido 2-(N-morfolino)-etanosulfónico monohidrato	MES
Murashige y Skoog	MS
Paraformaldehido	PFA
Receptor de Transferrina humana	hTfR
Reticulo Endoplasmático	ER
Sistema de Endomembranas	SE
Tirfostina A23	TyrA23
Vacuola Central	VC

## RESUMEN

En células vegetales diferenciadas, la Vacuola Central (VC) ocupa alrededor del 90% del total del volumen celular. VC es esencial para la homeostasis, crecimiento celular y desarrollo. En raíces, la configuración de la VC comienza en la zona de crecimiento meristemático donde una vacuola inmadura se expande progresivamente aumentando su volumen y membrana hasta alcanzar el estado de VC en la zona de diferenciación. Con el objetivo de estudiar la contribución del tráfico de vesículas desde la Membrana Plasmática (MP) en la configuración de la VC estudiamos las vacuolas a lo largo del gradiente de crecimiento celular en las raíces de *Arabidopsis thaliana*. Nosotros observamos que sacarosa impacta en las etapas tempranas del proceso de configuración vacuolar. La presencia de sacarosa incrementa la complejidad de la membrana vacuolar y promueve el crecimiento celular y de raíz completa. Interesantemente, encontramos que la presencia de sacarosa en el medio de crecimiento estimula la internalización de MP dependiente de clatrina. La perturbación farmacológica de la internalización de MP lleva a defectos en el proceso de configuración vacuolar reminiscentes a la condición libre de sacarosa. Consistentemente, la perturbación de la función de las cadenas livianas y pesadas de clatrina resulta en una menor internalización de MP y a defectos en la configuración vacuolar que homologan la condición libre de sacarosa. Remarcablemente, la perturbación química o genética del tráfico mediado por clatrina impacta etapas tempranas del proceso de configuración vacuolar disminuyendo la complejidad de la membrana vacuolar, pero, interesantemente, la morfología de la VC en células diferenciadas se mantiene imperturbable. En resumen, nuestras evidencias muestran que la EMC, es requerida para el proceso de configuración de la VC en etapas tempranas, probablemente promoviendo un

aumento de membrana vacuolar que permite una rápida configuración de la VC. Remarcablemente, estos resultados nos permiten sugerir que una de las fuentes de membrana del tonoplasto es la MP. Adicionalmente, podemos afirmar que la EMC es requerida para el crecimiento celular a través de la modulación del proceso de configuración de la VC.

## ABSTRACT

In differentiated plant cells, the Central Vacuole (CV) occupies about 90% of the volume. This compartment is essential for homeostasis, cell growth and development. In roots, the configuration of the CV begins in the meristematic growth zone where the immature vacuole is expanding progressively by increasing its content and membrane to reach the state of a CV in the root differentiation zone. In order to study the contribution of cellular trafficking from Plasma Membrane (PM) in CV configuration, we observed the vacuoles across the cell growth gradient in *Arabidopsis thaliana* roots. We observed that sucrose affects the early stages of the vacuolar configuration process along the root growth axis. The presence of sucrose increases the vacuolar membrane complexity and promote cell and root growth. Interestingly, we found that the presence of sucrose in the growth media positively stimulates PM-internalization and Clathrin-Mediated Endocytosis (CME). Chemical inhibition of PM-internalization leads to vacuolar configuration defects mimicking sucrose-free growth condition. Congruently, impairment of Clathrin light and heavy chains function resulting in lower PM-internalization leads vacuolar configuration defect mimicking sucrose free growth condition. Significantly, the chemical or genetic perturbation of clathrin-mediated traffic impacts early stages of the vacuolar configuration process by decreasing the complexity of the vacuolar membrane. Interestingly, in all cases, the CV morphology in differentiated cells remains undisturbed. In summary, our evidences show that CME is required for early stages during the CV configuration process, probably promoting an increase of the vacuolar membrane that allows a quick CV configuration. Remarkably, these results allow us suggest that one of the sources of vacuolar membrane PM. Additionally, we can

affirm that CME is required for cell growth through the modulation of CV configuration process.

## INTRODUCCIÓN

En plantas, de manera transversal al tipo de órgano o tejido, todas las células poseen un compartimiento limitado por una monocapa lipídica denominado vacuola. En células completamente diferenciadas la vacuola ocupa aproximadamente el 90% del volumen total de la célula, por lo que es comúnmente llamada Vacuola Central (VC). Esta vacuola es más que una simple cisterna de agua, siendo requerida para el desarrollo y supervivencia del organismo a través de múltiples funciones esenciales en la fisiología celular (Surpin, M. & Raikhel, N., 2004). Constituye, por un lado, el principal punto de almacenaje de metabolitos, entre los que se cuentan polisacáridos, pigmentos, toxinas y proteínas. Por otro, participa en la regulación de la homeostasis y proteostasis celular a través del secuestro de iones y de la degradación y reciclaje de diversos componentes celulares, respectivamente (Li y cols., 2016). Además, a través del almacenaje de agua y la consecuente generación de la presión de turgor la vacuola cumple un importante papel en la modulación de la expansión de la pared celular impactando, por tanto, el crecimiento celular (Green, P.B. & W.R. Cummins, 1974; Zhang y cols., 2014). El conjunto de funciones permite a la vacuola amortiguar y sobrellevar cambios ambientales abruptos en la célula, asegurando el éxito del estilo de vida sésil en vegetales.

### **1.1.- Establecimiento de la Vacuola Central**

#### **1.1.1.- La vacuola forma parte del Sistema de Endomembranas de la célula vegetal.**

En todas las células eucariontes se distingue una compleja compartimentación de las membranas intracelulares. La identidad y función de estos compartimientos se sustentan en su composición proteica y lipídica. Como conjunto estos organelos se

denominan Sistema de Endomembranas (SE) y su comunicación está dada físicamente o a través del tráfico de vesículas que es altamente regulado. En plantas los componentes principales del SE incluyen al Retículo Endoplasmático (ER), el Aparato de Golgi (GA), los Endosomas Tempranos o Red Trans-Golgi (TGN/EE), los compartimientos post TGN/EE que incluyen el Compartimiento Pre-vacuolar, conocido también como Endosomas Tardíos o Compartimientos Multivesiculares (PVC/LE/MVB), la vacuola y la Membrana Plasmática (MP). Dentro de la célula el SE es esencial para la síntesis, destinación, entrega y degradación de macromoléculas (Contento A. & Bassham D., 2012).

En términos generales, el tráfico dentro del SE puede ser funcionalmente dividido en dos grandes rutas: secretoria y endocítica. En la ruta secretoria, también denominada biosintética, lípidos y proteínas son sintetizados *de novo* en el ER. Las proteínas que cuentan con una señal de retención al ER permanecen en este organelo, mientras que las que cuentan con una señal de destinación a otro compartimiento prosiguen en tránsito. Muchas de las proteínas pasan al GA luego del ER. El GA está conformado por una serie de cisternas próximas entre sí, donde las macromoléculas son sometidas secuencialmente a distintas modificaciones post-traduccionales. Las modificaciones en el GA condicionan la retención de las macromoléculas a alguna de las cisternas, el tráfico de regreso al ER, o la progresión en la ruta secretoria (Nickel, W. & Wieland, F.T, 1998; Viotti, C. 2016).

El tráfico secretorio post-Golgi desemboca en el TGN/EE, organelo multiendosomal responsable de la destinación de macromoléculas a la MP, el PVC/LE/MVB o la vacuola (Jürgens, G. 2004; Cui y cols., 2016). Interesantemente, el transporte entre el TGN/EE y la vacuola deriva de la maduración de un TGN/EE en un PVC/LE/MVB el cual finalmente se fusiona con la vacuola (Scheuring y cols., 2011).

Por otro lado, en la ruta endocítica componentes extracelulares o residentes de MP son circunscritos e internalizados en vesículas en dirección al TGN/EE. En contraste a su contraparte animal o levadura el TGN/EE propio de células vegetales participa en la vía endocítica. Se ha reportado que cargos endocitados colocalizan rápidamente con marcadores de TGN/EE (Viotti y cols., 2010). En el TGN/EE, por tanto la vía endocítica y secretoria convergen. Particularmente, desde el TGN/EE los cargos endocitados pueden ser reciclados, o continuar en dirección a la vacuola para su almacenaje o degradación (Jürgens, G. 2004).

### **1.1.2.- Biogénesis vacuolar**

Observaciones de la ultraestructura celular en conjunto con análisis bioquímicos de compartimientos aislados mediante ultracentrifugación, permitieron proponer los primeros modelos de biogénesis vacuolar. Indistintamente, estos estudios sugieren que la vacuola se origina desde un compartimiento dentro del SE. Sin embargo, hasta la fecha, la fuente específica de membrana es controversial, y sigue siendo tema de discusión.

La estrecha o directa asociación entre el GA y estructuras vacuolares llevó a sugerir que la vacuola se origina a partir del alargamiento del espacio intermembrana de una de las cisternas de este organelo (Marinos, N., 1963). Por otro lado, debido a la naturaleza ácida encontrada en estos compartimientos, se sugirió que la nueva vacuola se origina desde vesículas derivadas del tráfico post-GA, (Marty, F., 1978). Este organelo corresponde al denominado actualmente TGN/EE, y el modelo que derivó de estas observaciones propone la aparición de estructuras tubulares, a partir de las vesículas de naturaleza ácida, las que posteriormente forman una intrincada red que tras cerrarse da lugar a la Vacuola Central (Marty, F., 1978; Marty, F., 1999).

No obstante, no existe evidencia experimental inequívoca que demuestre que el GA o el TGN/EE es la fuente de membrana que compone la Vacuola Central (Viotti, C., 2014).

En contraparte, se postuló que la fuente de membrana de la vacuola inicialmente proviene del ER (Bowes, B.G., 1965). El aumento de volumen de una de las cisternas del ER establecería una estructura vacuolar temprana que al término del proceso de formación es escindida de la membrana parental (Bowes, B.G., 1965). Un segundo grupo de evidencias muestra que múltiples vesículas derivadas del ER, denominadas pro-vacuolas, se fusionan para formar vacuolas de pequeño tamaño, tras lo cual se gatilla la expansión y fusión de estas estructuras para dar lugar a una Vacuola Central (Matile, Ph. & Moor, H. 1968). Interesantemente, se mostró que las vesículas derivadas del ER además de presentar marcadores proteicos y enzimáticos propios de este compartimiento, presentan la actividad de hidrolasas vacuolares (Matile, Ph. 1968).

En las últimas décadas el trabajo en torno a la biogénesis de la vacuola ha sido reactivado. Se demostró que proteínas residentes de la membrana vacuolar, el tonoplasto, alcanzan este compartimiento a través de rutas secretorias que no requieren el tráfico entre el ER y el GA o el tráfico post-GA (Gomez, L. & Chrispeels, M.J., 1993; De Marchis y cols., 2013; Viotti y cols., 2013). Dos de las proteínas más abundantes de la membrana vacuolar, las bombas de protones  $H^+$ -ATPase (V-ATPase) y la  $H^+$ -PPase (V-PPase), esenciales en la mantención del gradiente electroquímico que permite el transporte a través de esta membrana, tanto como la mantención del pH vacuolar (Gaxiola y cols., 2007) son ensambladas en el ER y dirigidas a la vacuola directamente (Viotti y cols., 2013). Interesantemente, en células del meristema de la raíz de *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*) ambas bombas de

protones son ensambladas en estructuras membranosas que derivan del ER denominadas pro-vacuolas, las cuales son reminiscentes a autofagosomas pero desprovistas de la maquinaria propia de autofagia (Viotti y cols., 2013). Por tanto, a pesar de que las etapas más tempranas en la formación de una vacuola no están resueltas del todo, se ha sugerido que este organelo deriva de una estructura que se origina del ER, probablemente un subdominio enriquecido en las proteínas propias del tonoplasto.

### **1.1.3.- Proceso de configuración de la Vacuola Central**

En las primeras décadas del siglo XX el estudio de la distribución de antocianinas en células epidermales foliares y florales resolvió dos grandes interrogantes, por un lado, reveló la compartimentalización de estos pigmentos en la vacuola de la célula vegetal y, además, mostró la presencia de la vacuola con el marcaje natural entregado por los antocianos en células meristemáticas (Guilliermond, A. 1929; Zirkle, C. 1937). Interesantemente, la morfología de la vacuola en el meristema dista notablemente de la estructura de Vacuola Central. Estos primeros reportes, mostraron que durante y tras la división celular la vacuola se configura como un conjunto de estructuras luminales ovoides o esféricas acompañadas de una red de túbulos. Posteriormente, a través de la microscopía electrónica se sugirió la presencia de una red intrincada de membrana conformando un aparato vacuolar en este tipo de células (Marty, F., 1978). En compás con el crecimiento y diferenciación celular, se observó que la vacuola incrementa su tamaño, proceso que conduce a la configuración de una Vacuola Central que abarca la mayor parte del volumen celular en una célula diferenciada.

La incorporación de marcadores fluorescentes en células vivas redimensionó el conocimiento de la vacuola y del proceso de configuración vacuolar. A través de

reconstrucciones tridimensionales se determinó que la membrana vacuolar forma una estructura continua. Particularmente, se observó que la Vacuola Central presenta una morfología compleja altamente organizada, la cual está en constante transformación (Oda y cols, 2009).

Por otro lado, el gradiente de crecimiento celular que se observa a lo largo de la raíz de *Arabidopsis* ofrece una poderosa ventaja para el estudio del proceso de configuración vacuolar. El uso de marcadores de tonoplasto, proteicos o lipídicos, en células de este órgano permite recapitular el proceso de configuración de la Vacuola Central exitosamente. Tal como sugerían observaciones tempranas, el volumen de la vacuola incrementa dramáticamente al contrastar la estructura de la vacuola en el meristema respecto a la Vacuola Central en una célula completamente diferenciada. En una célula meristemática que aproximadamente incrementa al doble su longitud, el volumen vacuolar aumenta 6 veces, sin embargo, la superficie de membrana aumenta solo 2 veces (Viotti y cols., 2013; Krüger & Schumacher, 2017). En consecuencia, la acumulación de membrana en el meristema es determinante para la configuración posterior de la Vacuola Central.

La maquinaria celular que rige el proceso de configuración de la Vacuola Central y la o las fuentes de membrana que contribuyen al proceso, han sido vislumbradas parcialmente. Dentro de estas, se ha sugerido fuertemente que el tráfico endosomal a nivel del PVC/LE/MVB es determinante. Por ejemplo, líneas de *Arabidopsis* en las que la maquinaria requerida para la formación de las vesículas intraluminales del PVC/LE/MVB se encuentra perturbada, la configuración de una Vacuola Central no se lleva a cabo (Isono y cols., 2010; Kolb y cols., 2015; Tan y cols., 2017). Si bien, la biogénesis del PVC/LE/MVB se inicia desde el TGN/EE el impacto de este organelo en la configuración de la Vacuola Central no ha sido explorado (Scheuring y cols.,

2011). Interesantemente, las vesículas intraluminales del PVC/LE/MVB direccionan material desde la MP a la vacuola, sin embargo, el posible papel de la ruta endocítica en la configuración de la Vacuola Central en células vegetales no ha sido descrito.

### **1.2.- La Vacuola Central impacta el crecimiento celular**

A través de la regulación de la presión de turgor se ha descrito que la vacuola controla el crecimiento celular (Surpin y Raikhel, 2004). En líneas mutantes de Arabidopsis que no presentan vacuolas el crecimiento celular se detiene y son letales a nivel embrionario (Rojo y cols., 2001; D'Ippólito y cols., 2017; Tan y cols., 2017). Por otro lado, diversas líneas de Arabidopsis que presentan defectos en la configuración de la vacuola, presentan raíces de menor longitud en comparación a la línea silvestre, sugiriendo una restricción del crecimiento celular en estos órganos (Feraru y cols., 2010; Isono y cols., 2010; Zheng y cols., 2011; Kolb y cols., 2015). Además, se observó que durante la germinación de la semilla el establecimiento de la Vacuola Central es determinante para el crecimiento celular desde los ejes embrionarios (Novikiva y cols., 2014).

Por otro lado, durante la configuración de la Vacuola Central se han reportado estructuras complejas de membrana del tonoplasto altamente enriquecidas en células en expansión. Se ha sugerido que estas estructuras participan como reservorios de membrana para facilitar y acelerar el proceso de configuración vacuolar (Saito y cols., 2002; Tanaka y cols., 2007).

Finalmente, la fitohormona auxina regula el crecimiento celular en la raíz de Arabidopsis (Rahman y cols., 2007). Llamativamente, auxina regula la configuración de la vacuola a través de la maquinaria de tráfico endosomal del PVC/LE/MVB (Löfke y cols., 2015). Análisis en tiempo real en la raíz de Arabidopsis demostraron que en

el mecanismo mediado por auxina el cambio en la vacuola antecede a la restricción del crecimiento celular (Löfke y cols., 2015; Scheuring y cols., 2016). Resultados que indican que la configuración de la vacuola impacta y dirige el crecimiento celular.

### **1.3.- Endocitosis Mediada por Clatrina y su relación con la biogénesis de vacuola**

#### **1.3.1.- Aspectos generales de la Endocitosis Mediada por Clatrina**

La interacción de las células eucariontes con su entorno inmediato está restringida por la MP. Distintos tipos de receptores, canales y lípidos especializados se agrupan en la MP permitiendo continuamente integrar estímulos externos. De este modo la MP participa de manera activa en funciones esenciales, tales como la señalización hormonal, el transporte de nutrientes, la defensa contra patógenos, entre otros. La mantención de la homeostasis requiere un estricto control del repertorio y la abundancia de proteínas y componentes alojados en la MP. La endocitosis es un mecanismo activo para ello, internalizando porciones de MP con proteínas y componentes extracelulares a través de vesículas. Esto permite el recambio, reciclaje y direccionamiento a degradación de proteínas de MP (Samaj y cols., 2004; Contento, A.L. & Bassham, D.C., 2012).

Múltiples mecanismos de internalización de cargos extracelulares o propios de la MP han sido reportados en células vegetales y animales. Dentro de estos mecanismos el más conocido, y conservado a nivel evolutivo en eucariontes, es la internalización de proteínas mediante Endocitosis Mediada por Clatrina (EMC) (Kirchhausen y cols., 2014).

La EMC funciona mediante la invaginación de porciones de MP para formar Vesículas Cubiertas por Clatrina (VCC) que median el transporte de contenido desde la MP a

compartimientos intracelulares. Clatrina es un complejo hexamérico que forma una estructura conocida como triskelion que junto a otras proteínas recubre la vesícula en formación (Kirchhausen y cols., 2014).

En células de mamíferos la EMC ha sido funcionalmente dividida en cinco etapas. En la primera etapa, "nucleación", regiones de MP enriquecidas en lípidos del tipo fosfatidilinositoles son curvadas hacia el citoplasma a través de proteínas específicas de unión de membrana. La generación de esta deformación antecede al reclutamiento del triskelion de clatrina y concluye con la formación de una invaginación de la MP denominada "pozo". En la segunda etapa, denominada "selección de cargos", proteínas de reconocimiento y proteínas de andamiaje son reclutadas al pozo en la MP. Una vez los cargos han sido seleccionados y reconocidos por las proteínas de reconocimiento y andamiaje inicia la tercera etapa, denominada "ensamblaje de la cubierta de clatrina", en que la cubierta de clatrina es acoplada formando el llamado pozo cubierto de clatrina. La polimerización de clatrina en torno al pozo estabiliza la deformación de la MP y conduce a la vesiculación de la membrana a partir de la invaginación formada. Posteriormente, en la cuarta etapa, denominada "escisión de la membrana", la maquinaria de escisión es reclutada en torno al cuello de la vesícula naciente lo que permite la fisión de la vesícula desde la membrana parental en un mecanismo dependiente de energía originando una VCC. Finalmente, en la quinta etapa, "perdida de cubierta", la cubierta de clatrina por la acción de proteínas auxiliares se desensambla quedando la membrana de la VCC expuesta. La vesícula desnuda de clatrina se fusiona a la membrana del endosomas temprano, primer punto en la ruta de tráfico endocítico (McMahon, H.T. & Boucrot, E., 2011).

Cada una de estas etapas ocurre de manera secuencial y jerárquica. Los diversos componentes que participan del proceso han sido descritos detalladamente en células

animales y, en comparación, el conocimiento del tráfico mediado por clatrina en plantas es incompleto (Cocucci y cols., 2012; Cocucci y cols., 2014). Sin embargo, el creciente conocimiento en torno al tráfico mediado por clatrina en células vegetales indica que múltiples características estructurales y regulatorias son compartidas (Cole y cols., 1987; Coleman y cols., 1988; Harley, M.S. & Beevers, L., 1989; Chen y cols., 2011).

### **1.3.2.- Tráfico mediado por clatrina en células vegetales**

En células animales componentes de MP o extracelulares internalizados a través de VCC poseen una región conservada dentro de su dominio citoplasmático que es reconocida durante la etapa de selección de cargos de la EMC. El receptor de transferrina humana (hTfR) posee esta región de la cual depende su internalización mediante EMC. Cuando se expresa heterológicamente hTfR en protoplastos de *Arabidopsis* se internaliza a compartimientos intracelulares (Banbury y cols., 2003; Ortiz-Zapater y cols., 2006), sugiriendo la presencia y funcionalidad de la EMC en plantas. Además, se han identificado genes ortólogos que codifican para cada uno de los componentes requeridos durante la EMC en el genoma de *Arabidopsis*. Líneas mutantes deficientes en la expresión de estos genes presentan un retraso en la internalización de PM, además de múltiples defectos durante el crecimiento y desarrollo de la planta (Kitakura y cols., 2011; Wang y cols., 2013; Kim y cols., 2013; Fan y cols., 2013; Di Rubbo y cols., 2013; Yamaoka y cols., 2013). Evidencias que en conjunto, validan la presencia y conservación de la EMC en células vegetales.

### **1.3.3.- El tráfico mediado por clatrina y su papel en la biogénesis de organelos líticos**

La participación del tráfico mediado por clatrina en la biogénesis vacuolar o en el proceso de configuración de la Vacuola Central no ha sido explorada. Sin embargo, la investigación en organismos que poseen grandes compartimentos líticos funcionalmente comparables a una Vacuola Central de células vegetales sugiere que la EMC impacta la Vacuola Central.

Como complejo hexamérico clatrina está conformado por tres subunidades pesadas o cadenas pesadas de clatrina (CHC; Clathrin Heavy Chain) y tres subunidades livianas o cadenas livianas de clatrina (CLC; Clathrin Light Chain) en donde cada CLC se encuentra asociada a una CHC configurando en conjunto un complejo con forma de triskellon (Kirchhausen y cols., 2014). La cepa silvestre de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (*Saccharomyces*) presenta una vacuola que se configura como una gran estructura central. Cepas delecionales de la cadena liviana de clatrina (*Clc1*), tanto como de la cadena pesada de clatrina (*Chc1*) son incapaces de configurar una Vacuola Central, y en contraste presentan múltiples pequeñas estructuras de tipo vacuolar (Payne y cols., 1988; Chu y cols., 1996). Además, nuestro laboratorio ha mostrado que la expresión del gen de *Saccharomyces Clc1* en la cepa mutante *clc1* rescata el fenotipo vacuolar alterado en la mutante, restableciendo la condición silvestre. Interesantemente, la expresión heteróloga de genes que codifican la cadena liviana de clatrina de *Arabidopsis* en la cepa de levadura mutante *clc1* también recuperan el fenotipo silvestre de la configuración vacuolar (Vázquez, B., datos no publicados). Por otro lado, la ameba *Dictyostelium discoideum* presenta una gran estructura vacuolar denominada Vacuola Contráctil. Líneas con pérdida de función de la cadena liviana y pesada de clatrina, e interesantemente, de proteínas de andamiaje requeridas particularmente para EMC presentan una Vacuola Contráctil fragmentada, de menor tamaño e inclusive en casos particulares la Vacuola

Contráctil está completamente ausente (Neuhaus y cols., 2002; Macro y cols., 2012). Estas evidencias sugieren que la EMC es requerida en la configuración de los organelos de tipo Vacuola Central.

En Arabidopsis las vesículas internalizadas desde la PM a través de la EMC son dirigidas al TGN/EE (Chen y cols., 2011). Por lo que el TGN/EE es constantemente alimentado por el flujo de membrana que deriva desde la MP. Dominios del TGN/EE maduran en un PVC/LE/MVB el que posteriormente se fusiona con la vacuola (Scheuring y cols., 2011; Cui y cols., 2016) sirviendo, por tanto, como fuente de membrana para este organelo. En suma, existe un flujo de membrana que continuamente va desde la MP, al TGN/EE y, finalmente, la vacuola. En consecuencia, la EMC podría cumplir un papel en la configuración de la Vacuola Central asegurando el flujo de membrana entre compartimientos endosomales tempranos y la Vacuola Central.

Considerando estos antecedentes, proponemos investigar en esta tesis el papel de la EMC en la configuración de la Vacuola Central en células vegetales utilizando como modelo la raíz de Arabidopsis.

## **HIPOTESIS**

El tráfico endocítico es requerido como fuente de membrana lipídica para ser utilizado en las etapas tempranas del proceso de configuración vacuolar en *Arabidopsis thaliana*.

## **OBJETIVOS**

### **3.1.- Objetivo general**

Estudio de la participación del tráfico mediado por clatrina en el proceso de configuración de la Vacuola Central en *Arabidopsis thaliana*

### **3.2.- Objetivos específicos**

1.- Estudio del impacto de la modulación de la endocitosis en el proceso de configuración de la Vacuola Central y el crecimiento celular en *Arabidopsis thaliana*.

2.- Estudio del proceso de configuración de la Vacuola Central ante la inhibición del tráfico mediado por clatrina.

3.- Evaluación del tráfico desde MP a la vacuola frente a la modulación del tráfico mediado por clatrina.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1.- Material vegetal: plantas de *Arabidopsis* utilizadas

Para el desarrollo de todos los experimentos se utilizó como línea silvestre el ecotipo Columbia-0 (Col-0). Todas las líneas mutantes y transgénicas descritas en este trabajo fueron generadas a partir del ecotipo Col-0. Para el estudio del tráfico mediado por clatrina se utilizó la línea doble mutante *clc2-1clc3-1* pérdida de función de las cadenas livianas de clatrina CLC2 (CLATHRIN LIGHT CHAIN2) y CLC3 (CLATHRIN LIGHT CHAIN3) de *Arabidopsis thaliana* (Wang y cols., 2013). Se utilizó, además, la línea *pINTAM::HUB1a* que expresa una versión dominante negativa de la cadena pesada de clatrina CHC1 (CLATHRIN HEAVY CHAIN1) de manera inducible por (Z)-4-Hydroxytamoxifen (Dhonukshe y cols., 2007; Robert y cols., 2010). Por otro lado, se utilizó la línea reportera de la cadena liviana de clatrina CLC2 fusionada al reportero GFP (GREEN FLUORESCENT PROTEIN) cuya expresión es comandada por su promotor endógeno *pCLC2::CLC2-GFP* (Wang y cols., 2013) y la línea reportera de la subunidad  $\mu$  del complejo AP2 (ADAPTADOR PROTEIN2) fusionada al reportero YPF (YELLOW FLUORESCENT PROTEIN) cuya expresión es dirigida por su promotor endógeno *p $\mu$ 2:: $\mu$ 2-YFP* (Bashline y cols., 2013). Como reportero de la membrana vacuolar, tonoplasto, se utilizó la línea  $\delta$ -TIP ( $\delta$ -TONOPLAST INTRINSIC PROTEIN) fusionada a GFP cuya expresión está comandada por el promotor de expresión constitutiva 35S del virus del mosaico de la coliflor *p35S::GFP- $\delta$ -TIP* (Cutler y cols., 2000).

### 4.2.- Esterilización de semillas de *Arabidopsis*

Para la esterilización de semillas se siguió uno de los siguientes protocolos. En ambos casos se persigue limpiar la superficie de las semillas.

#### **4.2.1.- Protocolo de esterilización de semillas con etanol**

Se preparó una solución en etanol 95% v/v de cloro comercial al 20% v/v y el detergente Tween-20 al 0,01% v/v. Con 1mL de esta solución se lavaron entre 300 y 500 semillas contenidas en un tubo eppendorf agitando por inversión durante 10 minutos. Bajo una campana de flujo laminar se retiró la solución descrita y se realizó un proceso de tres lavados consecutivos con etanol 95% v/v agitando las semillas en cada lavado durante 30 segundos. Posterior a esto, las semillas se mantuvieron expuestas al flujo laminar para su secado manteniendo abierta la tapa del tubo que las contiene por un mínimo de 20 minutos, con objeto de conseguir la completa evaporación del etanol. Finalmente, se agregó 1mL de agua estéril.

#### **4.2.2.- Protocolo de exposición de semillas a gas cloro**

Se dispuso en un contenedor, que permita herméticidad con respecto a su contenido, una gradilla con tubos de 1,5mL que albergan las semillas (100 a 500). La tapa de los tubos se mantiene abierta en forma perpendicular a su eje. Se instalaron dentro del contenedor hermético dos vasos de precipitado de 100mL conteniendo 80mL de la solución madre compuesta por cloro comercial con HCl de grado analítico en proporción 114:1. El contenedor es cerrado herméticamente por un mínimo de 12 horas permitiendo un ambiente que contiene cloro molecular (gas). Todo el procedimiento se realizó bajo una campana de extracción que permita aislar el procedimiento del contacto humano. Luego de las 12 horas la cámara hermética es abierta, el deshecho líquido descartado, y los tubos de 1,5mL conteniendo las semillas son puestos a ventilar por un mínimo de 2 horas en ambiente estéril en una campana de flujo laminar. En este estado las semillas pueden ser almacenadas por varios

meses. Antes de la estratificación las semillas deben ser re-suspendidas en agua estéril.

#### **4.3.- Estratificación de semillas de Arabidopsis**

Semillas esterilizadas y re-suspendidas en agua se mantuvieron a 4°C en oscuridad por un mínimo de 48 horas.

#### **4.4.- Condiciones de cultivo y crecimiento de plántulas de Arabidopsis**

Las semillas estratificadas se sembraron en medio de cultivo sólido (MCS) estéril el cual está compuesto de sacarosa 2% p/v o 0% p/v, dependiendo de lo indicado, mioinositol 0,01% p/v, MES [ácido 2-(N-morfolino)-etanosulfónico monohidrato] 0,05% p/v, medio Murashige y Skoog (MS) de cultivo 0,22% p/v y fitoagar 0,7% p/v, ajustado a pH 5,7 con KOH, sobre placas cuadradas de cultivo (120x120x17mm) conteniendo 40mL de MCS.

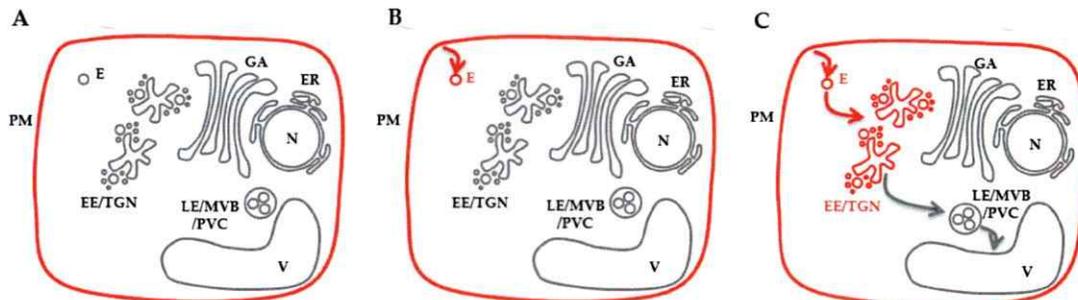
En cada placa se sembraron dos filas de semillas separadas por aproximadamente 6cm. Cada fila contiene 20 semillas separadas de manera equidistante. Las placas se dispusieron de modo vertical para que el crecimiento de cada plántula siga la dirección del vector de gravedad y se mantuvieron en incubadores que mantienen constante una temperatura de 22°C y que siguen un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad. Para el tratamiento de plántulas en presencia de los diferentes compuestos químicos descritos en este trabajo, se utilizó Medio de Cultivo Líquido (MCL) que corresponde al MCS sin fitoagar suplementado.

#### **4.5.- Estudio del tráfico endocítico desde la Membrana Plasmática y endosomas**

Para el estudio del tráfico endocítico entre la Membrana Plasmática y los endosomas se utilizó el fluoróforo FM4-64 (Bolte, S. y cols., 2004). FM4-64 es un esteril lipofílico, fluorescente en un medio hidrofóbico como una capa lipídica. Esta característica permite utilizarlo como trazador endocítico, pues una vez unido a la MP es internalizado secuencialmente a través de los compartimientos que componen la ruta endocítica dentro del Sistema de Endomembranas. La figura 1 muestra en rojo la progresión en la internalización de FM4-64 a través de los compartimientos de la ruta endocítica a lo largo del tiempo. En A el trazador se encuentra en la MP desde donde es endocitado a través de vesículas a compartimientos endosomales (E), como se muestra B, hasta concentrarse en el EE/TGN lo cual toma aproximadamente 30 minutos en una plántula silvestre, como se muestra en C. A tiempos posteriores el trazador alcanza los compartimientos pre-vacuolares (LE/PVC/MVB) y finalmente la membrana vacuolar (flechas grises en Figura 1C).

Se preparó una solución stock de FM4-64 (Invitrogen) a una concentración de 16mM usando como solvente agua estéril (preparación bajo campana de flujo laminar). Para la evaluación de la endocitosis, plántulas de 7 días se incubaron en una solución de FM4-64 a una concentración de 4 $\mu$ M preparada en MCL. Las plántulas se mantuvieron en oscuridad y a 4°C por 15 minutos, lo que asegura la unión del trazador a la Membrana Plasmática sin ser internalizado a compartimientos endosomales (Bolte, S. y cols., 2004), terminado este periodo las plántulas se incubaron en MCL a temperatura ambiente. Se observaron células de la epidermis de la punta de la raíz luego de 5, 15 y 30 minutos de la incubación en MCL a temperatura ambiente. Las imágenes del proceso de internalización de FM4-64 se obtuvieron por medio del microscopio confocal Zeiss LSM 710. Se utilizó una longitud de onda de excitación de

543nm y la emisión fue recolectada a 588-696nm. Las observaciones se realizaron utilizando un objetivo 40X de inmersión en aceite. El análisis de las imágenes se realizó mediante el software *Image J*.



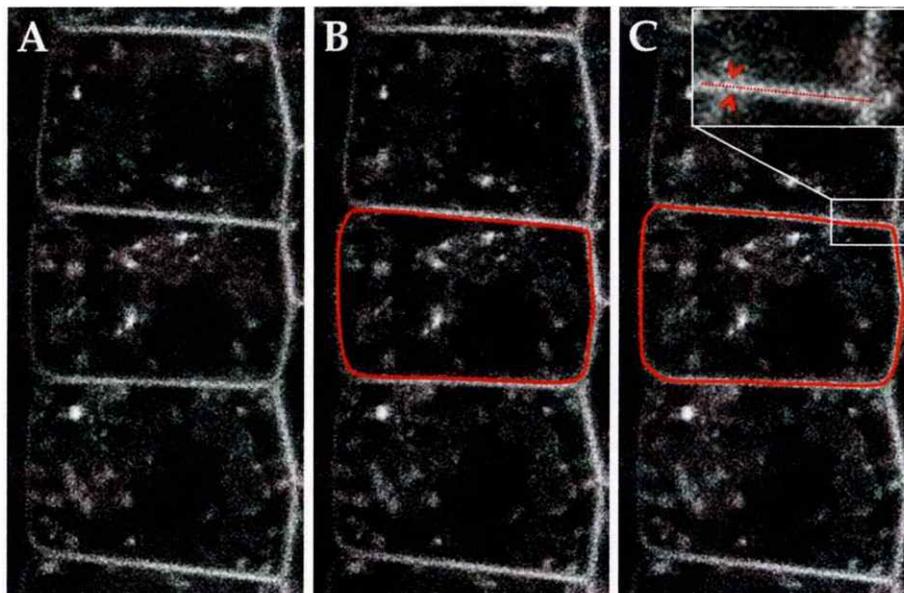
**Figura 1. Dinámica de internalización del trazador FM4-64.** El compuesto lipofílico FM4-64 actúa como un fluoróforo cuando se encuentra unido a una membrana lipídica. En células vegetales es usado como trazador endocítico, pues es posible monitorear su fluorescencia a medida que es internalizado desde la Membrana Plasmática (MP). En una célula vegetal a 4°C, FM4-64 se une a la MP, por lo tanto, solo se registra emisión de fluorescencia desde la MP (A). Al activar la internalización de MP aumentando la temperatura de la incubación el trazador es internalizado hasta los endosomas (B) alcanzando el EE/TGN en aproximadamente 30 minutos (C). Posterior a esta temporalidad, el trazador llega al compartimiento más tardío en la ruta endocítica: los LE/PVC/MVB y, finalmente, la Vacuola, entre 60 y 90 minutos (flechas grises en C). E = Endosomas, EE/TGN = Endosomas Tempranos/Red Trans-Golgi, LE/PVC/MVB = Endosoma Tardío/Compartimiento Pre-Vacuolar/Cuerpo Multivesicular, V = Vacuola Central, N = Núcleo y ER = Retículo Endoplasmático.

#### 4.6.- Cuantificación de la internalización de FM4-64 en células epidermales de la punta de la raíz de *Arabidopsis*

Con objeto de cuantificar la internalización del trazador FM4-64 se calculó la razón de fluorescencia intracelular sobre la intensidad total para cada una de las células de interés (Figura 2A) utilizando el software *ImageJ*. Primero, por medio de la herramienta “*Magnifying glass*” se amplificó la zona en la que se encuentra la(s) células de interés. A continuación, a través de la herramienta “*Polygon selection*” se

delimitó el área intracelular de una célula individual escogida (Figura 2B, línea continua roja). La función “*Measure*” entrega el valor de la intensidad de fluorescencia promedio del área seleccionada. Luego, se repitió el procedimiento con el área total de la célula (Figura 2C, línea continua roja). Debido a que en muchas ocasiones el límite de la MP entre dos células vecinas no se distingue con claridad, para la medición del área total de una célula el trazo se dibujó en el punto medio de la MP, tal como se detalla en la figura 2C.

Además, la señal de la MP fue obtenida como parámetro de análisis independiente. El valor de la señal de la MP es resultado de la resta entre la señal de fluorescencia total de la célula y la señal de fluorescencia intracelular.



**Figura 2. Medición de la endocitosis de FM4-64.** A través del uso del software *Image J* se seleccionan células de interés para la cuantificación (A). En una célula escogida se delimita el área intracelular y se obtiene el promedio de la intensidad de fluorescencia de la región de interés (B, línea roja continua). Luego se repite la operación para el área total de la célula (C, línea roja continua). El límite celular queda definido por el punto medio de la MP observable, como se describe en detalle por la línea discontinua roja en la región amplificada en la esquina superior derecha de la

figura C. La cuantificación de la internalización queda definida como la razón de la señal intracelular sobre la señal total.

#### **4.7.- Estudio de la configuración vacuolar en la raíz de Arabidopsis**

En la epidermis de la raíz de Arabidopsis la formación de una Vacuola Central puede ser recapitulada observando la morfología de la vacuola en células que se encuentran en distintas etapas de crecimiento (Viotti y cols., 2013; Krüger & Schumacher, 2017). Considerando esta ventaja, estudiamos el proceso de configuración vacuolar integrando las observaciones de la morfología de la vacuola en células del meristema, la zona de elongación y la zona de diferenciación en la epidermis de la raíz de Arabidopsis.

El trazador FM4-64 es internalizado a través de la ruta endocítica. Temporalmente y secuencialmente es incorporado a endosomas tempranos y tardíos, hasta finalmente alcanzar el tonoplasto. Por lo tanto, FM4-64 permite visualizar la membrana vacuolar luego de tiempos largos de incubación, lo que conduce a la eficiente concentración del trazador en esta membrana.

Plántulas de 7 días se incubaron por 5 minutos en una solución de FM4-64 idéntica a la descrita en la sección 4.5. Luego de esto se incubaron en MCL libre de FM4-64 y mantenidas en oscuridad a temperatura ambiente por 4 horas. Se obtuvieron imágenes mediante microscopia confocal utilizando la misma configuración descrita en la sección 4.5.

Por otro lado, se utilizó la línea *p35S::GFP- $\delta$ -TIP* (Cutler y cols., 2000) como reportera del tonoplasto. Las imágenes se obtuvieron por medio del microscopio confocal Zeiss LSM 710. Se utilizó una longitud de onda de excitación de 488nm y la emisión fue

recolectada en el rango 533-568nm. Las observaciones se realizaron utilizando un objetivo 40X de inmersión en aceite.

#### **4.8.- Estudio del lumen vacuolar**

La sonda fluorescente BCECF (2',7'-Bis(2-carboxyethyl)-5(6)-carboxyfluorescein) se acumula eficientemente en compartimientos de pH ácido (Swanson, S.J. & Jones, R.L., 1996). Debido a que la vacuola presenta un pH ácido (Shen y cols., 2013) BCECF permite visualizar la totalidad del lumen de este organelo.

Se preparó una solución stock de BCECF (Invitrogen) a una concentración de 1,22mM en DMSO (Winkler). Plántulas de 7 días se incubaron por 1 hora en una solución de BCECF a una concentración de 10 $\mu$ M preparada en MCL en oscuridad y a temperatura ambiente. Las plántulas teñidas se lavaron en MCL por 10 minutos a temperatura ambiente. Tras esto las plántulas se encuentran listas para observación. Las imágenes se obtuvieron por medio del microscopio confocal Zeiss LSM 710. Se utilizó una longitud de onda de excitación de 488nm y la emisión fue recolectada a en el rango 520-568nm. Las observaciones se realizaron utilizando un objetivo 40X de inmersión en aceite.

#### **4.9.- Delimitación exclusiva de la Membrana Plasmática en células de la epidermis de la raíz de Arabidopsis a través de FM4-64.**

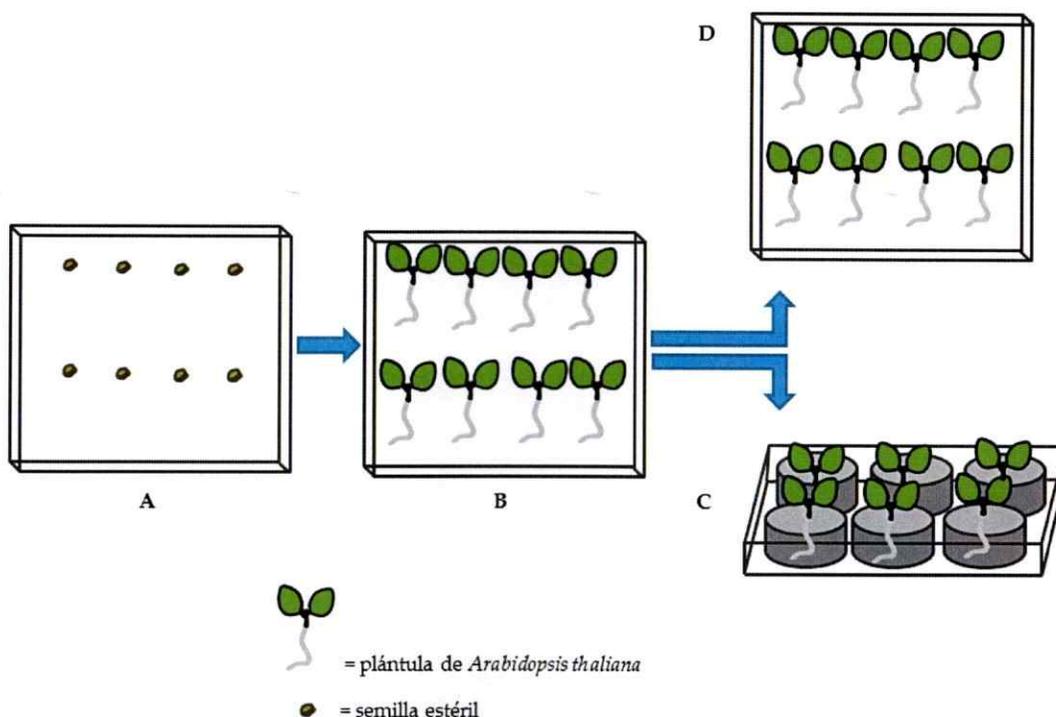
Con objeto de cuantificar las señales de proteínas reporteras en la MP de manera independiente del espacio intracelular, se utilizó el trazador FM4-64 para marcar exclusivamente la Membrana Plasmática. De este modo, la cuantificación de la señal de las proteínas reporteras se restringió a la región marcada por FM4-64. Las plántulas de líneas reporteras se incubaron en una solución de FM4-64 a una concentración de 4 $\mu$ M preparada en MCL en oscuridad a 4°C por 15 minutos e

inmediatamente visualizadas mediante microscopia confocal. Las condiciones de observación son idénticas a las descritas en la sección 4.5.

#### **4.10.- Tratamientos de plántulas de Arabidopsis con drogas que perturban el tráfico vesicular o que gatillan la expresión de un gen de interés en plántulas transgénicas.**

Se realizaron soluciones stocks dependiendo de la droga utilizada. Se preparó una solución de Tirfostina A23 (TyrA23; Sigma) 270mM y de (Z)-4-Hydroxytamoxifen (H-TAM; Sigma) de 10mM utilizando para ambos casos DMSO (Winkler) como solvente. Tirfostina A23 fue diluida en DMSO a una concentración de 100mM. Además, se utilizó la droga BrefeldinaA (BFA; Sigma) a 3,6mM disuelta en etanol absoluto.

Se definió como tratamiento agudo todo aquel en que plántulas de una línea de Arabidopsis de interés es sembrada y germinada en medio libre de cualquier tipo de droga o solvente (Figura 3A y 3B). Las plántulas son posteriormente expuestas en MCL a una droga o solvente por un periodo inferior o igual a 24 horas (Figura 3C). Por otro lado, se definió como tratamiento crónico aquel en que las semillas fueron germinadas en presencia de la droga o solvente (3D).



**Figura 3. Diseño experimental para el tratamiento de drogas en plántulas de *Arabidopsis thaliana*.** Semillas estériles se sembraron en placas cuadradas de 120x120x12mm conteniendo 40mL de MCS (A). En los tratamientos agudos plántulas de 7 días post siembra (B) fueron tomadas y transferidas a placas de 6 pocillos (85,4x27mm) conteniendo 3mL de MCL por pocillo suplementado con la droga de interés. Para los tratamientos crónicos desde el momento de la siembra (A) el MCS se encuentra suplementado con la droga. Cada tratamiento fue siempre comparado con el correspondiente tratamiento control. Los parámetros de crecimiento se evaluaron directamente a partir de las plántulas sobre la placa (D).

#### 4.10.1.- Tratamientos agudos

Se crecieron semillas de la línea reportera *p35S::GFP-δ-TIP* por 7 días en MCS. Entonces las plántulas se transfirieron a MCL suplementado con TyrA23 50μM, TyrA23 75μM o DMSO como control. Las plántulas fueron expuestas por 2 o 4 horas al tratamiento tras lo cual la morfología vacuolar fue evaluada mediante microscopia confocal siguiendo las indicaciones descritas en la sección 4.2.7.

Semillas de la línea reportera *pCLC2::CLC2-GFP* se crecieron en MCS por 7 días. Las plántulas fueron tratadas con TyrA23 75µM, o DMSO como control, por 4 horas o, por otro lado, con BFA 50µM o etanol absoluto como control por 1,5 horas. Luego del tratamiento la localización subcelular de la proteína de fusión CLC2-GFP fue monitoreada mediante el microscopio confocal Zeiss LSM 710. Se utilizó una longitud de onda de excitación de 488nm, se recolectó la emisión a 533-568nm. Se utilizó un objetivo 40X de inmersión en aceite para las observaciones.

Se crecieron semillas de la línea *pINTAM::HUB1a* (de aquí en adelante abreviada como HUB1a) y del ecotipo silvestre Col-0 por 7 días en MCS. Se transfirieron las plántulas a MCL suplementado con H-TAM 1µM o DMSO como control por 24 horas. Terminado el tratamiento se evaluó la morfología vacuolar utilizando FM4-64 según las indicaciones descritas en la sección 4.2.7.

#### **4.10.2.- Tratamientos crónicos**

Se sembraron semillas del ecotipo silvestre Col-0 en medio MCS suplementado con concentraciones de TyrA23 30µM, 50µM o 75µM. DMSO fue usado como control. Se evaluó el crecimiento de la raíz principal desde el día 4 al día 7 post siembra.

Semillas del ecotipo silvestre, Col-0, y de la línea HUB1a fueron sembradas en MCS suplementado con H-TAM 0,1µM o 1µM. DMSO fue usado como control en ambos casos. Se evaluó el largo de la raíz principal después de 7 días.

#### **4.11.- Análisis morfológico del largo de raíz principal de líneas de Arabidopsis**

Una vez terminado el tiempo de crecimiento y/o tratamiento de las plántulas se capturaron fotografías de las plántulas escaneando directamente las placas (escáner

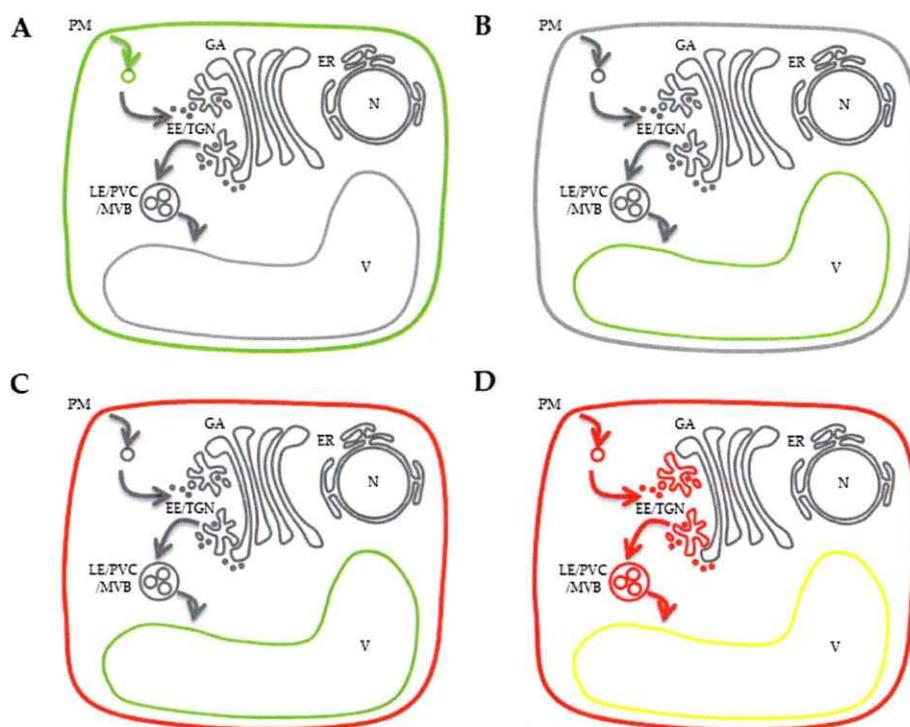
EPSON Perfection V600 Photo). La cuantificación del largo de raíz principal se realizó a través del programa de análisis de imagen tpsDig2.

#### **4.12.- Estudio del tráfico entre MP y la Vacuola en células epidermales de la raíz de Arabidopsis**

Se determinó la cinética de internalización de membrana entre la MP y la vacuola evaluando la colocalización de un trazador del tráfico endocítico (FM4-64) con un segundo trazador marcando el tonoplasto (FM1-43), a lo largo del tiempo. Se preparó una solución stock del esteril lipofílico FM1-43 (Invitrogen) a una concentración de 20mM utilizando como solvente agua estéril. Por otra parte, se preparó una solución stock de FM4-64 (Invitrogen) a una concentración de 16mM a partir de la cual se generó una solución de 4 $\mu$ M en MCL.

Plántulas de 7 días crecidas en MCS fueron incubadas en una solución de FM1-43 a una concentración de 5 $\mu$ M preparada en MCL por 5 minutos a temperatura ambiente (figura 4A). Luego, las plántulas fueron traspasadas a MCL y se mantuvieron en oscuridad por 4 horas permitiendo que el trazador alcance y se enriquezca en el tonoplasto (figura 4B). Finalizado este tiempo, las plántulas se incubaron en la solución de FM4-64 4 $\mu$ M por 15 minutos, en oscuridad y a 4°C, para permitir la unión de FM4-64 a la MP (figura 4C). Terminado este tiempo las plántulas fueron incubadas en MCL a temperatura ambiente, con objeto de activar la endocitosis y monitorear la internalización de la MP marcada con el trazador. Se consideró este momento como el tiempo cero en la cinética de endocitosis. Se monitoreó la señal de ambas sondas mediante microscopía confocal luego de 1 y 2,5 horas a partir del tiempo establecido como cero (figura 7D). La obtención de imágenes se realizó mediante el microscopio confocal Zeiss LSM 710. Para FM1-43 se utilizó el láser de excitación de 488nm y la

emisión fue recolectada en el rango 533-568nm, mientras que para FM4-64 se excitó con un láser de 543nm y la emisión fue recolectada a 588-696nm. Las observaciones se realizaron utilizando un objetivo 40X de inmersión en aceite. El análisis de colocalización fue desarrollado utilizando el software *ImageJ* a través del plugin "Intensity Correlation Analysis". La región de interés en el análisis de colocalización fue seleccionada a partir de la imagen obtenida con FM1-43.



**Figura 4. Estrategia para analizar cinética de internalización de membrana entre MP y la vacuola.** Plántulas de 7 días post siembra fueron incubadas en MCL suplementado con FM1-43 5 $\mu$ M por 5 minutos a temperatura ambiente, gatillando la unión e internalización del trazador desde la MP (A). Las plántulas fueron, entonces, incubadas en oscuridad por 4 horas, lo que aseguró la acumulación del trazador en la membrana de la vacuola (tonolasto) (B). Tras este periodo las plántulas se sometieron a una segunda incubación en presencia de FM4-64 4 $\mu$ M por 15 min en oscuridad y a 4°C. Este procedimiento aseguró la unión del trazador a la MP de manera de inhibir su internalización (C). Posteriormente, se incubaron las plántulas en MCL a temperatura ambiente. Este punto se consideró el tiempo cero de la cinética. Se evaluó la llegada del trazador FM4-64 a la membrana vacuolar marcada con el trazador FM1-43 tras 1 y 2,5 horas del tiempo de la cinética (D). Verde = FM1-

43, rojo = FM4-64, amarillo = colocalización entre FM1-43 y FM4-64. EE/TGN = Endosomas Tempranos/Red Trans-Golgi, LE/PVC/MVB = Endosoma Tardío/Compartimiento Pre-Vacuolar/Cuerpo Multivesicular, V = Vacuola Central, N = Núcleo y ER = Retículo Endoplasmático.

#### **4.13.- Extracción de RNA de raíces de plántulas de Arabidopsis de 10 días post siembra**

Se utilizaron 20 plantas de 10 días de crecimiento en MCS. Las plantas se congelaron utilizando nitrógeno líquido y se pulverizaron mediante el uso de pistilos en tubos de 1,5mL. Inmediatamente después se realizó la extracción de RNA utilizando el kit InviTrap Spin Plant RNA Mini Kit (Invitex) siguiendo las instrucciones detalladas por el fabricante. Se determinó la concentración de RNA obtenido y la calidad del RNA con base en las razones de la absorbancia 260/280 y 230/280 mediante el uso del espectrofotómetro Nanovue (General Electric).

#### **4.14.- Síntesis de DNA complementario a RNA (cDNA) a partir del RNA extraído de raíces de Arabidopsis de 10 días post siembra**

Se tomaron 3,5µg de RNA y se trataron con DNasa I (DNase I - RNase Free, Thermo Scientific). A cada muestra se agregó 0,5 unidades de DNasa, 1X buffer DNasa I (DNase I - RNase Free, Thermo Scientific) con MgCl<sub>2</sub>, 8 unidades del inhibidor de RNasas Ribolock (Ribolock RNase inhibitor, Thermo Scientific) en un volumen final de 20µL utilizando agua tratada con DEPC. La reacción se incubó a 37°C por 45 minutos. Se inactivó la enzima agregando EDTA a una concentración final de 2,5mM e incubando a 65°C por 10 minutos. Tras esto, se mantuvo la reacción a 4°C. Consecutivamente, se determinó la integridad del RNA, para ello se denaturó RNA incubándolo a 70°C por 15 minutos en una dilución 1X del buffer de carga denaturante

(Winkler). Luego, se realizó una electroforesis (60 minutos, 70mV) en un gel de agarosa 1,5% en buffer MOPS 1X (MOPS 20mM a pH = 7,0, Acetato de Sodio 8mM, EDTA 1mM a pH = 8,0 y formaldehído 2%). Se visualizó el RNA en gel de agarosa a través de un transiluminador de luz ultravioleta, previa tinción con bromuro de etidio (10µg/mL).

Entonces, 1,3µg de RNA tratados con DNAsa I, se usaron para sintetizar cDNA. Se agregó OligoAP a una concentración de 0,5µg/mL en un volumen total de 10µL.

Se incubó la reacción a 70°C por 5 minutos, tras lo cual se mantuvo a 4°C. Luego, se adicionó 1,5 unidades de Transcriptasa Reversa (Improm II Reverse Transcription System, Promega), 8 unidades de inhibidor de RNase (Ribolock RNase inhibitor, Thermo Scientific), Buffer Improm II Reverse Transcription System 1X (Promega), MgCl<sub>2</sub> 6,25mM, dNTP 0,75mM. Se utilizó el siguiente protocolo para la reacción de síntesis de cDNA: 5 minutos a 25°C, 60 minutos a 42°C y 14 minutos a 70°C. Como control negativo de la reacción de transcripción reversa, se realizó todo el procedimiento pero sin agregar la enzima transcriptasa reversa, lo que permite corroborar la ausencia de DNA en la muestra de RNA utilizada para la síntesis de cDNA.

#### **4.15.- Estudio de los niveles de transcritos de los genes que codifican los principales componentes estructurales de la maquinaria de clatrina.**

El análisis de los niveles de transcritos fue desarrollado mediante PCR en tiempo real (RT-qPCR). Para esto se utilizó el kit Brilliant III ultra-Fast qPCR Master Mix (Stratagen) bajo las siguientes consideraciones: 1X de Master Mix, 250nM de partidores 5' y 3', 0,45nM Rox y 0,5µL de cDNA. Se utilizó el siguiente protocolo de

amplificación de los transcritos: 2 segundos a 25°C, 3 minutos a 95°C, seguido de 50 ciclos de 10 segundos a 95°C y 30 segundos a 60°C. Luego se realizó una curva de denaturación desde 60°C a 95°C, precedida de 1 minuto de denaturación a 95°C (MX3000P qPCR System). Las reacciones se realizaron en placas de polipropileno de 96 pocillos (Agilent) tapadas con una lámina selladora (ThermalSeal RT, Sigma-Aldrich). Los partidores utilizados se encuentran descritos en la tabla 1. La cuantificación relativa de los niveles de transcritos fue determinada a través de la ecuación de Pfaffl dependiente del cambio en  $\Delta CT$  y la eficiencia de amplificación de transcritos (Pfaffl, M., 2001). Para ello la eficiencia de amplificación de los transcritos por cada conjunto de primers fue calculada usando el software LinReg (Ramakers y cols., 2003), y el nivel de transcrito menos variable entre los genes housekeeping fue seleccionado entre *ACT2* (AT3G18780), *PP2AC* (AT1G13320) y *UBQ10* (AT4G05320) por medio del software Normfinder (Andersen y cols., 2004) para ser usado en la ecuación de Pfaffl.

**Tabla I. Lista de partidores usados para el análisis de transcrito mediante RT-qPCR los genes que codifican los principales componentes estructurales de la maquinaria de clatrina.**

Nombre	Secuencia	Gen
qCLC1-F*	TCACCTGCCAAAGACGCAAGTGTGA	CLC1
qCLC1-R*	CTCCGCCTTGGTTCCCTCGGCCTCSGT	
qRT_AT2G40060_F	AAGAATGTTCCCGAAACCAAG	CLC2
qRT_AT2G40060_R	TCACACAGATGTAAGCAACGA	
qCLC3-F*	CCACTGATCTGTCTCGTATGCGT	CLC3
qCLC3-R*	CACTCACACTCACATTCGGGTCAG	
qCHC1/2-F*	ACAAAAAGAGGTGAAGGCCAAAGA	CHC1
qCHC1-R*	TTCCTGACATTCCTGGCATTCCA	
qCHC1/2-F*	ACAAAAAGAGGTGAAGGCCAAAGA	CHC2
qCHC2-R*	TGGCATGGGAGGCATTCCTGGCATAACCG	
qRT_AT3G18780_F	GCTTCTCCATTTGTTTGTTCAT	ACTINA2
qRT_AT3G18780_R	GGAATAAAGAGGCATCAATTCGA	
qRT_AT4G05320_F	ACCAGCAGCGTCTCATCTT	UBIQUITINA10
qRT_AT4G05320_R	GCATAACAGAGACGAGATTTAGAA	
qRT_AT1G13320_F	GATACTTTGTCGTGTGTTGTCTT	PP2A
qRT_AT1G13320_R	CAAATACGCCCAACGAACAA	

\*(Wang y cols., 2013)

**4.16.- Análisis de la localización subcelular de la Cadena Pesa de Clatrina (CHC; Clathrin Heavy Chain) mediante InmunoFluorescencia (IF) en la epidermis de la raíz de Arabidopsis.**

#### **4.16.1.- Fijación de tejido**

Plántulas de 7 días post siembra fueron fijadas en una solución de paraformaldehído 4% (PFA; Merck) y Tritón-X100 0,05% v/v preparado en buffer fosfato salino "PBS" 1X (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,8mM, NaCl 0,137M y KCl 2,7mM llevado a pH de 7,4). Las plántulas fueron incubadas por 1 hora a cámara de vacío. Finalizado este periodo, las plántulas fueron lavadas 3 veces, por 5 minutos cada vez, en PBS 1X.

Luego, se realizaron 3 lavados con agua destilada por 5 minutos en cada ocasión. Entonces las plántulas fueron montadas en portaobjetos SuperFrost™ (Thermo Scientific) y se incubaron a temperatura ambiente por un mínimo de 12 horas. Luego de esto, se removió, utilizando un bisturí, el tejido aéreo y una porción de la raíz correspondiente al primer cuarto de raíz desde el hipocotilo. Con esto solo quedó en el portaobjeto el tejido de interés, la raíz, la cual se circunscribió utilizando una matriz hidrofóbica para delimitar el espacio y favorecer el contacto con los anticuerpos.

#### **4.16.2.- Digestión de la pared celular**

El tejido fue tratado con driselasa 2,5% (Sigma) en PBS 1X a 37°C por una hora con objeto de degradar componentes de la pared celular y permitir el posterior ingreso de los anticuerpos a las células. Terminado este periodo, se realizaron dos lavados con PBS 1X Tritón-X100 0,05% v/v por 10 minutos en cada lavado.

#### **4.16.3.- Permeabilización de las membranas celulares**

Inmediatamente después se realizó el proceso de permeabilización de membranas celulares con DMSO 10% (Winkler,), IgePAL 3% (Winkler) en PBS 1X a temperatura ambiente por 1 hora. Finalizado este proceso, se realizaron 2 lavados por un periodo de 10 minutos con PBS 1X Tritón-X100 0,05% v/v.

#### **4.16.4.- Inmunofluorescencia**

El portaobjeto se bloqueó con una solución de BSA 3% en PBS 1X por una hora a temperatura ambiente. Entonces se incubó el tejido en solución BSA 3% PBS 1X con el anticuerpo primario  $\alpha$ -CHC (rabbit; Wang y cols., 2013) en dilución 1:400 por 4 horas. Se realizaron, entonces, 4 lavados por 10 minutos cada uno con solución PBS 1X Tritón-X100 0,05% v/v. Seguido a esto, se incubó en solución BSA 3% en PBS 1X

con el anticuerpo secundario anti-rabbit IgG (H+L) conjugado al fluoróforo Cy3 por 2 horas en solución 1:600.

#### **4.16.5.- Montaje del tejido**

Se utilizó la solución R-Fluor (90% glicerol, 10% PBS 1X y DAPCO (SIGMA) 25 mg/mL, pH 8,5) como solución de montaje del tejido. Las muestras fueron almacenadas a -20°C. EL tejido fue observado por medio del microscopio confocal Zeiss LSM 710. Se utilizó una longitud de onda de excitación de 543nm y la emisión fue recolectada a 588-696nm. Las observaciones se realizaron utilizando un objetivo 40X de inmersión en aceite.

## RESULTADOS

### **5.1.- Sacarosa promueve la internalización de MP en células epidermales de la raíz de Arabidopsis.**

En diversos tipos de células eucariontes la endocitosis participa como mecanismo de toma de nutrientes (Anderson y cols., 1992; Adlassnig y cols., 2012; Leborgne-Castel & Bouhidel, 2014). En plantas se ha sugerido que sacarosa, principal producto de la fotosíntesis, actúa como molécula señalizadora modulando diversos procesos celulares esenciales, incluyendo la endocitosis. Particularmente, se demostró que en cultivos de células vegetales heterotróficas la toma endocítica de diversos solutos y su posterior direccionamiento a la vacuola es inducido por sacarosa (Etxeberria y cols., 2005). Sin embargo, no existen resultados publicados a la fecha que demuestren que estas observaciones son homologables en el contexto de un organismo vegetal completo.

Con objeto de determinar si sacarosa modula la endocitosis en células vegetales dentro del contexto fisiológico de organismo completo y, por tanto, proyectar su uso como modulador endocítico, se estudió la internalización de MP en la raíz de plántulas de Arabidopsis germinadas en un medio de crecimiento libre de sacarosa, donde, por lo tanto, la única fuente de sacarosa proviene de la fotosíntesis, y se comparó con la endocitosis en presencia de sacarosa suplementada en el medio de crecimiento.

Plántulas de 7 días post siembra fueron incubadas a 4°C durante 15 minutos en una solución del trazador endocítico FM4-64 (4µM) preparada en MCL, en ausencia o presencia de sacarosa. La restricción de temperatura asegura la unión del trazador a la MP sin ser internalizado a compartimientos intracelulares (Bolte, S. y cols., 2004). Tras este periodo, con objeto de reestablecer la endocitosis, las plántulas fueron

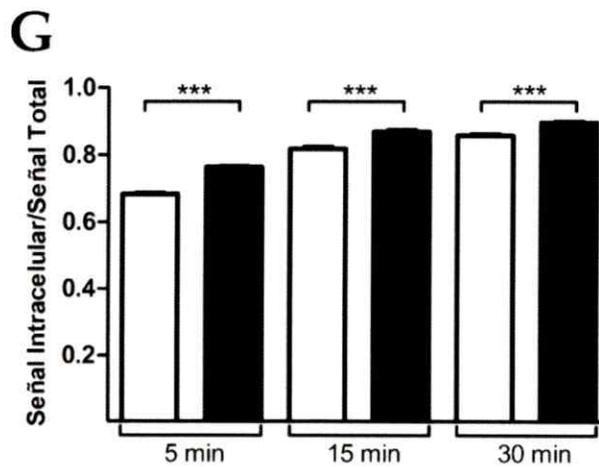
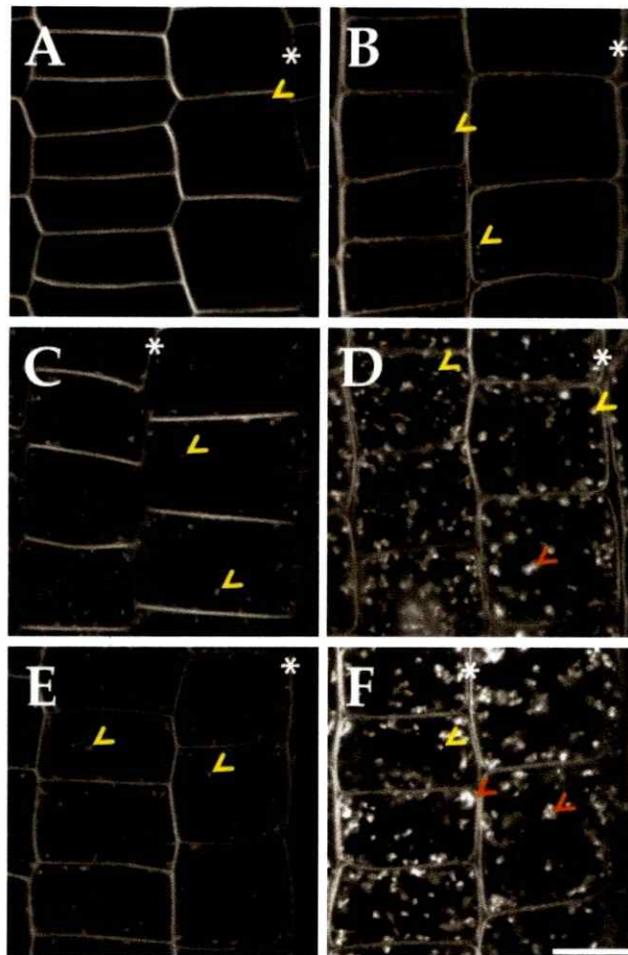
incubadas a temperatura ambiente en MCL. La internalización del trazador fue registrada en células epidermales de la raíz de *Arabidopsis* luego de 5, 15 y 30 minutos, por medio de microscopía confocal.

El trazador FM4-64 unido a la MP es internalizado e incorporado a compartimentos de tipo endosomal (asteriscos blancos y cabezas de flechas amarillas y naranjas, respectivamente en figura 5). Sin embargo, se apreciaron notorias diferencias en el tamaño y número de estos compartimentos intracelulares entre ambas condiciones de disponibilidad de sacarosa. A simple vista, tras 5 minutos, la abundancia de compartimentos endosomales es menor en plántulas germinadas en medio de cultivo sin sacarosa (Figura 5A) respecto a las germinadas en medio suplementado con sacarosa (Figura 5B). Acorde a la progresión en la endocitosis de FM4-64, se observó un mayor número de compartimentos de tipo endosomal en ambas condiciones luego de 15 minutos respecto a 5 minutos (Figura 8C, D). Consistentemente, se observó que las células de plántulas germinadas libre de sacarosa (Figura 5C) presentan un menor número de endosomas respecto a la condición suplementada con sacarosa (Figura 5D). Además, se observó solo en la condición suplementada con sacarosa cuerpos endosomales de mayor tamaño respecto a los observados a 5 minutos (cabezas de flecha naranja en Figura 5D). Estas estructuras han sido descritas como endosomas tardíos (Richter, S. y cols., 2009) lo que concuerda con el avance de membrana marcada con FM4-64 en la ruta endocítica. Finalmente, observamos la internalización de FM4-64 luego de 30 minutos. Coherentemente, el número de compartimentos endosomales aumentó en células de plántulas germinadas en condiciones libre de sacarosa respecto a la observación realizada a 15 minutos (Figura 5E), sin embargo, el número de compartimentos endosomales, fue evidentemente mayor en células epidermales de plántulas germinadas en la condición

suplementada con sacarosa (Figura 5F). Además, se observó un mayor número de endosomas tardíos en esta condición a este tiempo de observación (cabezas de flecha naranja en Figura 5F).

Concordante a estas observaciones, la cuantificación de la toma de FM4-64 en ambas condiciones confirma los resultados mencionados. Es decir, revela que la internalización del trazador fue claramente menor, y estadísticamente diferente, en células epidermales de plántulas germinadas en ausencia de sacarosa respecto a la condición suplementada con sacarosa en cada uno de los tiempos monitoreados (Figura 5G).

Estos resultados confirman que la presencia de sacarosa en el medio de crecimiento promueve la internalización del trazador FM4-64 en células epidermales de la raíz de plántulas de Arabidopsis.



**Figura 5.** La presencia de sacarosa en el medio de cultivo estimula la internalización del trazador endocítico FM4-64. Análisis de la internalización del trazador FM4-64 en células de la epidermis de la raíz de plántulas silvestres (Col-0)

de 7 días post siembra germinadas en ausencia o presencia de sacarosa. Los asteriscos blancos, cabezas de flechas amarillas y cabezas de flechas naranjas indican la MP, endosomas tempranos y tardíos, respectivamente. En ausencia de sacarosa, luego de 5 minutos de internalización, el trazador se observó en la MP y, con muy baja frecuencia, en endosomas tempranos (A). Mientras que en presencia de sacarosa el trazador alcanzó la MP y múltiples endosomas tempranos (B). Por otro lado, en ausencia de sacarosa, tras 15 minutos de internalización, el número de endosomas tempranos revelados por el trazador aumentó respecto a 5 minutos (C). Coherentemente, tras 15 minutos el número de endosomas observados en presencia de sacarosa fue mayor en comparación a 5 minutos de internalización y se observaron, además, endosomas tardíos (D). Finalmente, bajo 30 minutos de internalización en ausencia de sacarosa se observaron múltiples endosomas tempranos, pero no se observaron tardíos (E). En contraste, se observaron múltiples endosomas tempranos y tardíos en presencia de sacarosa (F). La cuantificación de la internalización de FM4-64 es congruente a las observaciones descritas. Se observó que a 5, 15 y 30 minutos la internalización del trazador es significativamente menor en ausencia, respecto a la presencia de sacarosa (G). Por lo tanto, sacarosa promueve la endocitosis en la epidermis de la raíz de Arabidopsis. La barra de tamaño es equivalente para todas las imágenes y representa 10µm. Los datos corresponden a tres réplicas experimentales independientes, con un número superior a 200 células totales por cada tiempo analizado. Estudio estadístico realizado mediante análisis t-student: \*=p<0.05; \*\*=p<0.01; \*\*\*=p<0.001.

## **5.2.- Sacarosa impacta el proceso de configuración vacuolar en la raíz de Arabidopsis.**

A lo largo de la raíz de Arabidopsis se han definido tres zonas con base en las diferencias observadas en el crecimiento celular. La primera de estas zonas, el meristema, se extiende por aproximadamente 500µm desde el centro quiescente en la punta de la raíz (identificado como QC en Figura 6A). La segunda, la zona de elongación, se extiende entre los 500 y los 1000µm desde el centro quiescente. La tasa de crecimiento celular es menor en el meristema respecto a la zona de elongación. Distal a la zona de elongación se extiende la zona de diferenciación donde el crecimiento celular es marginal, las células han alcanzado su tamaño definitivo y en algunas capas celulares se desarrollan estructuras celulares

especializadas denominadas pelos radicales (asterisco verde en Figura 6A) (van der Weele y cols., 2003; Verbelen y cols., 2006).

El proceso de configuración vacuolar puede ser recapitado observando la morfología de la vacuola en las distintas zonas de crecimiento celular a lo largo de la raíz de *Arabidopsis* (Viotti y cols., 2013; Krüger & Schumacher, 2017). Con el objetivo de estudiar el proceso de configuración vacuolar se visualizó la estructura de la vacuola en raíces de plántulas que fueron germinadas en medio libre de sacarosa o en medio suplementado con sacarosa. Se observó la morfología de la vacuola para el estudio de la configuración vacuolar de acuerdo a lo descrito en la sección 4.7.

En la epidermis de *Arabidopsis* encontramos dos tipos celulares morfológicamente distintos que se distribuyen en columnas longitudinales contiguas, los tricoblastos y los atricoblastos. Los tricoblastos se observan en el meristema y la zona de elongación como células más anchas que largas, mientras que los atricoblastos, se observan como células más largas que anchas. Además, y como característica definitoria, en la zona de diferenciación sólo los tricoblastos darán origen a un pelo radicular (Berger y cols., 1998).

En atricoblastos del meristema de plántulas crecidas en ausencia de sacarosa la membrana de la vacuola se observó como una gran estructura luminal central, acompañada en algunos casos por estructuras luminales ovoides de menor tamaño ubicadas periféricamente (asteriscos amarillos para ambas estructuras en Figura 6B). En tricoblastos, homológamente, el tonoplasto configuró una estructura luminal central la que se observó deformada en ciertas regiones dando lugar a lóbulos, además, presentó en algunas células estructuras luminales ovoides periféricas de menor tamaño al igual que en el caso del Atricoblasto (Figura 6B).

En contraste, en atricoblastos del meristema de plántulas crecidas en medio suplementado con sacarosa la membrana vacuolar se observó como una estructura altamente plegada, la cual configuró de una a tres estructuras de mayor tamaño las cuales poseen una forma lobular (asteriscos amarillos en Figura 6C). Mientras que en tricoblastos el tonoplasto se presentó como una red membranosa compuesta principalmente de pequeñas estructuras luminales reminiscentes a anillos y, además, estructuras tubulares (cabezas de flechas amarillas y azules, respectivamente, en panel Tricoblasto Figura 6C).

En la zona de elongación, el tonoplasto de atricoblastos y tricoblastos de plántulas germinadas en medio libre de sacarosa configuró una gran y predominante estructura luminal, la que es acompañada por estructuras luminales pequeñas ubicadas periféricamente (asteriscos amarillo, Figura 6D). Mientras que en plántulas germinadas en medio suplementado con sacarosa se observó que la membrana vacuolar del atricoblasto presenta una o dos estructuras luminales prominentes multilobuladas acompañadas de un número variable de otras estructuras ovoides más pequeñas (asteriscos amarillos en panel Atricoblasto Figura 6D). En el caso del tricoblasto se observó membrana formando estructuras luminales de forma ovoide, sin una posición característica dentro del plano celular, acompañada de cuerpos tubulares con un lumen mayor al observado en tricoblastos en células del meristema (asteriscos amarillos y cabezas de flecha azul, respectivamente en Figura 6D). Además, se observaron estructuras luminales de tipo anillo como las encontradas en el meristema en este mismo tipo celular (cabeza de flecha amarilla en Figura 6D).

Finalmente, observamos vacuolas en la zona de diferenciación, particularmente en la región inmediatamente distal a la zona de elongación. Encontramos que las células epidermales, tanto de atricoblastos como tricoblastos, de plántulas germinadas en

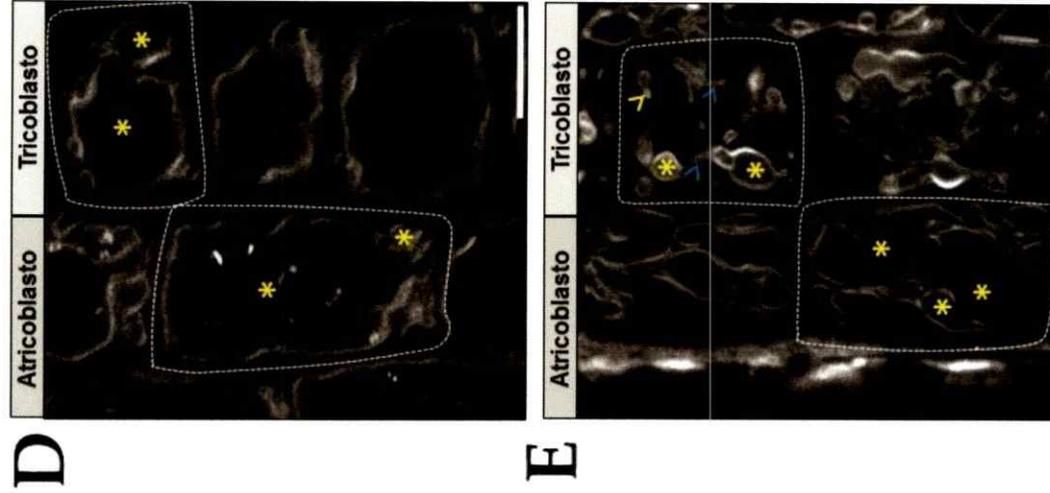
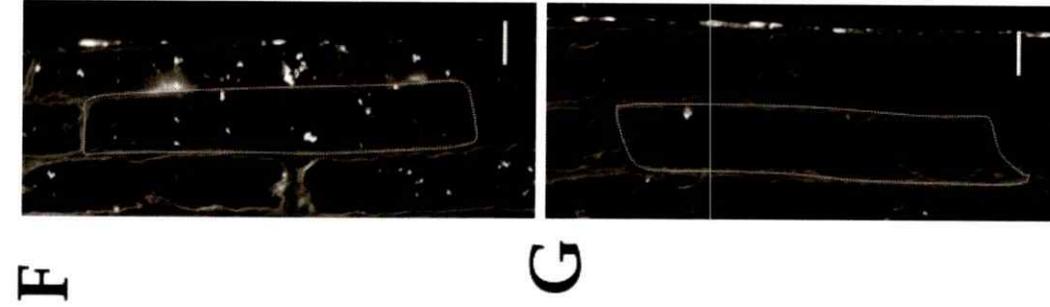
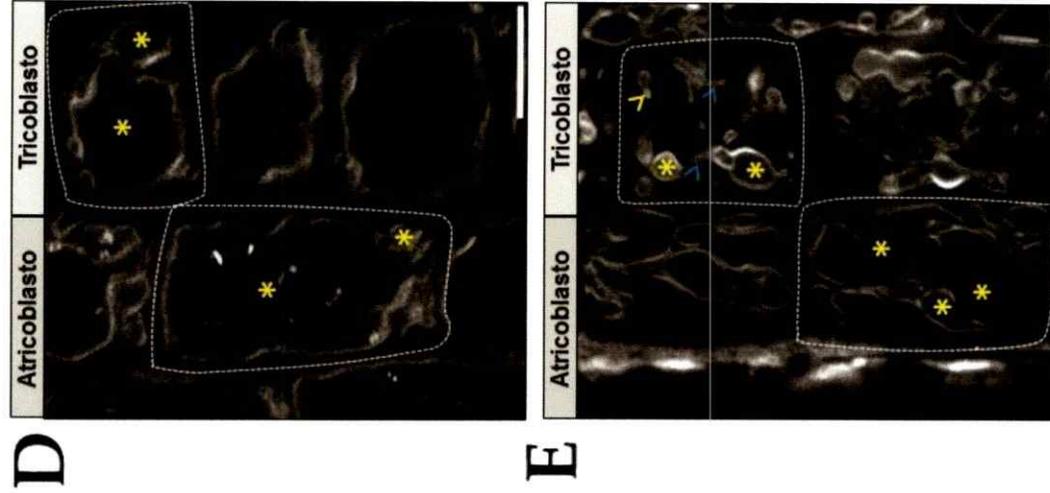
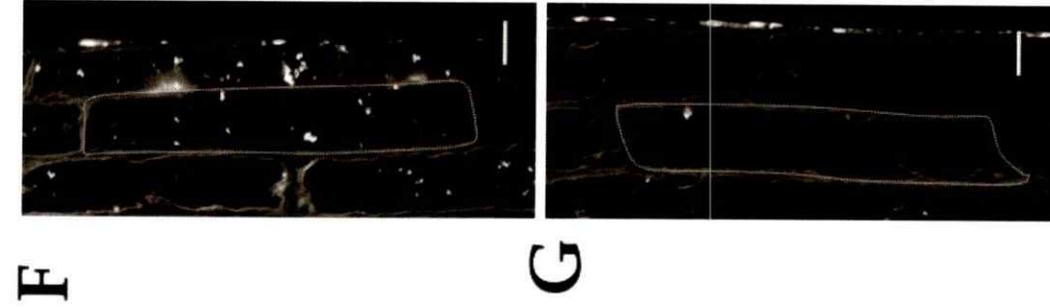
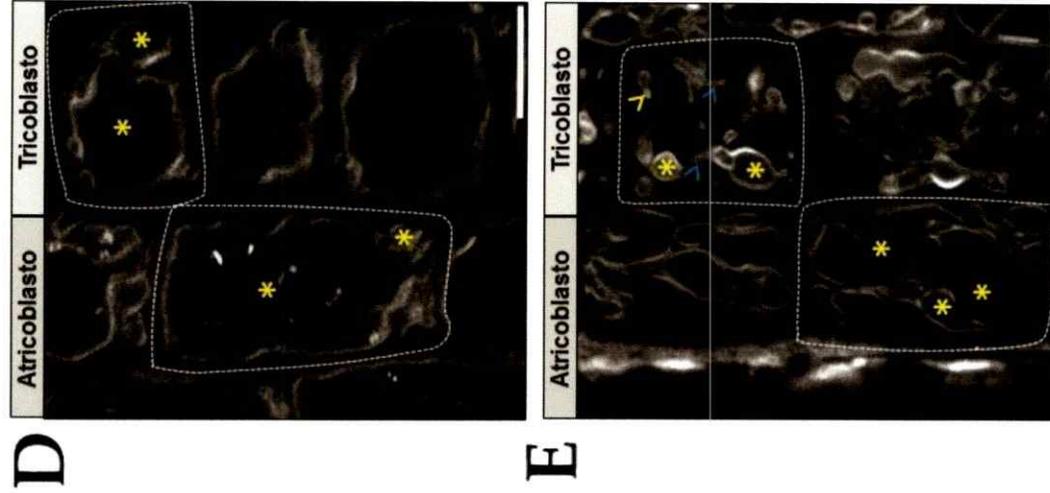
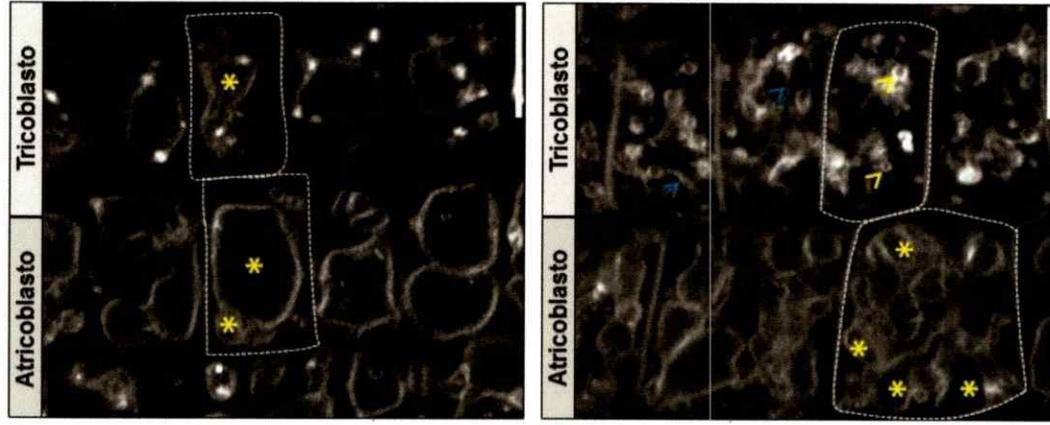
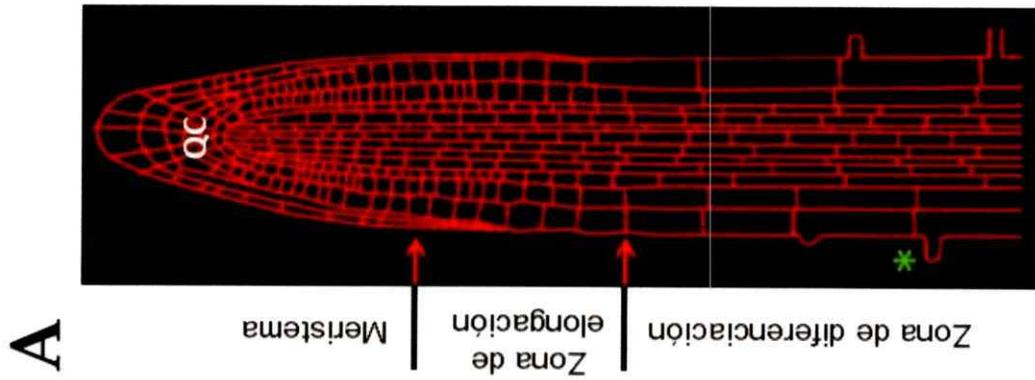
ausencia o en presencia de sacarosa presentaron una Vacuola Central totalmente configurada. Se observó que el tonoplasto abarca completamente el volumen de la célula en el plano óptico observado (Figura 6F y 6G). Un resumen de estas observaciones es presentado en la Tabla II.

**Tabla II. Configuración vacuolar en presencia y ausencia de sacarosa.** Son presentadas las principales características morfológicas de la vacuola observadas en atricoblastos y tricoblastos en las diferentes zonas de crecimiento celular en la raíz de Arabidopsis.

		Col-0 (2% sacarosa)	Col-0 (0% sacarosa)
MERISTEMA	Atri	Estructura multilobulada.	Estructura luminal central poco lobulada.  Estructuras luminales ovoides.
	Tri	Red tubular. Estructuras luminales de tipo anillo.	
ZONA DE ELONGACIÓN	Atri	Estructura multilobulada. Estructuras ovoides pequeñas.	Estructura luminal central, poco o nulamente lobulada.  Estructuras luminales ovoides ubicadas periféricamente.
	Tri	Red tubular. Estructuras luminales ovoides y de tipo anillo.	
ZONA DE DIFERENCIACIÓN	Atri	Vacuola Central configurada	Vacuola Central configurada
	Tri		

En conjunto, estas observaciones nos sugieren que las células epidermales de plántulas que crecen en medio suplementado con sacarosa presentan una mayor cantidad de membrana vacuolar en el meristema y la zona de elongación durante el proceso de configuración vacuolar respecto de las que lo hacen en ausencia de sacarosa. Una compleja red de membrana, o la presencia de estructuras complejas de membrana, formadas en continuidad con el tonoplasto, han sido sugeridas como

reservorios de membrana que permiten soportar una rápida configuración de la Vacuola Central, y por tanto, del crecimiento celular (Saito y cols., 2002). Considerando este contexto, nos preguntamos si nuestras observaciones correlacionan con el crecimiento celular en nuestro modelo de estudio, la epidermis de Arabidopsis, y en consecuencia modulan el crecimiento longitudinal de la raíz.



**Figura 6. Sacarosa impacta etapas tempranas del proceso de configuración vacuolar a lo largo del eje de crecimiento de la raíz.** El proceso de configuración vacuolar fue analizado observando la morfología de la vacuola marcada por el trazador FM4-64 en las tres zonas de crecimiento celular de la epidermis: meristema, zona de elongación y diferenciación (A). Se observan células de la epidermis de la raíz de plántulas silvestres (Col-0) de 7 días post siembra, germinadas en ausencia (B, D, F) o presencia de sacarosa (C, E, G). Asteriscos amarillos y cabezas de flecha azules indican estructuras luminales y estructuras tubulares, respectivamente. En ausencia de sacarosa una a dos estructuras luminales se observaron en atrico y tricoblastos de la epidermis (B). En contraste, en presencia de sacarosa, se observó en atricoblastos una estructura altamente plegada que define múltiples estructuras luminales de morfología lobular, mientras que los tricoblastos presentaron pequeñas estructuras luminales de tipo anillo acompañadas de una red tubular (C). En la zona de diferenciación, en ausencia de sacarosa, atrico y tricoblastos presentan estructuras luminales centrales de mayor tamaño a las presentes en el meristema (D). En presencia de sacarosa, en atricoblastos se observó una estructura central multilobulada, mientras que en tricoblastos se observaron estructuras luminales de mayor diámetro a las observadas en el meristema acompañadas de estructuras tubulares (E). En la zona de diferenciación se observó una Vacuola Central completamente configurada en ambas condiciones (F, G). Por lo tanto, sacarosa impacta solo las etapas tempranas de la configuración vacuolar. Las barras de tamaño representan 10µm en todos los casos. Los datos son representativos a tres réplicas experimentales independientes. QC = Centro Quiescente. Asterisco verde indica un pelo radicular.

### **5.3.- Sacarosa impacta el crecimiento celular y el crecimiento de la raíz principal en Arabidopsis.**

Con objeto de evaluar cambios en la elongación de células de la epidermis de la raíz de Arabidopsis por la presencia de sacarosa, se obtuvo la razón del largo celular sobre el ancho celular en tricoblastos y atricoblastos a lo largo de los primeros 150µm de la raíz de Arabidopsis. Los límites intercelulares fueron identificados marcando la MP con FM4-64 como se describe en la sección 4.9.

Se observó que la razón largo-ancho de las células es significativamente mayor en atricoblastos respecto a tricoblastos en ambas condiciones en estudio (Figura 7A). Este resultado es coherente a la rápida elongación del atricoblasto respecto al tricoblasto previamente reportada (Dolan y cols., 1993; Löffke y cols., 2013). Sin embargo, la razón celular largo-ancho en trico y atricoblastos de plántulas crecidas

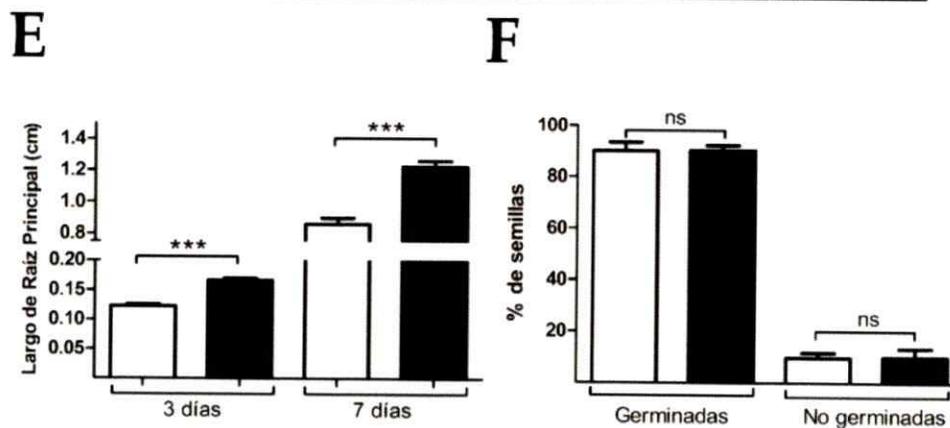
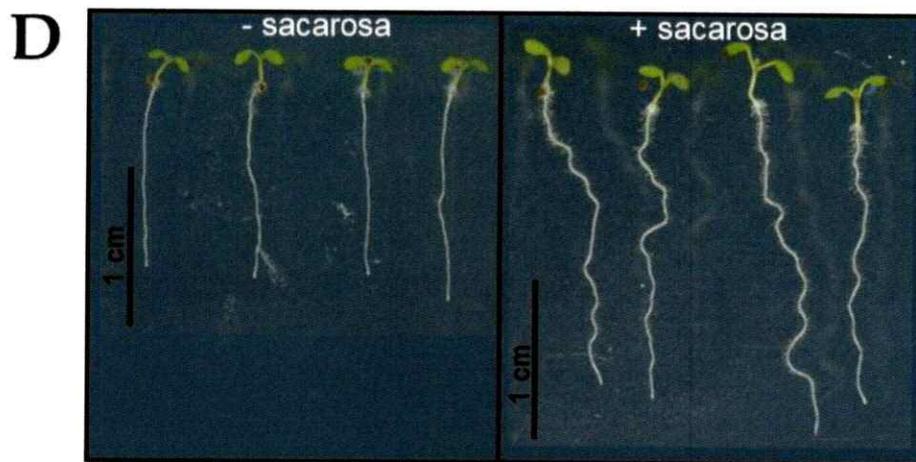
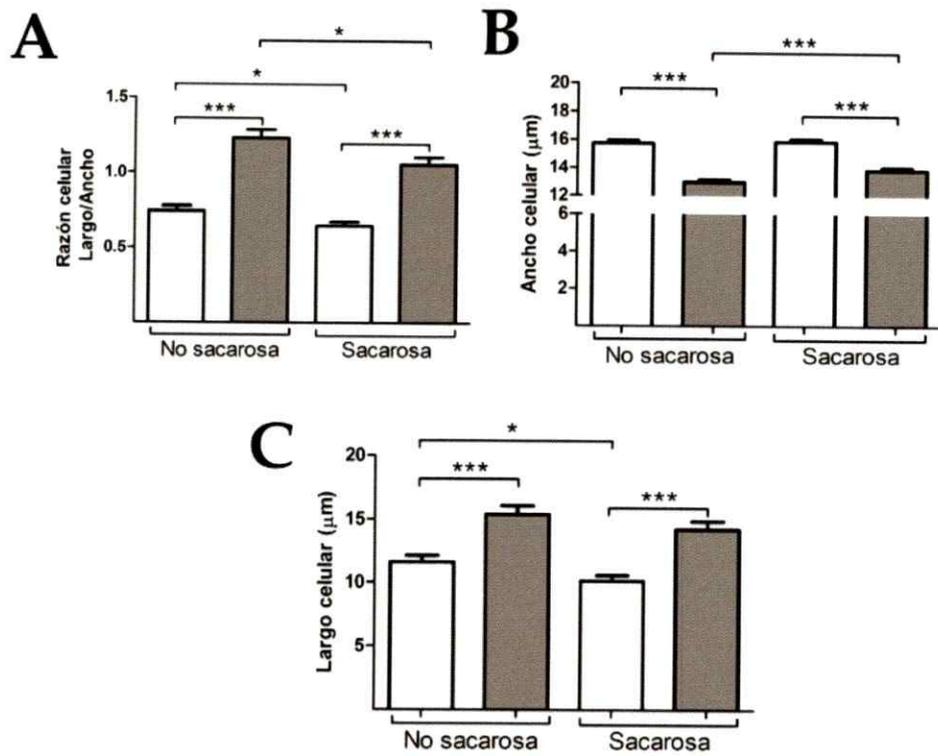
en medio libre de sacarosa es significativamente mayor a la encontrada en plántulas crecidas en medio suplementado con sacarosa (Figura 7A). Estos resultados sugieren una aceleración en el crecimiento celular en plántulas germinadas en medio libre de sacarosa.

Para profundizar en esta observación estudiamos el ancho y el largo celular como parámetros independientes en tricoblastos y atricoblastos. Dentro de cada una de las condiciones en estudio el ancho celular es mayor en tricoblastos en comparación a atricoblastos (Figura 7B). Luego, al contrastar la condición libre y suplementada de sacarosa se observó que no existen diferencias significativas entre el ancho de tricoblastos. Sin embargo, el ancho de atricoblastos de plántulas crecidas bajo suplementación de sacarosa es mayor al de plántulas que crecieron en un medio libre de sacarosa (Figura 7B). Por otro lado, se observó que el largo celular del atricoblasto fue mayor que el largo del tricoblasto en cada una de las condiciones en estudio (Figura 7C). Se observó, además, que el largo de tricoblastos en condiciones libre de sacarosa es mayor que en condiciones suplementadas de sacarosa (Figura 7C).

Es importante destacar, que el crecimiento de ambos tipos celulares propios de la epidermis incluye elongación vertical (largo celular) y elongación horizontal (ancho celular), en donde trico y atricoblastos deben alcanzar un ancho y un largo definitivo como célula diferenciada (Löfke y cols., 2013). Los resultados sugieren que existe una inhibición o retraso del crecimiento horizontal en atricoblastos de plántulas germinadas en ausencia de sacarosa respecto a la condición suplementada de sacarosa, que en consecuencia impacta en una mayor razón celular largo-ancho en este tipo celular.

El índice de crecimiento celular podría traducirse en un mayor crecimiento de la raíz principal en plántulas de *Arabidopsis* germinadas en medio libre de sacarosa. En contraste, al evaluar el crecimiento de la raíz principal encontramos que las raíces de plántulas en medio libre de sacarosa son más cortas que las de plántulas germinadas en medio suplementado con sacarosa (Figura 7D). Esta diferencia se evidencia en tiempos tan tempranos como 3 días post siembra (Figura 7E). Este resultado sugiere una cinética de crecimiento de la raíz principal menor en ausencia de sacarosa respecto a la presencia de sacarosa. En contra parte, esta observación puede tener lugar como resultado de un demora en la germinación de las semillas en ausencia de sacarosa, en consecuencia, retrasando el crecimiento de la raíz principal en comparación a las plántulas crecidas en medio suplementado con sacarosa. Por tanto, se evaluó la germinación de una población de semillas y se observó que bajo ambas condiciones de sacarosa, la protrusión de la radícula ocurre en niveles equivalente equivalentes (Figura 7F). Con esto descartamos la diferencia observada en el largo de raíz principal como una alteración en la germinación de la semilla entre la condición libre y suplementada de sacarosa.

El mayor crecimiento de la raíz principal en la presencia de sacarosa contrasta con la menor razón celular largo-ancho encontrada en tricoblastos y atricoblastos en presencia de este metabolito. Sin embargo, ambos resultados son coherentes bajo el supuesto de una aceleración en la cinética de crecimiento celular en presencia de sacarosa. Esta idea es afín a nuestras observaciones a nivel de morfología vacuolar, pues una alta complejidad de la membrana de la Vacuola, como la encontrada en presencia de sacarosa, ha sido indicada como membrana de reserva para sostener un rápido crecimiento celular (Saito y cols., 2002).



**Figura 7. Sacarosa actúa como regulador positivo del crecimiento en la raíz principal de Arabidopsis.** Plántulas silvestres de Arabidopsis (Col-0) de 7 días post siembra, germinadas en ausencia o en presencia de sacarosa, fueron utilizadas para el estudio del crecimiento celular a lo largo de los primeros 150µm de la raíz, además del crecimiento de la raíz principal. En **A**, **B** y **C** las columnas blancas y grises representan tricoblastos y atricoblastos, respectivamente. En **E** y **F** columnas blancas y negras indican ausencia y presencia de sacarosa, respectivamente. En ausencia de sacarosa el índice de crecimiento celular “razón largo-ancho” es mayor tanto en tricoblastos como en atricoblastos respecto a la presencia de sacarosa (**A**). En ausencia de sacarosa el ancho celular de atricoblastos es menor que en presencia de sacarosa (**B**). Por otro lado, en ausencia de sacarosa tricoblastos presentan un mayor largo celular en comparación a la presencia de sacarosa (**C**). Plántulas germinadas en ausencia de sacarosa poseen un largo de raíz principal menor respecto a aquellas germinadas en presencia de sacarosa (**D**, **F**). Se observó que tanto en ausencia como en presencia de sacarosa la tasa de germinación es equivalente (**E**) por lo que el menor crecimiento observado en **D** no se relaciona con un defecto en la germinación. Las diferencias registradas a nivel de crecimiento celular en conjunto al crecimiento de la raíz principal de Arabidopsis sugieren que sacarosa promueve el la cinética de crecimiento celular. Los datos corresponden a tres réplicas experimentales independientes. Estudio estadístico realizado mediante análisis t-student: \*=p<0.05; \*\*=p<0.01; \*\*\*=p<0.001; ns = no significativo.

#### **5.4.- Sacarosa incrementa los niveles de CLC2-GFP en compartimentos intracelulares y en la MP.**

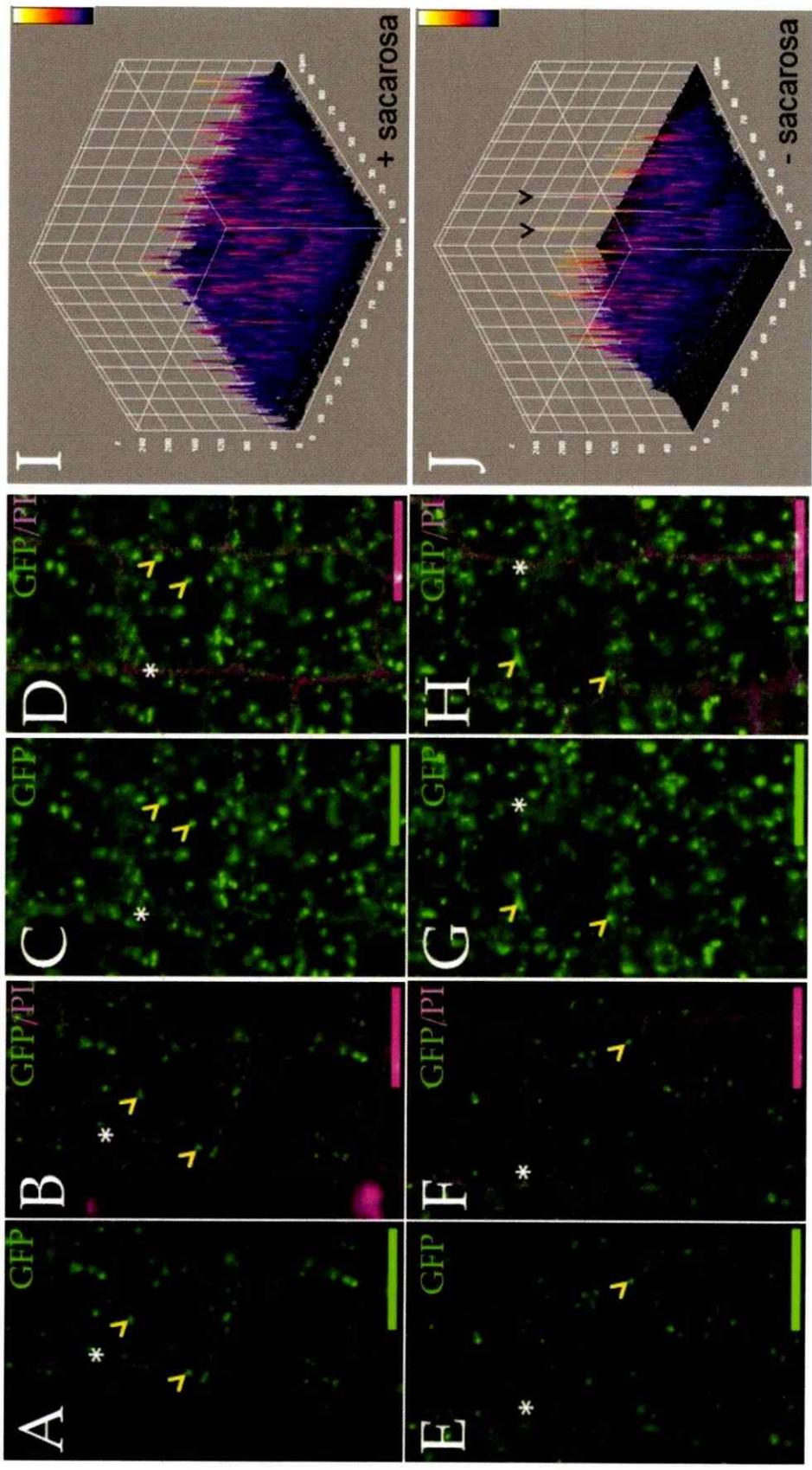
Nuestros resultados revelan que sacarosa promueve la internalización de MP en células de la epidermis de la raíz de Arabidopsis. Nos preguntamos, con base en esta observación, si la aceleración de la endocitosis es consecuencia de un incremento en la Endocitosis Mediada por Clatrina (EMC) una de las principales vías para la toma de componentes de MP y extracelulares en plantas (Chen y cols., 2011).

El genoma de Arabidopsis codifica tres subunidades de la cadena liviana de clatrina (CLC): *CLC1* (At2G20760), *CLC2* (At2G40060) y *CLC3* (At3G51890) (Fan y cols., 2015). Se ha sugerido que la función de *CLC1* y *CLC2* es más relevante en la fisiología de la planta dado sus altos niveles de expresión en diferentes tejidos respecto de los de *CLC3* (Paul & Frigerio, 2007). Considerando estos antecedentes

nos focalizamos en el estudio de la acumulación de la proteína CLC2 en células epidermales de raíces de *Arabidopsis* en condiciones libre y suplementada con sacarosa, utilizando para ello la línea reportera de *Arabidopsis* que acumula la proteína de fusión CLC2-GFP comandada por el promotor endógeno de *CLC2* (Wang y cols., 2013).

La proteína clatrina y con ello las cubiertas de clatrina se pueden detectar en la MP y en compartimientos intracelulares de células vegetales. Nuestras observaciones indican que CLC2-GFP se distribuye mayoritariamente en compartimientos de tipo endosomal y a lo largo de la MP de células epidermales de plántulas germinadas en ambas condiciones de sacarosa (Figura 8A-H). Se observó que tanto atricoblastos como tricoblastos de plántulas germinadas en condiciones libre de sacarosa presentan una menor intensidad de fluorescencia CLC2-GFP en comparación a los de plántulas germinadas en presencia de sacarosa (Figura 8A-H). Por tanto, sacarosa promueve la expresión de CLC2-GFP en los dos tipos celulares propios de la epidermis de la raíz de *Arabidopsis*. En consideración a esta observación nuestros análisis abarcan en adelante ambos tipos celulares epidermales de forma conjunta. Subsecuentemente, obtuvimos perfiles de intensidad de la señal GFP obtenida (Figura 8I, J). Estos resultados sugirieron que en ausencia de sacarosa existen una mayor frecuencia de máximos de intensidad que en presencia de sacarosa (cabezas de flecha negra en Figura 8J) y, por tanto, mayores niveles de CLC2-GFP en esos puntos.

Con objeto de comprender si la ausencia/presencia de sacarosa modifica la distribución de CLC2-GFP intracelular, cuantificamos diferencialmente la señal CLC2-GFP en la MP y en compartimientos de tipo endosomal en condiciones libre y suplementada con sacarosa.



**Figura 8. Sacarosa incrementa los niveles de CLC2-GFP en atricoblastos y tricoblastos de la epidermis de la raíz de Arabidosis.** La localización y abundancia de la proteína CLC2 fue evaluada en plántulas de 7 días post siembra de la línea reportera CLC2-GFP crecidas en ausencia o en presencia de sacarosa. Asteriscos blancos y cabezas de flecha amarillas indican Membrana Plasmática (MP) y estructuras de tipo endosomal, respectivamente. Ioduro de Propio (PI) fue utilizado para establecer los límites intercelulares. En ausencia (A, B, E, F) y en presencia de sacarosa (C, D; G, H) CLC2-GFP se localizó en la MP y en estructuras endosomales de atricoblastos (A, B, E, F) y en tricoblastos (E, F, G, H). Sin embargo, se observó un mayor número de compartimentos de tipo endosomal y, concordantemente, una mayor señal GFP intracelular en presencia de sacarosa en ambos tipos de células (C, D; G, H). Esto se corroboró en el perfil de intensidad de señal CLC2-GFP. En presencia de sacarosa los endosomas presentan una intensidad homogénea (I). Sin embargo, en ausencia de sacarosa, la distribución es poco homogénea, encontrándose compartimentos endosomales con máximos de intensidad CLC2-GFP (cabezas de flechas negras, J). Los datos corresponden a tres réplicas experimentales independientes. La barra de tamaño indica en todos los casos 10µm.

La señal CLC2-GFP asociada exclusivamente a la MP fue delimitada a través de la colocalización con el trazador FM4-64 de acuerdo a lo descrito en la sección 4.9. Coherente a lo observado en la figura 8, se observó que plántulas germinadas en medio suplementado con sacarosa presentan un mayor nivel de acumulación de CLC2-GFP en comparación a lo observado en ausencia de sacarosa tanto en células del meristema (Figura 9A-B respecto a 9C-D) y de la zona de elongación (Figura 9E-F en comparación a 9G-H). Particularmente, las estructuras de tipo endosomal son más numerosas y de mayor tamaño en presencia de sacarosa (cabezas de flecha amarillas en Figura 9A-H y 9P). Llamativamente, la señal de CLC2-GFP en la MP de plántulas crecidas en ausencia de sacarosa es mayor a las de aquellas germinadas en presencia de sacarosa (Figura 9Q). En conjunto, este resultado sugiere que el tiempo de vida media de CLC2-GFP en la MP en ausencia de sacarosa es mayor respecto a la presencia de sacarosa.

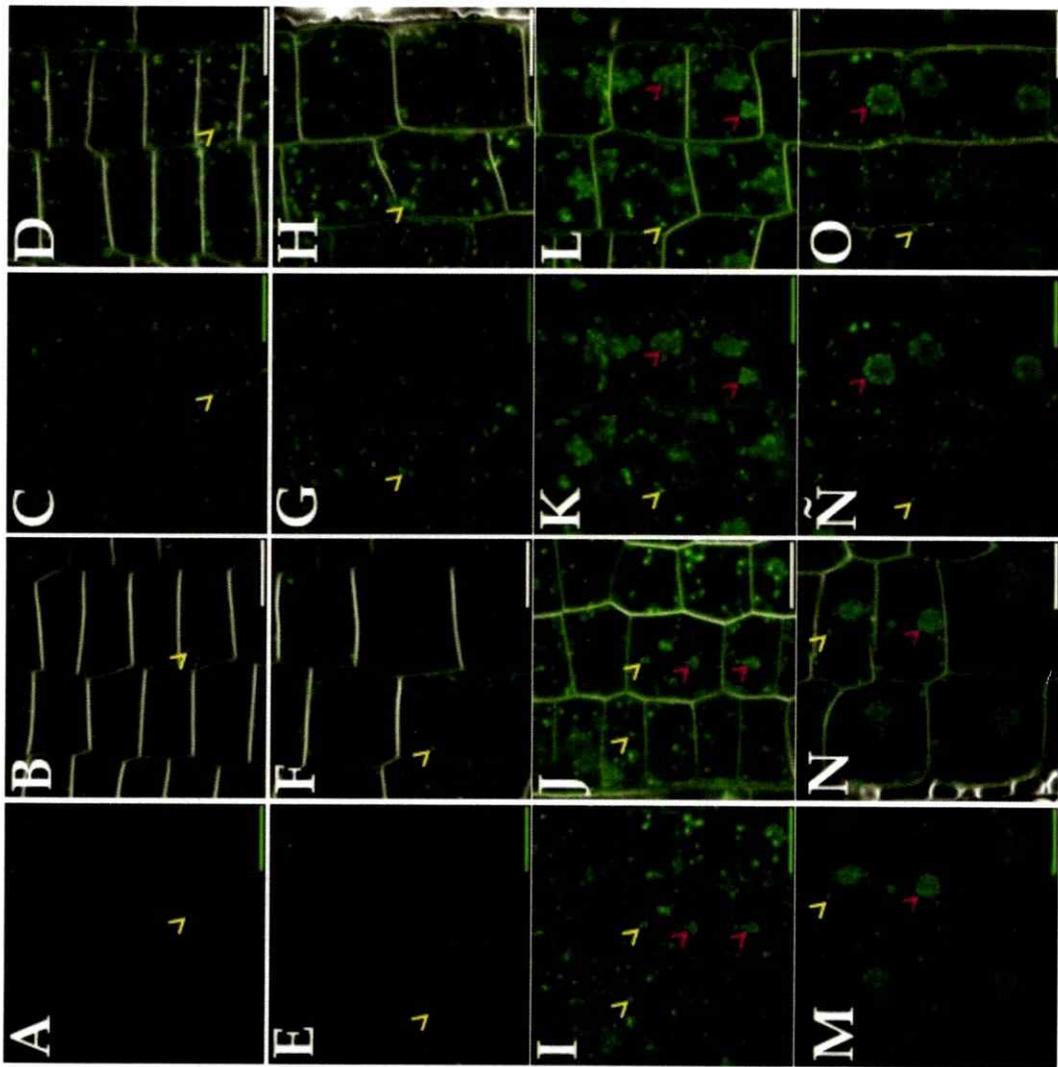
Con objeto de focalizar la cuantificación de CLC2 en compartimentos endosomales se utilizó la droga Brefeldina A (BFA) que gatilla la aglomeración de diversos tipos de

endosomas, incluyendo al TGN y MVB en los que se acumula CLC2 (Ito y cols., 2012), en un gran compartimiento denominado cuerpo de BFA (Jaillais y cols., 2008; Pedrazzini y cols., 2013). Debido a que los endosomas en los que localiza CLC2-GFP quedan agrupados en el cuerpo de BFA, esta droga nos permite concentrar la población intracelular de CLC2-GFP en un solo punto, aproximando la abundancia de esta proteína de fusión en endosomas en base al tamaño y número de cuerpos de BFA GFP positivos en cada célula.

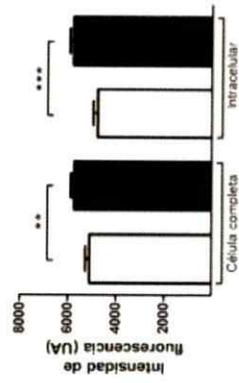
Entonces, plántulas de 7 días post siembra expresando CLC2-GFP crecidas en medio libre y suplementado con sacarosa fueron tratadas con BFA. Posteriormente, se incubaron con el trazador FM4-64 para delimitar la MP y establecer los límites intercelulares. Tras el tratamiento con la droga se observó que en ambas condiciones la señal CLC2-GFP se concentró en compartimientos de tamaño significativamente mayor al de un endosoma, morfológicamente equivalentes a cuerpos de BFA (Figura 9I-O). Se observó, además, que los cuerpos de BFA en plántulas germinadas en ausencia de sacarosa presentan un menor tamaño y número respecto a la condición suplementada con sacarosa (Figura 9R y 9S). Esta diferencia se evidenció fuertemente en células en la zona temprana del meristema (aproximadamente  $30\mu\text{m}$  desde el QC; Figura 6A) donde en ausencia de sacarosa se observaron múltiples y pequeños cuerpos de tipo BFA (Figura 9I y 9J). Estas estructuras gatilladas por la droga presentaron un mayor tamaño a los endosomas observados en condiciones control, aproximadamente  $1\text{-}2\mu\text{m}$  versus  $3\text{-}4\mu\text{m}$  de diámetro, en promedio (Figura 9A, B, E y F respecto a 9I, J, M y N). En la misma región de la epidermis en presencia de sacarosa se distinguió uno o dos cuerpos de BFA concentrando la mayor parte de las señal CLC2-GFP (Figura 9K y 9L). Además, se observó que en células ingresando en la zona de elongación en ausencia de sacarosa el cuerpo de BFA presenta una

morfología y tamaño equivalente al registrado en presencia de sacarosa (Figura 9M-O).

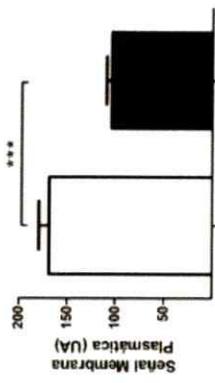
En conjunto, nuestras observaciones establecen que CLC2-GFP es más abundante en la epidermis de la raíz de *Arabidopsis* en presencia de sacarosa, concentrando las mayores diferencias en la zona del meristema. Además, sacarosa modula la distribución intracelular de CLC2-GFP disminuyendo su abundancia en la MP.



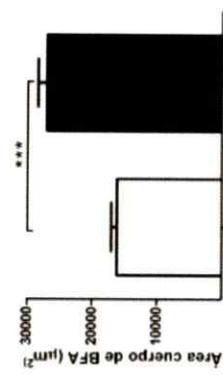
**P**



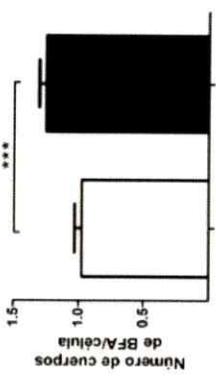
**Q**



**R**



**S**



**Figura 9. Sacarosa modula los niveles y distribución de CLC2-GFP en células de la epidermis de la raíz.** El trazador FM4-64 se utilizó para delimitar y distinguir la señal CLC2-GFP en la Membrana Plasmática (MP) respecto a compartimientos intracelulares. Se utilizó la droga Brefeldina A (BFA) para concentrar la señal total CLC2-GFP en endosomas. Cabezas de flechas amarillas y magentas indican estructuras de tipo endosomal y cuerpos de BFA. Columnas blancas y negras indican ausencia y presencia de sacarosa, respectivamente. En ausencia de sacarosa la señal intracelular es menor que en presencia de sacarosa (A-H, P). Sin embargo, en ausencia de sacarosa la señal CLC2-GFP en MP es mayor que en presencia de sacarosa (Q). Por otro lado, plántulas crecidas en ausencia de sacarosa presentaron cuerpos de BFA de menor tamaño (I-J) a los observados en presencia de sacarosa en el meristema (K-L). Al entrar en la zona de elongación, el tamaño de los cuerpos de BFA se homogeniza entre ambas condiciones de sacarosa (M-N y Ñ-O, respectivamente). A lo largo de la totalidad de la epidermis, los cuerpos de BFA son menor en tamaño y número en ausencia respecto a la presencia de sacarosa (R y S). En conjunto, las observaciones indican que sacarosa induce los niveles de CLC2-GFP en células de la epidermis, y además modula su distribución subcelular. La barra de tamaño indica en todos los casos 10µm. Los datos corresponden a tres réplicas experimentales independientes. Estudio estadístico realizado mediante análisis t-student: \*=p<0.05; \*\*=p<0.01; \*\*\*=p<0.001.

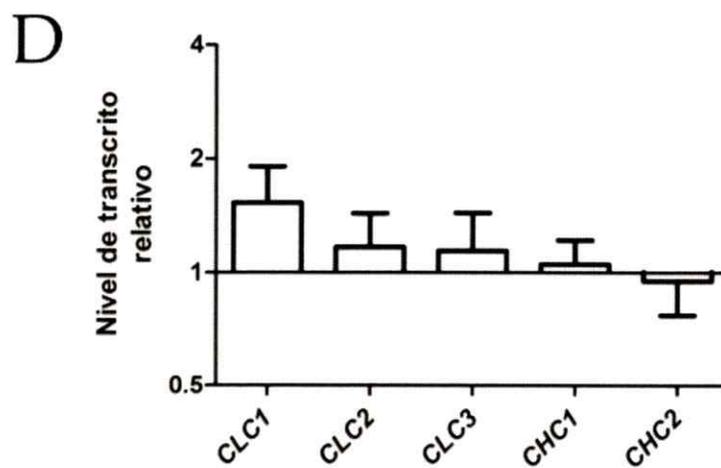
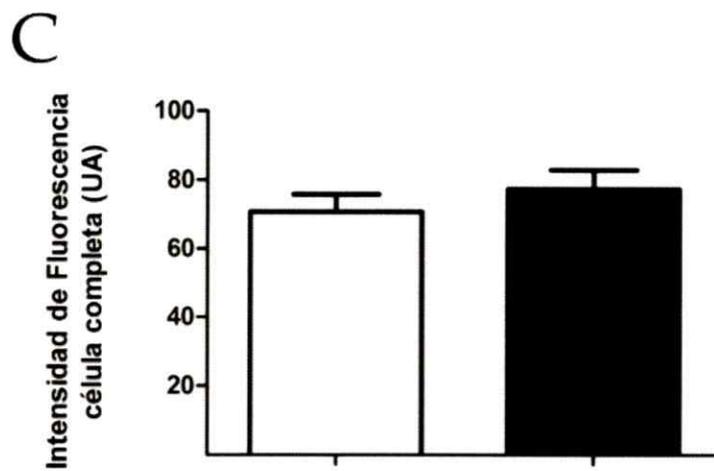
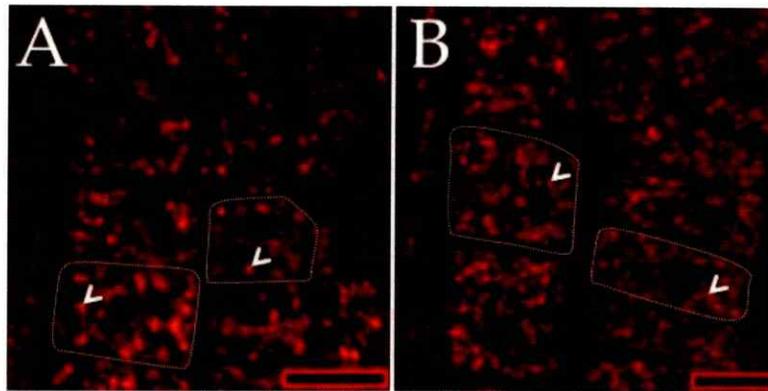
#### **5.5- Sacarosa modula diferencialmente los componentes de la maquinaria de la Endocitosis Mediada por Clatrina (EMC)**

La formación de una VCC involucra la correcta asociación de CLC y CHC para formar el trisquelion de clatrina. El genoma de Arabidopsis codifica dos CHC: *CHC1* (At3G11130) y *CHC2* (At3G08530) que comparten un 90% de identidad nucleotídica y, en consecuencia, se han descrito como funcionalmente redundantes (Kitakura y cols., 2011; Fan y cols., 2015). Sin embargo, sólo líneas de Arabidopsis con pérdida de función de *CHC2* presentan defectos en la internalización de MP (Kitakura y cols., 2011).

Con objeto de establecer si el principal componente funcional de la cubierta de clatrina es modulado bajo nuestras condiciones experimentales, estudiamos los niveles de CHCs en la epidermis de plántulas de Arabidopsis germinadas en medio libre y suplementado con sacarosa utilizando el anticuerpo que reconoce ambas CHCs de Arabidopsis. Se observó que células de la epidermis de plántulas germinadas en

ambas condiciones de sacarosa presentan un patrón de distribución de CHCs equivalente, caracterizado por la localización subcelular de la proteína en compartimientos de tipo endosomal que han sido previamente identificados como TGN (Dhonukshe y cols., 2007; Figura 10). Además, al cuantificar la señal del anticuerpo a nivel de la célula completa no se revelan diferencias significativas entre plántulas germinadas en ausencia o en presencia de sacarosa (Figura 10C). Sin embargo, en ausencia de sacarosa, las estructuras de tipo endosomal observadas presentan un mayor tamaño, sugiriendo un aumento en el reclutamiento de CHC a este tipo de compartimientos en esta condición (Figura 10A). Por otra parte, dado que el anticuerpo utilizado reconoce ambas CHCs, es imposible diferenciar el papel unitario de CHC1 de CHC2 dentro de este contexto experimental, pues ambos genes se expresan y traducen en la raíz de *Arabidopsis* (Kitakura y cols., 2011). Hecho importante, pues como se mencionó previamente solo la función de CHC2 se ha relacionado con la endocitosis según la evidencia genética (Kitakura y cols., 2011).

Se ha reportado que el tráfico vesicular puede ser modulado como resultado de cambios transcripcionales de la maquinaria requerida en determinadas vías de tráfico (Pizarro & Norambuena, 2014). Considerando esta información, evaluamos el nivel de expresión de las tres *CLCs* y las dos *CHCs* codificadas en el genoma de *Arabidopsis* (Fan y cols., 2015). Se determinó el nivel de transcrito de plántulas de 7 días germinadas en ambas condiciones de sacarosa mediante RT-qPCR. Los niveles de transcrito de los genes no reveló diferencias significativa entre estas condiciones (Figura 10D). Estos resultados son particularmente consistentes con lo observado utilizando el anticuerpo anti CHCs (Figura 10C) aunque contrastan con lo observado para *CLC2-GFP*.



**Figura 10.** La disponibilidad de sacarosa en el medio de cultivo de plántulas de *Arabidopsis* no afecta niveles de CHC y no promueve cambios transcripcionales de los componentes del triskelion de clatrina. Plántulas silvestres (Col-0) de 7 días

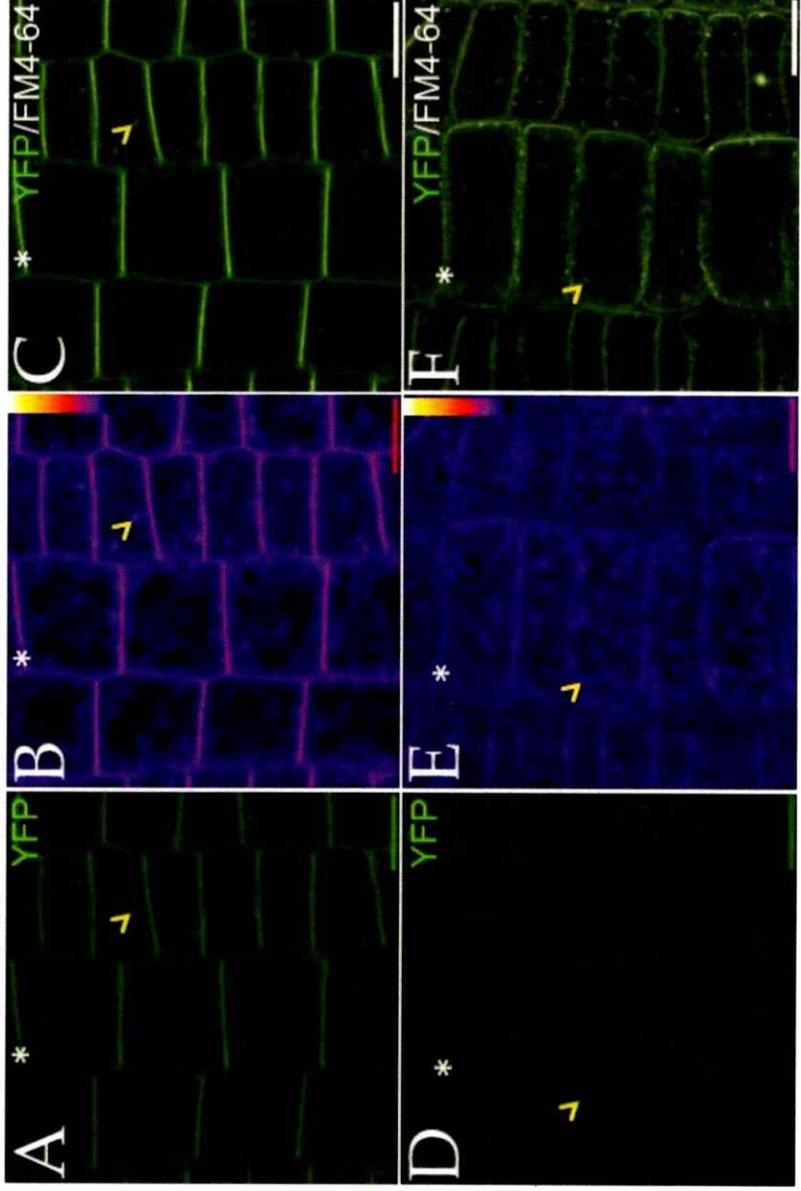
post siembra germinadas en ausencia o presencia de sacarosa se utilizaron para evaluar los niveles de CHC intracelulares mediante inmunifluorescencia ( $\alpha$ -CHCs 1:400) y para evaluar los niveles de transcrito de los componentes de clatrina mediante RT-qPCR. En ausencia (A) o en presencia de sacarosa (B) la señal CHC se registró principalmente en compartimientos de tipo endosomal (cabezas de flecha blancas). La cuantificación de la señal intracelular no revela diferencias significativas entre ambas condiciones (C). Los niveles de transcrito de *CLC1*, *CLC2*, *CLC3*, *CHC1* y *CH2* fue expresado como nivel de transcrito en ausencia de sacarosa relativo a la presencia de sacarosa (D). Estudio estadístico realizado mediante análisis t-student no revela diferencias significativas. La barra de tamaño indica 10 $\mu$ m.

El reconocimiento de cargos a nivel de la MP corresponde a la fase más temprana en la EMC. Durante esta etapa, proteínas adaptadoras interactúan con lípidos de membrana y con motivos de internalización propios de las proteínas cargos. Consecuentemente, se recluta a clatrina en el sitio de selección de cargos, dando lugar a los denominados pozos cubiertos de clatrina desde donde se origina la VCC. En Arabidopsis se han descrito 5 complejos adaptadores (AP1 a AP5). Se ha mostrado que sólo AP2 participa en la EMC (Di Rubbo y cols., 2013; Paez-Valencia y cols., 2016).

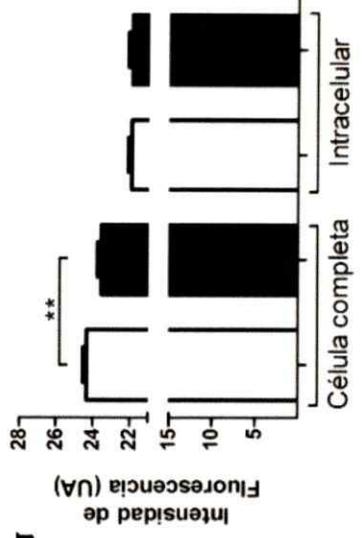
AP2 es un heterotetrámero conformado por dos subunidades mayores,  $\alpha$  y  $\beta$ 2, que interactúan con clatrina y con otras proteínas accesorias, una subunidad media, denominada  $\mu$ 2, que reconoce los motivos de internalización en las proteínas cargos, y una subunidad pequeña denominada  $\sigma$ 2 (Fan y cols., 2015; Paez-Valencia y cols., 2016). La subunidad  $\mu$ 2 es, por tanto, requerida para la especificidad en la internalización de membrana mediada por clatrina desde la MP. En células de la epidermis de Arabidopsis, la subunidad  $\mu$ 2 localiza en la MP como también en estructuras de tipo endosomal. Líneas pérdida de función de  $\mu$ 2 presentan defectos en la internalización de MP (Bashline y cols., 2013; Yamaoka y cols., 2013).

Debido al papel central de  $\mu 2$  en la EMC se utilizó la línea reportera que expresa la proteína de fusión  $\mu 2$ -YFP para estudiar su nivel de expresión y distribución en células de la epidermis de plántulas de 7 días germinadas en ausencia o presencia de sacarosa (Bashline y cols., 2013).  $\mu 2$ -YFP localizó en la MP y compartimientos de tipo endosomal en ambas condiciones (Figura 11). Sin embargo, la acumulación de  $\mu 2$ -YFP es evidentemente más robusta en la MP de células epidermales en ausencia de sacarosa respecto a la presencia de sacarosa (asterisco blanco en Figura 11A-D). Un mapa de intensidad de señal confirmó la concentración preferencial de la señal  $\mu 2$ -YFP en la MP en la epidermis de plántulas germinadas en ausencia de sacarosa respecto a la condición suplementada con sacarosa (Figura 11B-E).

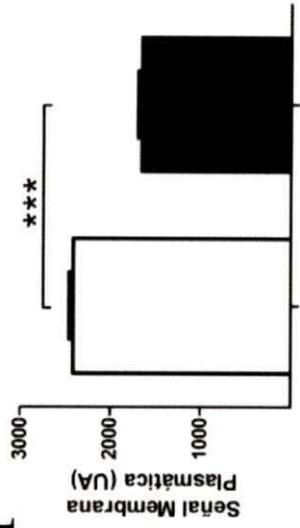
Con objeto de cuantificar la señal de  $\mu 2$ -YFP en la MP independientemente de la señal en la región intracelular, se utilizó FM4-64 para marcar únicamente la MP como se describe en la sección 4.9. En consecuencia la señal  $\mu 2$ -YFP asociada a la MP queda delimitada en la colocalización con FM4-64 (Figura 11C-F). Se observó que en ausencia de sacarosa las células presentan una mayor señal total de  $\mu 2$ -YFP en comparación a la condición suplementada con sacarosa. Sin embargo, la señal intracelular entre ambas condiciones no presenta diferencias significativas (Figura 11G). Coherente a nuestra observación inicial de la distribución de  $\mu 2$ -YFP, en ausencia de sacarosa la señal es significativamente mayor en la MP respecto a la condición suplementada con sacarosa (Figura 11H). Estos resultados revelan que sacarosa disminuye los niveles totales de  $\mu 2$ -YFP en células epidermales, y a su vez, cambia su distribución a nivel de la MP.



**G**



**H**



**Figura 11. La disponibilidad de sacarosa en el medio de cultivo de plántulas de Arabidopsis modula los niveles y distribución de  $\mu$ 2-YFP.** Se observó la distribución de  $\mu$ 2-YFP en plántulas de 7 días post siembra germinadas en ausencia o presencia de sacarosa. Asteriscos blancos y cabezas de flecha amarillas indican la MP y compartimientos de tipo endosomal, respectivamente. Columnas blancas y negras indican la condición de ausencia y presencia de sacarosa, respectivamente. En ausencia de sacarosa (A-C) y en presencia de sacarosa (D-F) se observó a  $\mu$ 2-YFP en la MP y en compartimientos de tipo endosomal. El mapa de intensidad de señal de YFP (B, E) reveló que en ausencia de sacarosa  $\mu$ 2-YFP está altamente enriquecida en la PM en ausencia de sacarosa respecto a la presencia de sacarosa. La cuantificación de la señal  $\mu$ 2-YFP restringida a la MP delimitada por un pulso del trazador FM4-64 mostró un mayor nivel en ausencia respecto a la presencia de sacarosa (X). Coherentemente, la cuantificación de la intensidad de señal de célula completa mostró mayor nivel de  $\mu$ 2-YFP en ausencia de sacarosa (G). La barra de tamaño indica en todos los casos 10 $\mu$ m. Los datos corresponden a dos réplicas experimentales independientes. Estudio estadístico realizado mediante análisis t-student: \*=p<0.05; \*\*=p<0.01; \*\*\*=p<0.001.

En conjunto, nuestras observaciones indican que la presencia de sacarosa en el medio de cultivo modula diferencialmente componentes de la maquinaria de EMC. Los niveles de CHCs se ven inalterados en presencia de sacarosa, sin embargo, la subunidad  $\mu$ 2 del complejo AP2 requerida para la especificidad del proceso de endocitosis mediado por clatrina desde la MP, cambia sus niveles y distribución intracelulares.

En resumen, el grupo de evidencias presentadas hasta este punto muestran que sacarosa en el medio de cultivo promueve la internalización de MP e impacta la configuración de la vacuola en tricoblastos y atricoblastos, los dos tipos celulares presentes en la epidermis de la raíz de Arabidopsis. Coherentemente, se observó que sacarosa modula el crecimiento celular, acorde al papel de la configuración de la vacuola en este proceso, y con ello el largo total de la raíz. Concretamente sacarosa modula diferencialmente los niveles y localización subcelular de algunos de los componentes de la maquinaria de la EMC, por lo que sugerimos que sacarosa promueve la internalización de MP a través de la EMC. Por tanto, nos propusimos

estudiar si la interferencia directa con la EMC impacta el proceso de configuración vacuolar. Esta propuesta corresponde al objetivo dos de esta tesis: "Estudio del proceso de configuración de la Vacuola Central ante la inhibición del tráfico mediado por clatrina".

#### **5.6.- Tirfostina A23 (TyrA23) altera el proceso de configuración vacuolar en la epidermis de la raíz de Arabidopsis.**

El análogo de fosfotirosina TyrA23 es una droga que ha sido ampliamente utilizada para interferir con la EMC en diversos modelos celulares. Particularmente, en plantas TyrA23 inhibe la internalización de proteínas residentes en la MP que participan en la señalización hormonal, toma de nutrientes y respuestas a estrés biótico como abiótico (Barberon y cols., 2011; Irani y cols., 2012; Lofke y cols., 2013; Hao y cols., 2014). En este trabajo se utilizó esta droga con objeto de evaluar el impacto de la inhibición de la EMC en el proceso de configuración vacuolar a lo largo de la epidermis de la raíz de Arabidopsis. Plántulas de la línea reportera de la membrana vacuolar GFP- $\delta$ TIP (Cutler y cols., 2000) se trataron con 50 o 75  $\mu$ M de TyrA23. Se ha reportado que estas concentraciones de TyrA23 inhiben eficientemente la internalización de proteínas de MP tanto como del trazador de MP FM4-64 (van Damme y cols., 2011).

En células en la zona de elongación, bajo ambas condiciones control, se observó que la señal GFP- $\delta$ TIP se distribuye en una enmarañada red de membranas entre las que se distinguen frecuentemente dos a tres estructuras luminales separadas por hebras trans-vacuolares (asteriscos amarillos y cabezas de flecha blanca en Figura 12A y 12D, respectivamente). Se observó que 120 minutos de tratamiento con 50  $\mu$ M de TyrA23 mantuvieron invariante el patrón de distribución de GFP- $\delta$ TIP respecto a la condición control bajo el mismo periodo de tiempo (Figura 12B). Sin embargo, se

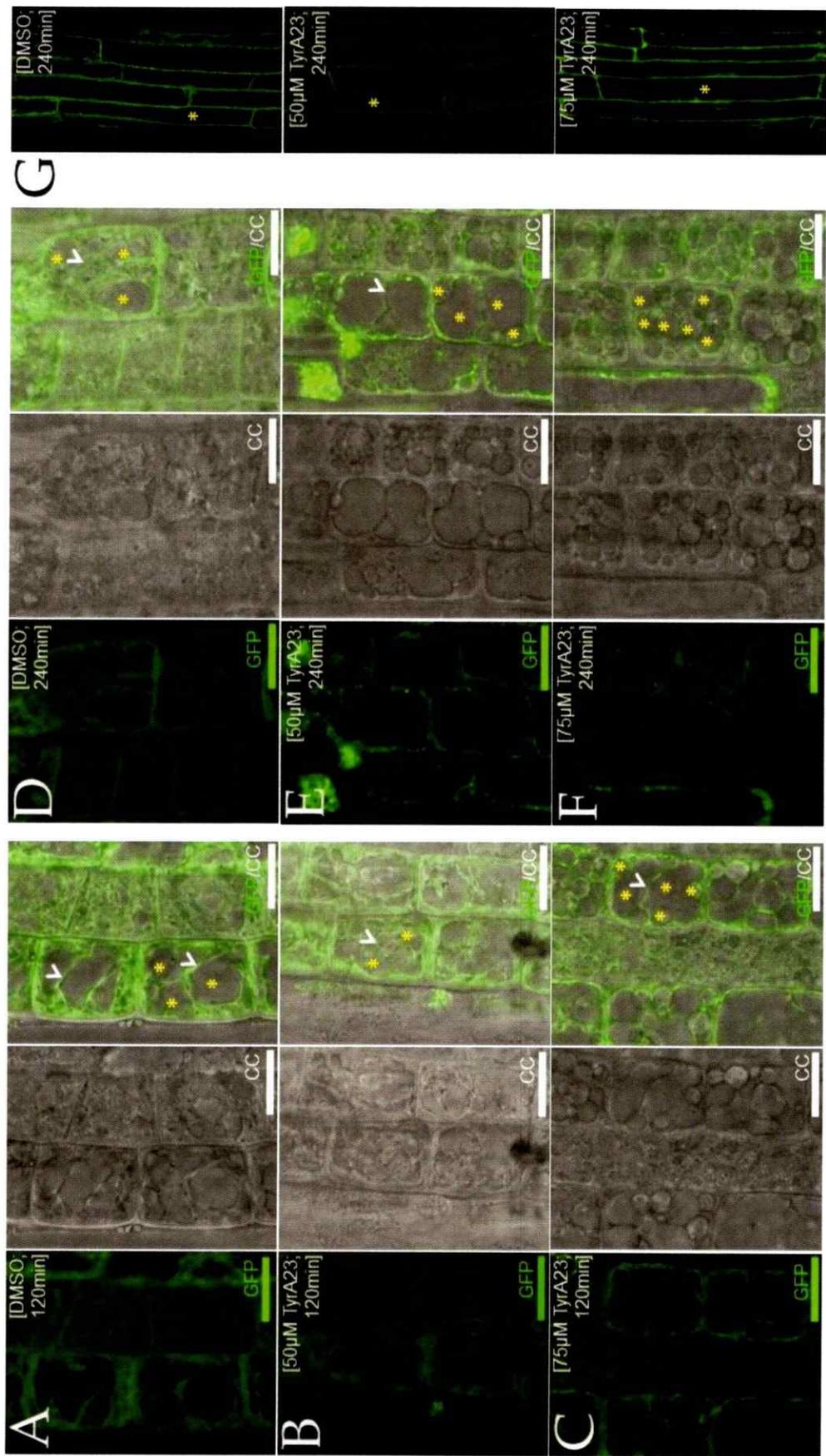
observó que tras el tratamiento con 75 $\mu$ M de TyrA23 la distribución de la membrana vacuolar reportada por GFP- $\delta$ TIP se alteró dramáticamente (Figura 12C). En estas condiciones, múltiples estructuras luminales ovoides y de tipo anillo se observaron por célula, comúnmente una o dos de estas ocupando la mayor parte del área celular observada, mientras que estructuras luminales de diámetro menor se disponían periféricamente a las de mayor tamaño (asteriscos amarillos Figura 12C). Por tanto, el tratamiento con TyrA23 75 $\mu$ M por 120 minutos disminuyó la complejidad en la disposición de la membrana vacuolar, aunque hebras trans-vacuolares son aún distinguibles (cabeza de flecha blanca Figura 12C).

Por otro lado, el tratamiento con TyrA23 por 240 minutos exacerbó los cambios observados en la configuración de la membrana vacuolar respecto a 120 minutos de exposición al compuesto (Figura 12D-F). El tratamiento con 50 $\mu$ M de TyrA23 por 240 minutos gatilló múltiples estructuras luminales ovoides y de tipo anillo por célula, entre las cuales se observaron hebras trans-vacuolares (asteriscos amarillos y cabeza de flecha blanca, respectivamente, en Figura 12E) configuración reminiscente al tratamiento con 75 $\mu$ M de TyrA23 por 120 minutos. Por último, en presencia de 75 $\mu$ M de TyrA23 se observó un número mayor a 5 estructuras luminales de tipo anillo por célula, las cuales presentaron un tamaño equivalente, además de otras de menor diámetro posicionadas periféricamente (Figura 12F).

En conjunto, estos resultados muestran que TyrA23 altera la disposición de la membrana vacuolar de células en la zona de elongación de forma temporal y dosis dependiente. En contra parte, el estudio de la disposición de la membrana vacuolar en células en la zona de diferenciación reveló una configuración equivalente entre la condición control y los diferentes tratamientos. Bajo ambas dosis de TyrA23 se observó que la señal GFP- $\delta$ TIP perfila una Vacuola Central completamente

configurada, que abarca la mayor parte del área de la célula dentro del plano observado (asterisco amarillo Figura 15G). Esto sugiere que TyrA23 altera el proceso de configuración pero no la morfología final de la Vacuola Central.

Lamentablemente la señal GFP- $\delta$ TIP en células del meristema de la raíz es particularmente intensa lo que impidió identificar la morfología de la membrana vacuolar con claridad, se decidió por esta razón no incluir esta región de la raíz en el análisis.



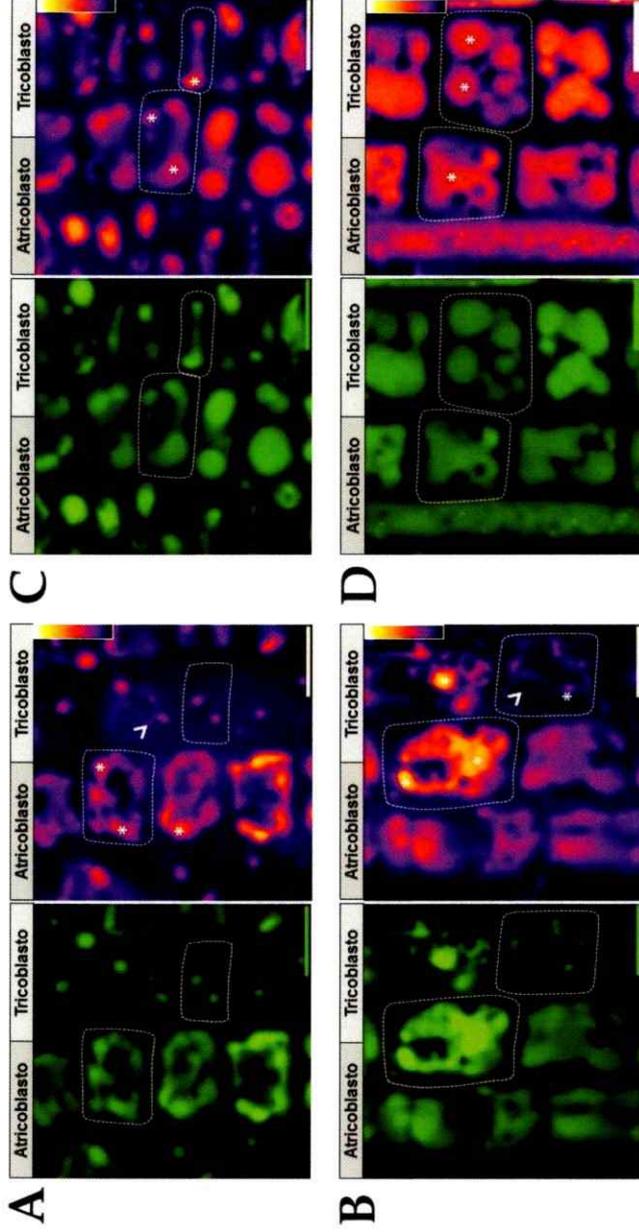
**Figura 12. Tyrfoestina A23 (TyrA23) modula de manera dosis y temporalmente dependiente la configuración vacuolar en células de la zona de elongación de la raíz primaria.** Plántulas de la línea reportera de la membrana vacuolar GFP- $\delta$ TIP de 7 días post siembra fueron tratadas con TyrA23 50 $\mu$ M o 75 $\mu$ M por 120 o 240 minutos. Asteriscos amarillos y cabezas de flecha blancas indican estructuras lumbinales y hebras transvacuolares, respectivamente. En condiciones control GFP- $\delta$ TIP revela una compleja red de membrana (A y D) la que se mantiene invariable en tratamiento con TyrA23 50 $\mu$ M por 120 minutos (B). Sin embargo, el tratamiento con TyrA23 50 $\mu$ M por 240 minutos o TyrA23 75 $\mu$ M gatilla la reducción de la complejidad de membrana observándose sólo múltiples estructuras lumbinales (C, E y F). En células completamente diferenciadas la morfología de la vacuola se mantiene inalterada en los tratamientos con TyrA23 bajo ambas restricciones temporales (G). Por lo tanto, TyrA23 altera la configuración vacuolar dependiente de la concentración y la temporalidad del tratamiento. La barra de tamaño indica 10 $\mu$ m. Las imágenes presentadas son representativas de tres réplicas experimentales independientes. CC = imagen en campo claro.

Una característica definitoria de la vacuola es su pH ácido (Shen y cols., 2013). El trazador 2',7'-bis(2-carboxyethyl)-5(6)-carboxyfluorescein (BCECF) se acumula preferentemente en compartimientos con estas características permitiendo revelar el lumen del compartimiento independiente del tipo o el estado de crecimiento de la célula (Swanson & Jones, 1996; Lanz y cols., 1999). Con objeto de estudiar la configuración vacuolar en presencia de TyrA23 desde el meristema, plántulas silvestres germinadas en presencia de sacarosa fueron tratadas con 75 $\mu$ M de TyrA23 en presencia del trazador.

En el meristema de la epidermis, bajo condiciones control, BCECF revela compartimientos morfológicamente diferentes dependiendo del tipo celular (Figura 13A). En atricoblastos el trazador se concentró principalmente en una estructura mutilobulada (asteriscos blancos dentro del perfil de intensidad en Figura 13A). Mientras que en tricoblastos se observó una o dos estructuras circulares (Figura 13A). Estas observaciones son coherentes a la morfología de la vacuola en células meristemáticas indicadas en la figura 9C. Sin embargo, en tricoblastos la red membranosa que acompaña a las estructuras lumbinales fue casi indistinguible a

través del trazador (cabeza de flecha en Figura 13A). Por otro lado, en células en la zona de elongación, los atricoblastos presentaron una estructura central concentrando el trazador, la cual posee múltiples deformaciones de morfología lobular (asteriscos blancos en Figura 13B). En tricoblastos se observó estructuras circulares u ovoideas de tamaño variable, entre los que se distingue una red tubular conectando las estructuras de mayor tamaño, pero que presentan una baja intensidad de señal del trazador (asteriscos y cabeza de flecha blancos, respectivamente, en Figura 13B).

En presencia de TyrA23 el trazador revela la presencia de compartimentos morfológicamente distintos a los observados en condiciones control. En tricoblastos y atricoblastos del meristema, la señal del trazador se concentró en una o dos estructuras circulares u ovoideas de diámetro variable (asteriscos blancos en Figura 13C). En la zona de elongación, se observó una estructura central poco lobulada en atricoblastos, mientras que se observaron múltiples estructuras circulares en tricoblastos (Figura 13D). Estos compartimientos son morfológicamente homólogos a los delimitados por GFP- $\delta$ TIP en presencia de la droga (Figura 12). Esta estrategia muestra que TyrA23 gatilla cambios en la configuración vacuolar a partir del meristema. En presencia de TyrA23 la complejidad del lumen vacuolar se ve disminuida respecto a la condición control. Los resultados obtenidos a través de BCECF son coherentes a los observados a través de GFP- $\delta$ TIP en presencia de TyrA23.



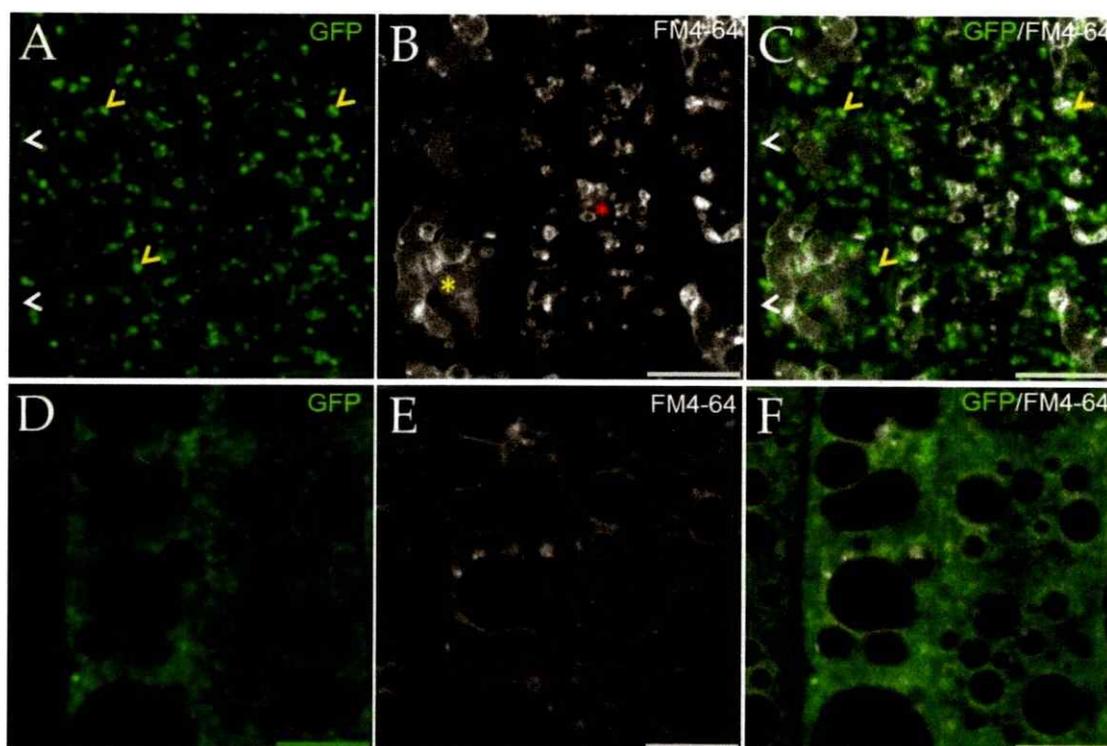
**Figura 13. Tyrfofina A23 (TyrA23) disminuye la complejidad del lumen vacuolar.** Plántulas silvestres (Col-0) de 7 días post siembra fueron tratadas con TyrA23 75µM por 240 minutos y co-tratadas con el trazador de lumen vacuolar BCECF. Para enfatizar los compartimentos en lo que el trazador se enriquece una imagen pseudocoloreada de acuerdo a la intensidad de señal es entregada en cada panel. Asteriscos indican estructuras lumbales lobuladas y circulares, y cabeza de flecha, estructuras tubulares. En el meristema, en condiciones control, el trazador reveló estructuras lobuladas en atricoblastos y principalmente estructuras circulares en tricoblastos (A). En la zona de elongación se observó una estructura lítica central multilobulada en atricoblastos y pequeñas estructuras circulares y tubulares en tricoblastos (B). Los compartimientos ácidos en presencia de TyrA23 se observaron como estructuras circulares de diverso tamaño (C y D). La barra de tamaño indica 10µm. Las imágenes son representativas de tres réplicas experimentales independientes.

Por otra parte, sacarosa regula los niveles y la distribución de CLC2-GFP en la epidermis de la raíz de Arabidopsis (Figura 8 y 9). Este resultado correlaciona directa y positivamente con la mayor internalización de MP. También correlaciona con la mayor complejidad del tonoplasto durante el proceso de configuración vacuolar observado en presencia de sacarosa. TyrA23 interfiere con la internalización de MP en células epidermales de la raíz de Arabidopsis (Van Damme y cols., 2011) y es capaz de bloquear los cambios en la configuración vacuolar inducidos por sacarosa (Figura 12) a niveles comparables al proceso de configuración vacuolar en ausencia de sacarosa (Figura 6B y D, respecto a Figura 12C, E y F). Considerando estos antecedentes nos preguntamos si TyrA23 interfiere además con la distribución de CLC2-GFP en presencia de sacarosa.

Plántulas de la línea reportera CLC2-GFP fueron sometidas a un pulso de solución del trazador endocítico FM4-64 (4 $\mu$ M) tras lo cual se reincubaron en solución sin trazador y mantenidas en oscuridad para asegurar el enriquecimiento del trazador de manera exclusiva en el tonoplasto. Posteriormente, las plántulas fueron incubadas en presencia de 75 $\mu$ M de TyrA23 o en condiciones control por 120 minutos.

Concordante a nuestras observaciones previas, células en la zona de elongación, bajo condiciones control, presentaron la señal CLC2-GFP en la MP y en compartimientos de tipo endosomal (cabezas de flecha blancas y amarillas en Figura 14A y 14C). Simultáneamente, se observó la vacuola de atricoblasto como una estructura central multilobulada, mientras que en tricoblastos se observaron estructuras de tipo anillo en conjunto a una red tubular; morfología propia de la vacuola de células en esta región de la raíz en presencia de sacarosa (asterisco naranja y rojo en figura 14B, respectivamente). En contraste, en presencia de TyrA23, CLC2-GFP pierde por completo su distribución subcelular, distribuyéndose de manera

homogénea en el espacio intracelular, probablemente libre en el citoplasma, sin estar asociado a ningún tipo de compartimiento (Figura 14D). En estas condiciones la vacuola se configura como múltiples estructuras luminales libre de estructuras complejas de membrana (Figura 14E-F). Por lo tanto, tal como se ha visto para otras proteínas asociadas a la EMC, incluyendo a  $\mu 2$ , TyrA23 interfiere con la distribución de CLC2-GFP en la epidermis de la raíz de *Arabidopsis* (Yamaoka y cols., 2013; Wang y cols., 2016).



**Figura 14. Tyrfofostina A23 (TyrA23) cambia la distribución de CLC2-GFP.** Se observó la zona de elongación de plántulas de la línea reportera CLC2-GFP de 7 días post siembra tratadas con TyrA23 75 $\mu$ M por 240 minutos. Se utilizó el trazador FM4-64 para revelar la morfología de la vacuola. Cabezas de flechas blancas y amarillas, indican Membrana Plasmática (MP) y compartimientos de tipo endosomal, respectivamente. En condiciones control, CLC2-GFP se observó en la MP y compartimientos endosomales (A y C). La vacuola se observó como una estructura luminal central multilobulada (asterisco blanco) o como estructuras luminales pequeñas en conjunto a túbulos (asterisco rojo) (B y C). En contraste, TyrA23 deslocalizó a CLC2-GFP respecto al control (D y F). Congruente, TyrA23 75 $\mu$ M por 240 minutos configuró vacuolas luminales circulares o de tipo anillo (E y F). La barra

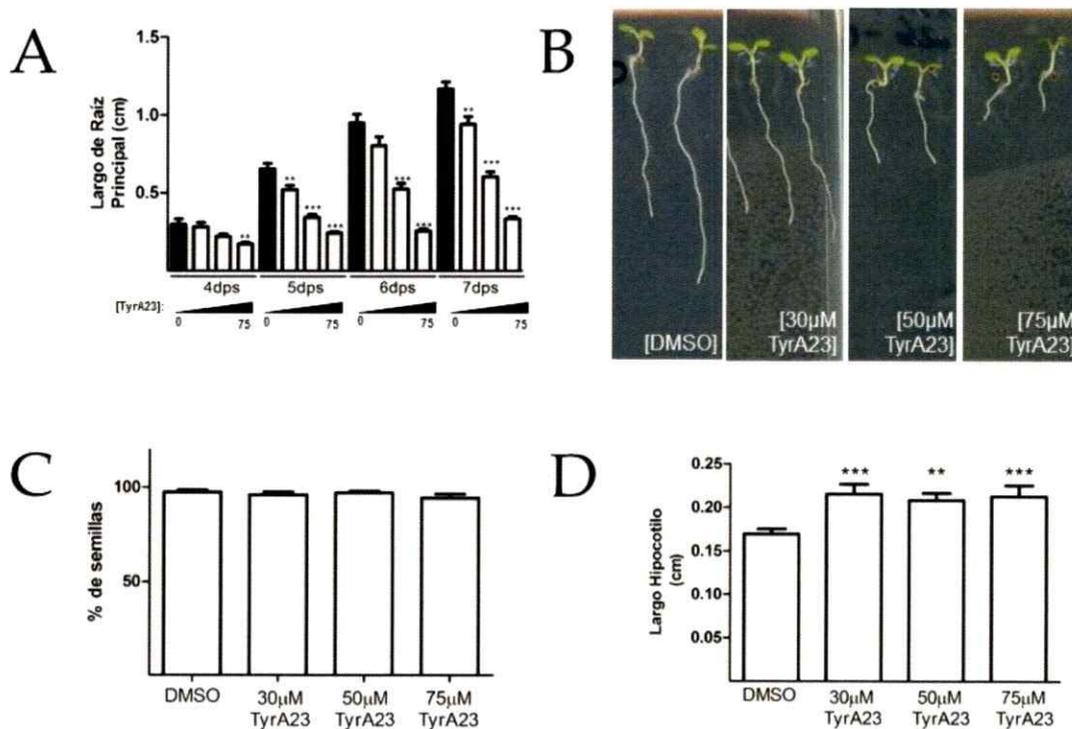
de tamaño indica  $10\mu\text{m}$ . Las imágenes son representativas de tres réplicas experimentales independientes.

**5.7.- La exposición crónica a TyrA23 altera simultáneamente el proceso de configuración vacuolar y el crecimiento de la raíz principal en la epidermis de la raíz de Arabidopsis.**

El crecimiento longitudinal de la raíz de Arabidopsis está regulado por la relación que existe entre la división y de elongación celular. Si bien, la velocidad promedio en que una célula tras dividirse alcanza su completa diferenciación es de  $241\mu\text{m}/\text{h}$ , los tiempos de residencia en cada una de las zonas de crecimiento dentro de la raíz son muy diferentes: 93 horas y 5.6 horas, para el meristema y la zona de elongación, respectivamente, en una plántula de 6 días (Beemster & Baskin, 1998). Es decir, una célula que se ha dividido estará en la zona del meristema alrededor de 4 días, en cambio, sólo 5.6 horas le tomara elongar antes de entrar en la zona de diferenciación.

Según se vio en la figura 12, TyrA23 mantuvo invariante la configuración de la membrana vacuolar en células diferenciadas de la epidermis de la raíz de Arabidopsis. Sin embargo, el marco temporal de nuestros experimentos en presencia de la droga contrasta con los marcos temporales endógenos requeridos para evaluar el proceso de configuración vacuolar completo. Para resolver el papel de TyrA23 y, por tanto, de la inhibición de la EMC en el proceso de configuración vacuolar total, plántulas de la línea silvestre fueron germinadas en medio suplementado con sacarosa en presencia de diferentes concentraciones de TyrA23. Luego de 7 días, post siembra, la configuración de la vacuola fue evaluada de acuerdo a lo descrito en la sección 4.7.

Primero, se cuantificó el largo de la raíz principal de las plántulas en cada tratamiento y por cada día de crecimiento. Se observó que TyrA23 inhibe el crecimiento de la raíz principal de manera dosis dependiente respecto a la condición control (Figura 15A-B). Desde el quinto día post siembra se observó que 75 $\mu$ M de TyrA23 restringe el crecimiento de la raíz principal a un tercio del crecimiento de la condición control, siendo este el caso de inhibición más drástico. Descartamos que la causa de esta inhibición sea resultado de diferencias en la tasa o temporalidad de germinación, ya que no existen diferencias significativas en el porcentaje de germinación entre cada condición experimental (figura 15C). Adicionalmente, se observó que TyrA23 indujo un aumento en largo del hipocotilo (Figura 15D).



**Figura 15. Tyrfoestina A23 (TyrA23) restringe el crecimiento de la raíz principal de Arabidopsis.** Plántulas de la línea silvestre (Col-0) fueron germinadas en condiciones control (barra negra) o en presencia de TyrA23 30 $\mu$ M, 50 $\mu$ M o 75 $\mu$ M

(barras blancas). En todos los casos el medio fue suplementado con sacarosa. El largo de la raíz principal fue registrado desde el día 4 al día 7 post siembra. TyrA23 inhibe el crecimiento de la raíz principal de manera dosis dependiente (A). Plántulas representativas para cada tratamiento son presentadas en B. La inhibición del crecimiento de la raíz principal en presencia de TyrA23 es independiente a la tasa de germinación de la semilla en presencia de la droga (C). Interesantemente, TyrA23 afecta positivamente el largo del hipocotilo (D). Por lo tanto, TyrA23 modula el crecimiento de plántulas de Arabidopsis de manera dosis dependiente. Los datos corresponden a tres réplicas experimentales independientes (N=15). Estudio estadístico realizado contra la condición control en todos los casos mediante análisis t-student: \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ; ns = no significativo.

En el meristema de la raíz de plántulas germinadas en condiciones control (DMSO), se observaron en atricoblastos vacuolas multilobuladas, mientras que en tricoblastos se observó una red de membrana tubular acompañada de estructuras luminales de diámetro variable (Figura 16A). En células en la zona de elongación, las vacuolas de atricoblastos mantuvieron una estructura multilobulada, pero con un notorio incremento del lumen del compartimento respecto a lo observado en el meristema, y en tricoblastos se distinguió una red tubular de membrana en conjunto a estructuras luminales de mayor tamaño a las observadas en el meristema (Figura 16B). En la zona de diferenciación, finalmente, el tonoplasto abarcó la totalidad del plano observado, alcanzando, por tanto, la configuración de Vacuola Central (Figura 16C). Estas observaciones son coherentes con nuestras descripciones previas de configuración vacuolar en plántulas germinadas en presencia de sacarosa como única restricción (Figura 6C, E y G).

En contra parte, se observó la configuración vacuolar en plántulas germinadas en presencia de 50 y 75 $\mu$ M de TyrA23. El tratamiento con 50 $\mu$ M de TyrA23 gatilló dos tipos distintos de configuración vacuolar (Figura 16D-F y 16G-I). En la primera de estas configuraciones se observó en atricoblastos del meristema vacuolas formadas por un grupo de estructuras luminales ovoides de diámetro similar (asteriscos

amarillos, Figura 16D) mientras que en tricoblastos, se observó una red tubular con escasas o nulas estructuras luminales (Figura 16D). En la zona de elongación, se observaron múltiples estructuras luminales ovoides alargadas en atricoblastos (asteriscos amarillos, Figura 16E) y para tricoblastos, se observó una red tubular equivalente a la observada dentro del meristema (Figura 16E). En último lugar, en la zona de diferenciación, se observó que el tonoplasto configura una Vacuola Central equivalente a la observada en condiciones control (Figura 16F respecto a 16C). Este tipo de configuración vacuolar fue visualizado en aproximadamente un 30% de las plántulas.

Por otra parte, el segundo tipo de configuración vacuolar observado bajo tratamiento con 50 $\mu$ M de TyrA23, se caracterizó por atricoblastos, en la zona del meristema, que presentan una estructura luminal central, homóloga a la observada en tratamiento control, pero de lóbulos alargados (Figura 16G). En tricoblastos miristemáticos se observaron múltiples estructuras luminales reminiscentes a anillos, ninguna de estas estructura se distinguió como estructura central. Contrastantemente, la red tubular propia de tricoblastos no fue observada (Figura 16G). En la zona de elongación, los atricoblastos mantienen una estructura central multilobulada, pero de mayor tamaño a la del meristema (Figura 16H). En tricoblastos las estructuras de tipo anillo dan lugar a una o dos estructuras centrales de mayor diámetro, ovoides, acompañadas de múltiples estructuras más pequeñas, aparentemente independientes (Figura 16H). Por último, en la zona de diferenciación se observó una Vacuola Central, configurada. Este tipo de configuración vacuolar estuvo presente en el 70% de las plántulas, aproximadamente (Figura 16I).

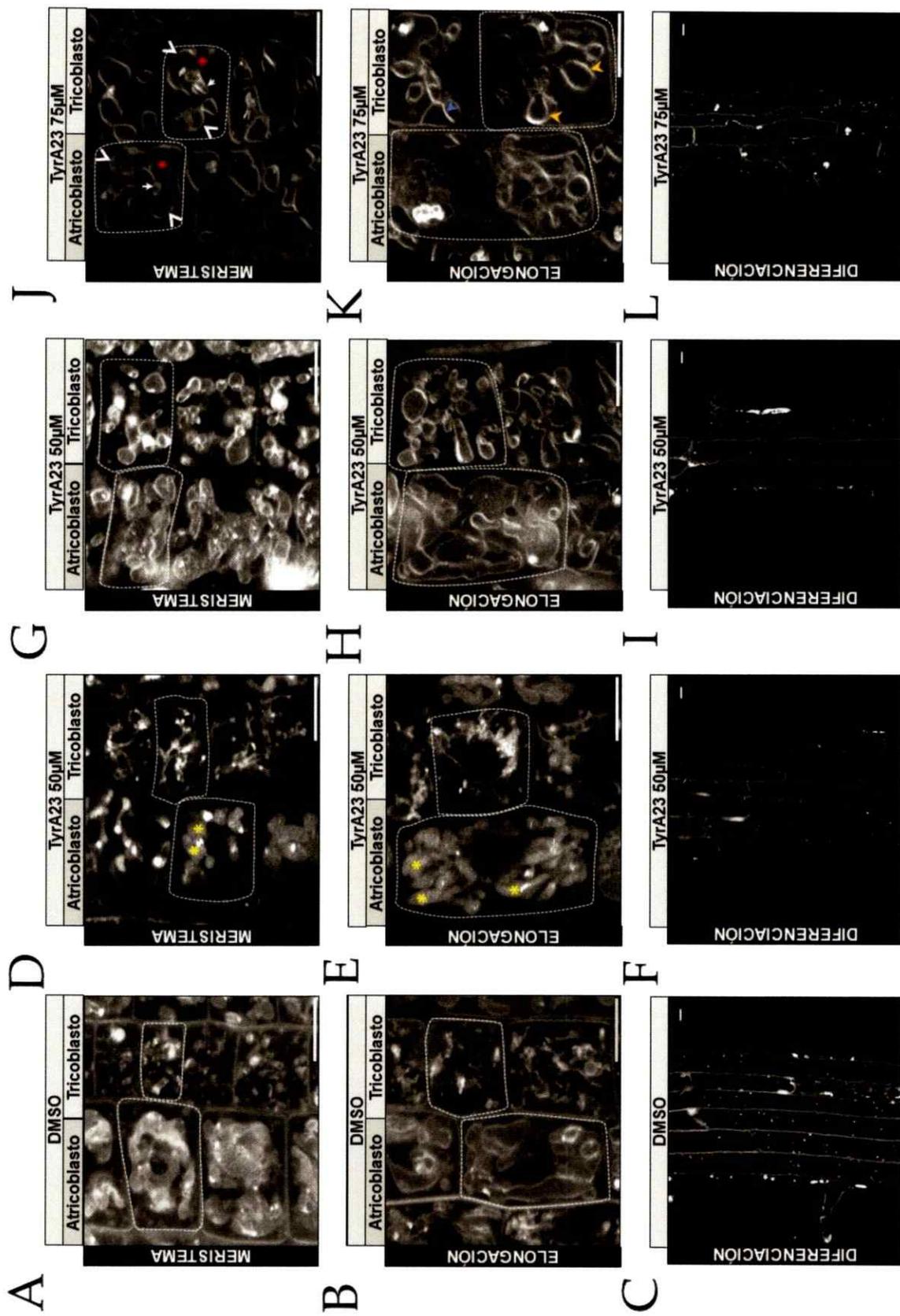
Como última condición experimental, se observó la configuración vacuolar en presencia de 75 $\mu$ M de TyrA23. En el meristema, tanto atricoblastos como tricoblastos

presentaron vacuolas con una configuración similar. Esta se caracterizó por una estructura luminal central en la que se distinguen dos a tres dominios lobulares, acompañados periféricamente por estructuras de menor tamaño ovoides formando, aparentemente, un continuo con la membrana de la estructura principal (asterisco rojo, cabezas de flechas y flechas blancas, respectivamente en Figura 16J). En la zona de elongación, se observó en atricoblastos vacuolas con una membrana dispuesta densamente, impidiendo distinguir una estructura luminal central (Figura 16K). En tricoblastos la membrana vacuolar definió una estructura luminal central, en la que internamente se distinguieron estructuras complejas de membrana, como hebras trans-vacuolares y estructuras de tipo bulbs (cabeza de flecha azul y naranja, respectivamente, en Figura 16K). Se observó, además, que en células diferenciadas el tonoplasto revela una Vacuola Central configurada. Sin embargo, el tamaño de las células en la zona de diferenciación fue a simple vista menor que bajo condiciones control (Figura 16L).

Un resumen de las principales observaciones de la configuración vacuolar bajo tratamiento crónico con TyrA23 es presentado en la tabla III.

**Tabla III. Configuración vacuolar bajo exposición crónica al inhibidor de la EMC TyrA23.**

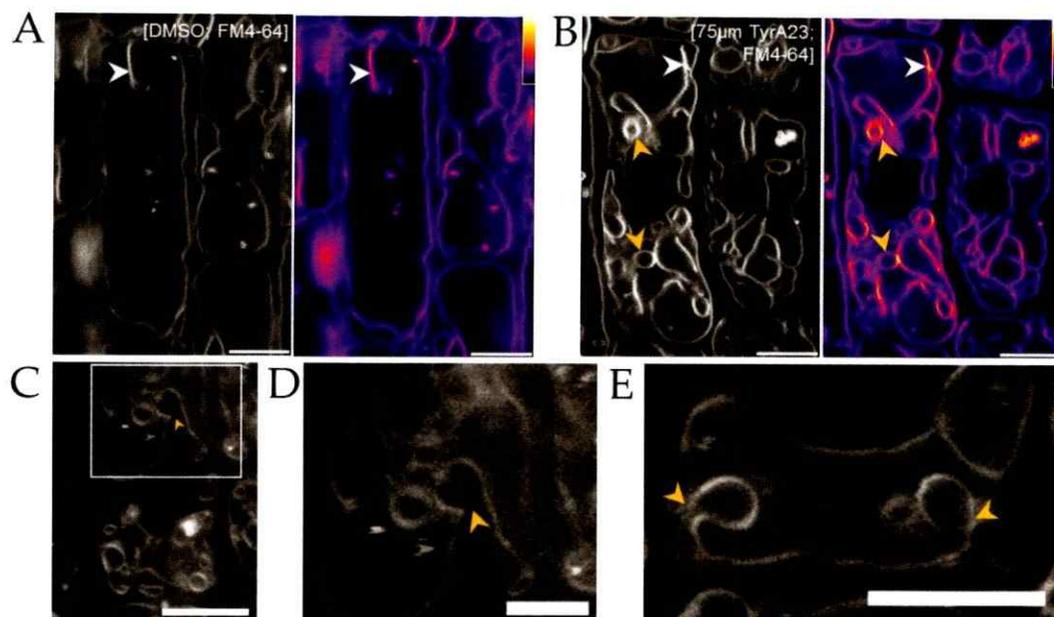
		CTL (DMSO)	TyrA23 50µM	TyrA23 50µM	TyrA23 75µM
			Configuración vacuolar 1	Configuración vacuolar 2	
MERISTEMA	Atri	Estructura multilobulada.	Múltiples estructuras lumbinales ovoides	Estructura multilobulada (lobulos alargados respecto a CTL)	Estructura central bi o tri lobulada.
	Tri	Red tubular. Estructuras lumbinales de tipo anillo.	Red tubular.	Múltiples estructuras lumbinales de tipo anillo	Estructuras ovoides de diverso tamaño.
ZONA DE ELONGACIÓN	Atri	Estructura multilobulada.	Múltiples estructuras lumbinales ovoides	Estructura multilobulada.	Estructuras lobuladas y ovoides densamente agrupadas.
	Tri	Red tubular. Múltiples estructuras lumbinales.	Red tubular.	Múltiples estructuras lumbinales de diverso tamaño	Estructura central bi o tri lobulada. Bulbs y hebras transvacuolares
ZONA DE DIFERENCIACIÓN	Atri	Vacuola Central configurada	Vacuola Central configurada	Vacuola Central configurada	Vacuola Central configurada
	Tri				



**Figura 16. La exposición crónica a Tyrfofostina A23 (TyrA23) altera el proceso de configuración vacuolar en la raíz de Arabidopsis.** La estructura de la vacuola de atricoblasto y tricoblasto en las diferentes zonas de la raíz las plántulas de la línea silvestre (Col-0) germinadas en TyrA23 fueron visualizadas a través de FM4-64. La condición control es mostrada en **A, B y C**. TyrA23 50 $\mu$ M gatilla dos tipos de configuración vacuolar (**D-F y G-I**) en las que se observaron distintos arreglos de estructuras luminales en comparación al control. Bajo tratamiento con TyrA23 75 $\mu$ M la se observaron vacuolas menos lobuladas pero densamente agrupadas en conjunto a estructuras complejas de membrana como hebras transvacuolares (cabeza de flecha azul) y bulbs (cabeza de flecha naranja) (**J-L**). La configuración de una Vacuola Central se observó bajo todos los tratamientos (**C, F, I, L**). Asteriscos amarillos indican estructuras luminales, Asterisco rojo, cabeza de flecha y flecha blanca indican estructura central, lóbulos y estructuras periféricas bajo TyrA23 75 $\mu$ M. Las barras de tamaño indican 10 $\mu$ m. Las imágenes son representativas de tres réplicas experimentales independientes.

En la vacuola existen estructuras membranosas altamente dinámicas denominadas “bulbs” las cuales forman un continuo con la membrana vacuolar. Se forman a partir de la proyección y cierre de la membrana vacuolar sobre sí misma hacia el interior del lumen vacuolar, generando una estructura de doble membrana. (Saito y cols., 2002; Uemura y cols., 2002). Tanto las hebras trans-vacuolares como los bulbs presentan una mayor intensidad relativa de señal de distintos reporteros fluorescentes como resultado de su condición de doble membrana (Uemura y cols., 2002; Han y cols., 2015). El tratamiento con 75 $\mu$ M de TyrA23 indujo un gran número de estructuras de tipo bulbs, visibles particularmente en la zona de elongación (Figura 16K). Para corroborar la identidad de estas estructuras se realizó un perfil de intensidad de la señal de fluorescencia de vacuolas en células en elongación (Figura 17). En tratamiento control, se observaron pocos o nulos bulbs, sin embargo, se observan hebras trans-vacuolares (cabeza de flecha blanca en Figura 17A). En contraste, en tratamiento con TyrA23 se observaron múltiples estructuras de tipo bulbs, las que coherentemente concentran la mayor intensidad de señal de fluorescencia (cabezas de flecha naranja en Figura 17B). Además, se observó membrana con alta intensidad de fluorescencia que morfológicamente evoca etapas tempranas de la formación de

bulbs (Figura 17C-E), equivalentes a las descritas durante la biogénesis de estas estructuras (Saito y cols., 2002;).



**Figura 17. Tyrfoestina A23 (TyrA23) promueve la biogénesis de bulbs de vacuola en células de la epidermis de la raíz de *Arabidopsis*.** Plántulas de la línea silvestre (Col-0) de 7 días post siembra, fueron germinadas en condiciones control o en presencia de TyrA23 75 $\mu$ M. FM4-64 fue usado para revelar la morfología de la vacuola en células en la zona de elongación de la raíz de *Arabidopsis*. Cabezas de flecha blanca y naranja indican hebras trans-vacuolares y bulbs, respectivamente. La imagen pseudocoloreada corresponde a un mapa de la intensidad de señal del trazador en la membrana vacuolar. En condiciones control se observan hebras trans-vacuolares y, en baja frecuencia, bulbs. Ambas estructuras concentran la mayor intensidad de señal dentro de la membrana vacuolar (**A**). En tratamiento con TyrA23 se observaron hebras trans-vacuolares y bulbs con mayor frecuencia respecto al control. Coherentemente, ambas estructuras concentran una alta intensidad de señal (**B**). En el tratamiento con TyrA23 se observaron estructuras de tipo bulbs en aparente proceso de cierre (**C-D**; **D** corresponde a una magnificación del cuadro en **C**). La generación de bulbs es próxima a la membrana vacuolar externa (**E**). La barra de tamaño indica en todos los casos 10 $\mu$ m. Las imágenes presentadas son representativas de tres réplicas experimentales independientes.

### **5.8.- La interferencia con la formación del triskelion de clatrina impacta el proceso de configuración vacuolar en células de la epidermis de la raíz de Arabidopsis.**

En el triskelion de clatrina cada CHC trimeriza e interactúa con CLC a través del dominio hub en el tercio C terminal de CHC (Näthke y cols., 1992; Ybe y cols., 1999). La sobreexpresión de hub en células animales inhibe la EMC como resultado de la competencia por CLC entre hub y el triskelion funcional (Liu y cols., 1998). De manera homóloga, la sobreexpresión de hub en células vegetales conduce a la inhibición de la internalización de MP y de proteínas internalizadas por EMC (Tahara y cols., 2007; Dhonukshe y cols., 2007; Kitakura y cols., 2011). El efecto dominante negativo ejercido por la sobreexpresión hub constituye, por tanto, una eficaz herramienta para el estudio del impacto del tráfico mediado por clatrina en distintos procesos celulares. Nosotros tomamos como herramienta la línea HUB1, en la que la expresión del dominio hub es comandada por el promotor INTAM inducible por 4-hydroxytamixifeno (H-TAM) (Kitakura y cols., 2011), para estudiar el proceso de configuración vacuolar en el contexto de la depleción de VCC.

Plántulas HUB1a germinadas en una escala creciente de concentraciones de H-TAM presentaron una drástica reducción, dosis dependiente, del largo de la raíz principal respecto a la condición control (Figura 18A) consistente con lo ya reportado (Kitakura y cols., 2011). En contra parte, el crecimiento de la raíz principal en plántulas silvestres se ve inalterado en presencia de H-TAM (Figura 18A). Interesantemente, se observó que a pesar de la suplementación de sacarosa en el medio de germinación, la promoción del crecimiento de la raíz principal mediado por sacarosa no superó la restricción del crecimiento mediada por la sobreexpresión de hub.

La raíz principal creció aproximadamente un 50% menos respecto a la condición control en tratamiento con 0,1 $\mu$ M de H-TAM y se restringió a menos del 20% a 1 $\mu$ M de concentración o superiores (Figura 18A). Por ello, se utilizaron como concentraciones críticas para evaluar la configuración vacuolar.

La membrana vacuolar fue marcada a través del trazador FM4-64 según se describe en la sección 4.9. En plántulas silvestres ambas concentraciones de H-TAM mantienen invariante la configuración vacuolar (Figura 18B y 18C). Las vacuolas en atricoblastos en la zona de elongación se observaron como una única estructura central multilobulada (asterisco amarillo, Figura 18B), mientras que en tricoblastos se distinguieron estructuras luminales de tipo anillo en conjunto a una red tubular (cabezas de flecha amarillas y azules, respectivamente, Figura 18B). En la zona de diferenciación, la membrana vacuolar abarcó la totalidad del plano observado, configurándose, por tanto, una Vacuola Central (Figura 18B).

En contraste, la configuración vacuolar se vio alterada en la línea HUB1a en presencia de H-TAM respecto a lo observado en Col-0. Se observó que atricoblastos en la zona de elongación bajo tratamiento con 0,1 $\mu$ M de H-TAM presentaron una estructura vacuolar central acompañada por estructuras luminales ovoides de menor tamaño (asteriscos amarillos, Figura 18B). En tricoblastos se observaron múltiples estructuras luminales ovoides de diverso diámetro y estructuras reminiscentes a anillos, sin distinguirse una estructura central predominante como en el caso de atricoblastos (Figura 18B). Además, se observó que la red tubular de membrana propia de vacuolas de tricoblastos es casi imperceptible respecto a plántulas silvestres (cabezas de flecha amarillas y azules, respectivamente, Figura 18B). Sin embargo, en la zona de diferenciación, el tonoplasto revela una Vacuola Central configurada (Figura 18B).

Consistentemente, bajo tratamiento con  $1\mu\text{M}$  de H-TAM vacuolas de atrico y tricoblastos en la zona de elongación se observaron como una estructura central sin lobulaciones (asterisco amarillo, Figura 18B). Se observó, además, que las vacuolas de tricoblastos acumulan parte de la señal del trazador en un polo de la membrana (cabeza de flecha roja, Figura 18B). Mientras que en la zona de diferenciación se configuró una Vacuola Central que ocupó la totalidad celular en el plano observado. Sin embargo, estas células son de un evidente menor tamaño en comparación a las observadas en la línea silvestre en presencia de H-TAM o en la línea HUB1a en presencia de  $0,1\mu\text{M}$  de H-TAM (Figura 18B). Por lo tanto, la inducción de hub en la línea HUB1a impacta el proceso de configuración vacuolar de manera dosis dependiente.

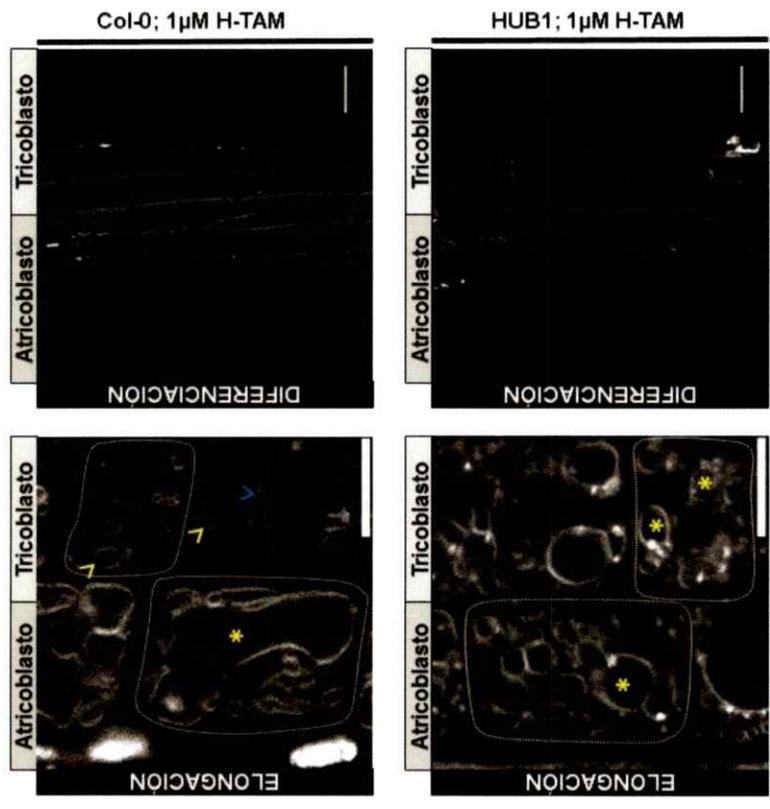
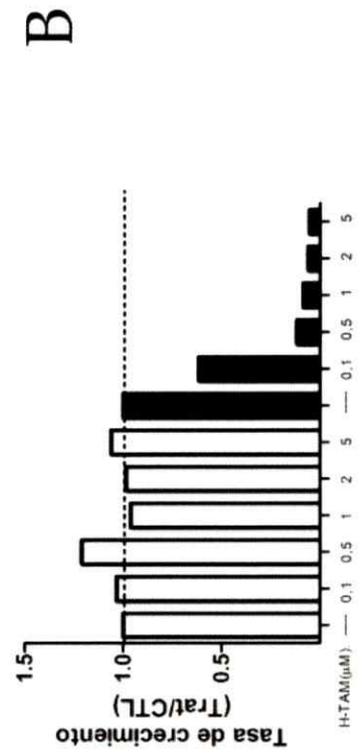
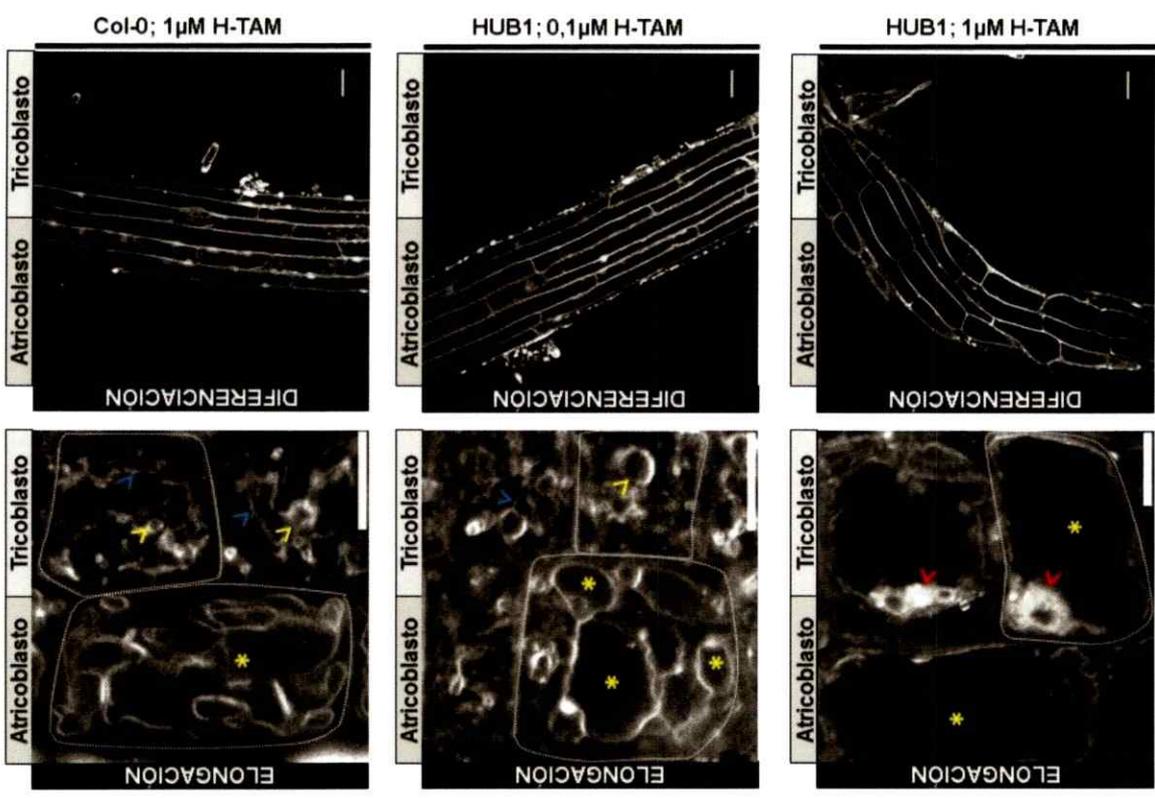
Con objeto de establecer si este grupo de observaciones son resultado de la inducción crónica del dominio hub en la línea HUB1a, plántulas crecidas en condiciones normales por 7 días, fueron expuestas por 24 horas a  $1\mu\text{M}$  de H-TAM. En atricoblastos en la zona de elongación de plántulas silvestres se observó, una vacuola configurada como una estructura central multilobulada. En tricoblastos, se observaron estructuras luminales ovoides acompañadas de una red tubular de membrana (Figura 18C). En la zona de diferenciación, se configura una Vacuola Central (panel superior derecho Figura 18C). En contraste, en plántulas HUB1a, se observó que en la zona de elongación atricoblastos y tricoblastos presentaron entre 5 y 7 estructuras luminales de tipo anillo y ovoides (Figura 18C). Particularmente, la red tubular membranosa de tricoblastos no se observó. Sin embargo, en células en la zona de diferenciación se configuró una Vacuola Central equivalente a la observada en plántulas silvestres (Figura 18C).

Las principales observaciones del proceso de configuración vacuolar en la línea HUB1a son mostrados en la tabla IV.

**Tabla IV. Configuración vacuolar en la línea HUB1a inducida por H-TAM.**

		CTL (DMSO)	HUB1a (H-TAM 0,1µM; crónico)	HUB1a (H-TAM 1µM; crónico)	HUB1a (H-TAM 1µM; 24 horas)
<b>ZONA DE ELONGACIÓN</b>	<b>Atri</b>	Estructura multilobulada.	Estructura poco lobulada.  Estructuras luminales ovoides	Estructura central no lobulada.	5 a 7 estructuras luminales (ovoides y/o anillos)
	<b>Tri</b>	Red tubular.  Estructuras luminales (ovoides y/o anillos).	Múltiples estructuras luminales ovoides	Cuerpo membranoso en un polo de la vacuola	
<b>ZONA DE DIFERENCIACIÓN</b>	<b>Atri</b>	Vacuola Central configurada	Vacuola Central configurada	Vacuola Central configurada	Vacuola Central configurada
	<b>Tri</b>				

En resumen, la inducción de hub en la línea HUB1a, y en consecuencia la interrupción del tráfico mediado por clatrina, impacta la configuración vacuolar pero permite el establecimiento de una Vacuola Central en células diferenciadas.



A

B

C

**Figura 18. La inducción del dominio *hub* altera el proceso de configuración vacuolar en la raíz de *Arabidopsis*.** Plántulas silvestres (Col-0) o HUB1a fueron germinadas bajo condiciones control (DMSO) o con el inductor del dominante negativo *hub*: 4-hydroxytamixifeno (H-TAM). H-TAM restringió de manera dosis dependiente el largo de la raíz principal en plántulas HUB1a, plántulas silvestres son insensibles a esta inhibición del crecimiento (A). La configuración vacuolar fue observada con 0,1 $\mu$ M o 1 $\mu$ M de H-TAM como restricción. FM4-64 fue utilizado para revelar la morfología de la vacuola. Asteriscos amarillos, cabezas de flecha amarillos y azules indican estructuras lumbales centrales, ovoides y tubulares, respectivamente. La condición control es mostrada en el panel superior en B. El tratamiento crónico con H-TAM 0,1 $\mu$ M o 1 $\mu$ M induce estructuras lumbales ovoides poco o nulamente lobuladas (B, panel central e inferior). H-TAM 1 $\mu$ M indujo la acumulación de membrana en un polo de la vacuola (cabeza de flecha roja, B). Homológamente, el tratamiento por 24 horas con H-TAM 1 $\mu$ M induce múltiples estructuras lumbales. En todas las condiciones se observó el establecimiento de una Vacuola Central. Barra de tamaño indica 10 $\mu$ m. Las imágenes son representativas de tres réplicas experimentales independientes.

De las tres CLCs codificadas en el genoma de *Arabidopsis*, la pérdida de función de *CLC1* es letal a nivel del gametofito. Sin embargo, líneas carentes de *CLC2* y *CLC3* son viables. La línea doble mutante *clc2clc3* presenta defectos en la internalización de trazadores de MP y en la internalización de proteínas internalizadas mediante EMC. Consecuentemente, *clc2clc3* presenta múltiples defectos durante el desarrollo post embrionario, incluyendo un menor crecimiento de la raíz principal (Wang y cols., 2013; Figura 19A-B).

Interesantemente, en ausencia de *CLC2* y *CLC3* los niveles de CHC se encuentran atenuados en la epidermis de la raíz de *Arabidopsis* (Wang y cols., 2013). En suma, la línea *clc2clc3* proporciona una excelente herramienta para evaluar el proceso de configuración vacuolar ante la deficiencia endógena del tráfico mediado por clatrina. Por ello se utilizaron para el estudio del proceso de configuración vacuolar de acuerdo al protocolo descrito en la sección 4.7.

En atricoblastos del meristema de plántulas silvestres se observó una a dos estructuras multilobuladas, mientras que en tricoblastos se observaron pequeñas

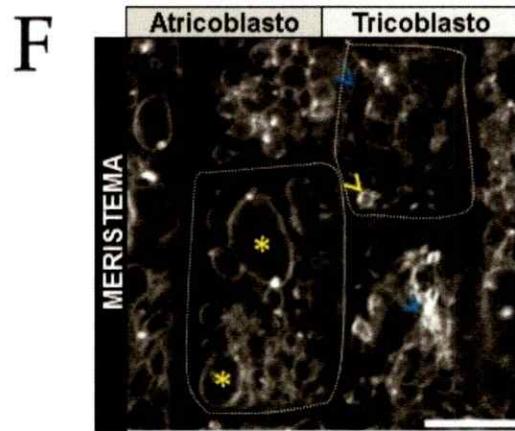
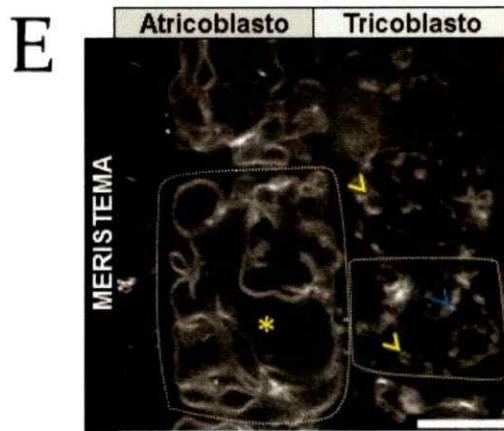
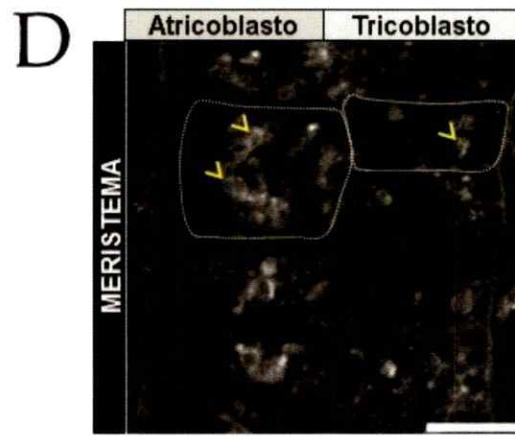
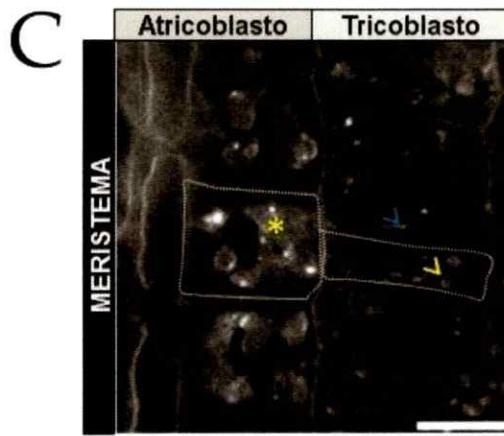
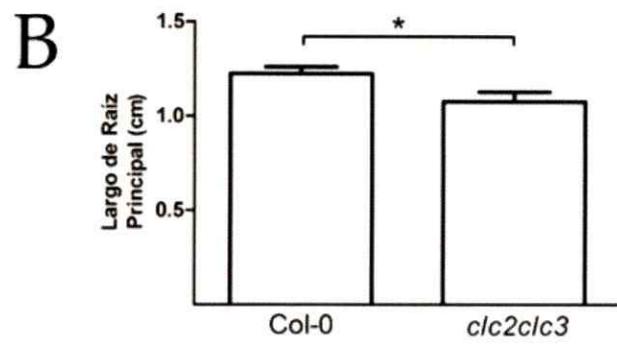
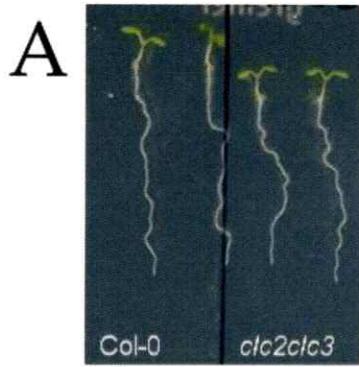
estructuras luminales de tipo anillo acompañadas de una red tubular (asterisco amarillo, cabezas de flecha amarilla y azul, respectivamente en Figura 19C). En contra parte, en atricoblastos de la línea *clc2clc3* se observaron múltiples estructuras luminales de tipo anillo de pequeño tamaño y en tricoblastos se observaron estructuras de morfología equivalente, pero dispersas y en menor número (cabezas de flechas amarillas en Figura 19D).

En la zona de elongación vacuolas de atricoblastos de plántulas silvestres presentaron una estructura central multilobulada, y se observó en tricoblastos estructuras luminales de tipo anillo, de mayor tamaño a las observadas en el meristema, acompañada de una red tubular (asterisco amarillo, cabezas de flecha amarilla y azul, respectivamente en Figura 19E). Contrastantemente, en atricoblastos de *clc2clc3* se observó una a dos estructuras ovoides ocupando gran proporción del plano celular, sumadas a múltiples estructuras de tipo anillo de diverso diámetro (asteriscos amarillos en Figura 19F). En tricoblastos se observaron estructuras luminales acompañando de una densa red de túbulos (cabezas de flecha amarilla y azul en figura 19F). Sin embargo, ambas líneas presentan una Vacuola Central configurada en la zona de diferenciación. Se observó tanto para Col-0 como para *clc2clc3* que el tonoplasto abarca la mayor parte del plano celular en este tipo de células (Figura 19G y H).

**Tabla V. Principales características del proceso de configuración vacuolar en la línea *clc2clc3* comparado a la línea silvestre.**

		<b>Col-0 (Línea silvestre)</b>	<b><i>clc2clc3</i> (Línea pérdida de función de CLC2 y CLC3)</b>
<b>MERISTEMA</b>	<b>Atri</b>	Estructura multilobulada.	Múltiples estructuras luminales de tipo anillo.
	<b>Tri</b>	Red tubular. Estructuras luminales de tipo anillo.	
<b>ZONA DE ELONGACIÓN</b>	<b>Atri</b>	Estructura multilobulada.	1 a 2 estructuras ovoides centrales. Múltiples estructuras de tipo anillo
	<b>Tri</b>	Red tubular. Estructuras luminales de tipo anillo.	Densa red tubular. Estructuras luminales de tipo anillo.
<b>ZONA DE DIFERENCIACIÓN</b>	<b>Atri</b>	Vacuola Central configurada	Vacuola Central configurada
	<b>Tri</b>		

En consecuencia, la pérdida de función de CLC2 y CLC3 impacta negativamente el proceso de configuración vacuolar en células epidermales de la raíz de *Arabidopsis*. Congruentemente, las características del proceso de configuración vacuolar en la línea doble mutante *clc2clc3* asemejan a los cambios observados tras la inducción de hub por 24 horas en la línea HUB1a (Figura 18C).



**Figura 19. La pérdida de función de *CLC2* y *CLC3* impacta negativamente el proceso de configuración vacuolar.** Se evaluó el proceso de configuración vacuolar en plántulas silvestres (Col-0) y dobles mutantes *clc2clc3* de 7 días post siembra, germinadas en presencia de sacarosa. La vacuola fue marcada por medio de FM4-64. Asteriscos amarillos, cabezas de flecha amarillas y azules indican estructuras multilobuladas, estructuras lumbales de tipo anillo y túbulos de membrana, respectivamente. Plántulas de la línea *clc2clc3* poseen un largo de raíz principal menor al de la línea silvestre (A-B). Configuración vacuolar propia de plántulas silvestres es mostrado en C, E y G. En la línea *clc2clc3* se observaron principalmente estructuras lumbales ovoides y de tipo anillo (D y F). En ambas líneas se observó una Vacuola Central configurada en células en la zona de diferenciación. Barra de tamaño indica 10µm. Las imágenes son representativas de tres réplicas experimentales independientes. Estudio estadístico realizado mediante análisis t-student: \*= $p < 0.05$ ; \*\*= $p < 0.01$ ; \*\*\*= $p < 0.001$ .

En conjunto, la manipulación farmacológica y genética reveló que el tráfico mediado por clatrina impacta la configuración vacuolar. Particularmente, nuestras observaciones indican una mayor relevancia del tráfico mediado por clatrina en etapas tempranas del proceso de configuración, dado que las principales consecuencias se observan en la morfología de la vacuola en células del meristema y la zona de elongación de la epidermis de la raíz de Arabidopsis. Por tanto, nos propusimos estudiar si la interferencia con la EMC impacta el tráfico entre la MP y la vacuola. Esta propuesta corresponde al objetivo tres de esta tesis: "Evaluación del tráfico desde MP a la vacuola frente a la modulación del tráfico mediado por clatrina".

### **5.9.- La inducción de la endocitosis mediada por sacarosa acelera el tráfico entre la MP y la vacuola.**

Nuestros resultados muestran que sacarosa promueve la internalización de MP y a su vez, sugieren, que esta inducción es mediada por la EMC. Además, sacarosa y el tráfico mediado por clatrina impactan el proceso de configuración vacuolar (Figuras

6, 12, 13, 16-19). En consecuencia, nos preguntamos si la aceleración de la internalización de MP repercute en la velocidad del tráfico endocítico a la vacuola.

Los trazadores de MP FM4-64 y FM1-43 son internalizados secuencialmente a través de los distintos compartimientos que conforman la ruta endocítica hasta alcanzar la vacuola (Emans y cols., 2002; Rigal y cols., 2015). Beneficiándonos de las diferencias en el espectro de emisión de cada fluoróforo diseñamos experimentos de doble marcaje para visualizar de mejor manera el tráfico entre la MP y la vacuola.

Plántulas de 7 días post siembra, germinadas en presencia o en ausencia de sacarosa en el medio fueron sometidas a un pulso del trazador FM1-43 (5 $\mu$ M) por 10 minutos a temperatura ambiente. Luego, se reincubaron en medio sin trazador y se mantuvieron en oscuridad por 6 horas. Esto asegura la llegada y enriquecimiento del trazador FM1-43 al tonoplasto. Finalizado este periodo de tiempo, se evaluó el y tráfico endocítico del trazador FM4-64. Luego de 60 y 120 minutos desde la incubación con FM4-64 se registró la emisión de señal de ambos fluoróforos y se estudió su colocalización en el interior de células de la epidermis de la raíz de *Arabidopsis* (Figura 4).

Se identificó el trazador FM1-43 en el tonoplasto de las plántulas crecidas en las condiciones contrastantes de sacarosa (paneles FM1-43 en Figura 20A y B). Tras 60 minutos de internalización de FM4-64 se observó el trazador en compartimientos de tipo endosomal en plántulas bajo ambas restricciones (Figura 20). Sin embargo, el número de compartimientos de tipo endosomal es mayor en presencia de sacarosa (paneles FM4-64 en Figura 20A y B).

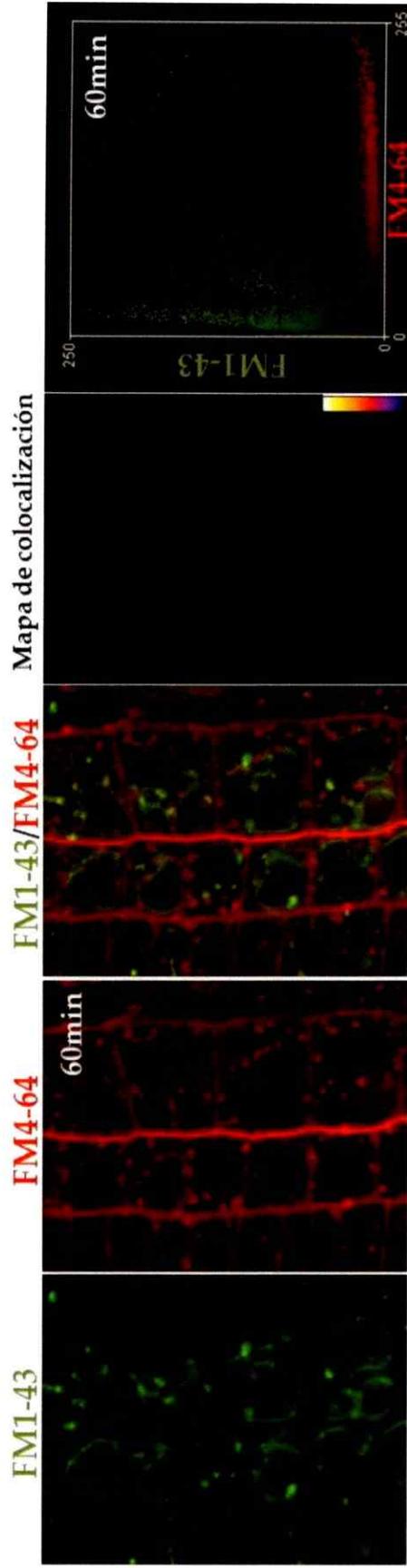
Se desarrolló un mapa de colocalización de la señal de FM1-43 y FM4-64 con objeto de visualizar el nivel y distribución de la colocalización de los trazadores. En ausencia

de sacarosa el mapa de colocación reveló que técnicamente no hay combinación de la señal de los trazadores (Figura 20A). Coherentemente, el histograma de solapamiento de las señales muestra la divergencia de la señal de FM1-43 de la de FM4-64 (Figura 20A). En contraste, el mapa de colocación mostró regiones de solapamiento de las señales en presencia de sacarosa (Figura 20B). Además, se observó en el histograma derivado de este análisis que las señales de los trazadores convergen en mayor medida respecto a la condición libre de sacarosa (Figura 20A). Las regiones que presentan un alto nivel de colocación (blanco en la escala pseudocoloreada del mapa de colocación) corresponden al tonoplasto (Figura 20B).

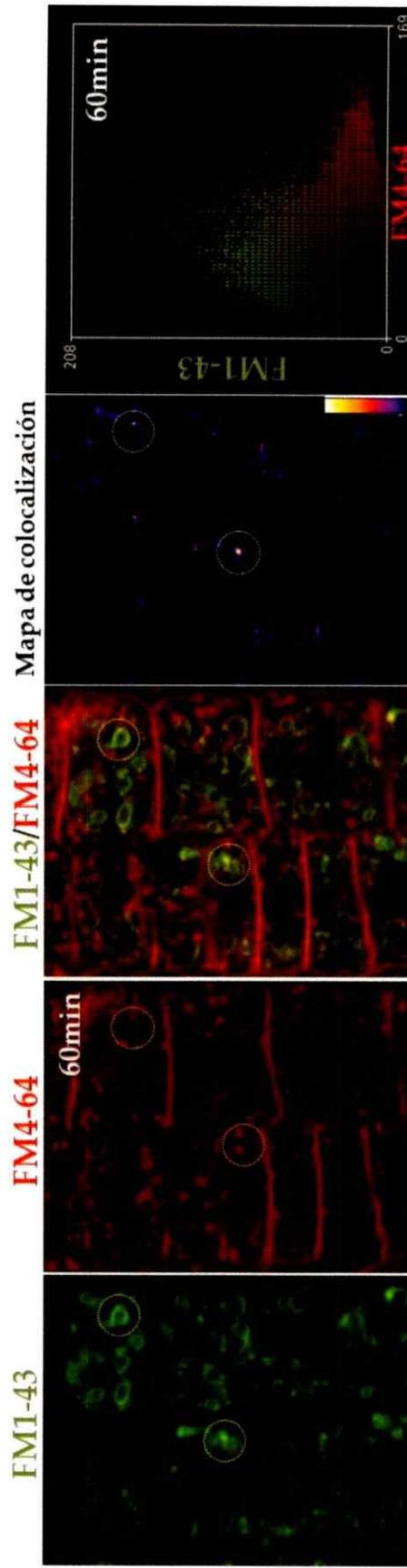
Consecuente al avance del trazador FM4-64 en la ruta endocítica, se observó tras 120 minutos que la colocación entre los trazadores aumenta en presencia y en ausencia de sacarosa. Sin embargo, aumentó más robustamente en presencia de sacarosa, resultado equivalente al obtenido tras 60 minutos.

Estos resultados dan cuenta de que la aceleración de la endocitosis mediada por sacarosa impacta la velocidad del tráfico vesicular en dirección a la vacuola.

A



B



**Figura 20. La presencia de sacarosa incrementa la velocidad con que el trazador FM4-64 es internalizado entre la Membrana Plasmática (MP) y la vacuola.** Plántulas silvestres (Col-0) fueron germinadas en ausencia o presencia de sacarosa durante 7 días. Se utilizó el trazador FM1-43 para marcar la vacuola en células de la epidermis en la raíz primaria. La internalización del trazador de Membrana Plasmática (MP) FM4-64 y su tráfico hasta la vacuola fue evaluada tras 60 minutos. Se estudió la colocalización de la señal de ambos fluoróforos (A y B). Puntos de sobreposición de las señales son mostrados a través de un mapa de colocalización. La escala de pseudocolor da cuenta de la intensidad de la colocalización dentro de la región de interés. Solo en presencia de sacarosa se aprecian punto de colocalización entre ambos fluoróforos (círculos de línea discontinua en B). Congruentemente, el histograma de cololización resultante (paneles derechos en A y B) indica el solapamiento de las señales de FM1-43 y FM4-64 bajo la condición de sacarosa (B). Barra de tamaño indica 10µm. Las imágenes presentadas son representativas de dos réplicas experimentales independientes.

#### **5.10.- Sacarosa modula los niveles de las RAB GTPasas ARA6 y ARA7.**

El tráfico vesicular requiere de una maquinaria específica altamente regulada. Dos tipos de reguladores del tráfico son conservados transversalmente entre los eucariontes: SNAREs y RAB GTPasas. Particularmente, las RAB GTPasas promueven el anclaje de una vesícula a una membrana blanco, lo que permite la subsecuente fusión de membranas mediada por proteínas del tipo SNAREs (Uemura & Ueda, 2014).

Las GTPasas ARA6 y ARA7 son requeridas para el tráfico endocítico en Arabidopsis. Localizan en la red trans-Golgi (TGN/EE) y el compartimiento prevacuolar (MVB/PVC/LE), respectivamente, y ambas colocalizan con el trazador endocítico FM4-64 (Ueda y cols., 2001; Ebine y cols., 2011; Jia y cols., 2013). Interesantemente, ARA6 y ARA7 pueden, además, localizar en el tonoplasto, sugiriendo un papel para estas GTPasas en la regulación del tráfico endocítico a la vacuola (Ebine y cols., 2011).

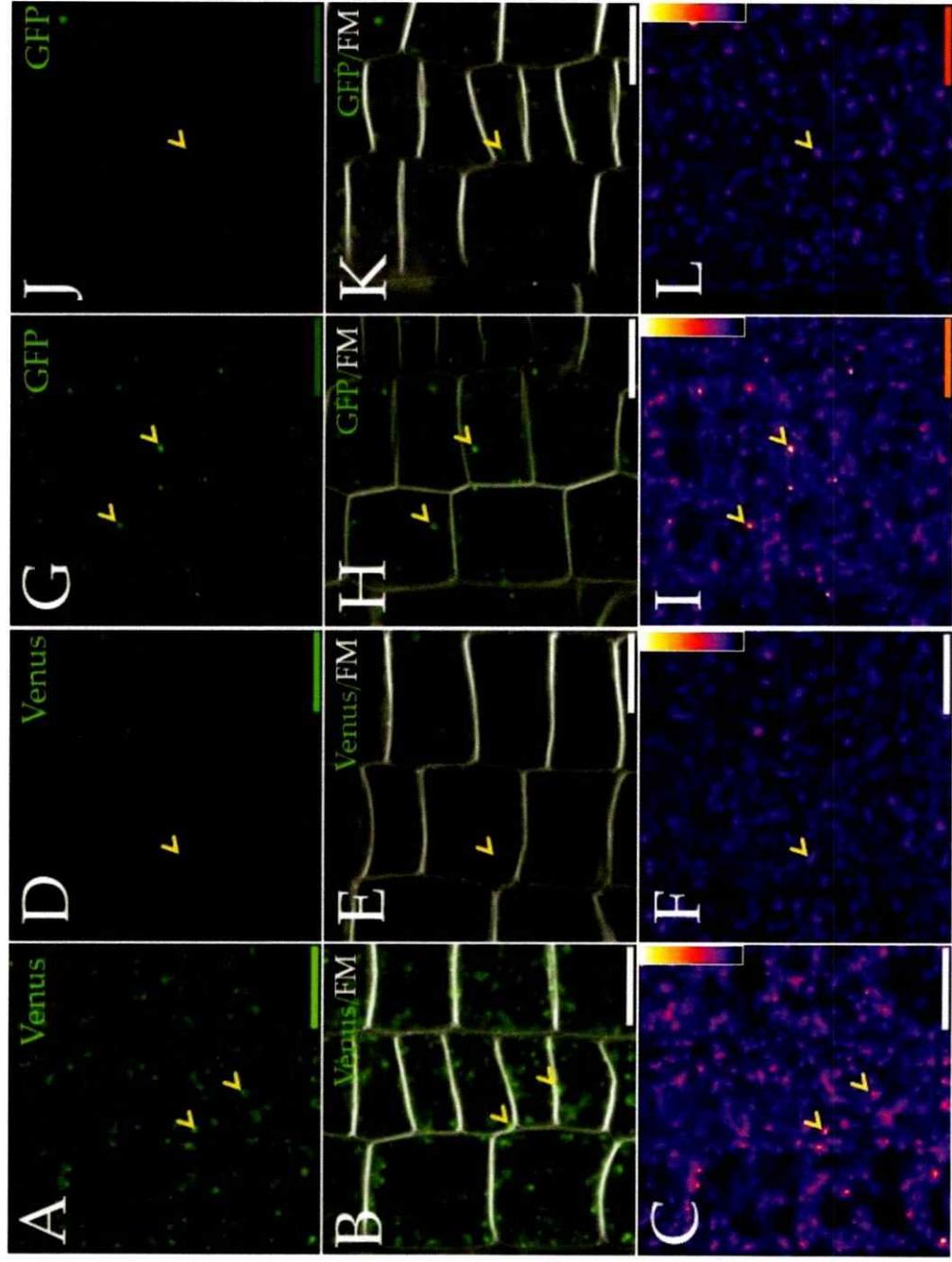
Nuestros resultados revelan que sacarosa impacta la dinámica del flujo del tráfico endocítico. Esta condición debe estar sostenida por una regulación diferencial de la

maquinaria de tráfico que participa en la ruta. Con objeto de determinar cambios en los reguladores del tráfico mediados por sacarosa se analizó la acumulación de las proteínas ARA6 y ARA7 en presencia y ausencia de este metabolito. Se utilizaron plántulas de *Arabidopsis* expresando bajo la región promotora de *ARA6* y *ARA7* las proteínas de fusión ARA6-Venus y GFP-ARA7, respectivamente. Se observó la acumulación y patrón de distribución de las proteínas reporteras GFP y Venus. FM4-64 se utilizó para delimitar la MP y establecer, de este modo, los límites intercelulares.

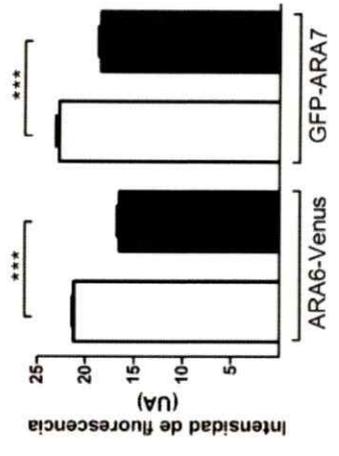
En ausencia de sacarosa se observó a ARA6-Venus en múltiples compartimiento de tipo endosomal (cabezas de flecha amarilla en Figura 21A y B). En presencia de sacarosa la proteína de fusión reside también en compartimientos de tipo endosomal (cabezas de flecha amarilla en Figura 21D y E). Sin embargo, la intensidad de señal de los compartimientos de tipo endosomal en ausencia de sacarosa es visiblemente mayor respecto a los observados en presencia de sacarosa. El perfil de intensidad de señal ARA6-Venus robustece esta observación y mostró, además, que los compartimientos de tipo endosomal presentan homogéneamente una alta intensidad ARA6-Venus en ausencia de sacarosa (Figuras 21C y F). Este resultado se confirma al cuantificar a intensidad de señal intracelular entre ambas condiciones a lo largo de la epidermis de la raíz de *Arabidopsis* donde coherentemente, en ausencia de sacarosa, se observó una mayor señal ARA6-Venus (Figura 21M).

Por otro lado, se observó que GFP-ARA7 reside en compartimientos de tipo endosomal en células epidermales de plántulas crecidas en ambas condiciones de sacarosa (cabezas de flecha amarilla en Figura 21G, H, J y K). No obstante, en ausencia de sacarosa se observó una mayor intensidad GFP-ARA7 (Figura 21G-H en contraste a 21J-K). El perfil de intensidad de señal reveló que en ausencia de sacarosa solo un grupo de endosomas presenta una alta intensidad de señal GFP-

ARA7, mientras que en presencia de sacarosa la señal es menor, pero homogénea, entre compartimientos de tipo endosomal (Figura 21I y L). Congruente a estas observaciones, la cuantificación de la señal GFP-ARA7 a lo largo de la epidermis de la raíz mostró una mayor intensidad de señal en ausencia de sacarosa respecto a la presencia de sacarosa (Figura 21M).



**M**



**Figura 21. Los niveles intracelulares de ARA6 y ARA7 disminuyen en presencia de sacarosa.** Plántulas de las líneas reporteras ARA6-Venus (A-F) y GFP-ARA7 (G-L) fueron germinadas en ausencia o presencia de sacarosa durante 7 días. El trazador FM4-64 fue utilizado para determinar la ubicación de la Membrana Plasmática (MP; B, E, H, K). El panel C, F, I, L muestran el mapa de intensidad de señal de Venus y GFP en base a una escala pseudocoloreada. M muestra la cuantificación de la señal de Venus y de GFP en ausencia (columnas blancas) o presencia (columnas negras) de sacarosa. Cabezas de flecha amarilla indican compartimientos de tipo endosomal. Bajo ambas condiciones ARA6-Venus y GFP-ARA7 presentaron una localización endosomal (A-L). Ambas proteínas se acumulan en un mayor nivel en ausencia de sacarosa (A-C y G-I; M). Barra de tamaño indica 10µm. Las imágenes son representativas de tres réplicas experimentales independientes para ARA6-Venus y dos, para GFP-ARA7. Estudio estadístico realizado mediante análisis t-student: \*=p<0.05; \*\*=p<0.01; \*\*\*=p<0.001.

Estos resultados indican que la sacarosa presente en el medio de cultivo modula reguladores del tráfico endocítico en células de la epidermis. Particularmente, la presencia de sacarosa disminuye los niveles de ARA6 y ARA7 en la epidermis de la raíz respecto a una condición libre de sacarosa.

En conjunto, este grupo de resultados muestran que sacarosa modula el flujo de membrana entre la MP y la vacuola. Además, muestran que esta modulación involucra la regulación diferencial de componentes de la maquinaria de tráfico, los que, probablemente, sostienen y permiten los cambios en el flujo de membrana.

\*

## DISCUSIÓN

El crecimiento celular permite la elongación de la raíz principal en plantas superiores, proceso esencial para la exploración del medio circundante, y por tanto, de la supervivencia del organismo. Clásicamente se ha descrito que las modificaciones en la pared celular en conjunto al establecimiento de la Vacuola Central direccionan el crecimiento celular en células vegetales. En una célula en que el proceso de crecimiento concluyó, la Vacuola Central ocupa aproximadamente el 90% del volumen celular. Si bien, existen múltiples reportes que abordan la toma de agua por parte de la Vacuola Central, mecanismo fundamental para completar su volumen, poco es conocido respecto a las fuentes de membrana que permiten su expansión. En consecuencia, el proceso de configuración vacuolar es pobremente conocido. Durante el desarrollo de esta tesis entregamos evidencias de que la internalización de MP y particularmente el tráfico mediado por clatrina se relaciona directamente con la expansión del tonoplasto durante el proceso de configuración vacuolar. La EMC, podría cumplir un papel en el proceso direccionando componentes de membrana a través de la ruta endocítica hacia la vacuola.

### **6.1.- Sacarosa es un regulador de la EMC en la epidermis de la raíz de Arabidopsis**

El nivel de carbono asimilado durante la fotosíntesis es determinante en la regulación del crecimiento de la raíz de Arabidopsis. Sacarosa, principal producto del proceso fotosintético, representa una unidad de movilización de carbono desde los órganos fotosintéticamente activos a los órganos sumideros heterotróficos, pero también constituye un señalizador, necesario y suficiente, para conducir el crecimiento de la raíz principal (Kircher & Schopfer, 2012).

El sistema vascular es responsable de la conducción de sacarosa a través de las largas distancias que separan el sistema aéreo, fotosintéticamente activo, del sistema subterráneo heterotrófico. Una vez alcanzado el órgano sumidero la movilización de sacarosa está restringida a dos rutas: simplástica o apoplástica. En la ruta simplástica, sacarosa se mueve pasivamente célula a célula a través de plasmodesmos que conectan el sistema vascular y las células del órgano sumidero. En contraste, en la ruta apoplástica sacarosa es liberada al apoplasto, desde donde es ingresada a la célula por medio de transportadores de sacarosa residentes en la MP (Sauer, N. 2007; Kühn & Grof, 2010). En la raíz de *Arabidopsis* se han identificado transportadores de sacarosa en el sistema vascular, tanto como en la MP de las células que forman parte del órgano sumidero (Barker y cols., 2000; Sivitz y cols., 2007; Sivitz y cols., 2008). Interesantemente, se demostró que la entrega de sacarosa a la punta de la raíz tiene lugar simplásticamente, sugiriendo que los transportadores de sacarosa de MP en esta región de la raíz cumplen un papel independiente a la toma de sacarosa desde el órgano fuente (Stadler y cols., 2005).

Nosotros detectamos que la presencia de sacarosa en el medio de crecimiento acelera la internalización de MP en células de la epidermis de la raíz. Esta observación es coherente a la aceleración de la endocitosis inducida por sacarosa en cultivos de células en suspensión generadas a partir de la raíz de *Acer pseudoplatanus* (Etxeberria y cols., 2005) demostrando que este proceso es independiente del contexto celular en la raíz. En condiciones naturales sacarosa no es parte del medio circundante a la región de crecimiento del sistema subterráneo, sin embargo, el propio sistema de raíces libera una cantidad significativa del carbono asimilado por la planta con objeto de establecer relaciones beneficiosas con microorganismos (Jaeger y cols., 1999; Vargas y cols., 2009). Probablemente, la

liberación de sacarosa al medio extracelular sea regulada finamente, debido a los requerimientos de sacarosa en el metabolismo celular, tanto como resultado del papel de sacarosa en el establecimiento de las interacciones microbianas (Baudoin y cols., 2003; Vargas y cols., 2009). En nuestras condiciones experimentales el medio de crecimiento enriquecido en sacarosa homologa el contexto en el que el sistema radicular ha liberado una alta cantidad de este fotosintato al espacio extracelular, en consecuencia, la aceleración de la endocitosis observada en la epidermis de la raíz, podría constituir un mecanismo regulatorio con objeto de disminuir proteínas residentes en la MP que favorecen la liberación de sacarosa, por ejemplo, transportadores de sacarosa.

El ingreso de sacarosa a células de la raíz de *A. pseudoplatanus* cultivadas en suspensión es mediado por transportadores, pero además sacarosa es directamente cargada e internalizada en el lumen de vesículas desde el espacio extracelular y dirigida a la vacuola, sin embargo, el mecanismo no se restringe a sacarosa, por lo que otros componentes del espacio extracelular son ingresados indiferenciadamente (Etxeberria y cols., 2005). La validez de este resultado en la epidermis de *Arabidopsis* queda por ser demostrado, no obstante, este fenómeno es coherente a la regulación de la concentración de sacarosa en la rizosfera, asegurando, por una parte, la disminución de sacarosa del espacio extracelular a una escala mayor a la permitida por los transportadores de sacarosa, y además, su compartimentación en un organelo que participa normalmente en el almacenaje de carbono asimilado (Doil y cols., 1979). Por otro lado, debido a que sacarosa es distribuida a las células de la raíz simplásticamente, esta observación es también coherente con un mecanismo de regulación del nivel de sacarosa extracelular independiente de transportadores de sacarosa.

En cualquiera de estos contextos, la aceleración en la internalización de MP debe ser sostenida por medio de la regulación de un mecanismo endocítico. En plantas, la EMC es el principal mecanismo de endocitosis (Chen y cols., 2011). Múltiples vías de señalización esenciales para la sobrevivencia y desarrollo de la planta son moduladas a través de la internalización de proteínas residentes en la MP por medio de la maquinaria de clatrina, entre las que se cuentan la respuesta a patógenos, balance de nutrientes y señalización hormonal (Dhonukshe y cols., 2007; Leborgne-Castel y cols., 2008; Barberon y cols., 2011; Irani y cols., 2012). Para aproximarnos a una posible regulación de la EMC mediada por sacarosa, estudiando algunos componentes centrales dentro de la maquinaria requerida en este proceso endocítico. Nuestros resultados revelan que sacarosa disminuye la señal en la MP de las proteínas reporteras CLC2-GFP y  $\mu$ 2-YFP cuya expresión es comandada por sus elementos regulatorio endógenos. Diversas evidencias en modelos no vegetales indican que CLC cumple un papel regulatorio en la formación de VCC (Mooibroek y cols., 1987; Näthkey cols., 1990; Brodsky y cols., 1991; Chu y cols., 1996). Por otro lado, la subunidad,  $\mu$ 2 del complejo adaptador AP2, es responsable de la selección de cargos específicos de MP regulando, por tanto, su internalización (Olusanya y cols., 2001; Chapa-y-Lazo & Ayscough, 2014). La disminución simultánea de la MP de ambos ejes regulatorio de la EMC, sumado a la aceleración en la internalización del trazador FM4-64, señala, en primer lugar, que sacarosa modula la internalización de MP a través de la EMC y, además, sugiere que sacarosa impacta la cinética de formación de VCC. Este supuesto sustenta por qué ambas proteínas de fusión no se encuentran enriquecidas en la MP, pues rápidamente serían redistribuidas entre la VCC escindida, el reservorio citoplasmático de proteínas requeridas para la EMC y la MP.

En contra parte a la disminución de la señal CLC2-GFP en la MP, nuestras observaciones revelan un incremento de la señal de esta proteína de fusión a nivel intracelular. Fundamentalmente, se observó que CLC2-GFP está enriquecida en compartimiento de tipo endosomal. La localización de CLC2 en este tipo de compartimientos ya ha sido reportada (Lam y cols., 2007; Ito y cols., 2012) sin embargo, la funcionalidad de CLC en Endosomas Tempranos o Red Trans-Golgi (EE/TGN), sigue siendo tema de debate en células vegetales (Robinson & Pimpl, 2014). El tráfico vesicular converge en el EE/TGN, no obstante, la movilización de vesículas en dirección a compartimientos tardíos es acotada, pues el propio EE/TGN madura en un compartimiento tardío el cual finalmente se fusiona con la vacuola (Scheuring y cols., 2011). Los niveles de CLC2-GFP observados, por tanto, podrían mediar una ruta de reciclaje entre el EE/TGN y la MP.

Intrigantemente, los niveles de CHC se ven inalterados en presencia de sacarosa. Esto nos sugiere que la modulación de sacarosa de la endocitosis está centrada en elementos regulatorios, por sobre elementos únicamente estructurales de la maquinaria requerida para la EMC. Además, encontramos que la expresión de los genes que codifican las cadenas livianas y pesadas de clatrina, en *Arabidopsis*, no presentan diferencias significativas en presencia de sacarosa, indicativo de que de sacarosa impacta CLC2 y  $\mu 2$  a través de un mecanismo post-traducciona. Apoyando esta hipótesis, se han reportados en plantas procesos fisiológicos, dependientes de hormonas, que gatillan la re-distribución subcelular de clatrina por una vía post-traducciona, manteniendo imperturbables los niveles de transcritos de los genes que codifican las proteínas centrales de la EMC (Wang y cols., 2013; Wang y cols., 2016).

Finalmente, la inducción de la EMC por sacarosa podría dar cuenta de una vía de señalización específica en la epidermis de la raíz de *Arabidopsis* en contraste a la

toma indiscriminada de componentes del espacio extracelular por medio de vesículas. Interesantemente, sacarosa gatilla la fosforilación e internalización mediada por clatrina del receptor de tipo kinasa SIRK1, el cual regula la fosforilación del transportador de sacarosa de MP SWEET11 (Wu y cols., 2013). Si bien, SWEET11 ha sido caracterizado solo durante el desarrollo del embrión de Arabidopsis, otros transportadores de sacarosa son putativos candidatos para ser internalizados a través de la EMC en la epidermis de la raíz (Chen y cols., 2015). En la punta de la raíz el transportador de sacarosa SUC3/SUT2 presenta una alta expresión, SUC3/SUT2 difiere de otros transportadores de sacarosa en un amplio dominio citoplasmático el cual cuenta con putativos dominios regulatorio cuya función no ha sido validada (Barker y cols., 2000; Meyer y cols., 2004). Coherentemente, en la raíz de tomate (*Solanum lycopersicum*) S/SUT2, homólogo de SUC3/SUT2, es internalizado en compartimientos de tipo endosomal durante la colonización de micorrizas (Bitterlich y cols., 2014). En conjunto estas evidencias refuerzan el papel de sacarosa como señalizador fisiológico y sugieren fuertemente que el mecanismo regulatorio subyacente requiere la endocitosis, particularmente la EMC.

## **6.2.- El tráfico dependiente de clatrina impacta la complejidad estructural de la vacuola.**

Distintas estructuras derivadas del tonoplasto han sido descritas. Nosotros observamos que a lo largo del meristema y la zona de elongación de la epidermis de la raíz, en ausencia de sacarosa, las vacuolas presentaron una única estructura luminal, acompañadas ocasionalmente por pequeñas estructuras reminiscentes a anillos. En contraste, en presencia de sacarosa, las vacuolas observadas se configuran como una estructura altamente plegada en la que se distingue una a dos estructuras centrales de morfología lobulada. Particularmente, en tricoblastos se

observó, sólo en presencia de sacarosa, que las estructuras lumbales están acompañadas por una red de estructuras tubulares. Estos resultados muestran que la presencia de sacarosa se relaciona directamente con la complejidad estructural de la vacuola en etapas tempranas del proceso de configuración vacuolar. Nuestros resultados indican que sacarosa modula el tráfico mediado por clatrina, por tanto, estudiamos la configuración vacuolar ante la perturbación química y genética de este proceso.

Vacuolas de células epidermales de la raíz, en presencia de sacarosa, bajo tratamiento con el inhibidor de la EMC TyrA23, pierden la configuración multilobulada y altamente plegada del tonoplasto previamente descrita. Estas vacuolas presentan una morfología circular que carece de estructuras complejas de membranas, tales como hebras trans-vacuolares o bulbs. Se observó, además, que la severidad del cambio en la morfología de la vacuola se restringe a la dosis y tiempo de tratamiento con TyrA23. Congruentemente, bajo la expresión de HUB, dominante negativo de CHC, o ante la pérdida de función de CLC2 y de CLC3 las vacuolas se configuraron mayoritariamente como estructuras lumbales centrales poco o nulamente lobuladas acompañadas por pequeñas estructuras reminiscentes a anillos.

Los organismos unicelulares *Saccharomyces cerevisiae* y *Dictyostelium discoideum* (ameba) poseen compartimientos líficos de tipo vacuola que ocupan una gran proporción del volumen celular. En ambos casos la pérdida de distintos componentes de la maquinaria de EMC no es letal, sin embargo, conduce a defectos en el crecimiento celular y notorias alteraciones en la morfología del compartimiento vacuolar (Payne y cols., 1988; Chu y cols., 1996; Macro y cols., 2012). En conjunto a nuestras observaciones, es posible sugerir que el tráfico mediado por clatrina cumple

transversalmente un papel en la configuración de organelos de tipo vacuolar en eucariontes.

En *Arabidopsis thaliana* reside en la MP y en el EE/TGN (Lam y cols., 2007; Ito y cols., 2012). Por tanto, los cambios observados en la morfología de la vacuola podrían dar cuenta de la alteración del tráfico secretorio que media la entrega de componentes estructurales y funcionales de este organelo a través de VCC provenientes del EE/TGN, sin embargo, esta ruta de tráfico es controversial en células vegetales (Robinson & Pimpl, 2014). En gran medida el tráfico mediado por clatrina desde el EE/TGN en dirección a la vacuola se fundamenta en el estudio del tráfico de las proteínas VSR (RECEPTOR DE SORTIN VACUOLAR) las cuales, teóricamente, ciclan entre el EE/TGN y el MVB/PVC/LE (Robinson y cols., 2012). VSR fue detectado en fracciones celulares ricas en VCC generadas a partir de hipocotilos de arvejas, posteriormente, se identificó a VSR en VCC del EE/TGN en *Arabidopsis* (Kirsch y cols., 1994; Hinz y cols., 2007). Sin embargo, reportes posteriores dieron cuenta de VSR en la MP, además, de identificarse motivos de internalización dependientes del complejo adaptador AP2 en el dominio citoplasmático de esta proteína (Saint-Jean y cols., 2010; Wang y cols., 2011). Al mismo tiempo, el tráfico mediado por clatrina desde el EE/TGN ha sido desestimado en base a tres evidencias. Primero, se demostró que el EE/TGN madura directamente en un MVB/PVC/LE, por lo que una ruta anterógrada entre ambos compartimientos sería innecesaria. Segundo, la expresión del dominante negativo de la cadena pesada de clatrina, HUB, no inhibe el transporte de proteínas vacuolares (Scheuring y cols., 2011). Por último, el tráfico mediado por clatrina desde el EE/TGN se sustenta en el reconocimiento de VSR por parte del complejo adaptador AP1. Se ha asumido ampliamente que AP1 participa en la carga de proteínas en VCC a nivel del EE/TGN para su destinación a

compartimentos endosomales tardíos. Particularmente, la interacción y requerimiento de AP1 para la localización de proteínas residentes en el tonoplasto y el lumen vacuolar fue mostrada. Sin embargo, la interacción entre AP1 y clatrina no ha sido demostrada *in vivo*, solo reportándose la colocalización parcial entre la subunidad AP1M2 del complejo AP1 y CHC. Interesantemente, la pérdida de función de AP1M2 conduce a serios defectos en el crecimiento celular y de planta completa, asociados al papel de AP1M2 durante la división celular, sin embargo, la configuración de la tonoplasto es normal en la línea pérdida de función de esta subunidad (Teh y cols., 2013; Park y cols., 2013; Wang y cols., 2014). Estos resultados sugieren que AP1 participaría en el reconocimiento y reclutamiento de proteínas cargos en el subdominio del EE/TGN que madura en un compartimiento tardío. En conjunto, estas evidencias han gatillado que se sugiera que la población de clatrina residente en el EE/TGN participa en el reciclaje de proteínas a la MP, en contraste al putativo papel de tráfico entre el EE/TGN y endosomas tardíos (Robinson & Pimpl, 2014).

En consideración a lo anterior, nuestros resultados muestran que la morfología, particularmente la complejidad estructural, de la vacuola tiene relación directa con la funcionalidad de la EMC.

Llamativamente, nosotros observamos que de manera dosis dependiente el tratamiento crónico con TyrA23 gatilló cambios en la morfología vacuolar distintos a los observados en tratamientos agudos. Como previamente hemos descrito, la configuración vacuolar observada en tratamientos agudos con TyrA23 es comparable a la observada ante la disrupción genética del tráfico mediado por clatrina. Es probable que la prolongada exposición de las plántulas a TyrA23 condicione programas transcripcionales que impacten la morfología de la vacuola. La modulación transcripcional de componentes de tráfico ya ha sido reportada y revisada (Pizarro &

Norambuena, 2014). En esta línea, por ejemplo, se ha reportado que la fitohormona auxina restringe la morfología vacuolar modulando los niveles de la syntaxina VT111, requerida para la fusión de compartimientos tardíos con la vacuola (Löfke y cols., 2015). Nosotros observamos que una alta concentración de TyrA23 promueve la aparición de estructuras complejas de membrana como bulbs y hebras transvacuolares cuya biogénesis depende de componentes de tráfico vesicular (Saito y cols., 2011). Observación que respalda la idea de la modulación de componentes de tráfico para dar cuenta de los cambios morfológicos de la vacuola observados en el tratamiento crónico con TyrA23. Por otro parte, se reportó que la exposición prolongada a TyrA23 media la acidificación citoplasmática (Dejonghe y cols., 2016). Si bien, no se ha relacionado la morfología vacuolar con el pH citoplasmático, no es posible descartar que los cambios observados en el tratamiento crónico con TyrA23 tengan lugar como resultado del cambio del pH intracelular.

### **6.3.- El proceso de configuración vacuolar requiere del tráfico mediado por clatrina**

La modulación del tráfico endocítico mediante la disponibilidad de sacarosa en el medio de cultivo o la disrupción genética o química (TyrA23) del tráfico mediada por clatrina conducen a cambios en la morfología de la vacuola en el meristema y la zona de elongación de la epidermis de la raíz. Sin embargo, en cada uno de estos casos se observó indistintamente el establecimiento de una Vacuola Central en células completamente diferenciadas. Nosotros observamos que la principal restricción en la morfología vacuolar gatillada por la inhibición del tráfico dependiente de clatrina es la pérdida de complejidad estructural del tonoplasto, particularmente, la disminución de estructuras lobuladas y tubulares altamente plegadas, incluyendo hebras transvacuolares y bulbs.

Las estructuras de membrana derivadas del tonoplasto sufren continuas transformaciones que dan cuenta de la complejidad y dinamismo de la vacuola. Se ha sugerido que estas estructuras constituyen reservorios de membrana que sustentan cambios rápidos en el volumen de la vacuola, permitiendo, en consecuencia, cambios en el volumen celular (Saito y cols., 2002; Tanaka y cols., 2007). Por ejemplo, en células de la guarda en *Vicia faba* el cierre estomal está mediado y determinado por la fisión de múltiples estructuras vacuolares a partir de una Vacuola Central, inversamente, las múltiples estructuras vacuolares se fusionan originando una Vacuola Central que incrementa el volumen celular y, en consecuencia, gatilla la apertura estomal (Gao y cols., 2005). De manera muy relevante, la reconstrucción tridimensional de la vacuola de células de guarda durante el cierre estomático en *Arabidopsis* reveló que la vacuola incrementa su superficie y se enriquece en estructuras internas de membrana de forma coordinada a la disminución en la superficie de la MP y, además, durante el proceso, la internalización del trazador FM4-64 está acelerada (Tanaka y cols., 2007). Finalmente, estructuras trans-vacuolares y bulbs detalladas en cotiledones e hipocotilos de *Arabidopsis* fueron preferentemente observadas en células en crecimiento apoyando, por tanto, la hipótesis de reservorios de membrana que permitan un rápido establecimiento de una Vacuola Central durante el crecimiento celular (Saito y cols., 2002).

En este contexto podemos sugerir que el tráfico mediado por clatrina contribuye con el establecimiento de estructuras complejas de membranas continuas al tonoplasto o el propio incremento de superficie del tonoplasto, para permitir una rápida configuración de la Vacuola Central. Apoyando este supuesto, la interferencia con el tráfico mediado por clatrina no impacta el establecimiento de la Vacuola Central, pues sería dispensable en su morfogénesis, pero requerida para modular la dinámica de

su establecimiento. Coherentemente, la vacuola tiene como fuente inicial de membrana al Retículo Endoplásmico (ER) (Viotti y cols., 2013) y podría sustentar su configuración en ausencia del tráfico mediado por clatrina con otras fuentes de membrana derivadas del tráfico secretorio.

Finalmente, si el tráfico mediado por clatrina regula la dinámica de configuración de la Vacuola Central, la perturbación de esta ruta de tráfico vesicular impactaría el crecimiento celular y en consecuencia el crecimiento del órgano completo. En relación a esto, nosotros observamos que el inductor de la EMC, sacarosa, altera los parámetros de crecimiento celular en la epidermis de la raíz respecto a una condición libre de sacarosa. En presencia de este fotosintato la raíz principal es más larga y, congruentemente, en las líneas en que el tráfico mediado por clatrina ha sido interferido, la raíz principal es más corta.

#### **6.4.- El proceso de configuración vacuolar requiere del tráfico endosomal entre la MP y la vacuola.**

Nuestros resultados muestran que, en presencia de sacarosa, FM4-64 alcanza el tonoplasto de manera acelerada en comparación a una condición libre de sacarosa. Además, en esta condición experimental observamos una menor expresión de las RAB GTPasas ARA6 y ARA7, requeridas para el tráfico a la vacuola, respecto a la condición libre de sacarosa. Este resultado, sorpresivamente, revela un mecanismo de regulación dependiente de sacarosa para estas proteínas previamente no informado en células vegetales. Interesantemente, se ha reportado en células de mamíferos que sacarosa impacta la morfología del lisosoma. Además, en este modelo, sacarosa gatilla cambios en la expresión de genes esenciales tanto en la homeostasis de este organelo como en múltiples genes de tráfico vesicular (Helip-

Wooley & Thoene, 2004). En conjunto, estos resultados sugieren que sacarosa de manera conservada en eucariontes participa como regulador del tráfico endocítico a nivel transcripcional.

Por otro lado, el análisis transcriptómico global de líneas de *Arabidopsis* con pérdida de función de ARA6 reveló incrementos en la expresión de genes que participan en la síntesis de almidón. Coherentemente, estas plantas presentan altos niveles de glucosa y almidón respecto a plantas silvestres (Tsutsui y cols., 2015). Estos resultados no solo dan cuenta del papel del tráfico de endomembranas en funciones celulares centrales, como el metabolismo de azúcares, sino que además, muestran que vías particulares de tráfico pueden impactar programas específicos de expresión génica.

En el contexto de nuestros experimentos, bajo distintas suplementaciones de sacarosa, sugerimos que los niveles de ARA6 y ARA7 actúan como punto de control para el tráfico vesicular en dirección a la vacuola. Coherentemente, se ha mostrado que el papel funcional de estas GTPasas es dinámico pudiendo participar en más de una vía de tráfico vesicular bajo restricciones fisiológicas y celulares específicas (Ebine y cols., 2011).

A modo de síntesis, nuestros resultados nos sugieren que el tráfico mediado por clatrina contribuye como una de las fuentes de membrana para abastecer la expansión del tonoplasto durante el proceso de configuración vacuolar. Para ello requiere de la maquinaria de tráfico en dirección a la vacuola, observación coherentemente con la biogénesis de los compartimientos tardíos a partir del EE/TGN, primer punto que alcanza el material endocitado en la célula vegetal (Viotti y cols., 2013). Particularmente, la presencia de sacarosa en el medio de crecimiento

puede homologar una situación de desarrollo favorable para la plántula, en donde tras activarse la vía de señalización correspondiente, impacta positivamente la síntesis de membrana. Esta membrana tras ser dirigida a través de la vía secretoria a la MP, en conjunto con proteínas residentes de este compartimento, puede ser redirigida a la vacuola para sostener coordinadamente el crecimiento celular a través del proceso de configuración vacuolar. Reforzando este modelo, dentro del Sistema de Endomembranas de la célula vegetal, la composición lipídica de la MP y el tonoplasto es altamente similar (Yoshida & Uemura, 1986).

## CONCLUSIONES

Los resultados presentados y discutidos en este trabajo permiten establecer como principales conclusiones:

- 1.- La disponibilidad de sacarosa en el medio de cultivo de plántulas de Arabidopsis regula la EMC en células de la epidermis de la raíz.
- 2.- El tráfico mediado por clatrina, particularmente la EMC, es requerido para el proceso de configuración vacuolar en etapas tempranas (vacuolas en meristema y zona de elongación), pero no afecta el establecimiento final de la Vacuola Central.
- 3.- La presencia de sacarosa acelera el tráfico entre la MP y la vacuola.
- 4.- La complejidad estructural de la vacuola en correlación a la EMC nos permite sugerir que el tráfico endocítico podría sustentar la configuración vacuolar promoviendo el establecimiento de estructuras complejas de membrana derivadas del tonoplasto para permitir una rápida configuración de la Vacuola Central.

## PROYECCIONES

1.- Durante el desarrollo de esta tesis nosotros mostramos que la suplementación de sacarosa en el medio de crecimiento modula componentes regulatorios y estructurales de la EMC. Sin embargo, es necesario definir si estos cambios involucran la internalización de proteínas residentes en la MP o se limitan a la internalización de membrana libre de cargos. De este modo esperamos poder ahondar en el mecanismo mediante el cual la endocitosis impacta el proceso de configuración vacuolar.

2.- El estudio de líneas de Arabidopsis pérdidas de función en componentes requeridos de manera exclusiva en la EMC, tales como la subunidad  $\mu 2$  del complejo AP2 o la dinamina DRP1A (Collings y cols., 2008; Kim y cols., 2013), nos permitirán establecer de manera indiscutible la correlación directa entre la EMC y el proceso de configuración vacuolar en la epidermis de la raíz.

3.- A través de la cuantificación de la membrana vacuolar a lo largo del proceso de configuración vacuolar ante la modulación de la EMC esperamos determinar si el tráfico endocítico impacta la configuración de la Vacuola Central modulando la cantidad de membrana vacuolar.

## BIBLIOGRAFÍA

- Adlassnig, W., Koller-Peroutka, M., Bauer, S., Koshkin, E., Lendl, T., Lichtscheidl, I.K. (2012) Endocytotic uptake of nutrients in carnivorous plants. *Plant J.* 71(2):303-313.
- Andersen, C.L., Jensen, J.L., Ørntoft, T.F. (2004) Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res.* 64(15):5245-5250.
- Anderson, R.G., Kamen, B.A., Rothberg, K.G., Lacey, S.W. (1992) Potocytosis: sequestration and transport of small molecules by caveolae. *Science* 255(5043):410-411.
- Barker, L., Kühn, C., Weise, A., Schulz, A., Gebhardt, C., Hirner, B., Hellmann, H., Schulze, W., Ward, J.M., Frommer, W.B. (2000) SUT2, a putative sucrose sensor in sieve elements. *Plant Cell* 12(7):1153-1164.
- Bashline, L., Li, S., Anderson, C.T., Lei, L., Gu, Y. (2013) The endocytosis of cellulose synthase in *Arabidopsis* is dependent on  $\mu$ 2, a clathrin-mediated endocytosis adaptin. *Plant Physiol.* 163(1):150-160.
- Banbury, N., Oakley, J., Sessions, R., Banting, G. (2003) Tyrphostin A23 inhibits internalization of the transferring receptor by perturbing the interaction between tyrosine motifs and the medium chain subunit of the AP-2 adaptor complex. *J. Biol. Chem.* 278: 12022–12028.
- Barberon, M., Zelazny, E., Robert, S., Conéjéro, G., Curie, C., Friml, J., Vert, G. (2011) Monoubiquitin-dependent endocytosis of the iron-regulated transporter 1 (IRT1) transporter controls iron uptake in plants. *PNAS* 108(32):E450-458.
- Barker, L., Kühn, C., Weise, A., Schulz, A., Gebhardt, C., Hirner, B., Hellmann, H., Schulze, W., Ward, J.M., Frommer, W.B. (2000) SUT2, a putative sucrose sensor in sieve elements. *Plant Cell* 12(7):1153-1164.
- Baudoin, E., Benizri, E., Guckert, A. (2003) Impact of artificial root exudates on the bacterial community structure in bulk soil and maize rhizosphere. *Soil Biol. Biochem.* 35:1183-1192.
- Beemster, G.T., Baskin, T.I. (1998) Analysis of cell division and elongation underlying the developmental acceleration of root growth in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 116(4):1515-1526.
- Berger, F., Hung, C.Y., Dolan, L., Schiefelbein, J. (1998) Control of cell division in the root epidermis of *Arabidopsis thaliana*. *Dev. Biol.* 194(2):235-245.
- Bitterlich, M., Krügel, U., Boldt-Burisch, K., Franken, P., Kühn, C. (2014) The sucrose transporter SISUT2 from tomato interacts with brassinosteroid functioning and affects arbuscular mycorrhiza formation. *Plant J.* 78(5):877-889.
- Bolte, S., Talbot, C., Boutte, Y., Catrice, O., Read, N., Satiat-Jeunemaitre, B. (2004) FM dyes as experimental probes for dissecting vesicle trafficking in living plant cells. *J. Microsc.* 214(Pt 2):159-173.
- Brodsky, F.M., Hill, B.L., Acton, S.L., Näthke, I., Wong, D.H., Ponnambalam, S., Parham, P. (1991) Clathrin light chains: arrays of protein motifs that regulate coated-vesicle dynamics. *Trends Biochem. Sci.* 16(6):208-213.

- Chapa-y-Lazo, B., Ayscough, K. R. (2014) Apm4, the mu subunit of yeast AP-2 interacts with Pkc1, and mutation of the Pkc1 consensus phosphorylation site Thr176 inhibits AP-2 recruitment to endocytic sites. *Commun. Integr. Biol.* 7: e28522.
- Chen, X., Irani, N.G., Friml, J. (2011) Clathrin-mediated endocytosis: the gateway into plant cells. *Curr. Opin. Plant Biol.* 14(6):674-682.
- Chen, L.Q., Lin, I.W., Qu, X.Q., Sosso, D., McFarlane, H.E., Londoño, A., Samuels, A.L., Frommer, W.B. (2015) A cascade of sequentially expressed sucrose transporters in the seed coat and endosperm provides nutrition for the Arabidopsis embryo. *Plant Cell* 27(3):607-619.
- Chu, D.S., Pishvaei, B., Payne, G.S. (1996) The light chain subunit is required for clathrin function in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 271(51):33123-33130.
- Coleman, J., Evans, D., Hawes, C. (1988) Plant coated vesicles. *Plant Cell Envir.* 11(8):669-684.
- Collings, D.A., Gebbie, L.K., Howles, P.A., Hurley, U.A., Birch, R.J., Cork, A.H., Hocart, C.H., Arioli, T., Williamson, R.E. (2008) Arabidopsis dynamin-like protein DRP1A: a null mutant with widespread defects in endocytosis, cellulose synthesis, cytokinesis, and cell expansion. *J. Exp. Bot.* 59(2):361-376.
- Crump, C.M., Williams, J.L., Stephens, D.J., Banting, G. (1998) Inhibition of the interaction between tyrosine-based motifs and the medium chain subunit of the AP-2 adaptor complex by specific tyrostophins. *J. Biol. Chem.* 273(43):28073-28077.
- Cutler, S.R., Ehrhardt, D.W., Griffiths, J.S., Somerville, C.R. (2000) Random GFP::cDNA fusions enable visualization of subcellular structures in cells of Arabidopsis at a high frequency. *PNAS* 97(7):3718-3723.
- Di Rubbo, S., Irani, N.G., Kim, S.Y., Xu, Z.Y., Gadeyne, A., Dejonghe, W., Vanhoutte, I., Persiau, G., Eeckhout, D., Simon, S., Song, K., Kleine-Vehn, J., Friml, J., De Jaeger, G., Van Damme, D., Hwang, I., Russinova, E. (2013) The clathrin adaptor complex AP-2 mediates endocytosis of brassinosteroid insensitive1 in Arabidopsis. *Plant Cell* 25(8):2986-2997.
- Dhonukshe, P., Aniento, F., Hwang, I., Robinson, D.G., Mravec, J., Stierhof, Y.D., Friml, J. (2007) Clathrin-mediated constitutive endocytosis of PIN auxin efflux carriers in Arabidopsis. *Curr. Biol.* 17(6):520-527.
- Dejonghe, W., Kuenen, S., Mylle, E., Vasileva, M., Keech, O., Viotti, C., Swerts, J., Fendrych, M., Ortiz-Morea, F.A., Mishev, K., Delang, S., Scholl, S., Zarza, X., Heilmann, M., Kourelis, J., Kasprovicz, J., Nguyen le, S.L., Drozdzecki, A., Van Houtte, I., Szatmari, A.M., Majda, M., Baisa, G., Bednarek, S.Y., Robert, S., Audenaert, D., Testerink, C., Munnik, T., Van Damme, D., Heilmann, I., Schumacher, K., Winne, J., Friml, J., Verstreken, P., Russinova, E. (2016) Mitochondrial uncouplers inhibit clathrin-mediated endocytosis largely through cytoplasmic acidification. *Nat. Commun.* 7:11710.
- Dolan, L., Janmaat, K., Willemsen, V., Linstead, P., Poethig, S., Roberts, K., Scheres, B. (1993) Cellular organisation of the Arabidopsis thaliana root. *Development* 119(1):71-84.
- Doll, S., Rodier, F., Willenbrink, J. (1979) Accumulation of sucrose in vacuoles isolated from red beet tissue. *Planta* 144(5):407-411.
- Ebine, K., Fujimoto, M., Okatani, Y., Nishiyama, T., Goh, T., Ito, E., Dainobu, T., Nishitani, A., Uemura, T., Sato, M.H., Thordal-Christensen, H., Tsutsumi, N., Nakano, A., Ueda, T. (2011) A

membrane trafficking pathway regulated by the plant-specific RAB GTPase ARA6. *Nat. Cell Biol.* 13(7):853-859.

Etxeberria, E., Baroja-Fernandez, E., Muñoz, F.J., Pozueta-Romero, J. (2005) Sucrose-inducible endocytosis as a mechanism for nutrient uptake in heterotrophic plant cells. *Plant Cell Physiol.* 46(3):474-481.

Emans, N., Zimmermann, S., Fischer, R. (2002) Uptake of a fluorescent marker in plant cells is sensitive to brefeldin A and wortmannin. *Plant Cell* 14(1):71-86.

Fan, L., Li, R., Pan, J., Ding, Z., Lin, J. (2015) Endocytosis and its regulation in plants. *Trends Plant Sci.* 20(6):388-397.

Gao, X.Q., Li, C.G., Wei, P.C., Zhang, X.Y., Chen, J., Wang, X.C. (2005) The dynamic changes of tonoplasts in guard cells are important for stomatal movement in *Vicia faba*. *Plant Physiol.* 139(3):1207-1216.

Han, S.W., Alonso, J.M., Rojas-Pierce, M. (2015) REGULATOR OF BULB BIOGENESIS1 (RBB1) Is Involved in Vacuole Bulb Formation in Arabidopsis. *PLoS One* 10(4):e0125621.

Hao, H., Fan, L., Chen, T., Li, R., Li, X., He, Q., Botella, M.A., Lin, J. (2014) Clathrin and Membrane Microdomains Cooperatively Regulate RbohD Dynamics and Activity in Arabidopsis. *Plant Cell* 26(4):1729-1745.

Helip-Wooley, A., Thoene, J.G. (2004) Sucrose-induced vacuolation results in increased expression of cholesterol biosynthesis and lysosomal genes. *Exp. Cell. Res.* 292(1):89-100.

Hinz, G., Colanesi, S., Hillmer, S., Rogers, J.C., Robinson, D.G. (2007) Localization of vacuolar transport receptors and cargo proteins in the Golgi apparatus of developing Arabidopsis embryos. *Traffic* 8(10):1452-1464.

Irani, N.G., Di Rubbo, S., Mylle, E., Van den Begin, J., Schneider-Pizoń, J., Hnilíková, J., Šíša, M., Buyst, D., Vilarrasa-Blasi, J., Szatmári, A.M., Van Damme, D., Mishev, K., Codreanu, M.C., Kohout, L., Strnad, M., Caño-Delgado, A.I., Friml, J., Madder, A., Russinova, E. (2012) Fluorescent castasterone reveals BRI1 signaling from the plasma membrane. *Nat. Chem. Biol.* 8(6):583-589.

Ito, E., Fujimoto, M., Ebine, K., Uemura, T., Ueda, T., Nakano, A. (2012) Dynamic behavior of clathrin in Arabidopsis thaliana unveiled by live imaging. *Plant J.* 69(2):204-216.

Jaeger, C.H., Lindow, S.E., Miller, W., Clark, E., Firestone, M.K. (1999) Mapping of sugar and amino acid availability in soil around roots with bacterial sensors of sucrose and tryptophan. *Appl. Environ. Microbiol.* 65(6):2685-2690.

Jaillais, Y., Fobis-Loisy, I., Miège, C., Gaude, T. (2008) Evidence for a sorting endosome in Arabidopsis root cells. *Plant J.* 2008 53(2):237-247.

Jia, T., Gao, C., Cui, Y., Wang, J., Ding, Y., Cai, Y., Ueda, T., Nakano, A., Jiang, L. (2013). ARA7 (Q69L) expression in transgenic Arabidopsis cells induces the formation of enlarged multivesicular bodies. *J. Exp. Bot.* 64(10):2817-2829.

Kim, Y.W., Park, D.S., Park, S.C., Kim, S.H., Cheong, G.W., Hwang, I. (2001) Arabidopsis dynamin-like 2 that binds specifically to phosphatidylinositol 4-phosphate assembles into a high-molecular weight complex in vivo and in vitro. *Plant Physiol.* 127:1243-1255.

- Kitakura, S., Vanneste, S., Robert, S., Löffke, C., Teichmann, T., Tanaka, H., Friml, J. (2011) Clathrin mediates endocytosis and polar distribution of PIN auxin transporters in Arabidopsis. *Plant Cell* 23(5):1920-1931.
- Kircher, S., Schopfer, P. (2012) Photosynthetic sucrose acts as cotyledon-derived long-distance signal to control root growth during early seedling development in Arabidopsis. *PNAS* 109(28):11217-11221.
- Kirchhausen, T., Owen, D., Harrison, S.C. (2014) Molecular structure, function, and dynamics of clathrin-mediated membrane traffic. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 6(5):a016725.
- Kirsch, T., Paris, N., Butler, J.M., Beevers, L., Rogers, J.C. (1994) Purification and initial characterization of a potential plant vacuolar targeting receptor. *PNAS* 91(8):3403-3407.
- Krüger, F., Krebs, M., Viotti, C., Langhans, M., Schumacher, K., Robinson, D.G. (2013) PDMP induces rapid changes in vacuole morphology in Arabidopsis root cells. *J. Exp. Bot.* 64(2):529-540.
- Kühn, C., Grof, C.P. (2010) Sucrose transporters of higher plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 13(3):288-298.
- Lam, S.K., Siu, C.L., Hillmer, S., Jang, S., An, G., Robinson, D.G., Jiang, L. (2007) Rice SCAMP1 defines clathrin-coated, trans-golgi-located tubular-vesicular structures as an early endosome in tobacco BY-2 cells. *Plant Cell* 19(1):296-319.
- Lanz, E., Slavík, J., Kotyk, A. (1999) 2',7'-bis-(2-carboxyethyl)-5(6)-carboxyfluorescein as a dual-emission fluorescent indicator of intracellular pH suitable for argon laser confocal microscopy. *Folia Microbiol (Praha)* 44(4):429-434.
- Leborgne-Castel, N., Bouhidel, K. (2014) Plasma membrane protein trafficking in plant-microbe interactions: a plant cell point of view. *Front Plant Sci.* 5:735.
- Leborgne-Castel, N., Lherminier, J., Der, C., Fromentin, J., Houot, V., Simon-Plas, F. (2008) The plant defense elicitor cryptogein stimulates clathrin-mediated endocytosis correlated with reactive oxygen species production in bright yellow-2 tobacco cells. *Plant Physiol.* 146(3):1255-1266.
- Liu, S.H., Marks, M.S., Brodsky, F.M. (1998) A dominant-negative clathrin mutant differentially affects trafficking of molecules with distinct sorting motifs in the class II major histocompatibility complex (MHC) pathway. *J. Cell Biol.* 140(5):1023-1037.
- Liu, S.H., Wong, M.L., Craik, C.S., Brodsky, F.M. (1995) Regulation of clathrin assembly and trimerization defined using recombinant triskelion hubs. *Cell* 83(2):257-267.
- Löffke, C., Dünser, K., Kleine-Vehn, J. (2013) Epidermal patterning genes impose non-cell autonomous cell size determination and have additional roles in root meristem size control. *J. Integr. Plant Biol.* 55(9):864-875.
- Löffke, C., Dünser, K., Scheuring, D., Kleine-Vehn, J. (2015) Auxin regulates SNARE-dependent vacuolar morphology restricting cell size. *Elife* 4.
- Löffke, C., Luschnig, C., Kleine-Vehn, J. (2013) Posttranslational modification and trafficking of PIN auxin efflux carriers. *Mech. Dev.* 130(1):82-94.
- Macro, L., Jaiswal, J.K., Simon, S.M. (2012) Dynamics of clathrin-mediated endocytosis and its requirement for organelle biogenesis in Dictyostelium. *J. Cell Sci.* 125(Pt 23):5721-5732.

- Meyer, S., Lauterbach, C., Niedermeier, M., Barth, I., Sjolund, R.D., Sauer, N. (2004) Wounding enhances expression of AtSUC3, a sucrose transporter from Arabidopsis sieve elements and sink tissues. *Plant Physiol.* 134(2):684-693.
- Moobroek, M.J., Michiel, D.F., Wang, J.H. (1987) Clathrin light chains are calcium-binding proteins. *J. Biol. Chem.* 262(1):25-8.
- Näthke, I.S., Hill, B.L., Parham, P., Brodsky, F.M. (1990) The calcium-binding site of clathrin light chains. *J. Biol. Chem.* 265(30):18621-18627.
- Näthke, I.S., Heuser, J., Lupas, A., Stock, J., Turck, C.W., Brodsky, F.M. (1992) Folding and trimerization of clathrin subunits at the triskelion hub. *Cell* 68(5):899-910.
- Olusanya, O., Andrews, P.D., Swedlow, J.R., Smythe, E. (2001) Phosphorylation of threonine 156 of the mu2 subunit of the AP2 complex is essential for endocytosis in vitro and in vivo. *Curr. Biol.* 11(11):896-900.
- Paez Valencia, J., Goodman, K., Otegui, M.S. (2016) Endocytosis and Endosomal Trafficking in Plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 67:309-335.
- Paul, M, Frigerio, L. (2007) Coated vesicles in plant cells. *Semin. Cell Dev. Biol.* 18:471-478.
- Park, M., Song, K., Reichardt, I., Kim, H., Mayer, U., Stierhof, Y.D., Hwang, I., Jürgens, G. (2013) Arabidopsis  $\mu$ -adaptin subunit AP1M of adaptor protein complex 1 mediates late secretory and vacuolar traffic and is required for growth. *PNAS* 110(25):10318-10323.
- Payne, G.S., Baker, D., van Tuinen, E., Schekman, R. (1988) Protein transport to the vacuole and receptor-mediated endocytosis by clathrin heavy chain-deficient yeast. *J. Cell Biol.* 106(5):1453-1461.
- Pedrazzini, E., Komarova, N., Rentsch, D., Vitale A. (2013) Traffic routes and signals for the tonoplast. *Traffic* 14(6):622-628.
- Pizarro, L., Norambuena, L. (2014) Regulation of protein trafficking: posttranslational mechanisms and the unexplored transcriptional control. *Plant Sci.* 225:24-33.
- Pfaffl, M.W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29(9):e45.
- Ramakers, C., Ruijter, J.M., Deprez, R.H., Moorman, A.F. (2003) Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neurosci. Lett.* 339(1):62-66.
- Richter, S., Voss, U., Jürgens, G. (2009) Post-Golgi traffic in plants. *Traffic* 10(7):819-828.
- Rigal, A., Doyle, S.M., Robert, S. (2015) Live cell imaging of FM4-64, a tool for tracing the endocytic pathways in Arabidopsis root cells. *Methods Mol. Biol.* 1242:193-103.
- Robinson, D.G., Langhans, M., Saint-Jore-Dupas, C., Hawes, C. (2008) BFA effects are tissue and not just plant specific. *Trends Plant Sci.* 13(8):405-408.
- Robinson, D.G., Pimpl, P. (2014) Clathrin and post-Golgi trafficking: a very complicated issue. *Trends Plant Sci.* 19(3):134-139.
- Robinson, D.G., Pimpl, P., Scheuring, D., Stierhof, Y.D., Sturm, S., Viotti, C. (2012) Trying to make sense of retromer. *Trends Plant Sci.* 17(7):431-439.

- Robert, S., Kleine-Vehn, J., Barbez, E., Sauer, M., Paciorek, T., Baster, P., Vanneste, S., Zhang, J., Simon, S., Čovanová, M., Hayashi, K., Dhonukshe, P., Yang, Z., Bednarek, S., Jones, A., Luschnig, C., Ariento, F., Zažímalová, E., Friml, J. (2010) ABP1 mediates auxin inhibition of clathrin-dependent endocytosis in Arabidopsis. *Cell* 143(1):111-121.
- Rosado, A., Hicks, G.R., Norambuena, L., Rogachev, I., Meir, S., Pourcel, L., Zouhar, J., Brown, M.Q., Boirdore, M.P., Puckrin, R.S., Cutler, S.R., Rojo, E., Aharoni, A., Raikhel, N.V. (2011) Sortin1-hypersensitive mutants link vacuolar-trafficking defects and flavonoid metabolism in Arabidopsis vegetative tissues. *Chem. Biol.* 18(2):187-197.
- Saint-Jean, B., Seveno-Carpentier, E., Alcon, C., Neuhaus, J.M., Paris, N. (2010) The cytosolic tail dipeptide Ile-Met of the pea receptor BP80 is required for recycling from the prevacuole and for endocytosis. *Plant Cell* 22(8):2825-2837.
- Saito, C., Ueda, T., Abe, H., Wada, Y., Kuroiwa, T., Hisada, A., Furuya, M., Nakano, A. (2002) A complex and mobile structure forms a distinct sub-region within the continuous vacuolar membrane in young cotyledons of Arabidopsis. *Plant J.* 29:245-255.
- Saito, C., Uemura, T., Awai, C., Tominaga, M., Ebine, K., Ito, J., Ueda, T., Abe, H., Morita, M.T., Tasaka, M., Nakano, A. (2011) The occurrence of 'bulbs', a complex configuration of the vacuolar membrane, is affected by mutations of vacuolar SNARE and phospholipase in Arabidopsis. *Plant J.* 68(1):64-73.
- Sauer, N. (2007) Molecular physiology of higher plant sucrose transporters. *FEBS Lett.* 581(12):2309-2317.
- Scheele, U., Holstein, S.E. (2002) Functional evidence for the identification of an Arabidopsis clathrin light chain polypeptide. *FEBS Lett.* 514(2-3):355-360.
- Scheuring, D., Schöller, M., Kleine-Vehn, J., Löffke, C. (2015) Vacuolar staining methods in plant cells. *Methods Mol. Biol.* 1242:83-92.
- Scheuring, D., Viotti, C., Krüger, F., Künzl, F., Sturm, S., Bubeck, J., Hillmer, S., Frigerio, L., Robinson, D.G., Pimpl, P., Schumacher, K. (2011) Multivesicular bodies mature from the trans-Golgi network/early endosome in Arabidopsis. *Plant Cell* 23(9):3463-3481.
- Shen, J., Zeng, Y., Zhuang, X., Sun, L., Yao, X., Pimpl, P., Jiang, L. (2013) Organelle pH in the Arabidopsis endomembrane system. *Mol. Plant.* 6(5):1419-1437.
- Sivitz, A.B., Reinders, A., Johnson, M.E., Krentz, A.D., Grof, C.P., Perroux, J.M., Ward, J.M. (2007) Arabidopsis sucrose transporter AtSUC9. High-affinity transport activity, intragenic control of expression, and early flowering mutant phenotype. *Plant Physiol.* 143(1):188-198.
- Sivitz, A.B., Reinders, A., Ward, J.M. (2008) Arabidopsis sucrose transporter AtSUC1 is important for pollen germination and sucrose-induced anthocyanin accumulation. *Plant Physiol.* 147(1):92-100.
- Stadler, R., Wright, K.M., Lauterbach, C., Amon, G., Gahrz, M., Feuerstein, A., Oparka, K.J., Sauer, N. (2005) Expression of GFP-fusions in Arabidopsis companion cells reveals non-specific protein trafficking into sieve elements and identifies a novel post-phloem domain in roots. *Plant J.* 41(2):319-331.
- Swanson, S.J., Jones, R.L. (1996) Gibberellic Acid Induces Vacuolar Acidification in Barley Aleurone. *Plant Cell* 8(12):2211-2221.

- Tahara, H., Yokota, E., Igarashi, H., Orii, H., Yao, M., Sonobe, S., Hashimoto, T., Hussey, P.J., Shimmen, T. (2007) Clathrin is involved in organization of mitotic spindle and phragmoplast as well as in endocytosis in tobacco cell cultures. *Protoplasma* 230(1-2):1-11.
- Tanaka, Y., Kutsuna, N., Kanazawa, Y., Kondo, N., Hasezawa, S., Sano, T. (2007) Intra-vacuolar reserves of membranes during stomatal closure: the possible role of guard cell vacuoles estimated by 3-D reconstruction. *Plant Cell Physiol.* 48(8):1159-1169.
- Teh, O.K., Shimono, Y., Shirakawa, M., Fukao, Y., Tamura, K., Shimada, T., Hara-Nishimura, I. (2013) The AP-1  $\mu$  adaptin is required for KNOLLE localization at the cell plate to mediate cytokinesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* 54(6):838-847.
- Tsutsui, T., Nakano, A., Ueda, T. (2015) The Plant-Specific RAB5 GTPase ARA6 is Required for Starch and Sugar Homeostasis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 56(6):1073-1083.
- Ueda, T., Yamaguchi, M., Uchimiya, H., Nakano, A. (2001). Ara6, a plant-unique novel type Rab GTPase, functions in the endocytic pathway of *Arabidopsis thaliana*. *The EMBO Journal* 20(17):4730-4741.
- Uemura, T., Ueda, T. (2014) Plant vacuolar trafficking driven by RAB and SNARE proteins. *Curr. Opin. Plant Biol.* 22:116-121.
- Uemura, T., Yoshimura, S.H., Takeyasu, K., Sato, M.H. (2002) Vacuolar membrane dynamics revealed by GFP-AtVam3 fusion protein. *Genes Cells.* 7(7):743-753.
- van Damme, D., Gadeyne, A., Vanstraelen, M., Inzé, D., Van Montagu, M.C., De Jaeger, G., Russinova, E., Geelen, D. (2011) Adaptin-like protein TPLATE and clathrin recruitment during plant somatic cytokinesis occurs via two distinct pathways. *PNAS* 108(2):615-620.
- van der Valk, P., Fowke, L.C. (1981). Ultrastructural aspects of coated vesicles in tobacco protoplasts. *Can. J. Bot.* 59:1307-1313.
- van der Weele, C.M., Jiang, H.S., Palaniappan, K.K., Ivanov, V.B., Palaniappan, K., Baskin, T.I. (2003) A new algorithm for computational image analysis of deformable motion at high spatial and temporal resolution applied to root growth. Roughly uniform elongation in the meristem and also, after an abrupt acceleration, in the elongation zone. *Plant Physiol.* 132(3):1138-1148.
- Vargas, W.A., Mandawe, J.C., Kenerley, C.M. (2009) Plant-derived sucrose is a key element in the symbiotic association between *Trichoderma virens* and maize plants. *Plant Physiol.* 151(2):792-808.
- Verbelen, J.P., De Cnodder, T., Le, J., Vissenberg, K., Baluska, F. (2006) The Root Apex of *Arabidopsis thaliana* Consists of Four Distinct Zones of Growth Activities: Meristematic Zone, Transition Zone, Fast Elongation Zone and Growth Terminating Zone. *Plant Signal. Behav.* 1(6):296-304.
- Viotti, C., Krüger, F., Krebs, M., Neubert, C., Fink, F., Lupanga, U., Scheuring, D., Boutté, Y., Frescatada-Rosa, M., Wolfenstetter, S., Sauer, N., Hillmer, S., Grebe, M., Schumacher K. (2013) The endoplasmic reticulum is the main membrane source for biogenesis of the lytic vacuole in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 25(9):3434-3449.

Wang, X., Cai, Y., Wang, H., Zeng, Y., Zhuang, X., Li, B., Jiang, L. (2014) Trans-Golgi network-located AP1 gamma adaptins mediate dileucine motif-directed vacuolar targeting in Arabidopsis. *Plant Cell* 26(10):4102-4118.

Wang, C., Hu, T., Yan, X., Meng, T., Wang, Y., Wang, Q., Zhang, X., Gu, Y., Sánchez-Rodríguez, C., Gadeyne, A., Lin, J., Persson, S., Van Damme, D., Li, C., Bednarek, S.Y., Pan, J. (2016) Differential Regulation of Clathrin and Its Adaptor Proteins during Membrane Recruitment for Endocytosis.

Wang, C., Yan, X., Chen, Q., Jiang, N., Fu, W., Ma, B., Liu, J., Li, C., Bednarek, S.Y., Pan, J. (2013) Clathrin light chains regulate clathrin-mediated trafficking, auxin signaling, and development in Arabidopsis. *Plant Cell* 25(2):499-516.

Wang, H., Zhuang, X.H., Hillmer, S., Robinson, D.G., Jiang, L.W. (2011) Vacuolar sorting receptor (VSR) proteins reach the plasma membrane in germinating pollen tubes. *Mol. Plant* 4(5):845-853.

Wu, X.N., Sanchez Rodriguez, C., Pertl-Obermeyer, H., Obermeyer, G., Schulze, W.X. (2013) Sucrose-induced receptor kinase SIRK1 regulates a plasma membrane aquaporin in Arabidopsis. *Mol. Cell Proteomics* 12(10):2856-2873.

Yamaoka, S., Shimono, Y., Shirakawa, M., Fukao, Y., Kawase, T., Hatsugai, N., Tamura, K., Shimada, T., Hara-Nishimura, I. (2013) Identification and dynamics of Arabidopsis adaptor protein-2 complex and its involvement in floral organ development. *Plant Cell* 25(8):2958-2969.

Ybe, J.A., Brodsky, F.M., Hofmann, K., Lin, K., Liu, S.H., Chen, L., Earnest, T.N., Fletterick, R.J., Hwang, P.K. (1999) Clathrin self-assembly is mediated by a tandemly repeated superhelix. *Nature* 399(6734):371-375.

Yoshida, S., Uemura, M. (1986) Lipid Composition of Plasma Membranes and Tonoplasts Isolated from Etiolated Seedlings of Mung Bean (*Vigna radiata* L.) *Plant Physiol.* 82(3):807-812.

Zouhar, J., Hicks, G.R., Raikhel, N.V. (2004) Sorting inhibitors (Sortins): Chemical compounds to study vacuolar sorting in Arabidopsis. *PNAS* 101(25):9497-9501.