



Grado en Ciencias Biológicas

Mención de Biotecnología

**Caracterización de la función de la
aminopeptidasa MPA1 en la meiosis
de *Arabidopsis thaliana***

Miguel Pachón Peñalba

Madrid, 2017

Universidad Complutense de Madrid

Facultad de Ciencias Biológicas

Departamento de Genética

Vº. Bº. del Tutor

Fdo. Miguel Pachón Peñalba

Fdo. Mónica Pradillo Orellana

Índice

Índice	1
Lista de abreviaturas	2
Resumen	3
Abstract	3
1. Introducción	4
1.1 Proteasas.....	4
1.2 Metaloproteasas de la familia M1: MPA1.....	5
1.3 El proceso de división meiótica y la recombinación homóloga	6
1.4 La función de MPA1 en meiosis	7
1.5 Objetivos e hipótesis de trabajo	8
2. Materiales y métodos	9
2.1 Materiales	9
2.2 Condiciones de cultivo.....	10
2.3 Análisis de la viabilidad del polen	10
2.4 Genotipado	10
2.5 Análisis citológico	12
2.6 Captura y análisis de imágenes	14
2.7 Análisis estadístico.....	14
3. Resultados.....	14
3.1 Estudio de la viabilidad del polen	14
3.2 Caracterización del fenotipo meiótico	15
3.2 Análisis de la frecuencia de quiasmas.....	17
4. Discusión	20
4.1 Análisis detallado de la meiosis en el alelo KO mpa1-1	21
4.2 Estudio de nuevos alelos mpa1	22
4.3 Posible localización de MPA1 en la ruta de HR	23
4.4 Futuros experimentos.....	24
5. Conclusiones	24
6. Bibliografía	25
Anexo 1.....	28

Lista de abreviaturas

Abreviatura	Significado
AGI	<i>Arabidopsis Genome Initiative.</i>
CO	<i>Crossover</i> , Sobrecruzamiento.
Col	Ecotipo Columbia.
MRN	MRE11/RAD50/NSB1.
DAPI	4,6-diamino-2-fenilindol.
dHJ	<i>Double Holliday Junction</i> , Doble Unión de Holliday.
DSB	<i>Double-Strand Break</i> , Rotura de Doble Cadena.
FISH	<i>Fluorescence In Situ Hybridisation</i> , Hibridación In Situ con Fluorescencia.
HR	<i>Homologous Recombination</i> . Recombinación Homóloga.
KD	<i>Knock Down</i> , mutante hipomorfo.
KO	<i>Knock Out</i> , mutante nulo.
LB	<i>Left Border T-DNA Primer</i> , Cebador del borde izquierdo del T-DNA.
LP	<i>Left T-DNA Primer</i> , Cebador izquierdo del DNA flanqueante al T-DNA.
MPA1	<i>MEIOTIC PROPHASE AMINOPEPTIDASE 1</i> , Aminopeptidasa 1 de la Profase Meiótica.
NCO	<i>Non-Crossover</i> , No sobrecruzamiento.
NOR	<i>Nucleolus Organizing Region</i> , Región Organizadora del Nucleolo.
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> , Reacción en Cadena de la Polimerasa.
PMC	<i>Pollen Mother Cell</i> , Célula Madre del Polen.
RP	<i>Right T-DNA Primer</i> , Cebador derecho del DNA flanqueante al T-DNA.
RT-PCR	<i>Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i> . Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa.
T-DNA	DNA transferente.
UTR	<i>Untranslated Region</i> , Región no Traducida.
Ws	Ecotipo Wassilewskija.
WT	<i>Wild Type</i> , Genotipo silvestre.
ZMM	ZIP4, MER3, MSH4, MSH5.

Resumen

Las proteasas son enzimas esenciales para la regulación del ciclo celular, especialmente las aminopeptidasas. En el caso de *Arabidopsis thaliana*, especie modelo en genética vegetal, estas proteínas son mayoritariamente metaloenzimas y su función es el corte de enlaces peptídicos localizados en los extremos N-terminales, afectando a una región clave para las modificaciones postraduccionales. Las metalopeptidasas de la familia M1 se encuentran en todos los eucariotas y son imprescindibles para su correcto crecimiento y desarrollo. En plantas se ha descrito además su implicación en la división meiótica, la división celular especializada que conduce a la formación de los gametos. En *A. thaliana*, la ausencia de función de la aminopeptidasa MPA1 (*MEIOTIC PROPHASE AMINOPEPTIDASE 1*), metalopeptidasa sensible al antibiótico puromicina, produce problemas de fertilidad como consecuencia de la formación de un elevado porcentaje de granos de polen inviables. El análisis de la meiosis masculina en el mutante nulo *mpa1-1* ha revelado deficiencias en la formación de los quiasmas, las conexiones debidas a intercambios recíprocos de ADN entre los cromosomas homólogos que permiten su correcta segregación en anafase I. En el presente estudio se han caracterizado diferentes alelos mutantes producidos por inserciones de T-DNA localizadas en distintas regiones del gen. Aunque no se han encontrado problemas de viabilidad de polen en las correspondientes líneas, la caracterización citológica de la meiosis ha puesto de manifiesto un descenso en la frecuencia media de quiasmas con respecto al genotipo silvestre. Los resultados obtenidos permiten profundizar en el análisis de la función de MPA1 en la meiosis de *A. thaliana*, para tratar de dilucidar su papel en el proceso de recombinación homóloga, responsable de la formación de los quiasmas.

Palabras Clave: Aminopeptidasa, Meiosis, Quiasma, Recombinación Homóloga, Sinapsis.

Abstract

Proteases are essential enzymes for the regulation of the cell cycle, especially aminopeptidases. In the model species for genetic studies *Arabidopsis thaliana*, most of them are metalloenzymes and their function is to cleave N-terminal peptide bonds, affecting a key region for post-translational modifications. M1 metalloproteases are present in all Eukaryotes and are indispensable for their correct growth and development. In plants, it has been reported their involvement in meiotic division, the specialised cellular division that leads to the gamete formation. In *A. thaliana*, the absence of the aminopeptidase MPA1 (*MEIOTIC PROPHASE AMINOPEPTIDASE 1*), a puromycin-sensitive metallopeptidase, produces fertility problems

due to the formation of a high proportion of inviable pollen grains. The characterisation of the male meiosis in the knockout mutant *mpa1-1* has revealed severe defects in chiasma formation, the connections produced between homologous chromosomes as consequence of reciprocal exchanges of DNA that are essential for their correct segregation at anaphase I. In the present study different mutant alleles, corresponding to several lines with T-DNA insertions located in different regions of the gene, have been characterised. Although inviable pollen grains have not been detected in these lines, the meiotic cytological characterization has revealed a decrease in the mean chiasma frequency respect to the wild type line. The results obtained allow a deeper analysis of the meiotic role of MPA1 in *A. thaliana*, in order to determine its implication during homologous recombination, the pathway responsible of chiasma formation.

Keywords: Aminopeptidase, Chiasmata, Homologous Recombination, Meiosis, Synapsis.

1. Introducción

1.1 Proteasas

Las proteasas son enzimas cuya función es el corte de los enlaces peptídicos establecidos entre los aminoácidos que forman parte de las cadenas polipeptídicas. De esta manera participan en la regulación de múltiples procesos, como el mantenimiento de la homeostasis celular, el crecimiento y desarrollo o la respuesta a diferentes tipos de estrés. Puesto que cumplen funciones relacionadas con el recambio de proteínas y la regulación de la actividad de las mismas, su función es fundamental durante el ciclo celular. Estas enzimas pertenecen a diferentes familias, presentan especificidad de sustrato y están sujetas a un estricto control temporal y espacial (van der Hoorn, 2008). Las proteasas pueden clasificarse en función del lugar de corte del enlace en la cadena polipeptídica. Si actúan sobre un enlace interno se las clasifica como **endoproteasas**, mientras que si cortan enlaces en los extremos de las cadenas polipeptídicas se denominan **exoproteasas**. Dentro de este último grupo podemos distinguir entre **carboxipeptidasas**, que son aquellas que actúan sobre el extremo C-terminal de la cadena polipeptídica; y **aminopeptidasas**, proteasas que actúan sobre el extremo N-terminal, una zona clave para las modificaciones postraduccionales (Walling, 2006). La proteína objeto de estudio de esta memoria, MPA1, pertenece a esta última categoría.

Las proteasas son abundantes en el genoma de *Arabidopsis thaliana*, que codifica para más de 800 (van der Hoorn, 2008). En función de su mecanismo catalítico las proteasas pueden clasificarse en cuatro grupos principales: aspartil, serín, cisteín y metaloproteasas,

grupo en el que se incluye MPA1. El proceso de catálisis de las **metaloproteasas** comienza con la unión de la cadena polipeptídica al centro activo, lo que desencadena la aparición de una carga parcial positiva en el carbono del enlace peptídico debido a la estabilización del oxígeno en un bolsillo polar de la proteína. A continuación, este átomo de carbono, vulnerable al estar polarizado, sufre el ataque de un nucleófilo como el agua, que previamente ha sido activado por un ion metálico (Figura 1). Como resultado se produce la rotura del enlace peptídico entre los dos aminoácidos de la cadena polipeptídica (van der Hoorn, 2008).

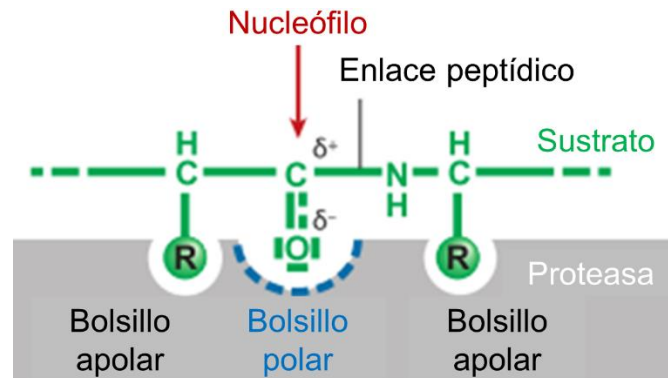


Figura 1. Esquema representativo del mecanismo catalítico de las metaloproteasas. Modificado de van der Hoorn (2008).

1.2 Metaloproteasas de la familia M1: MPA1

MPA1 es una metaloproteasa perteneciente a la familia M1, cuyos miembros suelen tener actividad aminopeptidasa. Las metaloproteasas de la familia M1 poseen una región catalítica formada por dos dominios, **el dominio GXXMN**, de unión al sustrato, con actividad exopeptidasa, y **el dominio HEXXH[X]₁₈E**, que participa en la unión del ion metálico. En la región N-terminal generalmente presentan **dominios hidrofóbicos**, capaces de formar anclajes a membranas o de interactuar con otras proteínas. Por último, en su región C-terminal suelen mostrar **dominios hidrofóbicos de interacción con otras proteínas** (Figura 2). Las metaloproteasas de esta familia suelen funcionar como homodímeros o como oligómeros si se asocian a otras proteínas (Peer, 2011).

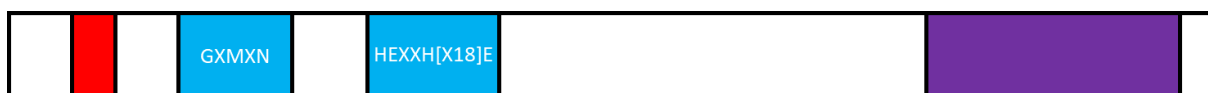


Figura 2. Estructura general de las metaloproteasas de la familia M1. Se muestran los dominios hidrofóbicos de la región N-terminal (rojo), los dominios de la región catalítica (azul), y los dominios de interacción con otras proteínas de la región C-terminal (morado). Modificado de Peer (2011).

Las metaloproteasas de la familia M1 se caracterizan por presentar **sensibilidad al antibiótico puromicina**, que provoca la parada del ciclo celular en las fases G₂ y M. Además, suelen ser multifuncionales ya que combinan su actividad aminopeptidasa con funciones no

proteolíticas y de regulación durante el ciclo celular, participando tanto en mitosis como en meiosis. Por ejemplo, la aminopeptidasa **APN** humana y la aminopeptidasa **PSA** de ratón están implicadas en la regulación de la mitosis (Peer, 2011). Por otro lado, en *C. elegans* la aminopeptidasa **PAM-1** participa en la salida de la meiosis (Lyczak *et al.*, 2006). En plantas, concretamente en *A. thaliana*, **APM1** tiene funciones en mitosis (Hosein *et al.*, 2010) y **MPA1** juega un papel fundamental durante la meiosis (Sánchez-Morán *et al.*, 2004).

1.3 El proceso de división meiótica y la recombinación homóloga

La meiosis es un proceso de división celular especializado que conduce a la formación de los gametos y que tiene como objetivo la reducción del número cromosómico a la mitad, permitiendo la restauración del número diploide tras la fecundación. Genera además variabilidad génica, gracias al proceso de recombinación asociado a ella. Esta división consiste en una única ronda de replicación, seguida de dos rondas sucesivas de segregación: la primera división meiótica es reduccional, durante ella tiene lugar el proceso de **recombinación homóloga** (HR, *Homologous Recombination*) y supone la separación de los cromosomas homólogos; y la segunda división es ecuacional, al implicar la separación de las cromátidas hermanas.

Para que sea posible la correcta segregación de los cromosomas homólogos debe formarse entre ellos al menos un **quiasma** (conocido como quiasma obligatorio). Los quiasmas son la expresión citológica de los sobrecruzamientos (CO, *Crossovers*) que se forman gracias al proceso de HR (Figura 3) y son el resultado de los intercambios recíprocos de DNA entre los cromosomas homólogos. Este proceso comienza al inicio de la profase I, con la formación de **roturas de doble hebra** (DSB, *Double Strand Break*) programadas mediante la actuación de la topoisomerasa SPO11 (Grelon *et al.*, 2001). Las DSB son procesadas posteriormente por el complejo MRN (MRE11/RAD50/NBS1), el cual genera extremos 3' de cadena sencilla, que invadirán la cromátida homóloga con la ayuda de las recombinasas RAD51 y DMC1 (Pradillo *et al.*, 2014; Mercier *et al.*, 2015). Tras la formación de una serie de intermediarios de recombinación la DSB puede derivar en la formación de CO o de no sobrecruzamientos (NCO, *Non Crossovers*), en el caso de que el intercambio de DNA entre los cromosomas homólogos no sea recíproco. Los CO pueden formarse a partir de dos rutas principales (Figura 3). La primera da lugar a la formación de **CO de clase I**, sensibles a interferencia positiva, fenómeno por el cual la presencia de un CO impide la formación de otro en su proximidad (Sturtevant, 1913). En este caso se forma previamente un intermediario conocido como doble unión de Holliday (dHJ, *Double Holliday Junction*), estabilizado por las

proteínas del grupo ZMM (ZIP4, MER3, MSH4 y MSH5) y resuelto por acción de las proteínas MLH1 y MLH3 (Jackson *et al.*, 2006). La segunda ruta está mediada por la proteína MUS81 y da lugar a la formación de **CO de clase II**, insensibles a interferencia y distribuidos al azar (Hollingsworth y Brill, 2004; Higgins *et al.*, 2008).

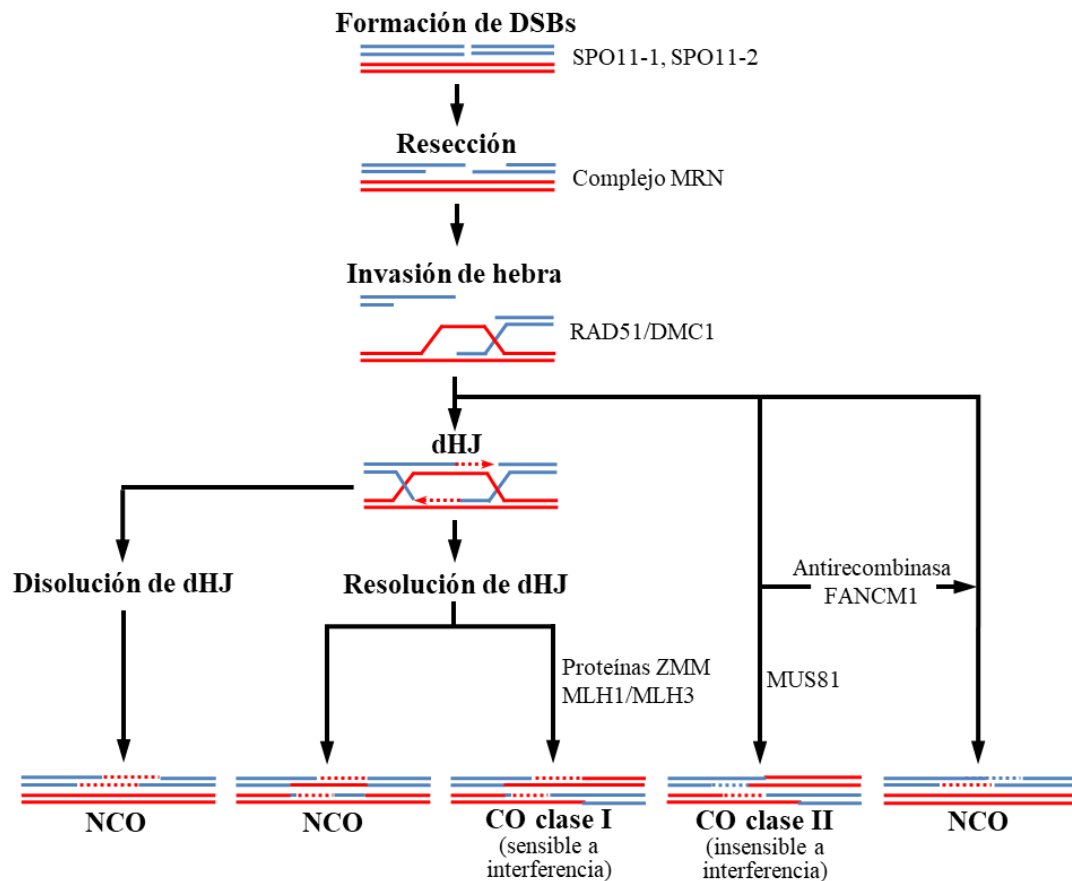


Figura 3. Pasos principales en la ruta de recombinación meiótica en *A. thaliana*. Modificado de Pradillo *et al.* (2014).

Los distintos organismos son dependientes de las dos rutas de CO de forma variable. Hay organismos en los que sólo hay CO de clase I, otros en los que sólo hay CO de clase II y otros en los que aparecen ambas clases. Concretamente, en la especie objeto de estudio de este trabajo, *A. thaliana*, los CO de clase I representan un 85% del total, mientras que los de clase II se estima que representen alrededor de un 15% (Higgins *et al.*, 2008).

1.4 La función de MPA1 en meiosis

El alelo *mpa1-1* fue descubierto en un escrutinio realizado con el objetivo de buscar mutantes de fertilidad reducida a partir de una colección de líneas de inserción de T-DNA (Sánchez-Morán *et al.*, 2004). El mutante *mpa1-1* destacó por mostrar un descenso en fertilidad en

comparación con el genotipo silvestre (WT, *Wild-type*), debido a la presencia de silicuas de tamaño pequeño, con un número reducido de semillas. Este descenso en fertilidad se demostró que era debido a una baja viabilidad del polen (Figura 4). Además, el análisis citológico de las células madre del polen (PMC, *Pollen Mother Cell*) reveló que la reducción en fertilidad tenía su origen en anomalías durante la meiosis masculina. El mutante presentaba una gran proporción de univalentes en metafase I, es decir, ausencia del quiasma obligatorio, lo que daba lugar a problemas en la segregación de los cromosomas homólogos y a la formación de políadas en lugar de tétradas al finalizar la meiosis (Figura 4).

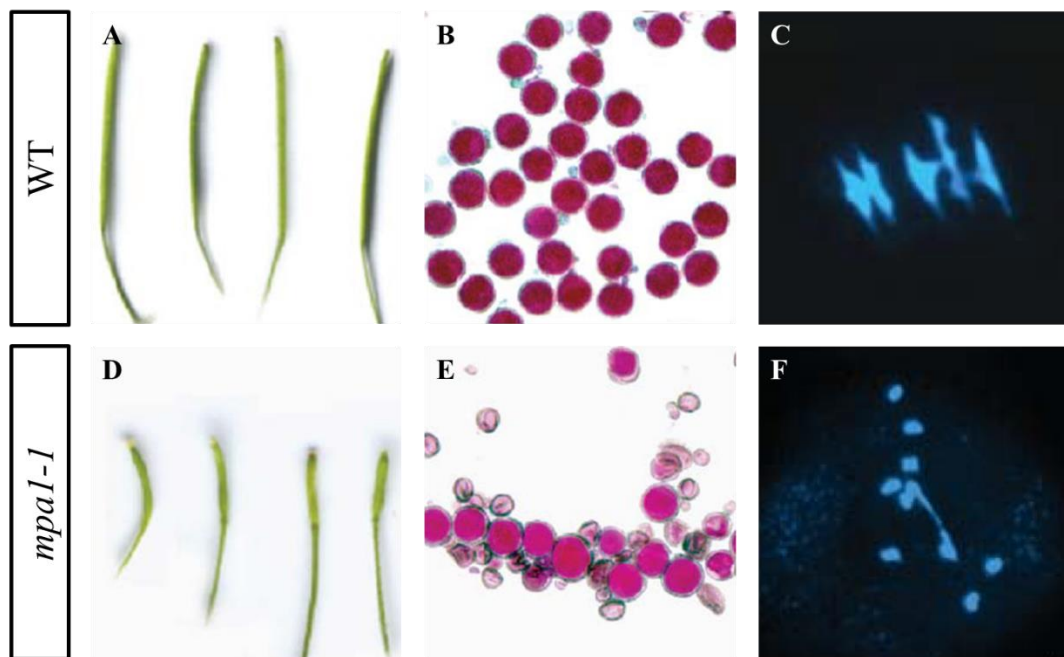


Figura 4. Problemas de fertilidad y anomalías meióticas en *mpa1-1*. (A-C) Genotipo silvestre. (D-F) *mpa1-1*. (A) y (D) Silicuas maduras, puede apreciarse que son de menor longitud en *mpa1-1*. (B) y (E) Estudio de la viabilidad del polen mediante tinción de Alexander. Se observan granos de polen de tamaño variable e inviábiles (con tinción azulada) en el caso de *mpa1-1*. (C) y (F) Metafase I. En la planta WT se observan cinco bivalentes, correspondientes a la asociación de los cromosomas homólogos mediante quiasmas, mientras que en *mpa1-1* tan sólo hay un bivalente, apareciendo el resto de cromosomas como univalentes. Modificado de Sánchez-Morán *et al.* (2004).

Por otro lado, el tratamiento de plantas WT con puromicina reveló que MPA1 era sensible a este antibiótico, dado que las plantas tratadas con él presentaron el mismo fenotipo meiótico que las plantas *mpa1-1* (Sánchez-Morán *et al.*, 2004).

1.5 Objetivos e hipótesis de trabajo

El principal objetivo de este trabajo es profundizar en la caracterización de la función de la aminopeptidasa MPA1 en meiosis, siendo nuestra hipótesis principal que las mutaciones inducidas por la inserción de T-DNA en distintas regiones del gen generan distintos fenotipos

durante esta división. Con el fin de comprobar dicha hipótesis se determinaron los siguientes objetivos parciales:

- La descripción detallada del fenotipo meiótico del alelo nulo (KO, *Knock Out*) *mpa1-1*.
- El estudio de la meiosis y de viabilidad del polen en nuevos mutantes *mpa1*, presuntamente correspondientes a alelos hipomorfos (KD, *Knock Down*).

2. Materiales y métodos

2.1 Materiales

Arabidopsis thaliana (L.) Heynh es una planta perteneciente a la familia de las crucíferas (Fam. Brassicaceae). Esta especie es organismo modelo en estudios de meiosis debido a una serie de características: i) **Ciclo de vida breve**, proporciona hasta ocho generaciones al año; ii) **Numerosa descendencia**, cada planta es capaz de producir en torno a 10.000 semillas; iii) **Número reducido de cromosomas** ($2n=10$), lo que facilita la identificación de los cromosomas mediante la técnica de hibridación in situ con fluorescencia (FISH, *Fluorescence in situ hybridisation*) con sondas de rDNA; iii) **Genoma completamente secuenciado** (Arabidopsis Genome Initiative, 2000), lo que permite que se hayan obtenido abundantes colecciones de mutantes para diferentes genes. Estas colecciones se han obtenido por mutagénesis al azar por inserción de T-DNA mediado por *Agrobacterium tumefaciens*.

En el presente estudio se ha analizado el gen *MPA1* (At1g63770) a través de la caracterización de cinco líneas mutantes de inserción de T-DNA (Tabla 1): dos de ellas, *mpa1-1* y *mpa1-3*, pertenecen al ecotipo Wassilewskija (Ws), mientras que los tres restantes, *mpa1-2*, *mpa1-6* y *mpa1-8*, tienen como fondo genético el ecotipo Columbia (Col). El gen *MPA1* comprende 8,96 Kb con 31 exones y 21 intrones en su secuencia codificante (Figura 5). Además, *MPA1* posee numerosas variantes de *splicing*.

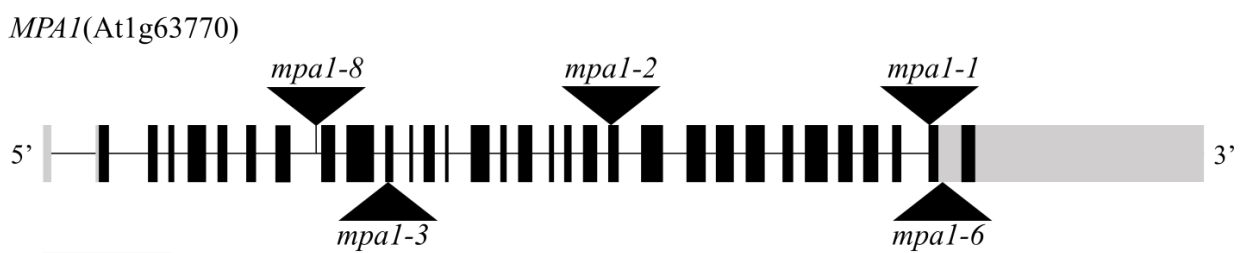


Figura 5. Representación esquemática del gen *MPA1* (At1g63770). En gris aparecen esquematizadas las regiones transcritas no traducidas (UTR, *Untranslated Region*), en negro los exones y los intrones se muestran como una línea entre éstos. Los triángulos indican los puntos de inserción de los T-DNA de cada una de las

líneas mutantes analizadas. La presencia de exones en la región determinada como 3'UTR (cuadro gris) se debe a la existencia de diversas variantes de *splicing*. La barra representa una longitud de 1 Kb.

En el caso del alelo *mpa1-1* las semillas proceden de una colección española del INIA de mutantes de T-DNA (Sánchez-Morán *et al.*, 2004), mientras que el resto de líneas fueron suministradas por el NASC (*Nottingham Arabidopsis Stock Centre*).

2.2 Condiciones de cultivo

Las semillas se sembraron en una mezcla estéril de tierra abonada y vermiculita (3:1), y se mantuvieron en cámara de cultivo a 19°C, 60% de humedad y con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad.

2.3 Análisis de la viabilidad del polen

La determinación de la viabilidad del polen se llevó a cabo mediante la tinción de Alexander (Alexander, 1969; Peterson *et al.*, 2010). Previamente se fijaron inflorescencias con botones maduros en etanol al 70%, al menos un día antes. Una vez fijados, los botones se diseccionaron para extraer las anteras, a las cuales se les añadió una gota de reactivo de Alexander (5 mL de agua destilada; 2,5 ml de glicerina; 1 mL de etanol absoluto; 0,5 mL de fucsina ácida 1% en H₂O; 0,1 mL de verde malaquita al 1% en etanol absoluto; 0,5 mL de orange G al 1% en H₂O y 0,25 mL de ácido acético). Después las anteras se mantuvieron a 60°C durante 30 minutos, para posteriormente incubarlas en cámara húmeda a 37°C durante 12 horas. Por último, se colocó un cubreobjetos sobre las anteras teñidas, aplastándolas ligeramente y se procedió a su observación al microscopio óptico.

2.4 Genotipado

Extracción de DNA genómico

Se realizaron extracciones mediante el lisado en frío del tejido vegetal con ayuda del equipo *Tissue Lyser* (Qiagen®). El tejido vegetal se maceró en seco durante 4 minutos a 30.000 rpm, posteriormente se añadieron a cada muestra 40 µL de tampón de extracción (100 mM Tris-HCl pH 9,5; 250 mM KCl, 10 mM EDTA), y se volvió a macerar durante 1 minuto. A continuación, se aplicó un choque térmico a 95°C durante 10 minutos, tras el cual, se mantuvieron las muestras en hielo durante 5 minutos. Por último, se añadieron 40 µL de tampón de dilución (3% BSA) y se centrifugaron las muestras, que fueron conservadas a 4°C.

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, *Polymerase Chain Reaction*)

El genotipado de las líneas suministradas por el NASC se llevó a cabo mediante PCR. De esta manera se seleccionaron las plantas homocigotas para las diferentes inserciones de T-DNA. Para cada línea estudiada se emplearon tres cebadores en la PCR (RP, LP y LB, ver Tabla 1). La pareja de cebadores RP y LP hibrida con secuencias que flanquean el punto de inserción del T-DNA, dando lugar a un producto de amplificación en torno a ~1000 pb (en el caso de que el T-DNA no esté presente). Por otro lado, el cebador LB se une al borde izquierdo del T-DNA, y amplifica un producto de ~500 pb con el cebador RP, en el caso de que el T-DNA esté presente. La diferencia de tamaño de ambos productos de amplificación hace que puedan separarse fácilmente en una electroforesis, de manera que podrían distinguirse plantas WT (una única banda ~1000 pb), plantas heterocigotas para la inserción (dos bandas, una banda ~1000 pb y otra ~500 pb) y plantas homocigotas para la inserción (una única banda ~500 pb).

La mezcla de reacción de PCR se preparó para un volumen final de 10 µL, (5 µL de Taq; 4,2 µL de H₂O MilliQ®; 0,2 µL de cada cebador y 4 µL del extracto de DNA). La Taq-polimerasa (Biotools®) utilizada contiene tanto la mezcla de dNTPs como el MgCl₂, necesarios para la reacción. Tras la preparación de las mezclas de reacción, éstas se sometieron al siguiente programa de amplificación: [1x (94°C-5 min.)] - [35x (94°C-30 seg., 55°C-1 min., 72°C-2 min.)] - [1x (72°C-10 min.)].

Tabla 1. Líneas mutantes analizadas en el presente estudio. Se indican su correspondiente código NASC, su ecotipo y los cebadores utilizados en la reacción de PCR. *La línea *mpa1-1*, procedente de la colección de mutantes de T-DNA del INIA, no precisó de genotipado ya que se encuentra en homocigosis al haber sido aislada en estudios previos llevados a cabo en el laboratorio (Sánchez-Morán *et al.*, 2004).

Alelo	Código NASC	Ecotipo	Inserción	Cebadores (5'-3')
<i>mpa1-1</i> *	-	Ws	Exón 30	-
<i>mpa1-2</i>	SALK_006826	Col	Exón 20	RP GCGAGAACAGAGCAGAGAATG
				LP TTTTCCTCTCTCTGGCAGATG
				LB ATTTTGCCGATTTTCGGAAC
<i>mpa1-3</i>	FLAG_434C01	Ws	Exón 10	RP TTCCCTGTCCAATTGTGAAAG
				LP TTTCTGCACACAGTGTGAAGC
				LB CTACAAATTGCCTTTTCTTATCGAC
<i>mpa1-6</i>	SALK_079316	Col	3' UTR	RP ATGCAGACGGGTACTIONCAAATG
				LP CTAGCCAAGGTAAATAGCCCCG
				LB ATTTTGCCGATTTTCGGAAC
<i>mpa1-8</i>	SALK_062487	Col	Intrón 8	RP TTGCATGAGCTGTTTGCATAG
				LP ACATCCTCATCCCCTTCATG
				LB ATTTTGCCGATTTTCGGAAC

Electroforesis en gel de agarosa

A los productos de la amplificación por PCR se les añadió 2 µL de tampón de carga (azul de bromofenol al 0,25%; sacarosa al 40%) con el fin de aumentar la densidad de la muestra y evitar su dispersión durante la carga y para marcar el avance del frente durante el proceso. Las muestras se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 0,8% (p/v) en TBE 0,5x (44,5 mM Tris-borato; 1 mM EDTA pH 8), al cual se añadió SYBR-*Green* para la visualización de las muestras con luz UV en un transiluminador. Se utilizó un marcador de peso molecular con una diferencia de tamaño entre bandas de 100 pb.

2.5 Análisis citológico

Preparaciones citológicas de células madre de polen

Los botones florales se fijaron en solución Carnoy (etanol:cloroformo:ácido acético glacial en proporción 6:3:1), cambiando el fijador tras 24 horas y almacenándolos a 4°C. Para el análisis citológico de PMC, se aplicó la técnica de esparcido (Ross *et al.*, 1996). Los botones florales fijados se lavaron tres veces en solución de etanol:ácido acético (3:1), a continuación, se lavaron otras tres veces en tampón citrato (citrato sódico 10 mM, pH 4,5), tras lo cual se procedió a la digestión de los botones mediante una mezcla enzimática (celulasa 0,3% p/v; pectinasa 0,3% p/v y citohelicasa 0,3% p/v, todas ellas de Sigma[®]) en tampón citrato (citrato sódico 10 mM, pH 4,5), a 37°C durante 2 horas en cámara húmeda, parando la reacción con tampón citrato frío transcurrido ese tiempo.

Para realizar las preparaciones citológicas, se tomaron los botones de uno en uno y se colocaron sobre un portaobjetos para proceder a su maceración con una aguja. Tras homogeneizar el botón en tampón citrato se añadieron 13 µL de ácido acético 60% (v/v), y se mantuvieron sobre una placa térmica a 42°C durante 1 minuto. Por último, se añadieron otros 13 µL de ácido acético 60% y se lavaron las preparaciones con 200 µL de solución de etanol:ácido acético (3:1), dejándolas secar a temperatura ambiente. Para la observación de las preparaciones con microscopía de fluorescencia, éstas se tiñeron con el agente intercalante DAPI (4,6-diamino-2-fenilindol; Sigma[®]), un fluorocromo que emite luz azul, disuelto en el medio de montaje Vectashield (Vector[®]) a una concentración de 10 µg/mL.

Hibridación in situ con fluorescencia (FISH)

Para la identificación de cada uno de los cromosomas del complemento de *A. thaliana* se aplicó la técnica de FISH (Figura 6). Esta técnica permite la detección de una secuencia diana a través de la hibridación de la misma con una sonda de DNA marcada con un compuesto

químico que es reconocido por un anticuerpo unido a un fluoróforo. En este caso se utilizaron sondas de rDNA correspondientes a las secuencias 5S (gen 5S de *A. thaliana* clonado en el plásmido pCT4.2; Campell *et al.*, 1992) y 45S (gen 45S de *Triticum aestivum* clonado en el plásmido pTa71; Gerlach y Bedbrook, 1979). Las regiones de rDNA 45S se corresponden con las regiones organizadoras del nucleolo (NOR, *Nucleolar Organising Region*) (Fransz *et al.*, 1998).

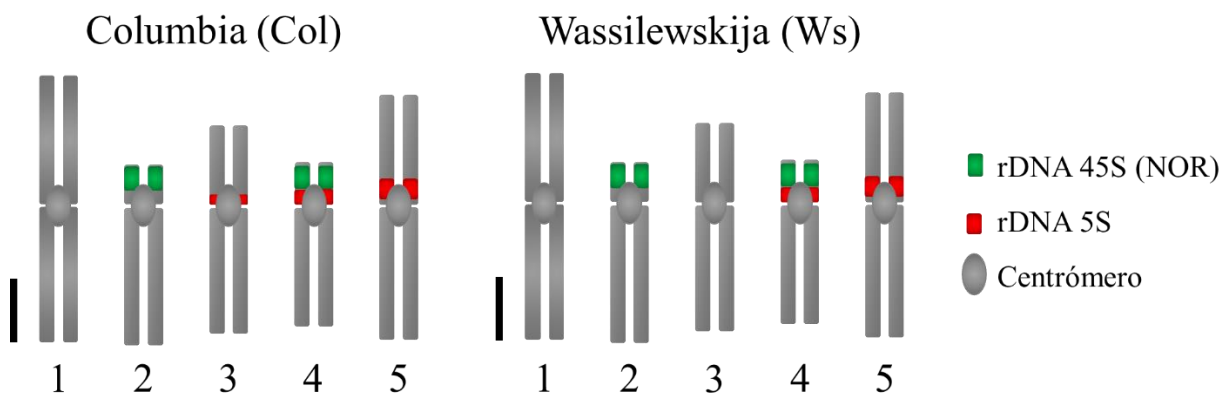


Figura 6. Idiograma de los ecotipos Col y Ws. Se muestran en verde las regiones correspondientes a los NOR (rDNA 45S) y en rojo las correspondientes al rDNA 5S. Barras de 0,5 μm .

Antes de la hibridación se realizó un pretratamiento de las preparaciones obtenidas por el protocolo de esparcido. Éstas se desmontaron manteniéndolas en solución 4T (4xSSC; 5% Tween 20; pH 7) durante al menos 3 horas. A continuación, se realizó un lavado de 10 minutos en tampón 2xSSC (0,3 M NaCl; 0,03 M citrato sódico; pH 7), tras el cual se sometió a las preparaciones a un tratamiento de 90 segundos con pepsina a 37°C. Después, se realizó un segundo lavado de 10 minutos en 2xSSC, seguido de 2 lavados de 5 minutos en agua destilada, para finalmente deshidratar las preparaciones mediante lavados de 2 minutos en etanol 70%, 90% y 100% (v/v), dejándolas secar a temperatura ambiente al menos durante 30 minutos.

Antes de la hibridación las sondas se marcaron por *Nick Translation*, utilizando digoxigenina-dUTP en el caso de la sonda de rDNA 45S y biotina-dUTP en el caso de la sonda rDNA 5S. A continuación, se preparó la mezcla de reacción, con un volumen de 20 μL por cada preparación. La mezcla se realizó diluyendo 3 μL de cada sonda en 14 μL de la mezcla de hibridación (5 mL formamida desionizada; 1 mL de 20x SSC; 1 g de sulfato de dextrano; pH 7). A continuación, se desnaturizó la mezcla (80°C durante 10 minutos) y se mantuvo 5 minutos en hielo antes de su utilización. Para la hibridación, se añadieron 19 μL de la mezcla previamente desnaturizada a cada preparación. Posteriormente las preparaciones

con la sonda añadida se mantuvieron durante 4 minutos a 72°C para desnaturalizar el DNA. Por último, las preparaciones se hibridaron en cámara húmeda a 37°C durante 24 h.

Tras la hibridación se realizaron: tres lavados de 5 minutos a 45°C en 50% formamida desionizada-2xSSC, un lavado de 5 minutos a 45°C en 2xSSC, un lavado de 5 minutos a 45°C en 4T y un último lavado de 5 minutos a temperatura ambiente en 4T. Tras este lavado se incubaron las preparaciones con los correspondientes anticuerpos a una concentración de 5 ng/μL. Concretamente se utilizó avidina-Cy3 (rojo) para la detección de sondas marcadas con biotina y antidigoxigenina-FITC (verde) para la detección de sondas marcadas con digoxigenina, ambos disueltos en TNB (100 mM TrisHCl pH 7,5; 150 mM NaCl; 0,5% (p/v) reactivo de bloqueo de Boehringer®). Tras añadir 50 μL de la mezcla a cada preparación éstas se cubrieron con un Parafilm y se mantuvieron 1 hora a 37°C. Después de la incubación las preparaciones se lavaron tres veces durante 5 minutos en 4T y se volvieron a teñir con 10 μL de DAPI.

2.6 Captura y análisis de imágenes

Las preparaciones se analizaron con un microscopio de epifluorescencia Olympus BX60®, utilizando filtros para DAPI, FITC y Cy3, acoplado a una cámara fotográfica digital Olympus DP70 con la que se tomaron las imágenes. Para el análisis de las mismas, se utilizó el programa Adobe Photoshop CC v14.0®. El conteo de quiasmas se llevó a cabo según los criterios descritos por Sánchez-Moran *et al.* (2001).

2.7 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó el programa GraphPad Prism 6.00®. Para comparar las diferencias entre las medias de las frecuencias de quiasmas de cada alelo y su respectivo control se realizó una *t* de *Student*. Para comparar los porcentajes de viabilidad del polen se realizó una Chi-cuadrado. En todos los casos se consideró un nivel de significación $\alpha = 0,05$.

3. Resultados

3.1 Estudio de la viabilidad del polen

El análisis de viabilidad del polen mediante tinción de Alexander puede utilizarse como primera aproximación para identificar potenciales defectos en la meiosis (Figura 7). De esta manera, se cuantificaron las proporciones de polen viable en todos los alelos, comparando cada uno con su respectivo ecotipo control (Tabla 2). Entre los alelos pertenecientes al ecotipo Ws se observó que el alelo *mpa1-1* era el único que presentaba diferencias significativas

respecto del control ($P < 0,001$), ya que mostraba tan sólo un 8,1 % de polen viable, mientras que el alelo *mpa1-3* presentaba un 96,3 % de viabilidad. Por otro lado, los alelos *mpa1-2*, *mpa1-6* y *mpa1-8* mostraban una viabilidad cercana o igual al 100 %, por lo que no se encontraron diferencias significativas respecto al control (Col).

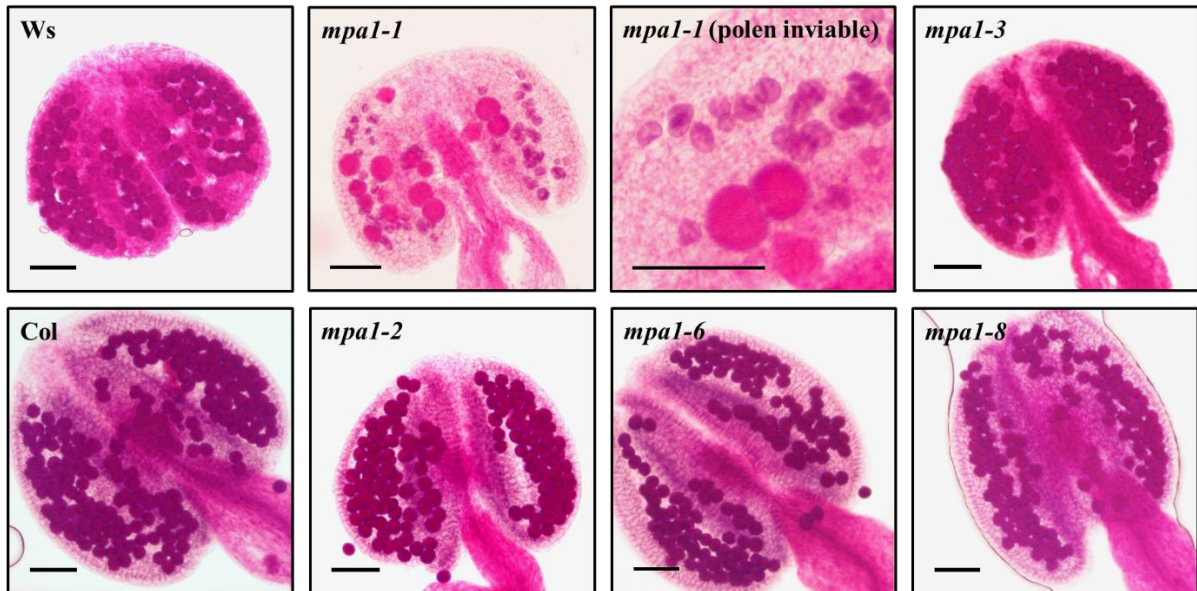


Figura 7. Tinción de Alexander para la observación de la viabilidad del polen en los distintos alelos *mpa1*. En el caso de *mpa1-1* se muestra una ampliación en la que pueden apreciarse granos de polen con diferente coloración y de tamaño más pequeño. Barras de 500 μ m.

Tabla 2. Porcentajes de viabilidad del polen en los distintos alelos *mpa1*. # $P < 0,05$; + $P < 0,01$; * $P < 0,001$.

	% viable	χ^2	<i>P</i>
Ws	100,0	-	-
<i>mpa1-1</i>	8,1	12,87	*
<i>mpa1-3</i>	96,3	1,172	-
Col	99,0	-	-
<i>mpa1-2</i>	100,0	0,005	-
<i>mpa1-6</i>	99,7	0,000	-
<i>mpa1-8</i>	100,0	0,005	-

3.2 Caracterización del fenotipo meiótico

La meiosis comienza en **leptotena**, con la formación de los elementos axiales y el inicio de la condensación de los cromosomas, al tiempo que se originan las DSB. A continuación, en **cigotena** (Figura 8A) ocurre el apareamiento de los cromosomas homólogos y se inicia la sinapsis entre ellos. Este proceso supone la formación del complejo sinaptonémico (SC, *Synaptonemal Complex*), una estructura tripartita, formada por dos elementos laterales y uno central, que une íntimamente a los dos cromosomas homólogos. En **paquitena** (Figura 8B), el

complejo sinaptonémico está completamente formado y los homólogos presentan sinapsis a lo largo de toda su longitud. Posteriormente, en la fase de **diplotena**, el SC se desensambla y los cromosomas homólogos aparecen formando bivalentes, debido a la formación de CO, visibles citológicamente como quiasmas. La condensación cromosómica prosigue en **diacinesis** (Figura 8C) hasta ser máxima en **metafase I** (Figura 8D). En esta fase aparecen los bivalentes biorientados en la placa metafásica. Debido a la tensión y a la condensación en esta especie (y en general en plantas) la cuantificación de quiasmas resulta más adecuada en esta fase que en etapas anteriores. A continuación, en **anafase I**, desaparece la cohesión entre cromátidas hermanas excepto en la región centromérica y los homólogos migran a polos opuestos. Tiene lugar una descondensación parcial de la cromatina durante **telofase I**. En la segunda división meiótica, en **profase II**, en *A. thaliana*, debido a que no hay citocinesis tras la primera división, se aprecian dos células separadas por una barrera de orgánulos. En **metafase II** (Figura 8E) se distinguen cinco cromosomas en cada núcleo. Posteriormente, en **anafase II** se elimina la cohesión centromérica y se produce la separación de las cromátidas hermanas a polos opuestos, generándose cuatro productos haploides que pueden verse formando una **tétrada** (Figura 8F) y que, tras unas divisiones mitóticas, darán lugar a los granos de polen.

En el mutante *mpa1-1* las primeras fases de la meiosis transcurrieron de manera normal, sin problemas en el apareamiento de los homólogos en cigotena (Figura 8. AA) ni tampoco en paquitena (Figura 8. AB), ya que los cromosomas homólogos presentaron sinapsis completa. No obstante, tras el desensamblaje del SC se observó una elevada proporción de univalentes, desde diacinesis hasta metafase I (Figura 8. AC y AD). La presencia de estos univalentes condujo a fallos en la segregación de los cromosomas en anafase I, dando lugar a núcleos desequilibrados en metafase II (Figura 8. AE), reflejando incluso la existencia de segregaciones ecuacionales (por separación de cromátidas hermanas) en anafase I. Todas estas anomalías llevaron a la formación de políadas (Figura 8. AF) al final de la meiosis.

En el caso de los alelos *mpa1-2* (Figura 8G-L), *mpa1-3* (Figura 8AG-AL), *mpa1-6* (Figura 8M-Q) y *mpa1-8* (Figura 8AM-AQ) se observó un fenotipo meiótico aparentemente indistinguible al de las plantas WT. No se detectaron univalentes en metafase I, ni tampoco se observaron fallos de segregación metafase II, de manera que se formaron tétradas con cuatro núcleos haploides con el mismo contenido.

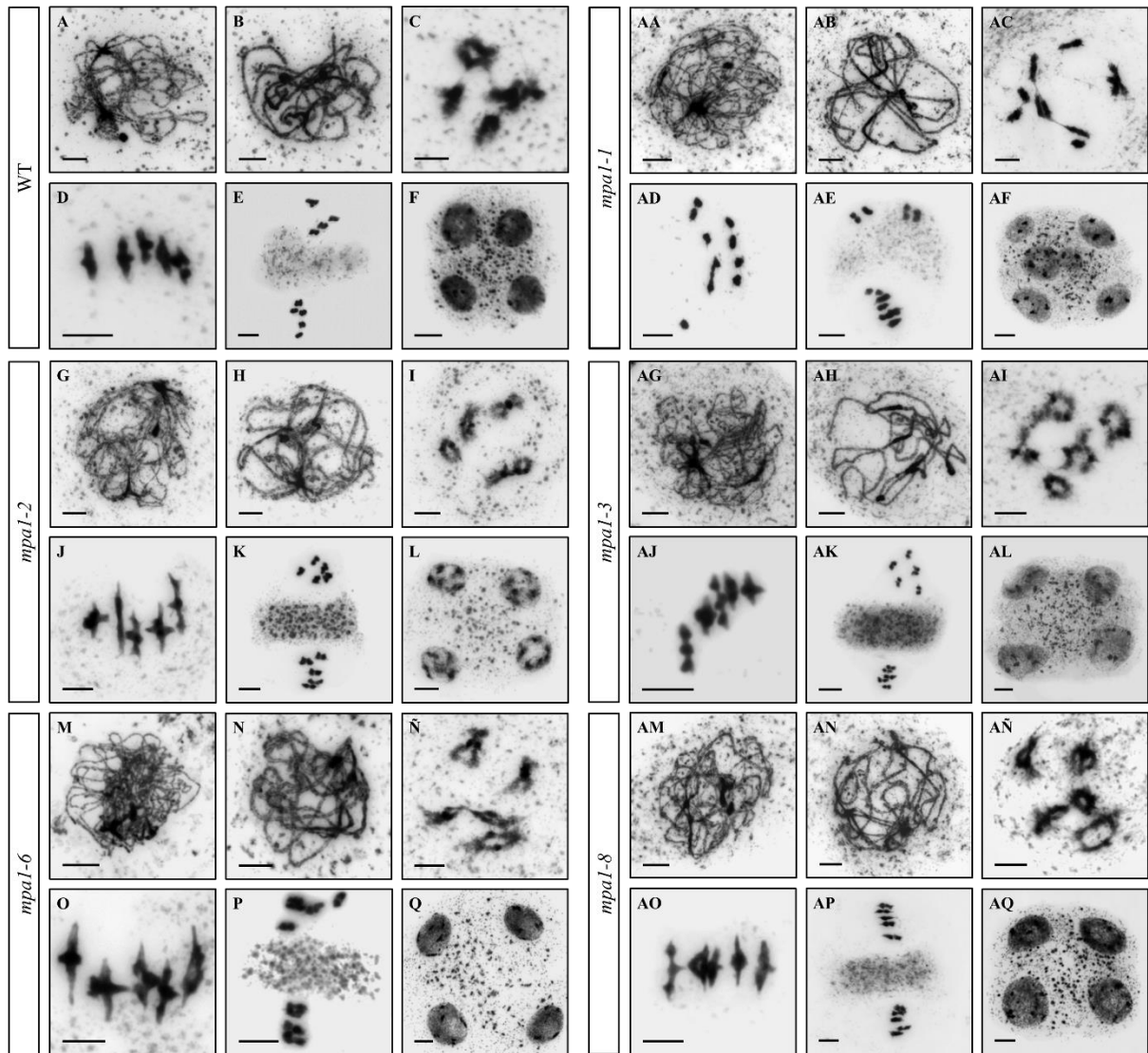


Figura 8. Análisis citológico de la meiosis en PMC de los distintos alelos analizados. (A, G, M, AA, AG, AM) Cigotena. (B, H, N, AB, AH, AN) Paquitena. (C, I, Ñ, AC, AI, AÑ) Diacinesis. (D, J, O, AD, AJ, AO) Metafase I. (E, K, P, AE, AK, AP) Metafase II. (F, L, Q, AF, AL, AQ) Tétrada. Barras de 5 μ .

3.2 Análisis de la frecuencia de quiasmas

Para poder identificar inequívocamente los cromosomas y cuantificar la frecuencia de quiasmas por célula y por cromosoma, se marcaron los cromosomas en metafase I mediante FISH. Se analizaron plantas silvestres de los dos fondos genéticos, ya que la frecuencia de quiasmas varía entre ecotipos distintos. En la Figura 9 se muestran los cromosomas en metafase I de cada uno de los alelos, agrupados en función del ecotipo al que pertenecen.

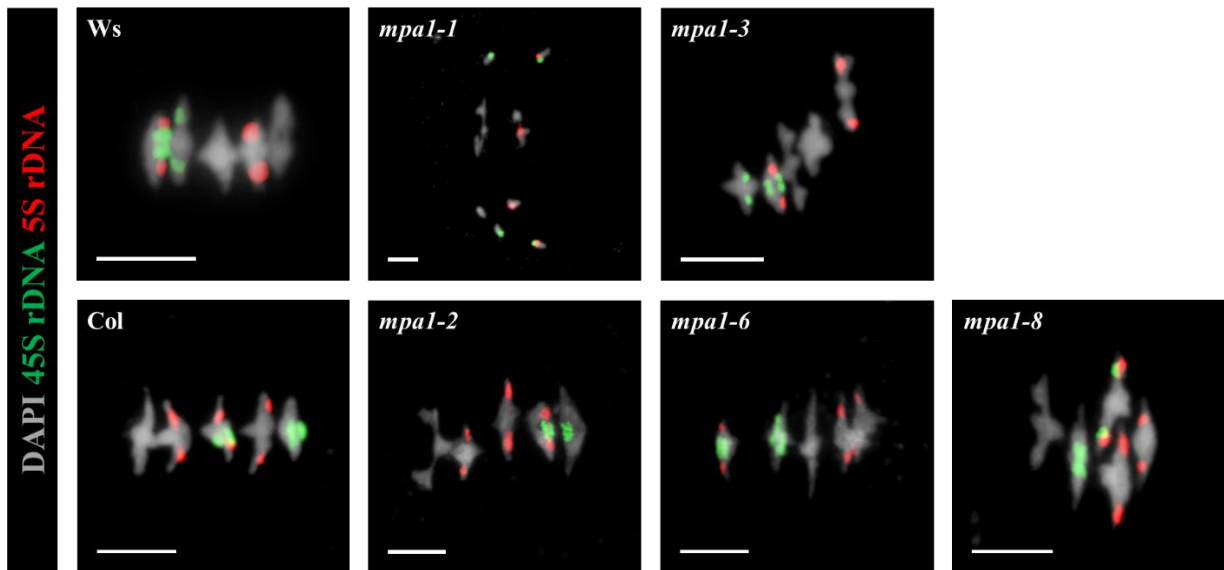


Figura 9. Metafasas I con FISH de los distintos alelos *mpa1* analizados. La sonda rDNA 45S aparece en verde y la sonda rDNA 5S en rojo. Barras de 5 μ m.

En la Tabla 3 se muestran los datos correspondientes a la cuantificación de la frecuencia de quiasmas por célula, por cromosoma y por brazo, así como la contribución de cada cromosoma a la frecuencia de quiasmas para cada uno de los alelos. Los resultados mostraron que no sólo el alelo con univalentes (*mpa1-1*, con una media de $0,87 \pm 0,10$) difiere significativamente del control (Ws, con una media de $9,64 \pm 0,13$), sino que también, el alelo *mpa1-3* (con una media de $8,65 \pm 0,13$), presenta diferencias significativas ($P < 0,001$) en la frecuencia de quiasmas por célula con respecto al control. También en el caso de los alelos pertenecientes al ecotipo Col (*mpa1-2*, *mpa1-6* y *mpa1-8*; con medias de $9,08 \pm 0,14$, $9,24 \pm 0,15$ y $9,30 \pm 0,11$, respectivamente), se detectaron diferencias significativas en la frecuencia de quiasmas por célula respecto al control (Col, con media $10,20 \pm 0,14$). Además, existen diferencias significativas en cuanto a la frecuencia de quiasmas por cromosoma y por brazo, y en la distribución de quiasmas por cromosoma, entre algunos alelos y su control. No obstante, no se observó que afectaran a ningún cromosoma de forma específica.

Tabla 3. Medias de las frecuencias de quiasmas por célula, por cromosoma y por brazo en los distintos alelos *mpa1* analizados. Entre paréntesis se muestra la contribución a la frecuencia de quiasmas por cromosoma. **C** Frecuencia total de quiasmas por célula. **c** Brazo corto. **l** Brazo largo. **n** Número células analizado. # $P < 0,05$; + $P < 0,01$; * $P < 0,001$.

	Cromosoma										C	n
	1		2		3		4		5			
	c	l	c	l	c	l	c	l	c	l		
Ws	0,97	1,31	0,66	1,00	0,82	1,08	0,77	1,01	0,91	1,10	9,64±0,13	77
	2,29	(0,24)	1,66	(0,17)	1,90	(0,20)	1,78	(0,18)	2,01	(0,21)		
<i>mpa1-1</i>	0,04*	0,12*	0,00*	0,15*	0,03*	0,19*	0,03*	0,10*	0,03*	0,16*	8,87±0,10*	67
	0,16*	(0,18)	0,15*	(0,19)*	0,22*	(0,27)	0,13*	(0,15)	0,19*	(0,20)		
<i>mpa1-3</i>	0,90	1,21	0,76	0,91	0,57*	1,01*	0,57*	0,89*	0,77*	1,05	8,65±0,13*	82
	2,11	(0,25)	1,67	(0,19)	1,59*	(0,18)	1,46*	(0,17)	1,82*	(0,21)		
Col	0,99	1,54	0,60	1,13	0,89	1,27	0,49	1,01	0,97	1,31	10,20±0,14	70
	2,53	(0,25)	1,73	(0,17)	2,16	(0,21)	1,50	(0,15)	2,29	(0,23)		
<i>mpa1-2</i>	0,91	1,26*	0,64	0,94 ⁺	0,76 [#]	1,05*	0,64 [#]	0,97	0,85 ⁺	1,06*	9,08±0,14*	95
	2,17*	(0,24)	1,58*	(0,17)	1,81	(0,20)	1,61	(0,18)*	1,92*	(0,21)		
<i>mpa1-6</i>	0,90	1,08*	0,78 [#]	1,06	0,90	1,00*	0,47	1,00	0,92	1,12 ⁺	9,24±0,15*	51
	1,98*	(0,22)*	1,84	(0,20) ⁺	1,90 ⁺	(0,21)	1,47	(0,16)	2,04 ⁺	(0,22)		
<i>mpa1-8</i>	0,83 ⁺	1,07*	0,75 [#]	1,00 ⁺	0,86	0,97*	0,73 ⁺	1,10	0,97	1,02*	9,30±0,11*	102
	1,90*	(0,20)*	1,75	(0,19) [#]	1,83*	(0,20)	1,82*	(0,19)*	1,99*	(0,22)		

Se estudió con mayor detalle el alelo *mpa1-1* analizando la contribución a la frecuencia de quiasmas por célula de cada cromosoma. También se cuantificó el porcentaje de univalentes por cromosoma y la proporción de células con diez univalentes. En el caso de la contribución debida a cada cromosoma se detectó que ésta variaba entre el alelo mutante y el control, de manera que el cromosoma 3 mostró una mayor aportación en el mutante (Figura 10A). La observación de células en metafase I reveló que un 41,8 % de las células carecían de quiasmas, presentando únicamente univalentes en metafase I. El 58,2 % restante mostró al menos un quiasma, encontrándose el cromosoma 3 implicado en un mayor porcentaje de quiasmas que el resto de los cromosomas, y consecuentemente, mostrando un menor porcentaje de univalentes (Figura 10 B y C).

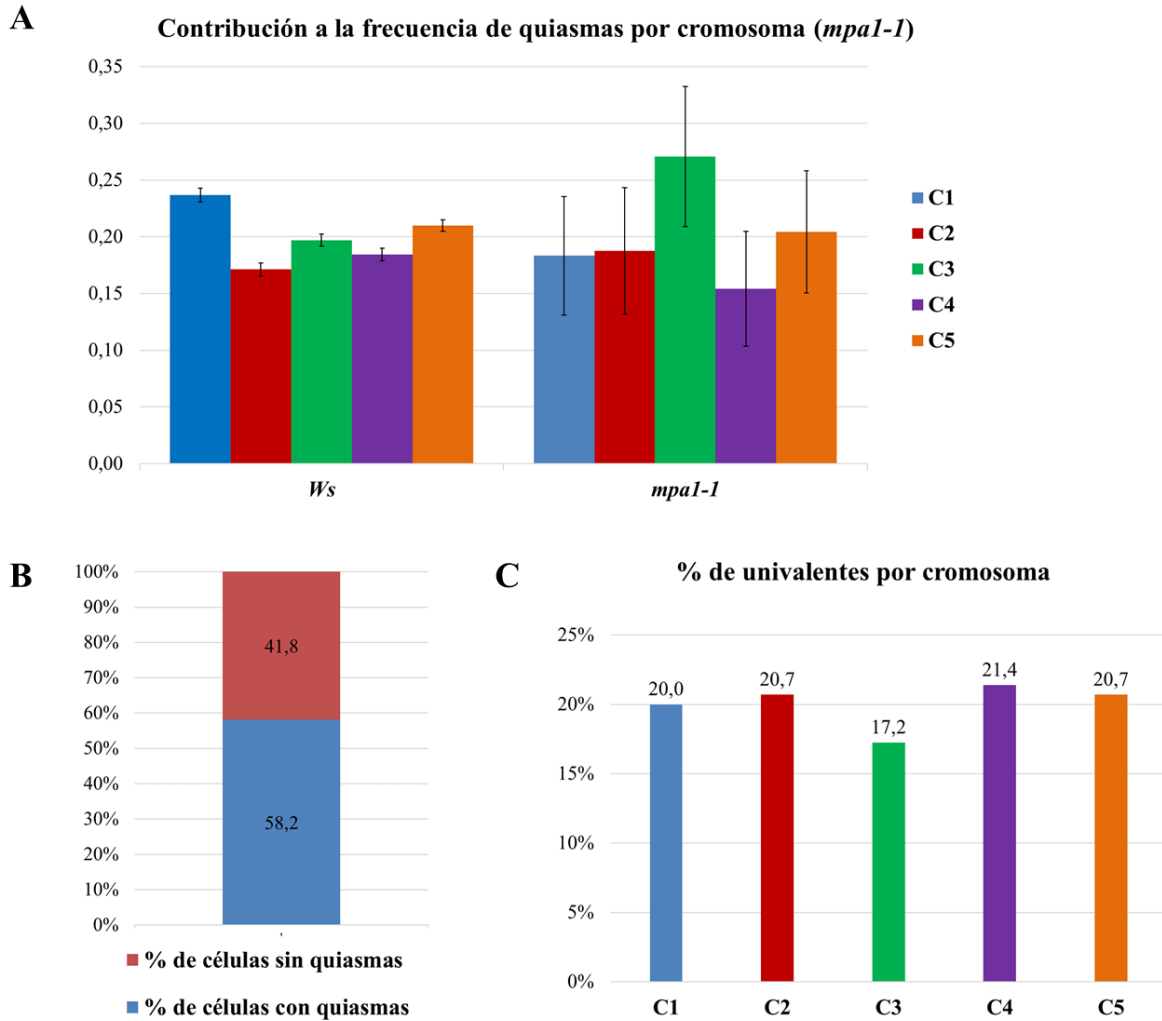


Figura 10. Análisis detallado de la formación de quiasmas en metafases I del alelo *mpa1-1*. (A) Contribución de cada cromosoma a la frecuencia de quiasmas por célula en el alelo *mpa1-1* en comparación con el control WT (ecotipo Ws). (B) Porcentaje de células con y sin quiasmas en el alelo *mpa1-1*. (C) Porcentaje de univalentes por cromosoma en las células que presentaban al menos un quiasma en el alelo *mpa1-1*.

4. Discusión

La función meiótica de la aminopeptidasa MPA1 fue estudiada previamente por Sánchez-Morán *et al.* (2004). En este estudio se analizó el mutante *mpa1-1*, el cual presenta problemas en fertilidad causados por una baja viabilidad del polen (Figuras 4 y 7; Tabla 2), como consecuencia de fallos durante meiosis. Concretamente los fallos consisten en una bajada drástica de la frecuencia de quiasmas (el mutante tiene una media de $0,87 \pm 0,10$ quiasmas por célula), lo que supone la presencia de una elevada proporción de univalentes en metafase I (Figura 8. AA-FA). Este fenotipo tan drástico es consecuencia de la ausencia total de la expresión del gen, considerándose *mpa1-1* como un alelo KO. Por otro lado, en el mismo estudio, se usaron inhibidores de aminopeptidasas marcados con fluorescencia, lo que permitió determinar que MPA1 es una proteína que actúa específicamente en los meiocitos, al

quedar estos marcados diferencialmente ante la presencia del inhibidor. De esta manera, se identificó a MPA1 como una aminopeptidasa con un papel central en la meiosis y la HR, llevando a cabo su principal actividad en las PMC. En el presente estudio, pretendemos ampliar esta caracterización con un análisis más detallado de la frecuencia de quiasmas, así como con el estudio de otros alelos mutantes de inserción de T-DNA con fenotipos menos drásticos.

4.1 Análisis detallado de la meiosis en el alelo KO *mpa1-1*

El alelo *mpa1-1* muestra un fenotipo desinápico, ya que las primeras fases de la meiosis transcurren sin diferencias con respecto a plantas WT y la formación del SC es normal (Figura 8. AA y AB). No obstante, a partir de diacinesis (Figura 8. AC) y en metafase I (Figura 8. AG) aparece una gran cantidad de univalentes en el mutante, debido a la ausencia de quiasmas producida por fallos durante la HR que impiden la formación de CO. Además, nuestros resultados sugieren que en el alelo *mpa1-1* hay un ligero cambio en la distribución de quiasmas respecto del control (Ws), ya que, aunque no haya diferencias significativas en la contribución de cada cromosoma a la frecuencia total, se observa una tendencia del cromosoma 3 a tener una mayor contribución. Por el contrario, en el control son los cromosomas 1 y 5, los cromosomas de mayor tamaño (Figura 6), los que más contribuyen (Figura 10.A). Estudios previos han puesto de manifiesto que estas variaciones en la contribución de cada cromosoma a la media total de quiasmas pueden aparecer en determinados mutantes meióticos, como *asy1* (Sánchez-Morán *et al.*, 2001). Este mutante muestra defectos en la formación de los elementos axiales y del SC, ya que ASY1 es una de las principales proteínas que los forman. Como consecuencia, *asy1* presenta una fuerte bajada en la frecuencia de quiasmas, siendo uno de los cromosomas acrocéntricos (el cromosoma 2) el de mayor contribución. En cambio, el mutante *dysl*, detallado en el mismo trabajo y que presenta fenotipo desinápico como *mpa1-1*, así como una reducción drástica de la frecuencia de quiasmas, no muestra cambios en la distribución de los mismos. No tenemos una explicación clara para determinar el origen del cambio de distribución de los quiasmas en *mpa1-1*. En otros trabajos se ha propuesto que este tipo de variaciones puede deberse a que exista una regulación de la recombinación a nivel de cromosoma (López *et al.*, 2012). Por otro lado, en este alelo (*mpa1-1*) hay una elevada proporción de células que carecen de quiasmas (Figura 10. B), por lo que la aparición de fallos de segregación que causan la formación de polen aberrante es muy frecuente (véase apartado 3.2). No obstante, en *mpa1-1*

la formación del SC contribuye de alguna manera a la segregación de los cromosomas homólogos a polos opuestos, a diferencia de lo que ocurre en *asyl* (Pradillo *et al.*, 2007).

4.2 Estudio de nuevos alelos *mpa1*

El resto de los alelos analizados en el presente estudio, aunque mostraron un fenotipo normal en meiosis (Figura 8), manifestaron un leve, aunque significativo, descenso en la frecuencia de quiasmas (Tabla 3). La diferencia con *mpa1-1* podría indicar que se trata de alelos hipomorfos o KD. No obstante, sería necesario un análisis de la expresión del gen (o de la proteína) para poder afirmarlo. El descenso en la frecuencia de quiasmas presente en los alelos no afectó a la viabilidad del polen en los mismos (Tabla 2), ya que no supuso la pérdida del quiasma obligatorio, garantizándose la correcta segregación de los cromosomas homólogos en anafase I. Además, aunque se observan ligeros cambios en la distribución de quiasmas, no parece que éstos afecten a los cromosomas de forma específica (Tabla 3).

Por lo tanto, no hay una bajada drástica de la frecuencia de quiasmas en los alelos cuyas inserciones se localizan en regiones del gen aguas arriba de las secuencias que codifican la región catalítica de la proteína, como ocurre en los alelos *mpa1-3* y *mpa1-8* (Figura 11). De la misma manera, tampoco se observan defectos severos en la meiosis de aquellos alelos cuyas inserciones se localizan aguas abajo de esta región, como es el caso de *mpa1-2*, o en la región 3' UTR como *mpa1-6* (Figura 11). En otros mutantes de inserción se ha comprobado que las inserciones de T-DNA en distintas zonas del gen pueden generar distintos fenotipos, al afectar de distinta manera a la expresión del gen y a la estructura de la proteína. Esto sucede porque dichas inserciones impiden la expresión del mensajero aguas abajo de su localización o truncan la proteína resultante (Bleuyard *et al.*, 2005). En *mpa1* los distintos fenotipos meióticos de los alelos analizados se pueden deber a las distintas posiciones del T-DNA en cada uno de ellos (Figura 11). Así, una posible explicación a nuestros resultados es que además de la región catalítica, otros dominios localizados en las regiones C-terminal y N-terminal sean necesarios para la función de MPA1 en la HR. En otras metaloproteasas de la familia M1 en estas regiones aparecen dominios de interacción proteína-proteína (Peer, 2011; van der Hoorn, 2008). En este sentido, es posible que MPA1 funcione como un homodímero, tal y como sucede con APM1 (Hosein *et al.*, 2010), codificada por un gen parálogo a *MPA1* y con función en mitosis; o que interactúe con otras proteínas durante la HR, ejerciendo funciones reguladoras de forma complementaria a su función de aminopeptidasa.

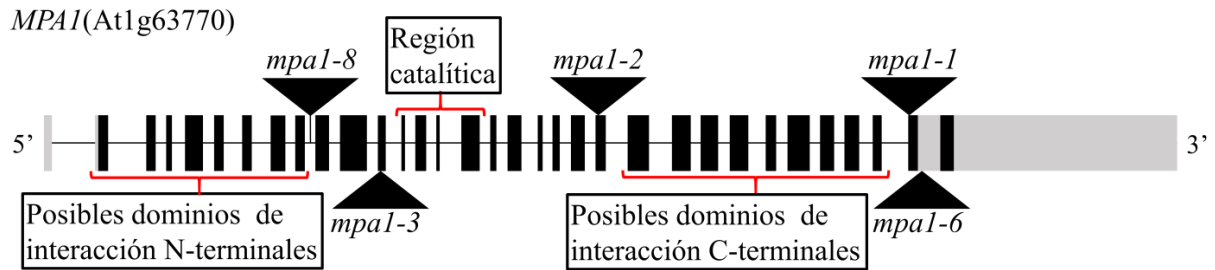


Figura 11. Esquema del gen *MPA1* con las inserciones de T-DNA correspondientes a cada alelo analizado y las regiones codificantes del dominio catalítico y de posibles dominios de interacción. La región catalítica está codificada por los exones 12 a 15.

4.3 Posible localización de *MPA1* en la ruta de HR

Una vez conocida la importancia de *MPA1* en la ruta de HR (Figura 3), el siguiente paso es situarla en el lugar donde actúa. Así, si nos centramos en el alelo nulo *mpa1-1*, la baja frecuencia de quiasmas que presenta ($0,87 \pm 0,10$ quiasmas por célula) y la aparente ausencia de problemas en las primeras etapas de la división meiótica hacen pensar que su intervención debería tener lugar antes de la formación de la dHJ. En este mutante la sinapsis es completa (Pradillo *et al.*, 2007), por lo que no deberían estar afectados los correspondientes pasos anteriores de la HR (Figura 3), como la generación de DSB por SPO11, su resección por el complejo MRN y la invasión de hebra mediada por las recombinasas RAD51 y DMC1, ya que son pasos necesarios para el correcto apareamiento y sinapsis de los homólogos. Por otro lado, la bajada de la frecuencia de quiasmas es menor a la esperada en el caso de que sólo estuviera presente una ruta ($\sim 8,5$ quiasmas si afectase sólo a la ruta de CO de clase II y 1,5 si sólo impidiera los CO de clase I), es lógico pensar que *MPA1* debería actuar previamente a la separación de ambas rutas (Figura 3). Dos posibles proteínas que pueden necesitar la presencia de *MPA1* para cumplir su función pueden ser MSH4, una proteína del grupo de las ZMM que interviene en la estabilización de las dHJ (Higgins *et al.*, 2004); y MUS81, endonucleasa implicada en la ruta de formación de CO de clase II (Berchowitz *et al.*, 2007; Higgins *et al.*, 2008). Además, el doble mutante para estos genes (*msh4/mus81*) presenta una frecuencia de quiasmas de 0,85 quiasmas por célula, similar la obtenida para el alelo KO *mpa1-1* (Higgins *et al.*, 2008). A pesar de los problemas de *mpa1-1* a la hora de formar quiasmas cabe destacar que todas las DSB producidas en el mutante son reparadas, ya que no se apreció fragmentación (Figura 8AA-AF). Esta reparación podría tener lugar mediante intercambios entre cromátidas hermanas, formación de NCO u otras rutas de reparación de DNA alternativas a la HR.

4.4 Futuros experimentos

Con el fin de llegar al máximo nivel de detalle en la caracterización de la función de MPA1 en meiosis y de poder localizar su posición en la ruta, así como su mecanismo de acción, se pretenden realizar los siguientes experimentos, que, en principio, formarán parte de mi próximo trabajo fin de máster:

- RT-PCR de los distintos alelos KD *mpa1* para conocer qué regiones del gen se están expresando.
- Análisis de la dinámica de proteínas implicadas en HR mediante inmunolocalización (RAD51, DMC1, MSH5, MLH1 y MUS81) en el alelo KO *mpa1-1*.
- Aplicación de inhibidores de aminopeptidasas sensibles a puromicina para fenocopiar los efectos del alelo KO en mutantes *msh4*, *mlh1* y *mus81*, con el fin de caracterizar el fenotipo meiótico y obtener los correspondientes dobles mutantes en el caso de encontrarse diferencias.
- Analizar los posibles efectos en meiosis de mutaciones en otras proteasas vegetales codificadas por genes parálogos a *MPA1* (por ejemplo, APM1 y LKH).

5. Conclusiones

- MPA1 es una metalopeptidasa esencial para la recombinación homóloga y la formación de sobrecruzamientos, ejerciendo su actividad principalmente en meiosis.
- El alelo KO, *mpa1-1*, sufre una reducción extrema de la frecuencia de quiasmas, manifestando además variaciones (aunque no significativas) en el porcentaje con que cada cromosoma contribuye a la media de quiasmas.
- El resto de los alelos analizados presentan un leve, aunque significativo, descenso en la frecuencia de quiasmas, conservando el quiasma obligatorio y sin manifestar problemas en la viabilidad del polen.
- El análisis de los distintos alelos sugiere que las inserciones de T-DNA en diferentes partes del gen *MPA1* pueden tener efectos distintos en el fenotipo. Esto puede deberse a variaciones en el patrón de expresión del gen o a que dominios no catalíticos podrían ejercer una función en la HR.

Este trabajo ha sido presentado y defendido en una comunicación oral en el congreso nacional de meiosis “2nd MeioNet Meeting”, celebrado en Miraflores de la Sierra (Madrid, España) del 14 al 18 de junio de 2017, con el título: “*Revisiting the aminopeptidase MPA1: Looking for new alleles to infer its function in chiasma formation*” (Anexo 1).

6. Bibliografía

- Alexander, M. P. 1969. Differential staining of aborted and nonaborted pollen. *Stain Technology*, 44: 117–122.
- Arabidopsis Genome Initiative. 2000. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, 408: 796–815.
- Berchowitz, L. E., Francis, K. E., Bey, A. L., & Copenhaver, G. P. 2007. The role of AtMUS81 in interference-insensitive crossovers in *A. thaliana*. *PLoS Genetics*, 3: 1355–1364.
- Bleuyard, J. Y., Gallego, M. E., Savigny, F., & White, C. I. 2005). Differing requirements for the *Arabidopsis* Rad51 paralogs in meiosis and DNA repair. *Plant Journal*, 41: 533–545.
- Campbell, B. R., Song, Y., Posch, T. E., Cullis, C. A., & Town, C. D. 1992. Sequence and organization of 5S ribosomal RNA-encoding genes of *Arabidopsis thaliana*. *Gene*, 112: 225–228.
- Fransz, P., Armstrong, S., Alonso-Blanco, C., Fischer, T. C., Torres-Ruiz, R. A., & Jones, G. 1998. Cytogenetics for the model system *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*, 13: 867–876.
- Gerlach, W. L., & Bedbrook, J. R. 1979. Cloning and characterization of ribosomal RNA genes from wheat and barley. *Nucleic Acids Research*, 7: 1869–1885.
- Grelon, M., Vezon, D., Gendrot, G., & Pelletier, G. 2001. AtSPO11-1 is necessary for efficient meiotic recombination in plants. *EMBO Journal*, 20: 589–600.
- Higgins, J. D., Armstrong, S. J., Franklin, F. C. H., & Jones, G. H. 2004. The *Arabidopsis* MutS homolog AtMSH4 functions at an early step in recombination: Evidence for two classes of recombination in *Arabidopsis*. *Genes and Development*, 18: 2557–2570.
- Higgins, J. D., Buckling, E. F., Franklin, F. C. H., & Jones, G. H. 2008. Expression and functional analysis of AtMUS81 in *Arabidopsis* meiosis reveals a role in the second pathway of crossing-over. *Plant Journal*, 54: 152–162.
- Hollingsworth, N. M., & Brill, S. J. 2004. The Mus81 solution to resolution: Generating meiotic crossovers without Holliday junctions. *Genes and Development*, 18:117–125.

- Hosein, F. N., Bandyopadhyay, A., Peer, W. A., & Murphy, A. S. (2010). The catalytic and protein-protein interaction domains are required for APM1 function. *Plant Physiology*, 152: 2158–2172.
- Jackson, N., Sanchez-Moran, E., Buckling, E., Armstrong, S. J., Jones, G. H., & Franklin, F. C. H. 2006. Reduced meiotic crossovers and delayed prophase I progression in AtMLH3-deficient *Arabidopsis*. *The EMBO Journal*, 25: 1315–1323.
- López, E., Pradillo, M., Oliver, C., Romero, C., Cuñado, N., & Santos, J. L. 2012. Looking for natural variation in chiasma frequency in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*, 63: 887–894.
- Lyczak, R., Zweier, L., Group, T., Murrow, M. A., Snyder, C., Kulovitz, L., Beatty, A., Smith, K., Bowerman, B. 2006. The puromycin-sensitive aminopeptidase PAM-1 is required for meiotic exit and anteroposterior polarity in the one-cell *Caenorhabditis elegans* embryo. *Development*, 133: 4281–4292.
- Mercier, R., Mézard, C., Jenczewski, E., Macaisne, N., & Grelon, M. 2015. The molecular biology of meiosis in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 66: 297–327.
- Moran, E. S., Armstrong, S. J., Santos, J. L., Franklin, F. C. H., & Jones, G. H. 2001. Chiasma formation in *Arabidopsis thaliana* accession Wassilewskija and in two meiotic mutants. *Chromosome Research*, 9: 121–128.
- Murashige, T.; Skoog, F. 1978. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiology of Plant* 43: 473 – 497.
- Peer, W. A. 2011. The role of multifunctional M1 metallopeptidases in cell cycle progression. *Annals of Botany*, 107: 1171–1181.
- Peterson, R., Slovin, J. P., & Chen, C. 2010. A simplified method for differential staining of aborted and non-aborted pollen grains. *International Journal of Plant Biology*, 1: 66–69.
- Pradillo, M., López, E., Romero, C., Sánchez-Morán, E., Cuñado, N., & Santos, J. L. 2007. An analysis of univalent segregation in meiotic mutants of *Arabidopsis thaliana*: A possible role for synaptonemal complex. *Genetics*, 175: 505–511.

Pradillo, M., Varas, J., Oliver, C., & Santos, J. L. 2014. On the role of AtDMC1, AtRAD51 and its paralogs during *Arabidopsis* meiosis. *Frontiers in Plant Science*, 5: 1-13.

Ross K. J., Fransz, P., & Jones, G. H. 1996. A light microscopic atlas of meiosis in *Arabidopsis thaliana*. *Chromosome Research*, 4: 507-516.

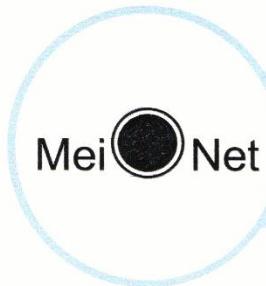
Sánchez-Morán, E., Jones, G. H., Franklin, F. C. H., & Santos, J. L. 2004. A puromycin-sensitive aminopeptidase is essential for meiosis in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell*, 16: 2895–2909.

Sturtevant AH. 1913. A third group of linked genes in *Drosophila ampelophila*. *Science*, 37: 990–992.

van der Hoorn, R. A. L. 2008. Plant proteases: from phenotypes to molecular mechanisms. *Annual Review of Plant Biology*, 59: 191–223.

Walling, L. 2006. Recycling or regulation? The role of amino-terminal modifying enzymes. *Current Opinion in Plant Biology*, 9: 227-233.

Anexo 1



2nd MeioNet Meeting

14th-16th June 2017

Miraflores de la Sierra, Madrid, Spain

To whom it may concern

This letter confirms that **Miguel Pachón Peñalba** attended the 2nd MeioNet Meeting at Miraflores de la Sierra (Madrid), between 14th and 16th June 2017.

Yours faithfully,

The Organizers

A handwritten signature in black ink, appearing to read "J. Carballo".

Jesús Carballo

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "R. Gómez".

Rocío Gómez

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "M. Pradillo".

Mónica Pradillo

www.meionet.org

Program

Wednesday, June 14th

- 14.30–16.30 *Registration*
 16.30 *Welcome Introduction*

Session 1.- Meiosis onset and Recombination (Chair: Ruth McCole)

- 17:00 **Attila Tóth (IS 1):** *Controlling DNA Breaks in Mammalian Meiosis.*
 17:45 **José Ayté:** *U2AF65^{Prp2} promotes intron definition by stabilizing U1 snRNP at the 5'splice site.*
 18:05 **Daniel Fernández:** *Small-RNaseq reveals miRNAs differentially expressed in female and male primordial germ and somatic cells in meiotic onset of the mouse embryo.*
 18:25 *Coffee Break*
 18:55 **David Álvarez-Melo:** *Regulation of Double Strand Break (DSB) formation via the axial element protein Hop1.*
 19:15 **Miguel Pachón:** *Revisiting the aminopeptidase MPA1: Looking for new alleles to infer its function in chiasma formation.*
 19:35 **Ana Martínez-Marchal:** *Study of the role of CHK2 in mammalian oogenesis.*
 19:55 **Elena de la Casa:** *Study of genetic background and diet effects on meiotic crossover frequency.*
 20:15 **Sponsor 1 seminar**
 21:00 *Dinner*

Thursday, June 15th

8:00–9:00 *Breakfast*

Session 2.- Regulation of Recombination (Chair: Alberto Pendás)

- 9:00 **Denise Zickler (IS 2):** *Interplay between Synaptonemal Complex and Spindle Pole Body components.*
 9:45 **Divyashree Coimbatore:** *A forward genetic screen to identify factors that control meiotic recombination in Arabidopsis thaliana.*
 10:05 **Jesús Page:** *Mid pachytene marks the transition from a meiotic to a somatic-like DNA damage response during mouse meiosis.*
 10:25 **Tatiana García-Muse:** *DNA damage Phosphorylation within the Synaptonemal Complex.*
 10:45 *Coffee Break + Poster Session*
 11:50 **Esther Herruzo:** *Identification of Pch2 localization determinants and its role in the pachytene checkpoint.*
 12:10 **Sara González:** *Role of the H2A.Z histone variant in the pachytene checkpoint.*

Session 3.- Chromosome Structure and Dynamics (Chair: Attila Tóth)

- 12:30 **Inés Berenguer:** *Inner Centromere Network in mouse meiosis: the interplay between SGO2 and CPC recruitment pathways.*

Revisiting the aminopeptidase MPA1: Looking for new alleles to infer its function in chiasma formation

¹MIGUEL PACHÓN, ¹Mónica Pradillo and ¹Juan Luis Santos

¹Departamento de Genética, Facultad de Biología, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain. mipachon@ucm.es

Plant proteases are key factors with essential regulatory roles during the cell cycle. They can be subdivided in four catalytic classes: metallo-, cysteine, serine and aspartic peptidases. Aminopeptidases cleave N-terminal peptide bonds and most of them are metalloenzymes. These proteins are tightly regulated since they affect an essential region for post-translational modifications.

The *Arabidopsis thaliana* MEIOTIC PROPHASE AMINOPEPTIDASE (MPA1) was identified from a forward genetic screen for mutants with reduced fertility [1]. MPA1 is a metallopeptidase and belongs to the M1 subfamily that is sensitive to the antibiotic puromycin. It may be a meiosis-specific protein, since mutant plants grow normally. The cytological characterization of pollen mother cells from the knockout mutant *mpa1-1* has revealed a desynaptic phenotype. MPA1 is essential during prophase I, after the recombinase RAD51 is loaded onto the chromatin, but before the loading of MSH4. In the mutant, pairing appears to proceed normally and synapsis is complete at pachytene, but a high frequency of univalents is observed at diplotene. The mean chiasma frequency is less than one chiasma per cell at metaphase I, revealing that MPA1 is a major regulator of meiotic recombination in *A. thaliana*.

In order to highlight why recombination pathway is disrupted when MPA1 is not functional, we are looking for knockdown mutants with T-DNA insertions located in different domains. We have applied cytological and molecular techniques to analyze several mutant lines and found a less extreme phenotype in two of them (*mpa1-2*, *mpa1-3*). The finding of these new *mpa1* alleles suggests that the manipulation of the gene *MPA1* could be useful from a plant breeding perspective.

[1] Sánchez-Morán, E., Jones, G.H., Franklin, F.C.H., Santos, J. L. (2004). A puromycin-sensitive aminopeptidase is essential for meiosis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 16: 2895–2909.