



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

UNAM
POSGRADO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS
FACULTAD DE QUÍMICA

“Función de eIF(iso)4E en la traducción
selectiva de mRNAs en *Arabidopsis thaliana*”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A:

**M. en C. ANA VALERIA MARTINEZ
SILVA**

Tutor: Dra. Tzvetanka Dimitrova Dinkova

MÉXICO, D. F.

Junio 2012



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química de la UNAM, Laboratorio 103 - Conjunto E, bajo la tutoría de la Dra. Tzvetanka Dimitrova Dinkova. El autor recibió beca de doctorado CONACYT y el proyecto fue realizado con fondos del CONACyT 43669 y 81708 y del Programa de Apoyo a la Innovación e Investigación Tecnológica (PAPIIT-UNAM) 204309.

INDICE

	Página
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
ANTECEDENTES	3
El proceso de traducción	3
Inicio	3
Elongación	6
Terminación	7
Reciclamiento	7
Complejo de unión a Cap, eIF4F	9
El factor eIF4E	10
Estructura de eIF4E	10
Funciones y regulación de eIF4E	12
Clasificación de los miembros de la familia eIF4E	13
Selectividad y funciones de los miembros de la familia eIF4E	13
Selectividad por el tipo de cap	13
Patrones de expresión	14
Funciones especializadas	15
Selectividad de traducción de mRNAs	15
Regulación de la expresión viral	16
eIF4E en el transporte de mRNAs	16
Miembros de la familia eIF4E en plantas	16
Elementos en los mRNAs que contribuyen al control traduccional	19
Análisis traduccional mediante el uso de microarreglos y gradientes de sacarosa	21
JUSTIFICACIÓN	24
HIPOTESIS	25
OBJETIVOS	25
Objetivo General	25
Objetivos Particulares	25
MÉTODOS EXPERIMENTALES	26
Material biológico	26
Generación de las líneas transgénicas que sobre-expresan al factor eIF(iso)4E	26
Condiciones de crecimiento	26
Análisis de la longitud de raíz	27
Extracción de proteína y análisis por Western blot	27
Gradientes polisomales	28
Aislamiento de RNA	29
Microarreglos de DNA	30
PCR tiempo real o cuantitativo (qRT-PCR)	31
RT-PCR	33
Análisis de estructuras UTR	34
RESULTADOS	35
Caracterización molecular de plantas mutantes y que sobre-expresan a <i>AteIF(iso)4E</i>	35
Comparación del perfil traduccional de plantas Wt y mutantes para eIF(iso)4E	39
Identificación de los genes regulados a nivel traduccional por eIF(iso)4E	42

	Página
Verificación de los cambios en traducción de mRNAs regulados por eIF(iso)4e por PCR en tiempo real	46
Efecto de la sobre-expresión de eIF(iso)4E en la distribución de los mRNAs seleccionados	51
<i>AteIF(iso)4E</i> regula la asociación a polisomas del mRNA <i>PHO1</i> en condiciones normales	54
eIF(iso)4E altera los niveles de proteína de <i>PHO1</i>	58
Caracterización de plantas mutantes	59
Búsqueda de características comunes entre los mRNAs para dilucidar su mecanismo de regulación	64
DISCUSION	65
CONCLUSIONES	70
PERSPECTIVAS	71
BIBLIOGRAFÍA	72
Apéndice 1. Secuencias de oligonucleotidos usadas para los experimentos de PCR en tiempo real (qRT-PCR)	78
Apéndice 2. Microarreglos de DNA	79
Fundamentos de la técnica	79
Fabricación de los microarreglos o Chips	79
Preparación de la muestra e hibridación	79
Colecta de datos, normalización y análisis	80
Aplicaciones	80
ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN	82
ARTÍCULO DE REVISIÓN	

RESUMEN

El factor eucariótico de inicio de la traducción 4E (eIF4E) es un componente central en el inicio y regulación de la síntesis de proteínas en células eucarióticas. El reclutamiento de la mayoría de mRNAs eucarióticas a la maquinaria traduccional involucra el reconocimiento de la estructura cap del extremo 5' del mRNA por este factor, y es el paso limitante en el inicio de la traducción. La existencia de múltiples miembros de la familia 4E en diferentes organismos incluyendo plantas, ha mostrado que la abundancia relativa y la actividad que presentan estos miembros durante algún momento del desarrollo o bajo una condición específica puede variar y tener papeles reguladores durante etapas del desarrollo y /o bajo alguna condición o estrés específico por lo tanto, su función no es totalmente redundante y pueden tener actividad discriminatoria para el reconocimiento de ciertos mRNAs. eIF(iso)4E es un factor de inicio específico de plantas cuyo papel en el control de la traducción *in vivo* aun se desconoce, ya que los estudios previamente hechos han sido realizados principalmente a nivel de su expresión y su función *in vitro*.

En este trabajo, nos hemos planteado analizar la función de eIF(iso)4E en la traducción selectiva de mRNAs en *Arabidopsis thaliana* utilizando una mutante que presenta interrupción del gen eIF(iso)4E y una línea que lo sobre-expresa. En particular, se estudió su papel en el desarrollo y el efecto de su ausencia en la expresión genética a nivel traduccional usando perfiles polisomales separados en gradientes de sacarosa. El análisis se realizó empleando métodos bioinformáticos, y análisis de microarreglos de DNA. Encontramos varios genes que muestran cambios significativos en su nivel traduccional; al modificar los niveles de eIF(iso)4E la mayoría de los mRNAs alterados muestran expresión preferencial en raíz. Entre estos genes se encuentra *PHO1*, un transportador de fosfatos que comprobamos requiere de este factor para su traducción. Por otra parte también observamos que la raíz de las plantas carentes de eIF(iso)4E son más largas que las de plantas silvestres, por el contrario, plantas que sobre-expresan este factor presentan raíces más cortas. Los resultados obtenidos sugieren que la traducción selectiva de algunos mRNAs por eIF(iso)4E es requerida para el desarrollo de la raíz de *A. thaliana* en condiciones normales de desarrollo.

ABSTRACT

The eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E) is a central component in initiation and regulation of protein synthesis in eukaryotic cells. The recruitment of most eukaryotic mRNAs to the translational machinery involves the recognition of the cap structure at the 5' end of mRNA by this factor, and it is the rate limiting step in the translation initiation. The existence of multiple 4E family members in many organisms including plants, has shown that the relative abundance and the activity of these members can be variable and have regulatory roles in development, therefore, its function is not fully redundant and it can have discriminatory activity for mRNA recognition. eIF(iso)4E is a plant specific initiation factor whose role at *in vivo* translational control remains unknown, since previous studies have been done mainly at expression level and about its *in vitro* function.

In this work, we decided to analyze the eIF(iso)4E function in mRNA selective translation in *Arabidopsis thaliana* using two mutant plants, one that has interrupted the eIF(iso)4E gene and another that over-expresses it. In particular, we studied its role in plant development and the effect of its absence in gene expression at translational level using polysomal profiles separated by sucrose gradients and the analysis was performed using bioinformatic methods and DNA microarray analysis. We found several genes that show significant changes in the translational levels; when the eIF(iso)4E levels were modified, the most altered mRNAs showed preferential expression in roots. One of these genes is *PHO1*, a phosphate transporter that we verified that requires this factor for its optimal translation. On the other hand we also observed roots of plants lacking eIF(iso)4E are longer than those of wild type, and plants that overexpress this factor shows shorter roots. The results obtained suggest that the selective translation of some mRNAs for eIF(iso)4E is required for *A. thaliana* root development under normal conditions.

ANTECEDENTES

EL PROCESO DE TRADUCCION

La mayoría de los RNA mensajeros eucarióticos son modificados con una guanina metilada en su extremo 5' (5'-7-metilguanosintrifosfato, ^{m7}GpppN, donde N es cualquier nucleótido). Esta estructura es conocida como cap, y sirve para el reclutamiento de los mRNAs por la maquinaria de traducción. En eucariontes, la síntesis de más de 95% de todas la proteínas es iniciada involucrando el cap de los mRNAs (Browning, 2004; Fischer, 2009; Kaye *et al.*, 2009).

La traducción de mRNAs consta de cuatro etapas: iniciación, elongación, terminación y reciclamiento; cada una catalizada por diferentes grupos de proteínas: factores de iniciación, de elongación, y de terminación. Cada uno de estos pasos puede ser regulado resultando en una síntesis diferencial de proteínas específicas y cambios profundos en la fisiología celular (Figura 1; Groppo and Richter, 2009), sin estar acompañados necesariamente por cambios en la transcripción de los genes correspondientes.

Inicio

La iniciación de la traducción es un proceso complicado que requiere de más de 12 factores de inicio (eIF, Tabla 1). El paso inicial es el ensamblaje del complejo circular mRNA-proteína (Figura 1). En este proceso, el 5'-^{m7}GpppN-cap del transcrito es reconocido por el factor eucariótico de traducción 4E (eIF4E) unido a eIF4G (proteína de anclaje); el cual, también recluta a la helicasa eIF4A (que facilita el desenrollamiento dependiente de ATP de estructuras secundarias en el RNA). El complejo formado por los factores eIF4E, eIF4G y eIF4A es conocido como eIF4F. Una vez unido eIF4F al 5'-cap del mRNA, se recluta eIF4B quien es un homodímero que une el poly(A)] y estabiliza la unión del ATP con eIF4A. Por último, eIF4G recluta a la proteína PABP (Poly A Binding Protein) unida a la cola de Poly A del mensajero promoviendo la circularización del mRNA y estimulando la actividad de la RNA helicasa. Esto favorece el reinicio múltiple de la traducción sobre el mRNA, debido a que protege al transcrito de la acción de nucleasas y facilita el posterior reciclaje de los componentes de la maquinaria de traducción. La proteína eIF4G unida a eIF4E también recluta al resto de la maquinaria traduccional mediante el complejo ternario que consiste en GTP, met-tRNA, y el factor de inicio eIF2, mediante su asociación con

eIF3 el cual es parte del complejo multifactor integrado por eIF5, eIF1 y eIF1A, asociados a la unidad ribosomal 40S formando el complejo de pre-inicio 43S; este aglomerado de factores se recluta en el extremo 5' del mRNA por medio de interacciones con eIF4G y eIF3 formando el complejo de pre-inicio 48S. Una posición adecuada de este complejo en el extremo 5' requiere del complejo de unión a cap, eIF4F. Los factores eIF1, eIF1A junto con el complejo 48S, recorren el mRNA en dirección 3', en busca del codón de inicio AUG en el contexto adecuado, donde se une la subunidad ribosomal 60S para formar el ribosoma 80S, y comenzar la elongación del péptido. Este último paso ocurre acompañado de la hidrólisis de GTP por eIF2 α asistido por eIF5 y la disociación de los factores de inicio, lo que permite que la maquinaria de inicio de la traducción pueda reciclarse y comenzar otro evento de iniciación (Pain, 1996; Kawaguchi and Bailey, 2002; Combe, 2005; Groppo and Richter, 2009; Fischer, 2009; Martínez-Silva y Dinkova, 2010).

El inicio de la traducción es el evento más controlado fisiológicamente, lo cuál tiene sentido, porque es energéticamente favorable controlar el primer paso de cualquier reacción (Groppo y Richter, 2009). Una variación en el inicio tiene influencia tanto en el contenido de proteína (regulación cuantitativa), como en los niveles relativos de síntesis de diferentes proteínas (regulación cualitativa; Rhoads, 1999; Jackson, 2005). Particularmente, dos pasos de la vía de inicio parecen ser los puntos críticos de regulación fisiológica; la unión de Met-tRNA a la subunidad ribosomal 40S, mediada por eIF2, y la unión inicial del complejo de pre-inicio 43S al extremo 5' del mRNA, mediada por eIF4E y factores asociados. El primero de ellos, es principalmente relevante en la regulación cuantitativa, mientras que el paso de reconocimiento del cap y unión del mRNA puede ejercer efectos en la traducción de diferentes mRNAs (Pain, 1996).

Tabla 1. Factores de inicio de la traducción

FACTOR	TAMAÑO	FUNCIÓN	SITIOS DE UNIÓN
eIF1	~12 KDa	Forma complejo multi-factor (MFC) con eIF2, eIF3, eIF5, Met-tRNA _i ^{Met} . Reconocimiento codon-anticodon.	Sitio de unión a eIF3
eIF1A	~17 KDa	Análogo IF1. Se asocia a 40S en sitio A. Retrasa la re-asociación con la subunidad 60S. Puente entre los factores de inicio y el ribosoma.	
eIF2 α eIF2 β eIF2 γ		Recluta al tRNA ^{Met} Análogo IF2-tRNA _i . Une el Met-tRNA _i ^{Met} , GTP y la subunidad 40S en sitio P. Forma parte del complejo ternario 43S. Subunidad reguladora: α ; actividad GTPasa: γ ; unión a eIF5B: β .	Sitio de unión a tRNA (no identificado) 3 elementos de unión a GTP.
eIF2B		Intercambia GDP/GTP para liberar a eIF2.	
eIF3	~750 kDa	Análogo IF3. Une varios eIFs y a la subunidad 40S. Estabiliza al complejo de pre-inicio 43S.	Motivos de reconocimiento de RNA
eIF4B	~57 kDa	Helicasa que estimula eIF4A.	Motivos de reconocimiento a RNA (RRM), dominio DRYG,
eIF4A	~50 kDa	Helicasa RNA-dependiente.	Motivo de unión a ATP ATPasa A, motivos de unión a RNA. Motivos SAT requeridos para la actividad de helicasa
eIF4E	~24 kDa	Proteína que reconoce y se une a 5'CAP (7mGpppN) del mRNA.	Motivos de unión a cap y a eIF4G.
eIF4G	~160 kDa	Puente de anclaje. Une varios factores.	Sitio de unión a eIF4E, ribosomas, eIF4A.

Tabla 1. Factores de inicio de la traducción (continuación)

FACTOR	TAMAÑO	FUNCIÓN	SITIOS DE UNIÓN
eIF4H	~25kDa	Helicasa, junto con eIF4B estimula la actividad de eIF4A.	
eIF5	~50 kDa	Parte del complejo MFC. Estimula la hidrólisis de GTP por eIF2 actuando como GTPasa.	Sitio de unión a eIF3.
eIF5B	~180 kDa	Análogo IF2-GTP. Une eIF1A. Actividad GTPasa conjunta con eIF2 durante reconocimiento codon de inicio.	Sitio de unión a eIF1A.
eIF6		Se asocia con la subunidad ribosomal 60S previniendo su asociación con la subunidad 40S, regula la traducción en respuesta a señales extracelulares Es esencial en la biogénesis de ribosomas.	

Martínez-Silva y Dinkova, 2010.

Elongación

En contraste con la iniciación, la elongación es un proceso menos complicado, que requiere mantener el marco de lectura, seleccionar y entregar correctamente los aminoacil-tRNAs al ribosoma 80S, y formar los enlaces peptídicos. Solo son requeridos dos factores de elongación: eEF1A, que ayuda a cargar los tRNAs a los ribosomas y eEF2, el cual promueve la translocación del ribosoma a lo largo del mRNA.

Se han encontrado algunos casos de regulación en la elongación, por ejemplo, para disminuir la síntesis de proteínas cuando las células entran en mitosis. Sin embargo, las células mitóticas contienen polisomas pesados que son menos activos traduccionalmente que los polisomas ligeros. Parece que las células reducen su grado de elongación cuando se preparan para dividirse, lo cual es seguido de una rápida síntesis de proteínas una vez que entran a la fase G1 del ciclo celular. Esta reducción en la velocidad de elongación, es probablemente mediada por la fosforilación de eEF2

por su cinasa, resultando en una disminución en los niveles de traducción (Groppo y Richter, 2009).

Terminación

La terminación es mediada por el factor de liberación eRF1, que reconoce los tres codones de paro (UAA, UAG ó UGA), induce la hidrólisis del péptido del tRNA y se une al ribosoma en lugar del tRNA. Después eRF3, estimula la hidrólisis de GTP y la liberación de eRF1.

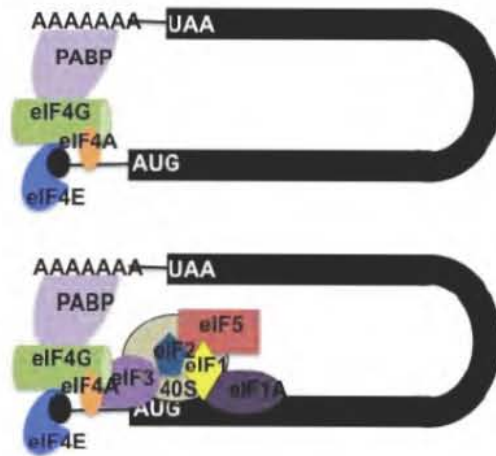
La hidrólisis de GTP por eRF3 acopla el reconocimiento del codón de paro y la hidrólisis de peptidil tRNA mediada por eRF1. Por lo tanto, la unión de eRF1, eRF3 y GTP al complejo de pre-terminación, produce un complejo que requiere de un futuro re-arreglo, inducido por la hidrólisis de GTP, para promover la liberación del péptido (Holcik y Pestova, 2007).

Reciclamiento

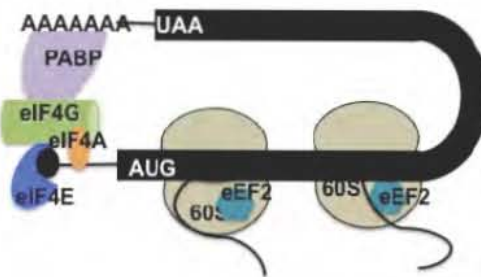
Después de la terminación de la síntesis de proteínas y la liberación de la cadena polipeptídica, el ribosoma queda con el sitio A vacío y un tRNA deacilado en el sitio P, este es conocido como complejo de post-terminación (post-TC). Para que el ribosoma pueda comenzar otra vuelta de traducción, este complejo necesita disociarse para permitir la unión de la subunidad ribosomal con los factores de inicio en el sitio donde comienza la traducción del mRNA (Weixlbaumer *et al.*, 2007).

En bacterias, se demostró que el desmontaje del complejo de post-terminación, es un proceso activo catalizado por el factor de reciclaje del ribosoma (RRF) que actúa liberando al ribosoma del mRNA, funciona junto con el factor de elongación G, EFG, y es esencial para la viabilidad en procariontes (Hirokawa *et al.*, 2006). En eucariontes no existe un homólogo de RRF, y el mecanismo que precede al estado de terminación difiere entre procariontes y eucariontes. En eucariontes, eIF3 es el principal factor que promueve la disociación de ribosomas en post-terminación en subunidades 60S, tRNA y mRNA unido a las subunidad 40S. Su actividad es aumentada por los factores eIFs 3, 1, y 1A. eIF1 interviene en la liberación del tRNA del sitio P, mientras eIF3 favorece la disociación de mRNA (Pisarev *et al.*, 2007).

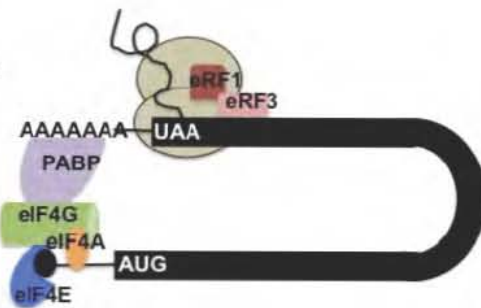
Inicio



Elongación



Terminación



Reciclamiento

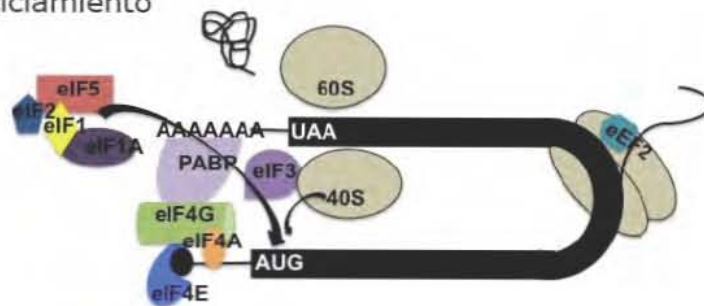


Figura 1. Representación esquemática del proceso de traducción. En eucariontes, la traducción cap-dependiente se realiza en cuatro pasos: Iniciación, elongación, terminación y reciclamiento. Durante la iniciación, el mRNA se une al complejo de factores eIF4F (eIF4E, eIF4G, eIF4A) mediante la interacción CAP-eIF4E. El complejo 43S (eIF2, tRNAMet, GTP, 40S, eIF3, eIF1A) se une al mensajero a través de la interacción entre eIF4G y eIF3 para formar el complejo de inicio 48S. Este complejo recorre el mRNA hasta encontrar el codón de inicio en contexto apropiado. Una vez encontrado el AUG, se une la subunidad ribosomal 60S y se liberan los factores de inicio. La elongación comienza con la formación de la cadena polipeptídica, eEF1A lleva los tRNAs al ribosoma, mientras que eEF2 promueve la traslocación. Al encontrarse un codón de paro, eRF1 se une al ribosoma y estimula la hidrólisis de la cadena peptídica. La posterior unión de eRF3 e hidrólisis de GTP permiten el desensamble del ribosoma, tRNA y factores. En el reciclamiento eIF3 promueve la disociación del complejo post-terminación, permitiendo la futura unión de la subunidad 40S con los factores de inicio para que pueda comenzar otra vuelta de traducción (Martínez-Silva y Dinkova, 2010).

COMPLEJO eIF4F de UNION A CAP.

Antes de que la subunidad ribosomal 40S y el mRNA interactúen, el complejo de inicio de la traducción eIF4F que comprende a eIF4E, eIF4A y eIF4G, se une a la estructura cap del mRNA y junto con eIF4B funciona desenrollando la estructura secundaria en el extremo 5'UTR del mRNA (Dever, 2002; Mathews, 2002; Sonenberg y Dever, 2003; Pestova *et al.*, 2007; Gallie, 2007, Mayberry *et al.*, 2009). La longitud y estabilidad de estructuras secundarias en las regiones 5'-UTR son variables para los mRNAs.

eIF4E es una proteína de ~24 kDa, cuya estructura le permite ser el único factor de inicio que tiene contacto directo con el cap. Se ha demostrado que la interacción con eIF4G favorece la estabilidad de esta unión, propiciando que el resto de factores se una al complejo. Además, la presencia de regiones de unión a RNA en eIF4G y eIF4A sugieren que el contacto con el RNA juega un papel importante en el reconocimiento del mRNA por eIF4F (Mayberry *et al.*, 2009; Kaye *et al.*, 2009).

eIF4A es un péptido sencillo de ~50 kDa, una helicasa con motivo DEAD/H prototipo que une ATP (Rogers *et al.*, 2002). Una caracterización bioquímica de este factor muestra que exhibe una actividad de ATPasa dependiente de RNA y una actividad para desenrollar duplex de RNA dependiente de ATP, por lo tanto, su principal función es deshacer estructuras secundarias en el mRNA (Pain, 1996; Mayberry *et al.*, 2009).

eIF4G es una proteína modular y multifuncional de ~200 kDa, que co-localiza con todas las demás proteínas involucradas en el reclutamiento de la subunidad 40S al mRNA. Interacciona con eIF3 y eIF4A que se unen en su región central y carboxilo terminal, y con PABP (Poly A binding protein) y eIF4E en su tercera región amino terminal (Prévôt *et al.*, 2003). Además posee una secuencia de unión a RNA en su región central. eIF4G estimula la traducción por interacción con dos regiones del mRNA que estimulan la actividad de eIF4E por circularización de mRNA, una es una secuencia de RNA no específica, mientras que la otra es el tallo, a través del cual eIF4G interacciona con PABP, favoreciendo la unión eIF4E-cap (Mayberry *et al.*, 2009; Rhoads, 2009; Yanagiya *et al.*, 2009).

Sin embargo, no se sabe cómo la unión al cap contribuye a la estabilidad del complejo eIF4F-mRNA, y aún no es claro como eIF4F puede discriminar entre RNAs con y sin cap. Jankowsky y colaboradores demostraron que la estructura cap es esencial para un eficiente inicio de la traducción, y que la unión de RNA por eIF4F depende de la longitud de RNA, no del reconocimiento del cap, el cuál puede funcionar como un paso subsecuente para la unión eIF4F-RNA. Lo anterior sugiere que el reconocimiento del mRNA por la maquinaria de traducción es más compleja que la asociación espontánea de eIF4F al RNA en el cap (Kaye *et al.*, 2009).

EL FACTOR eIF4E

El factor de inicio de la traducción eIF4E fue descubierto como una proteína que promueve el inicio de la traducción, está involucrada en el reclutamiento de mRNAs al ribosoma y tiene el potencial de influir en la expresión de cada proteína en la célula, por esta razón, se dice que eIF4E es un potenciador traduccional, aunque en la última década se descubrió que también puede actuar como represor traduccional (Rhoads, 2009).

Estructura de eIF4E

Dadas las funciones que desempeña eIF4E en la célula, no es sorprendente el hecho de que su secuencia primaria de aminoácidos sea altamente conservada en todos los organismos (Goodfellow *et al.*, 2008). Estructuras cristalográficas de Rayos X y NMR (resonancia magnética nuclear) muestran flexibilidad del sitio de unión a cap, el cuál se ordena hasta que el ligando se une. En general, los eIF4E tienen 8 cadenas β antiparalelas y 3 α hélices. La estructura adopta forma de guante con el 5'-cap unido a

la superficie cóncava de las cadenas β , las α hélices en la cara convexa sirven como interfase de proteínas de unión. El núcleo de unión contiene tres principales regiones que interactúan con el cap; 2 residuos de triptofanos, W56 y W102, localizados en la región loop en las extremidades del guante, cuya interacción es estabilizada por tres enlaces de hidrógeno del cap a la pared del sitio de unión (W102 y E103), una segunda región que contiene residuos cargados R112, R157, K159 y K162 que hacen contacto con el fosfato en la estructura cap para estabilizar el complejo y finalmente el loop A203-T211 localizado en el extremo C terminal de la proteína que interactúa con el segundo nucleótido del cap (Siddiqui *et al.*, 2011). Juntos estos contactos contribuyen a la estabilidad conformacional del sitio de unión a cap. Aparentemente la ribosa no contribuye significativamente a la unión, en cambio el grupo trifosfato, participa en muchas interacciones polares entre ligandos y eIF4E. La contribución de la interacción π a la unión es determinante en el reconocimiento del cap por eIF4E. La mayoría de las proteínas que interactúan con eIF4E, incluyendo eIF4G, se unen en la cara convexa de eIF4E, involucrando al triptófano 73 (Rhoads, 2009). En la proteína eIF4E de trigo, se encontró un puente disulfuro intramolecular entre dos cisteínas que es conservado solo en plantas, esta observación genera la posibilidad de que su estado de oxidación pueda tener un papel en la regulación de la función de la proteína (Figura 2; Monzingo *et al.*, 2007; Goodfellow *et al.*, 2008; Fischer, 2009).

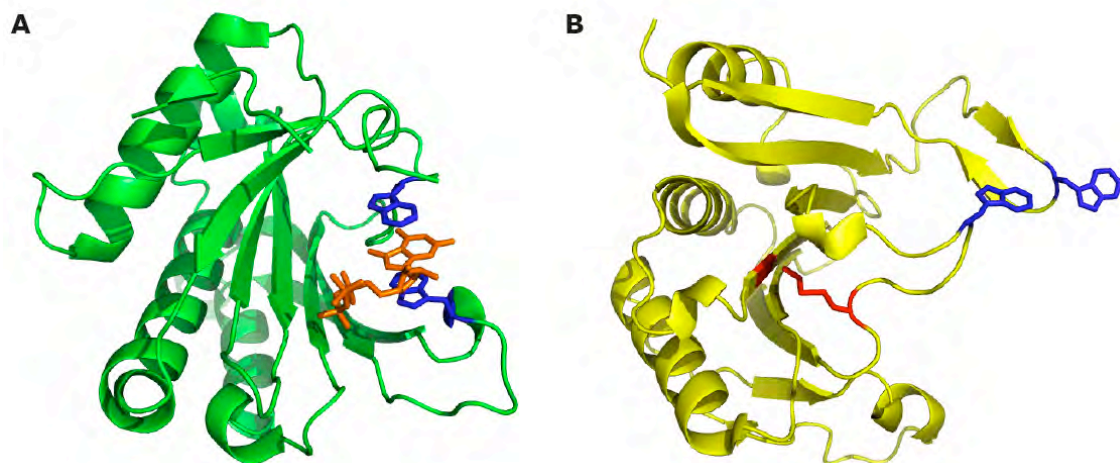


Figura 2. A) Estructura de eIF4E de humano. Los triptofano 53 y 102 involucrados en la unión a cap se muestran en azul, la estructura CAP en naranja (Niedzwiecka A., *et al* 2002). B) Estructura de eIF4E de trigo. Los triptofanos involucrados en la unión a CAP se muestran en azul, las cisteínas que forman el puente disulfuro en rojo (Monzingo *et al.*, 2007).

Funciones y regulación de eIF4E

eIF4E regula la traducción global de mRNAs, y además modula la expresión de genes involucrados en crecimiento celular, proliferación y apoptosis mediante dos principales vías: la traducción dependiente de cap y la exportación de mRNAs (Siddiqui *et al.*, 2011).

Dado que eIF4E es limitante en el inicio de la síntesis de proteínas, los mRNAs compiten por eIF4E bajo condiciones celulares normales. Si los niveles de eIF4E aumentan, la traducción de mRNAs débiles (poco expresados bajo condiciones normales con 5'UTR altamente estructuradas) es selectiva y desproporcionadamente aumentada, y los mRNAs fuertes (genes de mantenimiento) siguen siendo expresados a niveles elevados.

La función de eIF4E parece estar regulada por diferentes mecanismos. Existe evidencia que sugiere que eIF4E se encuentra poco abundante a diferencia de los otros factores de inicio, por lo tanto, su disponibilidad es una limitante del mecanismo de traducción. En mamíferos se han descrito proteínas inhibitorias de unión a eIF4E llamadas 4E-BP (proteínas de unión a 4E), que se unen a la superficie dorsal de 4E, distantes al sitio de unión a cap y que modulan la actividad de unión a cap, al competir con eIF4G por eIF4E, disminuyendo la mayoría de la traducción cap dependiente. Dado que eIF4G, 4E-BP y otras proteínas que actúan de manera similar y a través de secuencias específicas se unen a la misma región de eIF4E, es fácil ver como ocurre la competencia por el cap. Las proteínas que se unen a la superficie dorsal de 4E pueden actuar para regular su actividad a través de 2 mecanismos: 1) 4E-BP puede bloquear estéricamente la interacción con 4G, evitando el reclutamiento de otros factores de traducción y consecuentemente inhibiendo la traducción, y 2) otras proteínas pueden causar cambios alostéricos en 4E produciendo una reducción en la afinidad por cap. La mayoría de las proteínas de unión a eIF4E tienen el motivo YXXXXL Φ (donde Φ es cualquier aminoácido hidrofóbico). Pero se ha sugerido que pueden existir proteínas de unión a eIF4E no canónicas que controlen la traducción (Groppo y Richter, 2009, Siddiqui *et al.*, 2011).

Por otro lado, se ha propuesto que la fosforilación de un residuo conservado, serina 209, favorece la unión de eIF4E al cap, pero esto no ha podido confirmarse aún. Otro mecanismo de regulación del papel de eIF4E en el inicio de la traducción es la presencia de más de un miembro de la familia eIF4E en cada organismo, los cuales podrían traducir mRNAs de manera selectiva (Raught y Gingras, 1999).

Clasificación de los miembros de la familia eIF4E

La mayoría de los eucariontes expresan múltiples miembros de la familia eIF4E, cada uno con diferentes funciones en la célula. Joshi y colaboradores (2004), subdividieron a los miembros de la familia eIF4E en tres clases de acuerdo a los residuos correspondientes de Trp-43 y Trp-56 de eIF4E-1 de *H. sapiens*. La clase I contiene triptófanos en ambas posiciones, la clase II, contienen Tyr, Phe o Leu en la posición 43 y Tyr o Phe en la posición 56, y la clase III contienen Trp en la posición 43 y Cys o Tyr en la posición 56. Algunos miembros de la familia eIF4E tienen alteradas sus afinidades de unión a cap y a otras proteínas, diferencias que indican variedad en los papeles fisiológicos de los miembros de la familia eIF4E. Se ha sugerido que un miembro de la familia eIF4E en cada organismo es expresado ubicua y constitutivamente para llevar a cabo la traducción general y que los otros están involucrados en funciones especializadas, tanto traduccionales como no traduccionales (Rhoads, 2009).

A pesar de que eIF4E es uno de los factores de traducción más estudiados, poco se conoce sobre la especialización de las funciones de miembros de esta familia.

SELECTIVIDAD Y FUNCIONES DE LOS MIEMBROS DE LA FAMILIA eIF4E

En organismos que presentan varios miembros de la familia eIF4E, se encontró que solo uno de ellos es ubicuo y expresado constitutivamente, siendo responsable de la traducción cap-dependiente de mantenimiento, este es representado por eIF4E-1 en *Drosophila*, eIF4E-1 en mamíferos, IFE-3 en *C. elegans*, eIF4E-1A en pez Zebra y eIF4E en plantas (Rodríguez *et al.*, 1998; Keiper *et al.*, 2000; Joshi *et al.*, 2004; Robalino *et al.*, 2004; Hernández *et al.*, 2005; , Hernández y Vazquez-Pianzola, 2005). Los otros eIF4Es son activos en tejidos o etapas de desarrollo particulares, o se unen a ciertos mRNAs. Esto le confiere considerable versatilidad a esta familia de proteínas, y apoya la hipótesis de que no son completamente redundantes al presentar selectividad traduccional.

Selectividad por el tipo de cap

Algunos miembros de la familia 4E presentan selectividad por diferentes estructuras cap (Figura 3). Los mRNAs de *C. elegans* contienen dos tipos de cap, m7GpppN y m7,2,2GpppN. IFE-3, y IFE-4 se unen preferentemente a m7GpppN, mientras que IFE-1, IFE-2 y IFE-5 se unen a ambos tipos de estructura cap (Rhoads *et al.*, 2005;

Syntichaki *et al.*, 2007; Rhoads, 2009). En plantas, eIF4E y eIF(iso)4E presentan selectividad en el reconocimiento de estructuras cap mono y di-metiladas; y nCBP (proteína novedosa de unión a CAP) presenta una afinidad de unión a cap mayor que eIF4E y eIF(iso)4E (Rodríguez *et al.*, 1998; Ruud, 1998; Browning, 2004; Rhoads, 2009).

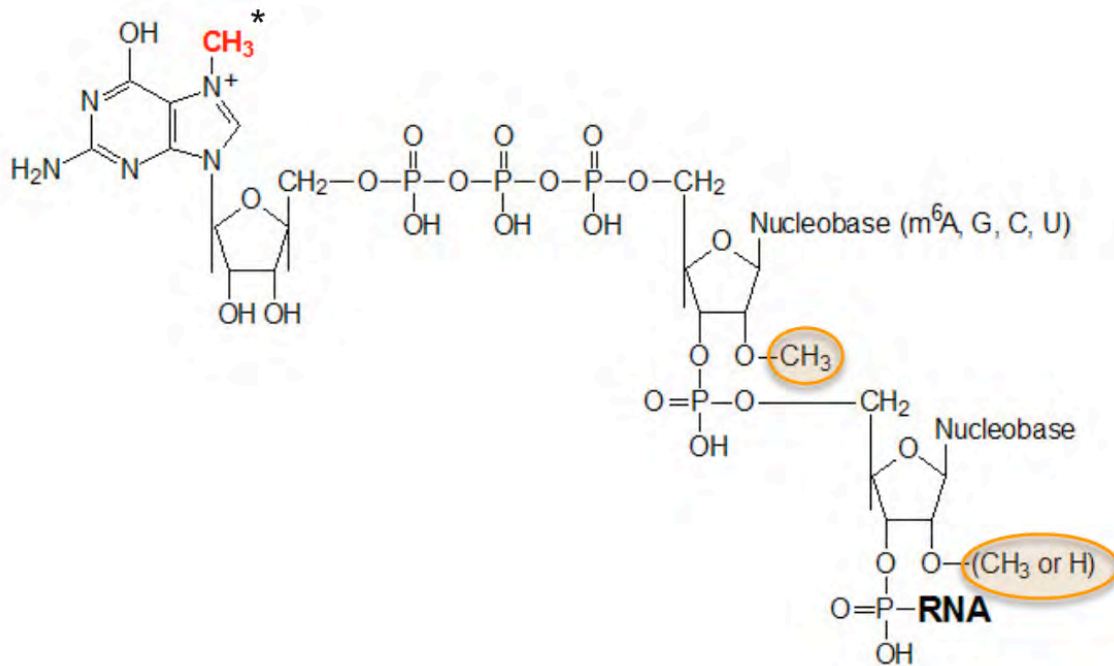


Figura 3. Estructura del 5'- Cap de mRNAs eucarióticos. La metilación marcada con * esta presente en todos los tipos de cap (m^7GpppN), las metilaciones encerradas en círculos dan lugar a las estructuras cap di y tri-metiladas ($m^7,2GpppN$ y $m^7,2,2GpppN$).

Patrones de expresión

Es común que los diferentes miembros de la familia 4E se expresen diferencialmente en el organismo en cuestión, por ejemplo: el pez zebra (*Danio rerio*) cuenta con dos miembros de esta familia, eIF4E-1A, se expresa ubicuamente, mientras que eIF4E-1B solo en embriones y gónadas (Robalino *et al.*, 2004). En *Schizosaccharomyces pombe* se observó que ambos miembros de la familia 4E son pobremente encontrados en núcleo, y a pesar de que ambos son exclusivos de citoplasma presentan una distribución desigual por lo que se considera que tienen co-localización subcelular diferencial (Ptushkina *et al.*, 2004). En *A. thaliana* el transcrito de eIF(iso)4E se

encuentra en mayor abundancia en puntas de raíz, órganos florales y en tejidos en desarrollo, mientras que el de eIF4E se expresa en la mayoría de los tejidos de las plantas maduras (Rodríguez *et al.*, 1998) y nCBP es abundante en botones florales (Hidalgo-Mejía, 2007; www.arabidopsis.org).

Función especializadas

En la mayoría de los organismos se ha reportado que al menos un miembro de la familia eIF4E es esencial para la viabilidad. En *C. elegans* IFE-3 es esencial y al menos uno de los tres factores: IFE-1, IFE-2 o IFE-5 también lo es. La depleción de IFE-1 bloquea la espermatogénesis y afecta la ovoposición, mientras que IFE-2 tiene un efecto negativo sobre la longevidad y resistencia al estrés oxidativo, (Rhoads *et al.*, 2005; Dinkova *et al.*, 2005; Syntichaki *et al.*, 2007; Rhoads, 2009,). En *Drosophila* se han reportado ocho miembros de la familia eIF4E, la actividad de unión a cap de eIF4E-1 es la principal durante la embriogénesis y mutantes en este factor presentan viabilidad reducida (Lachance *et al.*, 2002). eIF4E-2 de *S. pombe* está involucrado en repuestas a estrés por falta de nutrientes, temperatura y sal, deteniendo la división celular y el crecimiento (Ptushkina *et al.*, 2004). En *Drosophila*, eIF4E-1 es esencial para el desarrollo del ovario y del embrión (Hernández *et al.*, 2004).

Selectividad de traducción de mRNAs

En animales, los mensajes que dependen más fuertemente de eIF4E codifican para genes que actúan en la progresión del ciclo celular y supervivencia, por el contrario, eIF4E no se asocia a mRNAs correspondientes a reguladores negativos de crecimiento ni a genes de mantenimiento o *housekeeping* (Lazaris-Karatzas *et al.*, 1990; Rodríguez *et al.*, 1998; Culjkovic *et al.*, 2006). IFE-4, afecta la traducción de un grupo de 33 mRNAs en *C. elegans*, varios de los cuales están relacionados con la deposición de huevos *in vivo* (Dinkova *et al.*, 2005). eIF4E-2 de *S. pombe* favorece la traducción de mRNAs con regiones 5'-UTR estructuradas (Ptushkina *et al.*, 2004). En maíz, se ha demostrado *in vitro* que tanto eIF4E como eIF(iso)4E traducen mRNAs de manera selectiva (Dinkova y Sánchez de Jiménez, 1999; Dinkova *et al.*, 2000). Otros estudios *in vitro* han sugerido que eIF(iso)4E traduce preferencialmente mRNAs con regiones 5'-UTR cortas y poco estructuradas, en contraste, eIF4E traduce principalmente mRNAs con secuencias 5'-UTR grandes y altamente estructuradas (Carberry y Goss, 1991).

Regulación de la expresión viral

El mRNA de la familia de calcinovirus, que causa enfermedades en humanos y animales, tiene unida covalentemente una proteína viral llamada *Vpg* (genome-linked protein) que actúa como sustituta del cap para reclutar a eIF4E y traducirse eficientemente, al parecer la *Vpg* se une en un sitio diferente al sitio de unión a cap y a las proteínas 4E-BPs (Goodfellow y Roberts, 2008)

En plantas, eIF4E y eIFiso4E se unen a la proteína *VPg* de potyvirus con diferentes afinidades, lo cual correlaciona positivamente con la infección viral. *A. thaliana* carente de eIF(iso)4E no presenta fenotipo distinguible, pero la falta de este factor le confiere resistencia a la infección producida por algunos potivirus (Duprat, *et al.*, 2002, Browning, 2004).

eIF4E en el transporte de mRNAs

Recientemente, se encontró que eIF4E también tiene un papel fuera del inicio de la traducción, en la exportación de algunos mRNAs específicos del núcleo al citoplasma. Alrededor del 68% de eIF4E es encontrado en el núcleo de células eucariontes en distintos sitios conocidos como cuerpos nucleares donde se involucra en la exportación de un grupo de mRNAs que contienen una estructura conocida como elementos sensibles a 4E (*4E-sensitivity element*). eIF4E entra en el núcleo por la unión a 4E-T (transportador de eIF4E). Una vez en el núcleo, su interacción con numerosas proteínas puede regular la unión a cap e inhibir la exportación de mRNAs (Goodfellow y Roberts, 2008; Fischer, 2009).

el control de la expresión genética a través del efecto de eIF4E en el transporte de mRNA contribuye a su potencial oncogénico (Topisirovic *et al.*, 2009). Además, eIF4E puede jugar un importante papel en el secuestro y estabilidad de mRNAs en cuerpos de procesamiento citoplásmico (cuerpos P). Asimismo, eIF4E dirige la progresión del ciclo celular y la proliferación celular mediante la coordinación de la expresión de muchos genes a nivel post-transcripcional (Culjkovic, *et al.*, 2007)

MIEMBROS DE LA FAMILIA eIF4E EN PLANTAS

Como se mencionó anteriormente, la mayoría de los eucariontes expresan múltiples miembros de la familia eIF4E clasificados en tres familias; eIF4E-I, eIF4E-II y eIF4E-III. Cada uno podría mostrar diferentes funciones en la célula. En plantas se han reportado tres miembros de la familia eIF4E (figura 4): eIF4E (ortólogo de eIF4E-1 de

mamíferos, clase eIF4E-I) eIF(iso)4E (específica de plantas, clase eIF4E-I), ambas presentan selectividad en el reconocimiento de estructuras cap mono y di-metiladas; y nCBP (proteína novedosa de unión a CAP, clase eIF4E-II) encontrada en *Arabidopsis thaliana* y que tiene ortólogos en nemátodos y mamíferos. nCBP es el miembro menos abundante en plantas y presenta una afinidad de unión a cap menor que eIF4E y eIF(iso)4E (Rodríguez *et al.*, 1998; Ruud, 1998; Browning, 2004; Rhoads, 2009). Los tres miembros de la familia eIF4E se encuentran presentes en diversas especies de plantas pero hasta el momento de iniciar este trabajo no se había podido determinar con certeza su especialización funcional.

En organismos que presentan varios miembros de la familia eIF4E, se ha encontrado que solo uno de ellos es ubicuo y expresado constitutivamente, siendo responsable de la traducción dependiente de CAP general, en plantas, este es representado por eIF4E (clase I) (Mayberry *et al.*, 2009).

eIF4E y eIF(iso)4E, muestran 50% de identidad en su secuencia de aminoácidos y las masas moleculares en *Arabidopsis* son de 26 y 22 kDa respectivamente. El transcrito de eIF(iso)4E se encuentra en mayor abundancia en puntas de raíz, órganos florales y tejidos en desarrollo, mientras que eIF4E se expresa en la mayoría de los tejidos de la plantas maduras (Rodríguez *et al.*, 1998). Por otro lado, la proteína de eIF4E es abundante en células en cultivo y silicuas, y eIF(iso)4E se expresa principalmente en raíces y flores (Dinkova *et al.*, 2002; Browning, 2004; Proteoma de *Arabidopsis*, <http://www.tair.org>). Al depletar los niveles de eIF(iso)4E en *Nicotiana tabacum* y *A. thaliana*, los niveles de proteína de eIF4E aumentan, probablemente para compensar la falta de este factor (Browning, 2004).

En maíz se demostró que los transcritos de eIF4E y eIF(iso)4E se expresan diferencialmente durante la germinación, ambos se encuentran presentes en semillas secas, sin embargo, eIF4E se sintetiza *de novo* después de las 12 h, mientras que eIF(iso)4E permanece constante durante las primeras 24 h de germinación. También en maíz, se ha demostrado *in vitro* que tanto eIF4E como eIF(iso)4E traducen mRNAs de manera selectiva (Dinkova y Sánchez de Jiménez, 1999; Dinkova *et al.*, 2000).

Por otra parte, en plantas se ha encontrado otro complejo eIF4F llamado eIF(iso)4F formado por las subunidades eIF(iso)4E y eIF(iso)4G con actividad *in vitro* similar a 4F pero menos eficiente.

En *A. thaliana*, un solo gen en el cromosoma V codifica para *eIF(Iso)4E* (*At5g35620*), mientras que para *eIF4E* se han identificado tres genes, uno en el cromosoma IV (*AtEIF4E1*, *At4g18040*) que parece ser el más altamente expresado. Los otros dos genes, casi idénticos, se localizan en el cromosoma I (*AtEIF4E2*; *At1g29590* y

AteIF4E3; *At1g29550*). Solo un gen codifica a nCBP y se encuentra en el cromosoma V (*At5g18110*).

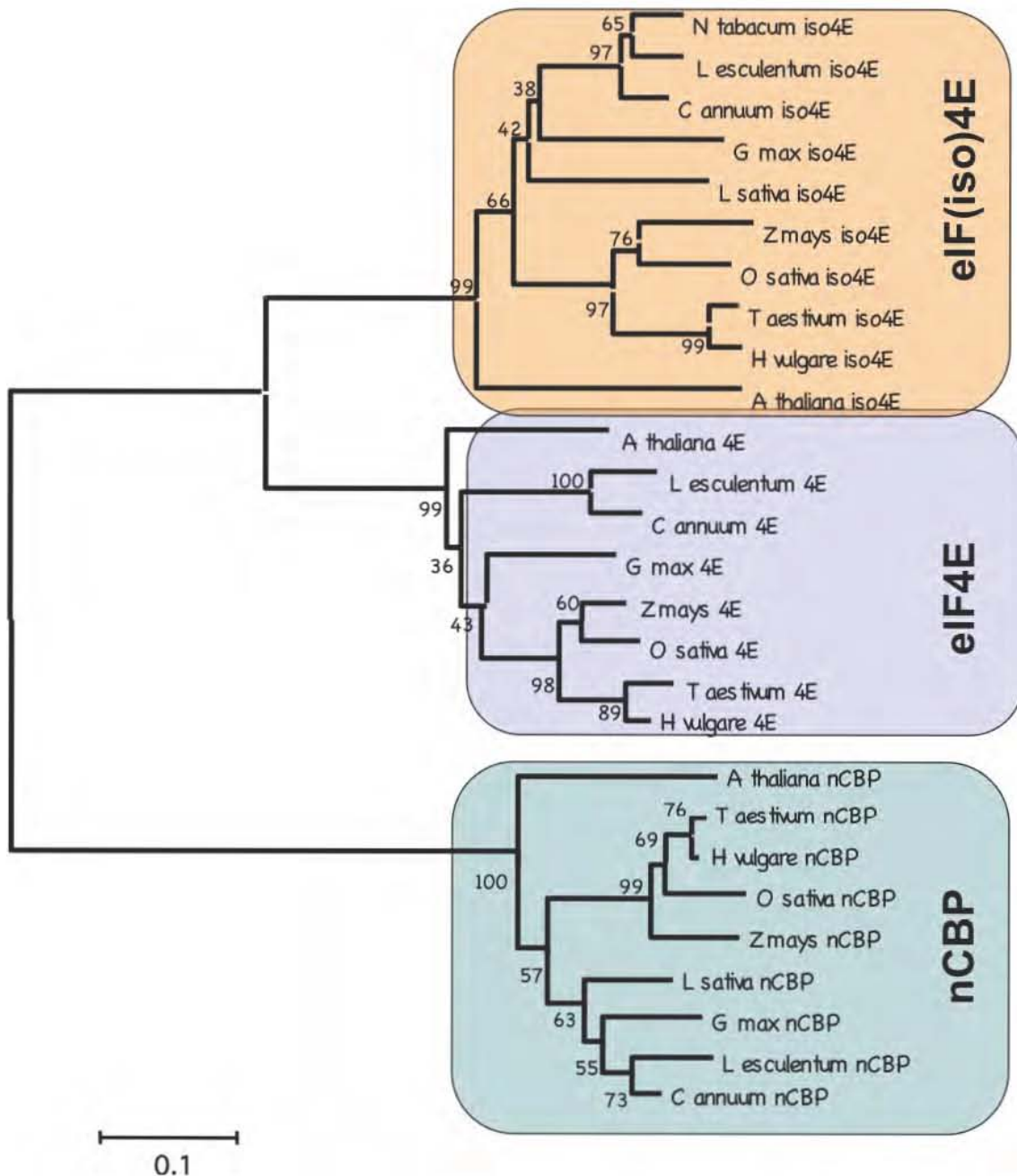


Figura 4. Árbol filogenético de los miembros de la familia eIF4E en plantas. Se han reportado tres miembros de la familia eIF4E en plantas, eIF4E, pertenece a la clase I y es ortólogo a eIF4E-1 de mamíferos. eIF(iso)4E, también incluida en la clase I, específica de plantas y nCBP, con ortólogos en mamíferos y nemátodos, clasificada dentro de la clase II (tomado de Martínez-Silva y Dinkova, 2010).

Las plantas que carecen totalmente de *eIF(iso)4E* no presentan ninguna alteración detectable en condiciones normales, lo que sugiere que este podría ser necesario en otras situaciones como algún tipo de estrés ambiental. Cuando *eIF(iso)4E* está ausente, se sobre-expresa *eIF4E* pero los niveles del mRNA *AteIF4E1* no se afectan, probablemente debido a una modificación post-transcripcional que causa un incremento en la síntesis y estabilidad de la proteína *eIF4E*, lo que puede deberse a un incremento en la traducción del mensajero *AteIF4E1* y es el reflejo de la extraordinaria capacidad del complejo *eIF4F* de promover la traducción. Otra posibilidad es que el incremento de *eIF(iso)4G* libre, consecuencia de la ausencia de *eIF(iso)4E* promueva la formación del complejo *eIF4E/eIF(iso)4G* que estaría funcionando en lugar del complejo *eIF(iso)4F* ya que *in vitro* se ha comprobado la formación espontánea y funcionalidad de este complejo (Duprat *et al.*, 2002; Lellis *et al.*, 2010; Mayberry *et al.*, 2011). De esta manera la planta es capaz de mantener la traducción global de mRNAs sin observar alteraciones importantes. Sin embargo, al tener diferentes afinidades de unión al RNA, la eficiencia traduccional no es igual para los complejos 4F, lo que sugiere que algunos mRNAs interactúan preferencialmente con *eIF(iso)4E* o *eIF4E*. Por ejemplo, ya se ha mencionado que *eIF4E* es más tolerante a las estructuras secundarias en 5'UTR, mientras que *eIF(iso)4E* tiene mayor afinidad de unión a mRNAs con caps hipermetilados que *eIF4E*, por lo tanto, el ensamblaje de isoformas específicas de factores de inicio juega un papel importante en la traducción diferencial de mRNAs. Lo anterior sugiere que los miembros de la familia *eIF4E* están sometidos a diferentes mecanismos de regulación, y podrían tener también diferentes funciones en el desarrollo de las plantas mediante una actividad discriminatoria para el reconocimiento de mRNAs. Por lo cual se considera que la función de los miembros de la familia *eIF4E* no es totalmente redundante.

ELEMENTOS EN LOS mRNAs QUE CONTRIBUYEN AL CONTROL TRADUCCIONAL.

A pesar de que muchas características de un mRNA pueden contribuir a la eficiencia de su traducción, la mayoría de los elementos control se localizan en las regiones no traducidas (UTRs). El 5' cap y la cola de polyA en el 3' son estructuras determinantes en la eficiencia de la traducción. Pero además, los niveles de traducción son afectados por características en el 5'UTR como longitud de las UTRs, presencia de estructura secundaria, codones de inicio AUG río arriba (uAUG), marcos de lectura abiertos río

arriba (uORF), sitios internos de entrada al ribosoma (IRES), y en 3'UTR puede haber numerosos sitios de unión a factores reguladores, usualmente proteínas, y elementos de poliadenilación (CPE) entre otros.

A través de diversos estudios se han identificado secuencias específicas que pueden influenciar el inicio de la traducción en plantas. En *A. thaliana* hay correlación entre la eficiencia de traducción y el contenido de nucleótidos GC en el extremo 5' UTR cuando las plantas son expuestas a estrés ambiental. Se identificó una secuencia consenso que al rodear al codón de inicio AUG, promueve un inicio óptimo de la traducción, esta secuencia es A(A/C)AAA₊₁UGGC en dicotiledóneas y A(A/G)CCA₊₁UGGC en monocotiledóneas. Como se describió anteriormente, la estructura secundaria o de tallo-asa del 5' UTR puede influenciar la unión de formas específicas de eIF4E y 4F, lo cual puede afectar el nivel de traducción de manera que correlacione con las actividades y patrones de expresión de dichos factores, además afecta negativamente la traducción al impedir la unión o migración de la subunidad ribosomal 40S. Los uAUGs normalmente reprimen la traducción al favorecer el uso de sitios de inicio alternativos. Aproximadamente un tercio de los mRNAs de *A. thaliana* contiene uORFs en la secuencia 5', la presencia de estos uORFs resultan generalmente en la represión traduccional dado que el ribosoma no puede reiniciar la traducción después de liberarse del uORF. Generalmente el efecto inhibitor de los uORF es menor que el de los uAUGs porque el ribosoma tiene el potencial de reiniciar la traducción en el ORF principal después de la terminación en el codón de paro del uORF. Los IRES promueven el inicio cap-independiente, una forma alterada de inicio en la cual la subunidad ribosomal es reclutada directamente por el IRES o por un grupo de factores de inicio de la traducción que no incluyen a eIF4E. En cuanto a la región 3' UTR, ésta contiene muchos elementos que regulan la traducción actuando como sitios de reconocimiento para proteínas reguladoras, estos elementos pueden ser estructurados o no estructurados. Micro RNAs antisentido (miRNAs) reprimen la traducción al aparearse con secuencias complementarias en el 3'UTR. Los CPE y el hexanucleótido AAUAAA son requeridos para activar el "alargamiento" de la cola de polyA de los mRNAs. En conclusión, secuencias específicas del mRNA son de suma importancia en el control traduccional ya que pueden estimular o reprimir el inicio de la traducción mediante mecanismos atípicos (Wilkie *et al.*, 2003; Muench *et al.*, 2012).

ANÁLISIS TRADUCCIONAL MEDIANTE EL USO DE MICROARREGLOS Y GRADIENTES DE SACAROSA

La velocidad de sedimentación en gradientes de sacarosa ha sido utilizado por más de cuatro décadas para estudiar el estado traduccional de un mRNA. Los mRNAs se separan en un gradiente de sacarosa por ultracentrifugación de acuerdo con el número de ribosomas a los que están asociados. Existen dos parámetros que están directamente relacionados con la eficiencia traduccional de un gen: 1) el porcentaje de transcritos que están asociados a los ribosomas (ocupación ribosomal), que nos da información de la eficiencia con la que el transcrito de un gen en particular es reclutado por la maquinaria traduccional; y 2) el número de ribosomas con el que un mRNA se asocia (densidad ribosomal), este dato nos brinda información del equilibrio general entre los pasos de unión al ribosoma, la progresión a lo largo de la región codificante, y la disociación. Las diferencias en estos parámetros entre diferentes mRNAs reflejan diferencias en su eficiencia de traducción (Melamed y Arava, 2007).

Los microarreglos de DNA han sido utilizados rutinariamente para monitorear la abundancia de transcritos en un estado estático, sin embargo, esta tecnología puede ser implementada para medir los niveles de mRNAs que se encuentran formando parte de ribonucleoproteínas o en complejos polisomales. En los últimos años, los microarreglos de DNA se han utilizado para realizar análisis simultáneo del estado traduccional de numerosos mRNAs, lo que permite tener una visión global y comprensión de la eficiencia traduccional y su regulación (Figura 5). Estos análisis se han realizado en mRNAs aislados de diversos organismos bajo numerosas condiciones de crecimiento o mutaciones, y a diferentes resoluciones. El análisis de estos genomas ha dado nueva evidencia del proceso de traducción en general y de la regulación de genes particulares. Todos los diseños experimentales para estudiar el estado traduccional de una célula, comparten los pasos generales de separación de complejos ribonucleoproteicos en gradientes de sacarosa, fraccionamiento del gradiente, purificación de RNA de las fracciones, marcaje del cDNA, e hibridación con el microarreglo de DNA.

Es común emplear la separación del gradiente de sacarosa en dos fracciones: mRNAs libres (no polisomales), en estas fracciones se incluyen los mRNAs asociados a un ribosoma; y mRNAs asociados a polisomas (polisomales). El marcaje y la hibridación de las fracciones no polisomales y polisomales con los microarreglos se debe hacer con fluoróforos diferentes. El resultado de la relación rojo/verde indicará el estado traduccional de un mRNA mediante su distribución entre fracciones no polisomales

(NP) y polisomales (P). Esto es, mRNAs con un radio elevado P/NP están altamente asociados a polisomas, y *vice-versa* para radios pequeños. Uno puede comparar los radios P/NP de todos los genes y determinar cuales son los genes más afectados en su traducción bajo cierta condición.

Cuando se desea mayor resolución, es necesario coleccionar más de dos fracciones. Los gradientes pueden dividirse hasta en 25 fracciones, usualmente con la finalidad de identificar cambios en el número de ribosomas asociados con cada mRNA. Este diseño experimental permite conocer la abundancia relativa de cada mRNA en cada fracción.

Los diseños experimentales antes mencionados se enfocan en la determinación de los cambios en la asociación de ribosomas que se reflejan en cambios de los niveles de mRNA en estado estacionario. Para obtener conclusiones correctas del efecto traduccional, es necesario realizar un análisis de los cambios a nivel global de los mRNAs ya que alteraciones en este nivel pueden derivar en cambios en la distribución polisomal de los mRNAs. Para realizar el análisis global es necesario extraer RNA total del organismo de interés y marcar el RNA sin separarlo en un gradiente de sacarosa. Las muestras se marcan y se hibridan en un microarreglo, las señales se cuantifican para conocer los cambios relativos de genes y se comparan con los datos obtenidos de los microarreglos realizados a partir de RNA polisomal (Arava *et al.*, 2003).

Finalmente, siempre es necesario verificar los datos obtenidos por esta técnica, empleando otros métodos como Northern blot o qRT-PCR

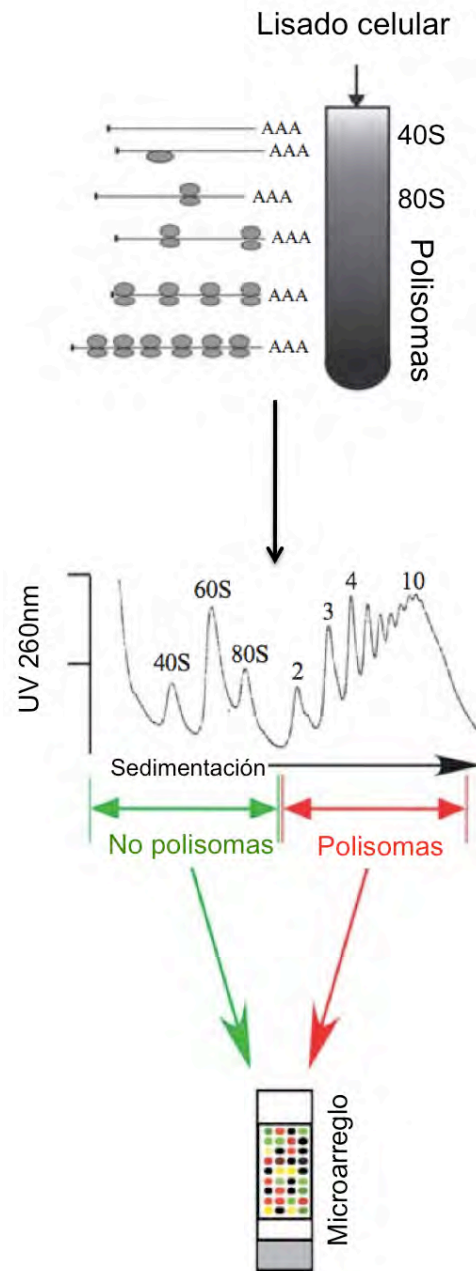


Figura 5. Esquema experimental de análisis por microarreglos de fracciones obtenidas por gradiente de sacarosa. Todos los protocolos experimentales empiezan con un paso de separación del lisado celular por sedimentación en un gradiente de sacarosa. Colección y lectura a 260 nm de las fracciones deseadas para generar el perfil polisomal y permitir la identificación de los picos correspondientes a la sedimentación de 40S, 60S, 80S y complejos polisomales. En el esquema se muestra la separación del gradiente en dos fracciones para continuar con la hibridación de microarreglos de DNA.

JUSTIFICACIÓN

El factor de inicio de la traducción eIF4E juega un papel crítico y limitante en la síntesis de proteínas. Por ser el factor que reconoce y se une a la estructura 5'-cap de los mRNAs para permitir el posterior ensamblaje de la maquinaria traduccional que da lugar a la síntesis de proteínas, su actividad y regulación resultan clave en el adecuado funcionamiento de las células. Todos los organismos eucariontes presentan más de un miembro de la familia eIF4E, y en algunos casos se ha sido posible asignarles funciones particulares dentro de algún proceso fisiológico, bajo cierto tipo de estrés o en algún momento determinado del desarrollo del organismo. En plantas existen 3 factores de inicio 4E: eIF4E, eIF(iso)4E y nCBP de los cuales se sabe que presentan expresión diferencial en tejidos y en diferentes etapas del desarrollo de la planta, pero se desconoce el papel específico de cada uno de ellos. Para entender el control impuesto por los factores de inicio de la traducción de la familia eIF4E en la síntesis de proteínas en plantas, es necesario conocer en qué radica la selectividad de estos factores para favorecer la traducción de algunos mRNAs. Por esta razón, este trabajo tiene la finalidad de comprobar la selectividad traduccional del único factor 4E específico de plantas, eIF(iso)4E, y de esta manera tener herramientas para dilucidar la relevancia de su función.

HIPÓTESIS

Dado que eIF(iso)4E se expresa diferencialmente durante el desarrollo de las plantas, entonces, mutantes para este factor presentarán cambios en la traducción selectiva de mRNA durante el desarrollo y/o condiciones de estrés.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

Determinar la relevancia de eIF(iso)4E en la traducción selectiva de mRNA en *A. thaliana*.

OBJETIVOS PARTICULARES:

- a. Comparar el perfil traduccional de plantas silvestres y mutantes para el factor *AteIF(iso)4E*.
- b. Identificar los genes que presentan cambios a nivel traduccional por ausencia de *AteIF(iso)4E*.
- c. Verificar los cambios de mRNAs seleccionados como candidatos a ser regulados por *AteIF(iso)4E*.
- d. Analizar fenotípicamente plantas mutantes y compararlas con plantas silvestres.
- e. Buscar características comunes entre los mRNAs que se ven afectados en su traducción en ausencia de eIF(iso)4E.

MÉTODOS EXPERIMENTALES

Material biológico.

Para la realización de este proyecto se utilizaron semillas de *A. thaliana* silvestres (WT) ecotipo Columbia (*Col-0*) que fueron obtenidas del *Arabidopsis Biological Resources Center* (ABRC) de la Universidad del estado de Ohio. La línea mutante *AtelF(iso)4E-1* que contiene una inserción del transposon *dspm* en el gen *eIF(iso)4E*, fue amablemente donada por el Dr. Christophe Robaglia del *CNRS-CEA Université de la Méditerranée*, Francia. Las líneas transgénicas que contienen la construcción de *eIF(iso)4E* fusionada a la proteína verde fluorescente (GFP) bajo el promotor constitutivo del virus de mosaico de la coliflor (CaMV) 35S se generaron usando la tecnología *Gateway® cloning* (*Invitrogen*).

Generación de las líneas que sobre-expresan al factor *eIF(iso)4E*

La región codificante de *eIF(iso)4E* o *eIF4E* fue primero amplificada por PCR con los oligos apropiados y luego clonados en el vector *pENTR-D* (*Invitrogen*). Finalmente, la región codificante fue introducida por recombinación con la *clonasa LR* (*Invitrogen*) en el vector binario *pEarlyGate 103* como vector destino. Las recombinantes positivas fueron confirmadas por secuenciación de DNA. El plásmido que contiene la fusión correcta y el gene de resistencia al glufosinato de amonio (BASTA) fue introducido a la cepa *GV3101* de *Agrobacterium tumefaciens*, y usado para transformar plantas *Col-0* por el método de inmersión floral (floral dip). Varias líneas independientes homócigas fueron aisladas por su resistencia a BASTA y autofertilizadas por al menos tres generaciones antes de su uso. La línea de plantas *AtelF(iso)4E-2* fue seleccionada como representativa por los niveles de expresión del mRNA determinados (Aguirre-Martínez, 2009). Se siguió el mismo procedimiento para las líneas transgénicas que sobre-expresan a *eIF4E*.

Condiciones de crecimiento.

Las semillas de *A. thaliana* se esterilizaron superficialmente con 0.1% de *Tween 20* y una solución al 20% de hipoclorito de sodio por 10 minutos y enjuagadas 5-8 veces con agua desionizada estéril hasta eliminar el hipoclorito de sodio.

Las semillas esterilizadas se sembraron en placas petri con medio mínimo *Gamborg's B5* con 1% de sacarosa y 0.7% de agar. Las semillas fueron estratificadas durante 2 días a 4° C en oscuridad y después se colocaron en cámara de crecimiento a 20° C

con una intensidad de luz de $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$ en un fotoperiodo luz/oscuridad de 8/16 horas durante 15 días.

La plantas usadas para el análisis de proteínas se crecieron por una semana en medio *Murashige-Schoog* (MS); adicionado con 1% de sacarosa. Después de este tiempo, las plántulas se transfirieron a medio líquido que contenía 1% de sacarosa, KNO_3 (2.5 mM), $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ (100 μM), MgSO_4 (1mM), Fe-EDTA (25 μM), MnCl_2 (14 μM), CuSO_4 (0.5 μM), ZnSO_4 (1 μM), H_3BO_3 (70 μM), NaMoO_4 (0.2 μM) y NaCl (10 μM) a un pH final de 5.7, y suplementado con 1mM (+Pi) ó 10 μM (-Pi) de KH_2PO_4 .

Para el estudio del fenotipo de raíz, las semillas se germinaron en medio *Gamborg's B5* sólido durante 2 semanas y después se transfirieron a medio Hoagland que contenía KNO_3 (6 mM), $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (4mM), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (2mM), $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (0.009 mM), H_3BO_3 (0.046 mM), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.0008 mM), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.0003 mM), $\text{H}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0.0001 mM), Fe-EDTA (0.005 g/ml) y $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 0.5 mM como fuente de fosfato (+Pi), o medio Hoagland (-Pi) que incluía todo lo anteriormente mencionado excepto $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ el cual fue sustituido por $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0.5 mM) por 10 días.

Análisis de la longitud de raíz.

Para analizar el desarrollo de la raíz, se germinaron semillas de *A. thaliana* en cajas petri cuadradas orientadas verticalmente. 20 días después de la germinación, las plantas se retiraron cuidadosamente del medio y se midió la raíz principal usando una regla digital (*imageJ 1.45s*, National Institutes of Health, USA). Se hicieron 9 experimentos en los que se midieron 5 plantas por línea (WT, *AtelF(iso)4E-1* y *AtelF(iso)4E-2*). Para conocer el efecto de la falta de fosfato en el desarrollo de la raíz, las semillas de *Arabidopsis* se germinaron en medio *Gamborg's B5* por 2 semanas y después se transfirieron a medio *Hoagland* con (+Pi) o sin (-Pi) fosfato por 10 días, transcurrido este tiempo, se retiraron cuidadosamente las plántulas y se midió la longitud de las raíces principales. Este experimento se repitió 5 veces con 5 plantas por línea. Todos los datos fueron analizados por ANOVA one way con comparación múltiple Tukey's usando un valor $p < 0.05$ (Programa Prism 5 for Mac OS X).

Extracción de proteína y análisis por Western blot.

Los extractos de proteína total fueron obtenidos homogenizando 2 g de hojas congeladas y pulverizadas con nitrógeno líquido en 2ml de amortiguador de extracción que contenía HEPES (100 mM, pH 7.5), glicerol (5% v/v), KCl (50 mM), EDTA (5 mM), NaF (5 mM), Triton X-100 (0.1% v/v), DTT (1 mM) y una tableta de inhibidor de proteasas Complete EDTA-free (Roche Molecular Diagnostics) por cada 50 ml de

amortiguador. Las muestras se centrifugaron a 13,000 g por 15 minutos a 4° C y se colectó el sobrenadante. La concentración de proteína se cuantificó usando el reactivo Bradford (BioRad Laboratories) y BSA como estándar.

Para la purificación y detección de la proteína de unión a cap se siguió el siguiente protocolo: la proteína de fusión eIF(iso)4E-GFP se purificó usando MAgneHis system (Promega), se separaron 30 µg de proteína total por SDS-PAGE y se transfirió a una membrana PVDF (Polyvinylidene Fluoride, Millipore), la cual fue bloqueada con PBS-Tween (0.1%) con leche al 5% (p/v) y se incubó con el anticuerpo primario toda la noche a 4° C. Los anticuerpos para detectar eIF4E y eIF(iso)4E fueron donados por la Dra. Karen Browning (Department of Chemistry and Biochemistry, University of Texas at Austin, TX) y se usaron en una dilución 1:1,000). El anticuerpo secundario anti-conejo se usó con una dilución 1:10,000 y se incubó por 1 h a temperatura ambiente. Las membranas se revelaron con Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore).

Para la detección de PHO1, 2 g de plántulas o raíces congeladas y trituradas con nitrógeno líquido se homogenizaron en 2 ml de amortiguador ⁷mGTP que contiene KCl (100mM), HEPES (20 mM, pH 7.6), EDTA (0.2 mM), Glicerol (10%), PMSF (100 mM), DTT (0.1 M) y una tableta de inhibidor de proteasas Complete EDTA-free (Roche Molecular Diagnostics) por cada 50 ml de amortiguador. El homogenizado se centrifugó por 30 min a 12,000 rpm a 4° C y se separó el sobrenadante al cual se le midió la concentración de proteína con el reactivo Bradford (BioRad Laboratories) y BSA como estándar. De estos extractos de proteína total se tomaron 50 µg y se separaron por SDS-PAGE, se transfirió a una membrana PVDF (Millipore), la cual fue bloqueada con PBS-Tween con leche al 5% (p/v) e incubada con el anticuerpo primario toda la noche a 4° C. El anticuerpo para detectar PHO1 fue donado por el Prof. Yves Poirier de la Université de Lausanne y se uso en una dilución 1:3,000. El anticuerpo secundario anti conejo se usó con una dilución 1:5,000 y se incubó por 1 h a temperatura ambiente. Las membranas fueron reveladas con ECL (Amersham™).

Gradientes Polisomales.

Dos gramos de plántulas *A. thaliana* de dos semanas se congelaron y trituraron con nitrógeno líquido y se homogenizaron en 2 ml de amortiguador de lisis (Tris-HCl (200 mM), KAc (50 mM), MgAc (25 mM), EGTA (2 mM), PTE (10 Tridecyl Polyoxyethylene ether, 10%), Nonidet P-40 (1%) y cycloheximida (50 mg/ml)) se centrifugaron por 15 min a 14000 rpm a 4° C. El sobrenadante se llevó a un volumen final de 4 ml con amortiguador de lisis, se colocó sobre 1 ml de colchón de sacarosa al 60% con

cicloheximida (50 mg/ml), y se centrifugó por 3h a 50,000 rpm a 4° C (rotor Beckman 75Ti). El botón de precipitado obtenido se resuspendió en 400 µl de H₂O-DEPC y se incubó al menos durante 30 min a 4° C para su resuspensión. Se preparó un gradiente continuo de sacarosa de 20 – 60%. Primero se disolvió la sacarosa en amortiguador de gradiente (Tris - HCl (50 mM), KAc (20 mM), EGTA (2 mM), Cicloheximida (50 mg/ml)), después, en un tubo para centrifuga de 11 ml se colocaron 5 ml de sacarosa al 60%, y con pipeta Pasteur lentamente se colocaron 5 ml de sacarosa al 20%, teniendo cuidado de mantener las dos fases separadas. El tubo se inclinó 90° y se dejó por 2 h a temperatura ambiente. Transcurrido ese tiempo, se levantó el gradiente y se colocaron los 400 µl de extracto lisado en la parte superior del gradiente. El gradiente se centrifugó 2.5 h a 36,000 rpm a 4° C (rotor Beckman SW40). El gradiente fue fraccionado de arriba hacia abajo con un monitoreo continuo de absorbancia a 260 nm y juntando fracciones menores a 1 ml.

Aislamiento de RNA.

Para la extracción de RNA total, se trituraron 50-100 mg de plántulas de dos semanas con nitrógeno líquido en tubos eppendorf de 1.5 ml y se homogenizaron con 1 ml de Trizol ® Reagent (Invitrogen). El homogenizado se incubó por 5 min a temperatura ambiente para permitir la completa disociación de complejos nucleoprotéicos. En seguida se añadieron 0.2 ml de cloroformo, se agitaron los tubos vigorosamente y se incubaron 3 min a temperatura ambiente, se centrifugó a 12,000 g por 15 min a 4° C. La fase acuosa se transfirió a un tubo eppendorf nuevo y estéril y el RNA se precipitó con 0.5 ml de isopropanol, se incubó la muestra por 10 min, a temperatura ambiente y se centrifugó 10 min a 4° C a 12,000 g. El sobrenadante fue removido cuidadosamente y el botón de RNA se lavó con 1 ml de etanol al 75%, nuevamente se centrifugó durante 5 min a 7500 g a 4° C. Se eliminó el etanol y el RNA se resuspendió en 50 µl de H₂O- DEPC. Finalmente se incubó a 60° C por 10 min para resuspender completamente el RNA. El RNA fue cuantificado a 260 y 280 nm y su integridad fue analizada en gel de agarosa desnaturalizantes al 1.5%.

Para la extracción de RNA polisomal, las fracciones colectadas de los gradientes de sacarosa se dividieron en tubos eppendorf con 500 µl cada uno, y se añadió a cada una 25 µl de SDS (10 %) y 1 µl de proteinasa K (100 mg/ml, SIGMA). Los tubos se agitaron en vortex y se incubaron 30 min a 37° C. Luego se añadieron 250 µl de fenol (amortiguado con Tris-EDTA 50 mM, pH 8) y 250 µl de cloroformo – isoamílico (24:1). Nuevamente se agitó vigorosamente con vortex y se centrifugó a 12,000 rpm por 5 min a 4° C. La fase acuosa se retiró y se hizo una re-extracción con 250 µl de fenol

amortiguado y 250 µl de cloroformo – isoamílico (24:1). Se centrifugó a 12,000 rpm por 5 min a 4° C y se retiró la fase acuosa. A la fase acuosa se le agregó 79 µl de LiCl (10 M) y 470 µl de isopropanol frío. Los tubos se incubaron por 60 min a -20° C. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se centrifugaron las muestras a 14,000 rpm por 15 min a 4° C. El botón de precipitado obtenido se lavó con 500 µl de etanol al 70% frío y se agitó con vortex. Se centrifugó a 14,000 rpm por 10 min a 4° C, el etanol se eliminó en centrifuga al vacío por 5 min y se resuspendió el botón en un volumen de 30 µl de agua DEPC.

El RNA se cuantificó a 260 y 280 nm y se verificó su integridad en gel de agarosa desnaturalizante al 1.5%. Con base a su patrón electroforético y a la D.O. a 260 nm, las fracciones se dividieron en dos mezclas: fracciones No Polisomales (NP) y fracciones Polisomales (P).

Microarreglos de DNA.

Los Microarreglos fueron fabricados en la Universidad de Arizona usando Qiagen-Operon Arabidopsis Genome Array Ready Oligo Set (AROS V.3.0) que contiene 29,000 oligonucleotidos (<http://www.arizona.edu/microarray/>). Los chips que contenían los arreglos se re-hidrataron con vapor de agua a 60° C, y se fijaron con dos ciclos de luz UV (1200J). Después se hirvieron por dos minutos a 92° C, se lavaron con etanol (95%) por un minuto y se pre-hibridaron en SCC 5X, SDS (0.1%) y BSA (1%) por 1 h a 42° C. Después fueron lavados y secados para su futura hibridación. Se usaron 10 µg de RNA para sintetizar cDNA incorporando dUTP-Alexa₅₅₅ o dUTP- Alexa₆₄₇ empleando el kit First-Strand cDNA labeling (Invitrogen). La incorporación de los fluoroforos (dUTP-CY5 y dUTP-CY3) se analizó midiendo la absorbancia a 555nm para Alexa₅₅₅ y 650nm para Alexa₆₄₇. Cantidades iguales de cDNA marcado se hibridaron al chip usando UniHyb (TeleChem International) por 14 h a 42° C. Se realizaron dos replicas experimentales usando en cada una RNA obtenido de grupos independientes de plantas.

Adquisición de datos y análisis de microarreglos

La adquisición y cuantificación de las imágenes de los microarreglos se realizó usando ScanArray 4000 acoplado al software ScanArray 4000 (Packard BioChips). Todas las imágenes fueron capturadas usando 65% de ganancia PMT, 70 a 75% de poder de láser y 10 µm de resolución al 50% de grado de escaneo. Para cada punto de Alexa₅₅₅ y Alexa₆₄₇ el valor del promedio de la densidad y del fondo o background se calculó con el software ArrayPro Analyzer (Media Cybernetics). El análisis de los datos del

microarreglos se hizo con el software genArise, desarrollado en la unidad de computo del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM (<http://www.ifc.unam.mx/genarise>). GeneArise lleva a cabo numerosas transformaciones como correcciones del fondo, normalizaciones, filtros de intensidad, análisis de replicas y selección de genes con expresión diferencial. El propósito de GenArise es identificar qué genes presentan evidencia de expresión diferencial, esto se logra identificando genes que se expresan diferencialmente calculando el valor z-score que es dependiente de la intensidad. Utiliza un algoritmo para calcular el promedio y la desviación estándar de cada punto, y define el z-score donde z es el número de desviaciones estándar del promedio: $z_i = [R_i - \text{promedio}(R)] / ds(R)$, donde z_i es el z-score de cada elemento, R_i es el logaritmo de radio de cada elemento y $ds(R)$ es la desviación estándar del logaritmo del radio. Con este criterio, los elementos con z-score > 1.5 desviaciones estándar representan a genes expresados diferencialmente. Más detalles del protocolo y análisis de datos pueden obtenerse en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE29386>.

Para el caso de los microarreglos de DNA a partir de RNA total, se hizo un análisis tipo SWAP que consistió en empalmar los microarreglos de WT-Cy3 con el microarreglo de *AteIF(iso)4E-1*-Cy5. Cada gen fue clasificado como estimulado, reprimido o no alterado. Las comparaciones se hicieron tomando al WT como control y a *AteIF(iso)4E-1* como muestra experimental. Se realizó una replica de cada experimento intercambiando los fluoroforos.

Para analizar los microarreglos de DNA a partir de RNAs polisomales, se realizó un análisis tipo SWAP que consistió en empalmar los microarreglos WT-Cy3 con el microarreglo *AteIF(iso)4E-1* - Cy5, No Polisomales y Polisomales. Al igual que con los microarreglos de RNA total, cada gen fue clasificado como estimulado, reprimido o no alterado y las comparaciones fueron hechas tomando al WT como control y a *AteIF(iso)4E-1* como muestra experimental.

PCR tiempo real o cuantitativo (qRT-PCR).

Tratamiento con DNase RQ1 (Promega).

Para la realización de qRT-PCR es necesario contar con muestras de RNA libres de DNA, para lo cual se hizo un tratamiento con DNase RQ1 (Promega) de la siguiente manera: a 2 µg de RNA se adicionaron 1 µl de RQ1 RNase-Free DNase 10x Reaction Buffer, 1 unidad de RQ1 RNase-Free DNase, y agua libre de nucleasas para alcanzar un volumen total de 10 µl. Se incubó 30 min. a 37° C. La reacción se llevó a 300 µl con agua y se extrajo con el mismo volumen de Fenol:Cloroformo:Isoamilico (25:24:1), se centrifugó por 15 min a 14,000 rpm a 4 °C. La fase acuosa se separó y se precipitó

con 1/3 de volumen de acetato de amonio (10 M) y 2 volúmenes de etanol absoluto y se incubó toda la noche a -20° C. Transcurrido el tiempo de incubación, se centrifugó a 14,000 rpm a 4° C durante 15 min, el botón se lavó tres veces con etanol al 70 % y se centrifugó nuevamente por 5 min a 14,000 rpm a 4° C. Se eliminó el etanol y se resuspendió en 10 µl de agua-DEPC.

Síntesis de cDNA.

El RNA tratado con DNasa RQ1 fue utilizado para sintetizar cDNA, se le adicionó 1µl de oligo dT (10 mM), 1µl de dNTP's (10 mM) y 12 µl de agua estéril. Se incubó 5 min a 65° C, en seguida se puso en hielo por 5 min y se agregaron 4 µl de 5x First-Strand Buffer, 2 µl de DTT (0.1 M) y 1 µl de inhibidor de RNasa RNasin (Promega). Se mezcló gentilmente y se incubó a 37° C por 2 min. Se adicionó 1 µl (200 U) de M-MLV-RT (Invitrogen), se mezcló con pipeta y se incubó durante 50 min a 37° C. Finalmente se inactivó a la enzima incubando a 70° C por 15 min.

Diseño de oligonucleótidos.

El PCR en tiempo real fue realizado usando oligonucleotidos específicos para cada gen (Apéndice 1).

Los oligonucleótidos se diseñaron en el programa MacVector (Suplementaria 1). Amplifican fragmentos pequeños (80 a 150 pb) y cumplen con las siguientes características:

Tm 58 - 60° C

Las últimas 5 bases del extremo 3' no deben ser más de 2 G's o C's

Las Tm de ambos oligonucleótidos deben ser cercanas

Contenido de GC 30-80 %

Evitar repeticiones de más de 4 nucleótidos, especialmente G's

Los oligonucleótidos diseñados fueron probados con ensayos de RT-PCR con RNA total de plantas Wt, RNA monosomal y polisomal de plantas Wt y *AteIF(iso)4E-1*, RNA tratado con DNase RQ1 (Promega) de fracciones monosomales y polisomales y con Supermix SYBRgreen. Una vez que se tuvo la certeza de que los oligonucleótidos funcionaron bien, se realizó la amplificación en el equipo de tiempo real.

PCR cuantitativo en tiempo real.

La amplificación fue realizada en el equipo 7500 DNA analyzer (Applied Biosystems) para la detección de la señal se usó el SYBR® Green PCR master mix (Applied Biosystems). Para normalizar el contenido total de cDNA presente en las muestras, se

uso el gen del rRNA 18S como control de amplificación. Las reacciones se realizaron con 100 ng de cDNA, 12.5 µl de SYBR® Green master mix, 0.75 µl de cada oligonucleótido (10 µM) y agua estéril c.b.p. 25 µl. Se siguió el siguiente protocolo:

Ciclo 1: (1X) 50° C 10 min

Ciclo 2: (1X) 95° C 5 min

Ciclo 3: (40X) 95° C 10 seg

60° C 30 seg

Ciclo 4: (80X) 55° C 10 seg

Aumentando la temperatura 0.5° C después del ciclo 2, hasta llegar a 95° C.

Para conocer los cambios de RNA total, se calculó el valor R (expresión relativa del gen) siguiendo la ecuación:

$$R = ((E_{\text{Gen X}})^{\Delta\text{CT}_{\text{Gen X (silvestre - mutante)}}}) / (E_{\text{Hkp}})^{\Delta\text{CT}_{\text{Hkp(silvestre - mutante)}}}$$

E es la eficiencia de los oligos ($E = 10^{-1/m}$) donde m es la pendiente que se obtiene de graficar Ct vs concentración de cDNA. El valor de E debe ser entre 1.8 y 2.2. **Gen X** es el gen ha estudiar y **Hkp** es el gen control (18S).

La concentración de mRNAs individuales se calcularon como $2^{\Delta\text{CT}}$ y se representaron gráficamente como porcentaje de mRNA de la cantidad de RNA total (suma de todos los mRNAs) presente en cada fracción. Para polisomas se obtuvo como ΔCT la resta del mayor ciclo. Se obtuvo el valor $2^{\Delta\text{CT}}$ para cada fracción y se sumó todas las fracciones. Se calculó el porcentaje para cada fracción. Esto se realizó para genes candidatos a regulación traduccional por eIF(iso)4E y para los constitutivos como actina, eIF4A ó eIF1a.

RT-PCR.

Para hacer el análisis semi-cuantitativo de transcritos, se sintetizó cDNA a partir de RNA total con la enzima Transcriptasa Reversa M-MLV-RT (Invitrogen) y se amplificó por PCR, el número de ciclos y la temperatura de alineamiento variaron dependiendo del transcrito a amplificar.

Análisis de estructuras UTR.

Las estructuras 5' y 3' UTR de los mRNAs afectados traduccionalmente por la falta de AteIF(Iso)4E-1 se analizaron en el sitio *Arabidopsis Information Resource* (TAIR10:11/17/10). Las secuencias reportadas en la lista de genes *Salk-Stanford-PGEC Arabidopsis ORF* fueron usadas para determinar la longitud de las secuencias UTR, la presencia y estabilidad de estructuras secundarias en las 5'UTR se analizaron con el programa *mfold* (<http://mfold.rit.albany.edu>) y la presencia de uORFs (marcos de lectura abiertos río arriba), uAUGs (codones de inicio río arriba), elementos IRES y CPE se encontraron por *UTRScan* (<http://www.ba.itb.cnr.it/BIG/UTRScan>) y RegRNA (<http://regrna.mbc.nctu.edu.tw>).

RESULTADOS

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE PLANTAS MUTANTES Y QUE SOBRE-EXPRESAN A *AteIF(iso)4E*.

Para conocer la relevancia funcional del factor de inicio de la traducción eIF(iso)4E, se utilizaron dos líneas de plantas, una mutante nula y otra que sobre-expresa a este factor. La mutante nula, *AteIF(iso)4E-1*, reportada previamente por Duprat en el año 2002 contiene un transposon (*dspm*) que confiere resistencia a glufosinato de amonio (BASTA) insertado en el segundo exón del gen *At5g35620* (figura 6A). Y las plantas que sobre-expresan tienen al factor eIF(iso)4E fusionado a la proteína reportera GFP en el extremo carboxilo terminal bajo el promotor 35S en un fondo silvestre de Col-0 (figura 6B). La fusión es separada por 16 aminoácidos que permiten el correcto e independiente plegamiento de eIF(iso)4E y GFP fueron tres líneas independientes *AteIF(iso)4E-2*, -3 y -4, que expresan al factor eIF(iso)4E (Aguirre-Martínez,2009). Se realizó un modelaje estructural de esta fusión que mostró que no hay alteración significativa en el pocket de unión a cap ni en la superficie que contiene el dominio de unión a eIF4G (figura 7).

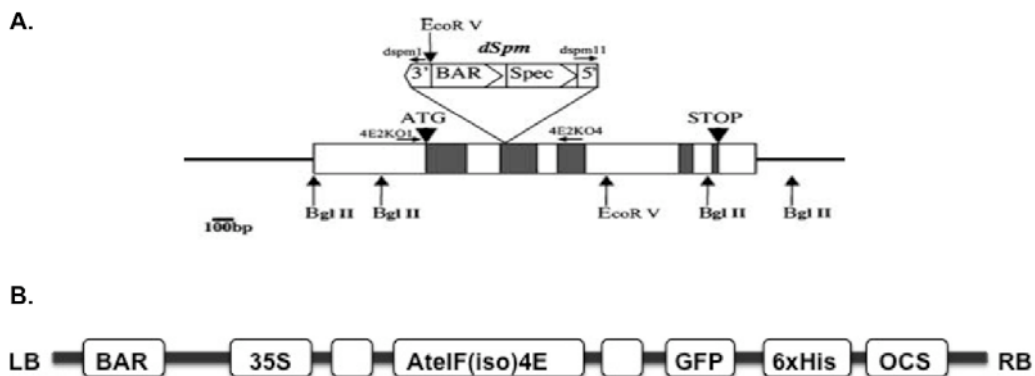


Figura 6. Diagramas de las líneas utilizadas en este trabajo. **A.** Inserción de transposon *dSpm* en el segundo exón del gen *eIF(iso)4E*, que confiere resistencia al herbicida BASTA (*BAR*). Tomado de Duprat et al., 2002. **B.** Fusión de *eIF(iso)4E::GFP* bajo el promotor constitutivo 35S, el marcador de selección *BAR* y una cola de 6 histidinas para su purificación.

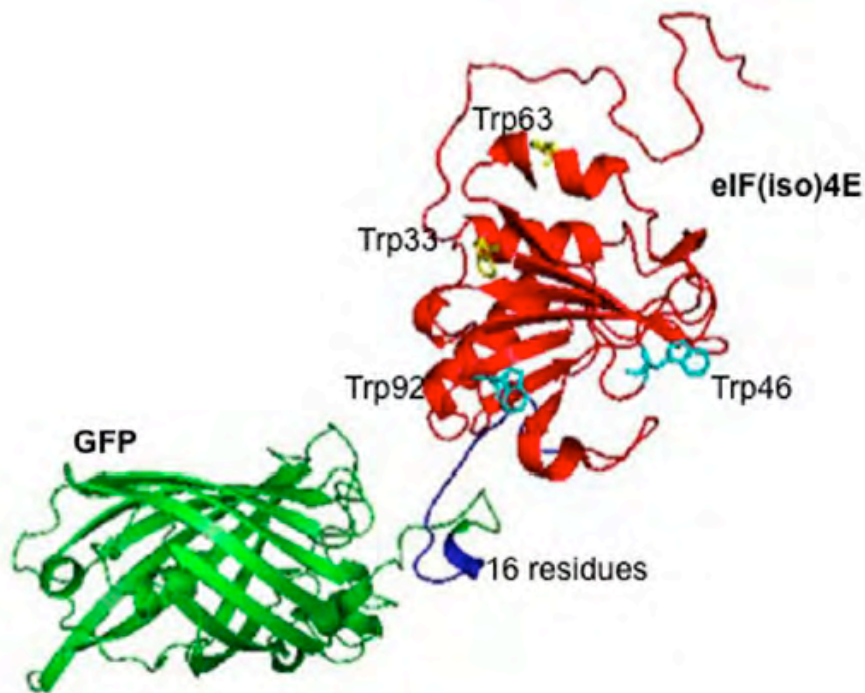


Figura 7. Modelaje estructural de la proteína de fusión eIF(iso)4E::GFP. En rojo se muestra la estructura de AteIF(iso)4E unida por 16 aminoácidos marcados en azul a la proteína GFP mostrada en verde. También se señalan los Trp involucrados en el reconocimiento de la estructura cap.

Dado que la transposon *dSpm* insertado para interrumpir al ge *AteIF(iso)4E* contiene la secuencia BAR que confiere resistencia al herbicida BASTA, para confirmar la estabilidad de la inserción de las mutantes, las plántulas fueron crecidas en presencia de BASTA y analizamos los niveles de RNA y proteína (Figuras 8A y B). Confirmamos la ausencia de RNA y proteína eIF(iso)4E en la línea *AteIF(iso)4E-1*, y observamos la sobre-expresión de la proteína eIF4E, lo que concuerda con lo reportado previamente (Duprat *et al.*, 2002). En la línea *AteIF(iso)4E-2*, observamos que los niveles de transcrito y de proteína son mayores con respecto a Wt. Detectamos a la proteína de fusión (iso)4E-GFP, de aproximadamente 55 kDa, con los anticuerpos contra AteIF(iso)4E y contra GFP y esta fusión fue capaz de unirse a ⁷mGTP-sefarosa (figura 8C), indicando que aún fusionada a GFP, conserva su función principal de unirse a cap. Las tres líneas transgénicas sobre-expresoras *AteIF(iso)4e-2*, -3 y -4 muestran diferentes niveles de RNA de eIF(iso)4E, pero todas muestran incremento desde 2.5 a

3.5 veces comparado con plántulas Wt de 2 semanas (Figura 9). Para realizar la mayoría de los futuros experimentos, se seleccionó solo la línea *AtelF(iso)4E-2*.

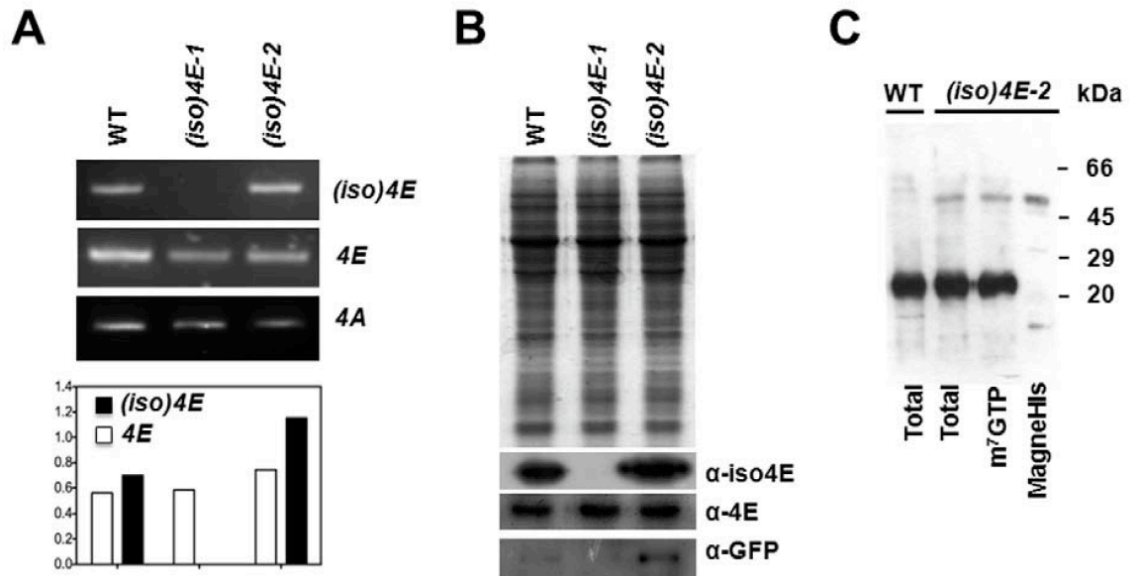


Figura 8. Análisis molecular de las plantas mutantes *AtelF(iso)4E*. A. La amplificación por RT-PCR empleando oligonucleótidos para amplificar los transcritos de *eIF(iso)4E* y *eIF4E* de *Arabidopsis* indica que el mRNA de *(iso)4E* está ausente en *AtelF(iso)4E-1* y aumentado cerca de 2 veces en *AtelF(iso)4E-2*, mientras que los niveles de *eIF4E* permanecen similares en todas las líneas. El transcrito *eIF4A* fue empleado como control de carga, abajo se muestra la normalización de los transcritos *eIF(iso)4E* y *eIF4E* con *eIF4A*. B. Electroforesis de 50µg de proteína total teñida con azul de Coomassie y ensayos western blot usando anticuerpos específicos contra *eIF(iso)4E*, *eIF4E* y GFP. Se observó la ausencia de una banda de 22 kDa correspondiente a *(iso)4E* en la mutante *AtelF(iso)4E-1*, mientras que la banda de 25 kDa que corresponde a *eIF4E* esta aumentada. La detección de GFP mostró la presencia de una banda de 55kDa correspondiente a la proteína de fusión *eIF(iso)4E-GFP* en la línea transgénica *AtelF(iso)4E-2*. C. Extractos de proteína purificada por ⁷mGTP-sefariosa o MagneHis System (Promega) se separaron por SDS-PAGE junto con extractos totales de plantas Wt y *AtelF(iso)4E-2* para realizar Inmunoblot contra *eIF(iso)4E* de *Arabidopsis*, La banda de 55 kDa que se observa en el extracto total y en las fracciones purificadas de *AtelF(iso)4E-2* corresponde a la fusión *eIF(iso)4E-GFP* con la cola de histidinas en el extremo carboxilo terminal, esta señal no se detecta en extractos de plantas Wt. La banda de 22 kDa que se detecta en extractos totales *AtelF(iso)4E-2* y Wt corresponde a *eIF(iso)4E* nativa.

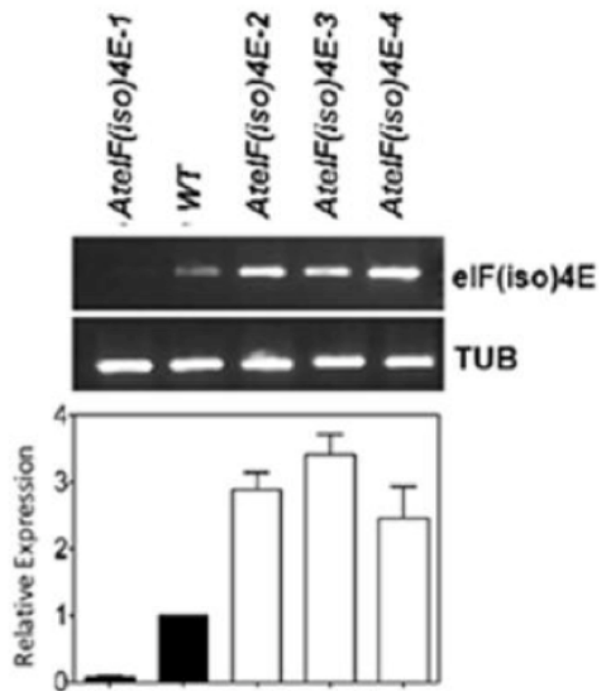


Figura 9. El aumento del transcrito eIF(iso)4E en las líneas sobre-expresoras *AtelF(iso)4E-2*, -3 y -4 por efecto de la inserción de la construcción eIF(iso)4E::GFP, fue comprobado por RT-PCR, la amplificación del gen tubulina (TUB) fue usada como control de carga y para calcular la expresión relativa

Se estudiaron los niveles de expresión de los mRNAs de los factores de inicio de la traducción de la familia eIF4E de plantas, *eIF4E*, *eIF(iso)4E* y *nCBP*, en plántulas de las líneas *AtelF(iso)4E-1* y *AtelF(iso)4E-2* y se compararon con los niveles de estos en plántulas Wt (figura 10). Encontramos que el mRNA de eIF4E tiene un ligero aumento, menor al 30%, en las dos líneas mutantes, mientras que los niveles del transcrito de nCBP son menores en comparación a lo observado en plántulas Wt. También, nuevamente se comprueba que el transcrito eIF(iso)4E está sobre-expresado en la línea *AtelF(iso)4E-2* y ausente en *AtelF(iso)4E-1*. Se utilizó tubulina como control para normalizar los valores relativos de expresión.

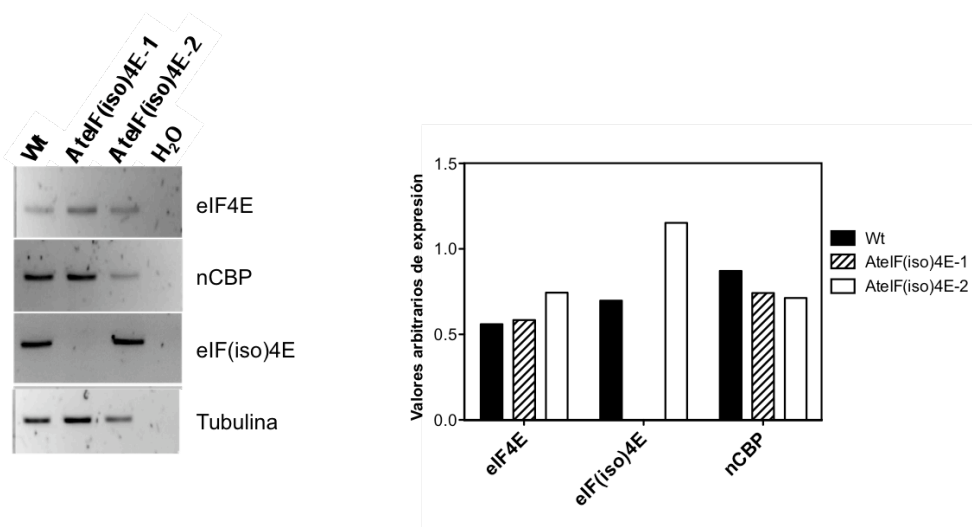


Figura 10. Determinación por RT-PCR de los niveles de expresión de los miembros de la familia 4E en las tres líneas usadas en este estudio. eIF4E se sobre-expresa en la línea *AtelF(iso)4E-1* mientras que nCBP disminuye en *AtelF(iso)4E-2*. La detección del mensajero de Tubulina se usó como control de carga. Panel izquierdo: electroforesis en gel de agarosa. Panel Derecho: La gráfica representa los valores de intensidad obtenidos en la electroforesis.

COMPARACIÓN DEL PERFIL TRADUCCIONAL DE PLANTAS WT Y MUTANTES PARA eIF(iso)4E.

Para comparar el perfil traduccional de plantas silvestres y mutantes nulas para eIF(iso)4E, se utilizaron métodos bioinformáticos, esto se logró gracias a que se conoce el genoma completo de *A. thaliana*, y existen microarreglos que lo contienen. Para determinar el nivel global de transcritos, se realizaron microarreglos de DNA a partir de RNA total extraído de plántulas Wt y mutantes *AtelF(iso)4E-1* de 2 semanas de germinación. Se hizo un replica experimental de los microarreglos siguiendo el siguiente diseño experimental:

	Wt	<i>AtelF(iso)4E-1</i>
RNA total ⁽¹⁾	Cy3	Cy5
RNA total ⁽²⁾	Cy5	Cy3

Los resultados obtenidos de este microarreglo se analizaron usando el programa **geneArise** desarrollado en la unidad de cómputo del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. El programa **geneArise** identifica los genes que muestran expresión diferencial calculando el valor **z-score** que es dependiente de la intensidad emitida por los fluoróforos unidos a los mRNAs, llevando a cabo una serie de transformaciones como correcciones de fondo o background, normalizaciones, análisis de réplicas y selección de genes expresados diferencialmente. Con este criterio se consideró que los elementos que presentaron un valor de $z\text{-score} \geq 2$ ó $z\text{-score} \leq -2$, son los genes que presentan significativamente expresión diferencial. Se encontraron 469 genes que aumentaron su expresión y 290 que la disminuyeron por efecto de la mutación. Se analizaron los transcritos utilizando los sitios **genevestigator** (www.genevestigator.ethz.ch) y TAIR (www.arabidopsis.org) para obtener información sobre su función molecular, sus niveles de expresión en los diferentes tejidos de la planta y durante el desarrollo.

Encontramos que la mayoría de los genes afectados, tanto los que se inducen como los que se reprimen, intervienen en procesos metabólicos como es el metabolismo de carbohidratos, de aminoácidos, de nucleótidos y en el metabolismo energético. En igual porcentaje, hay un número importante de transcritos relacionados con el procesamiento de información genética como traducción y transcripción en ambos grupos (figura 11). Dada la naturaleza del experimento, es importante recordar que estos transcritos son alterados a nivel transcripcional por la ausencia de eIF(iso)4E, y para poder enfocarnos en los efectos traduccionales ocasionados por cambios en los niveles de dicho factor es necesario descartar el efecto transcripcional en nuestro estudio.

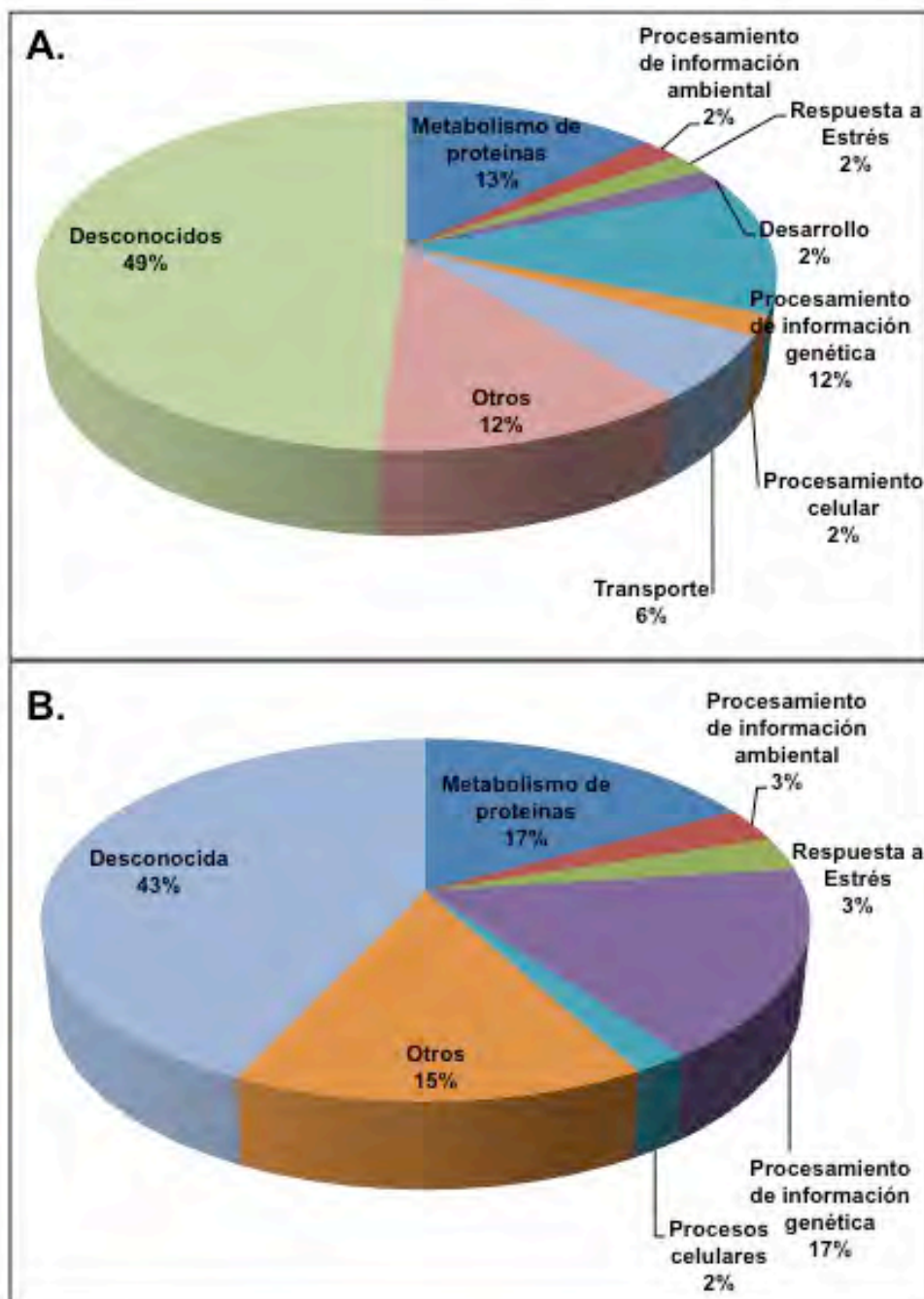


Figura 11. Análisis y clasificación funcional de los transcritos alterados a nivel global por la ausencia de eIF(iso)4E. **A.** 469 genes que aumentan su expresión **B.** 290 genes que disminuyen su expresión.

IDENTIFICACIÓN DE LOS GENES REGULADOS A NIVEL TRADUCCIONAL POR eIF(iso)4E.

El fraccionamiento de extractos de plántulas sobre un gradiente de sacarosa (de 20 a 60%) permitió la separación en fracciones polisomales y no polisomales para lograr la identificación de los genes regulados a nivel traduccional por eIF(iso)4E. Las fracciones no polisomales están compuestas por RNAs mensajeros (mRNAs) libres formando parte de ribonucleoproteínas o unidos a un ribosoma, son mRNAs traduccionalmente no activos. Por otro lado, las fracciones polisomales están constituidas por mRNAs unidos a más de un ribosoma, es decir, son fracciones traduccionalmente activas. Esta técnica nos permite observar la movilización selectiva del mRNA para la traducción (perfil traduccional) independiente de los cambios globales a nivel celular del transcrito. En la figura 12 se muestran los perfiles polisomales de plántulas Wt y *AteIF(iso)4E-1* de 2 semanas de germinación en medio Gamborg's B5, obtenidos después de pasar el tejido lisado por un gradiente de 20 a 60% de sacarosa y monitoreados durante su fraccionamiento a 260 nm. Se extrajo RNA a partir de las fracciones colectadas de los gradientes de sacarosa y se analizó su integridad en geles desnaturalizantes de agarosa. Las fracciones de RNA se agruparon en fracciones no polisomales (NP - mRNAs traduccionalmente no activos) y fracciones polisomales (P - mRNAs traduccionalmente activos).

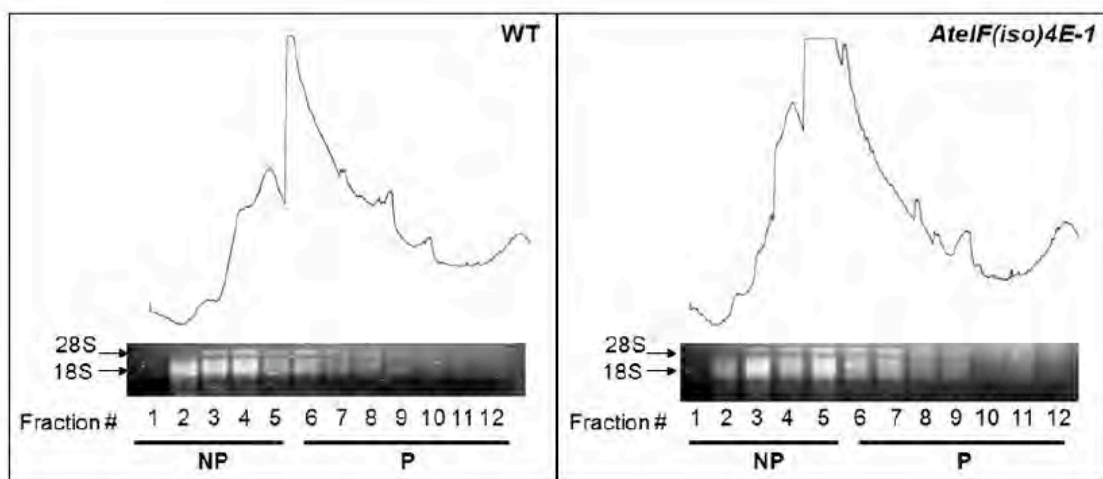


Figura 12. Perfiles polisomales y extracción de RNA polisomal de las fracciones obtenidas del gradiente de sacarosa en gel desnaturalizante de agarosa. Analizando el perfil polisomal y el patrón electroforético de RNA, se agruparon en fracciones NP (1-5) y P (6-12).

Con las líneas Wt y *AtelF(iso)4E-1*, obtuvimos un total de 12 fracciones de aproximadamente 1 ml cada una y se agruparon en fracciones NP las fracciones 1 a 5 y en fracciones P de la fracción 6 a la 12.

Para conocer el efecto traduccional de la ausencia de eIF(iso)4E, se hibridaron microarreglos de DNA con el RNA extraído de fracciones NP y P de plántulas de 2 semanas Wt y *AtelF(iso)4E-1*. De cada uno se realizó una replica experimental intercambiando los fluoroforos para poder realizar un análisis tipo SWAP, que consistió en empalmar los microarreglos de Wt - Cy3 con el microarreglo de *AtelF(iso)4E-1* – Cy5 y *viceversa*. La cuantificación y análisis de la intensidad de cada transcrito fue realizado con el programa **Array-Pro Analyzer**. Los resultados obtenidos se analizaron usando el programa **GenArise** y cada transcrito fue clasificado como estimulado, reprimido o no alterado. Las comparaciones fueron hechas tomando las intensidades de Wt como control y a *AtelF(iso)4E-1* como muestra experimental, se tomaron como cambios significativos valores de z-score por arriba o por abajo de 1.5 veces de cambio. Los microarreglos de DNA a partir de RNA No Polisomal y Polisomal se realizaron de la misma manera que los microarreglos de DNA a partir de RNA total. El diseño experimental de estos microarreglos se muestra en el siguiente cuadro.

	Wt	<i>AtelF(iso)4E-1</i>
RNA de no polisomas ⁽¹⁾	Cy3	Cy5
RNA de no polisomas ⁽²⁾	Cy5	Cy3
RNA de polisomas ⁽¹⁾	Cy3	Cy5
RNA de polisomas ⁽²⁾	Cy5	Cy3

En el análisis de estos microarreglos, se generaron dos grupos, el **Grupo I** compuesto por los transcritos que presentaron un valor de Zscore ≥ 1.5 en NP y Zscore ≤ -1.5 en P; y el **Grupo II** que incluye a los mRNAs que presentaron el comportamiento opuesto; Zscore ≥ 1.5 en P y Zscore ≤ -1.5 en NP. Para asegurarnos de que los cambios encontrados se debieran a un efecto traduccional y no transcripcional, nos cercioramos de que los genes de ambos grupos no mostraran alteración a nivel de RNA total. En este análisis, encontramos 79 transcritos del Grupo I, reprimidos en polisomas y estimulados en fracciones no polisomales, lo que sugiere, que estos 79 mRNAs son candidatos a ser regulados a nivel traduccional por eIF(iso)4E (Ver Tabla S2 Martínez-Silva *et al.*, 2012). Se realizó un análisis más detallado de estos dos grupos de transcritos, con la finalidad de obtener información acerca de su expresión

tejido específica, de su localización subcelular y de su función biológica. Para conocer en qué tejidos se expresan los mRNAs candidatos de cada grupo, cada gen fue clasificado de acuerdo a la estructura de la planta con el mayor nivel de transcrito reportado en el sitio TAIR utilizando la herramienta *ATGenexpress Visualization tool* (Schmid *et al.*, 2005; TAIR, <http://www.arabidopsis.org/>). En cuanto a la localización subcelular y función molecular, se tomó en cuenta lo reportado para cada mRNA en <http://www.arabidopsis.org>.

Este análisis mostró que la mayoría de los mRNAs candidatos a ser traducidos por eIF(iso)4E (Grupo I), se expresan principalmente en raíz (33%). Por otro lado, 61% de estos mRNAs son componentes de membrana, principalmente del sistema endomembranoso (39%). Respecto a la función molecular se encontró que el 33% de los transcritos afectados son proteínas de unión y el 15% son factores de transcripción (figura 14). Entre estos 79 transcritos destacan transportadores de carbohidratos como SUT2 (*sucrose transporter 2*), un transportador de fosfato, PHO1 (*phosphate 1*), factores de transcripción como TFEII (*transcription initiation factor II*), proteínas estructurales de pared celular como ATEXT3 (*extensin 3*) y varias proteínas de unión a ácidos nucleicos.

Dado que los niveles de eIF4E se encuentran aumentados en las plantas *AteIF(iso)4E-1*, es posible, al analizar los microarreglos, encontrar candidatos a ser traducidos preferencialmente por eIF4E, estos 47 transcritos son los que pertenecen al Grupo II y que se encuentran reprimidos en fracciones NP y estimulados en fracciones P, lo cual nos indica que se están traduciendo activamente (Ver Tabla S3 Martínez-Silva *et al.*, 2012). El análisis de este grupo de transcritos arrojó que a diferencia de los transcritos del Grupo I, el 64% se expresa principalmente en inflorescencia y solo 4% son de raíz, el 40% son componentes de núcleo y 34% de membranas. La función molecular resultó variable, ya que no existe alguna que represente a la mayoría de los transcritos, pero al igual que el grupo I la principal función encontrada es de unión (Figura 14). Entre estos transcritos, se encontraron varios factores de transcripción como ERF/AP2, RAP2.9 (*related to AP2 transcription factor*), factores de inicio de la traducción como eIF3K (*eukaryotic initiation factor 3K*) y proteínas estructurales de ribosomas como L12.

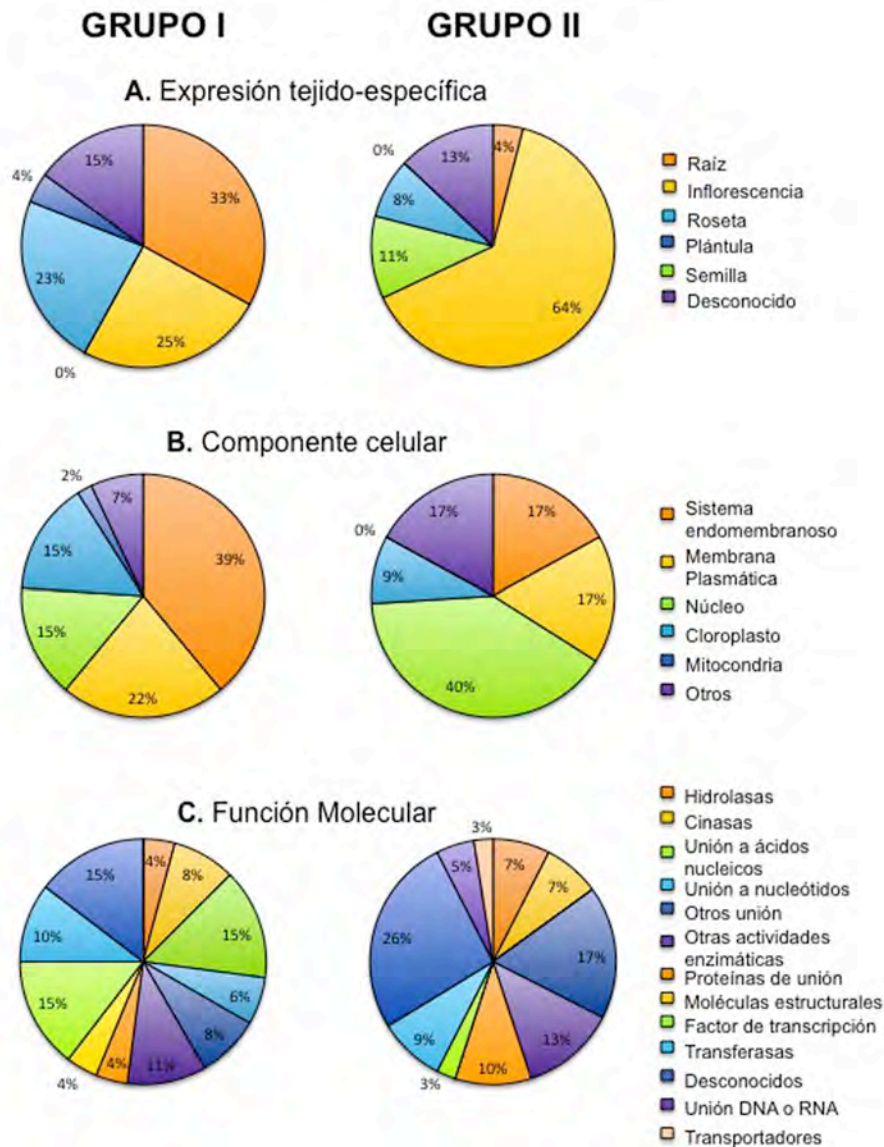


Figura 13. Clasificación de los mRNAs traducidos diferencialmente en plántulas *Wt* y *AtelF(iso)4E-1*. **A.** Expresión tejido específica, la clasificación se realizó de acuerdo a lo reportado en *AtGenexpress Visualization tool* (Schmid et al., 2005; TAIR, <http://www.arabidopsis.org/>). **B.** Localización subcelular y **C.** Función molecular, de acuerdo a lo reportado en TAIR, <http://www.arabidopsis.org>. La clasificación se realizó de acuerdo a los cambios significativos de z-score ($-1.5 \geq z\text{-score} \geq 1.5$) en NP y P. Grupo I esta representado por los mRNAs disminuidos en P y aumentados en NP; Grupo II incluye a los mRNAs aumentados en P y disminuidos en NP.

VERIFICACIÓN DE LOS CAMBIOS EN TRADUCCIÓN DE mRNAs REGULADOS POR eIF(iso)4E POR PCR EN TIEMPO REAL

Una vez identificados los mRNAs candidatos a ser traducidos preferencialmente por eIF(iso)4E (Grupo I), y los candidatos a ser traducidos principalmente por eIF4E (Grupo II), se seleccionaron al azar algunos de ellos para cuantificar su expresión por PCR en tiempo real, y de esta manera comprobar que su traducción es alterada por la ausencia de eIF(iso)4E.

Los candidatos del Grupo I seleccionados fueron:

- At3g23430* Transportador de fosfatos (PHO1)
- At4g02950* Proteína de la familia Ubiquitina
- At4g20340* Factor de inicio de la transcripción (TFIIIE)
- At3g55580* Regulador del la condensación cromosomal (RCC1)
- At2g02860* Transportador de sacarosa 3 (SUC3)
- At2g30260* U2 Componente del complejo snRNP (U2B")
- At1g21630* Proteína de unión a calcio, con motivo EF
- At2g17630* Piridoxal fosfatasa (PLP) transferasa dependiente
- At1g78240* Factor del desarrollo de tumores en tallo 2 (TSD2)
- At5g15630* Cobra-like 4 (COBL4)
- At5g01840* Proteína de la familia Ovate 1 (OFP1)
- At1g64580* Proteína que contiene repeticiones de Pentatricopéptido (PPR)

Y los transcritos seleccionados del grupo II fueron:

- At2g27940* Proteína con caja RING/U
- At2g28600* P-loop hidrolasa que contiene nucleósidos trifosfatos
- At1g68670* Factor transcripcional de la familia MYB-like
- At4g06746* Factor transcripcional ERF/AP2 DREB de la subfamilia A-5 (*RAP2.9*)
- At3g57600* Factor transcripcional ERF/AP2 DREB de la subfamilia A-2 (*ERF/AP2*)
- At2g05710* Aconitasa (*ACO3*)
- At5g61430* Proteína con dominio NAC (*NAC5*)
- At1g6880* Factor de transcripción (*BRC2*)
- At4g18720* Factor de transcripción IIS
- At5g15850* Factor de transcripción, constans-like 1 (*COL1*)
- At4g33250* Factor eucariótico de inicio de la traducción 3K (*EIF3K*)

Se hizo el diseño de oligonucleótidos especiales para PCR en Tiempo Real y específicos para cada transcrito (Apendice 1). Cada par de oligonucleótidos se probó con cDNA sintetizado a partir de RNA total, RNA de fracciones polisomales y no polisomales, con y sin tratamiento con DNasa I y con los reactivos específicos para ensayos de PCR en tiempo real (SYBR® Green PCR Master Mix de Applied Biosystems). Únicamente se trabajó con los oligonucleótidos que amplificaron el fragmento deseado, sin contaminación ni dobletes (figura 14).

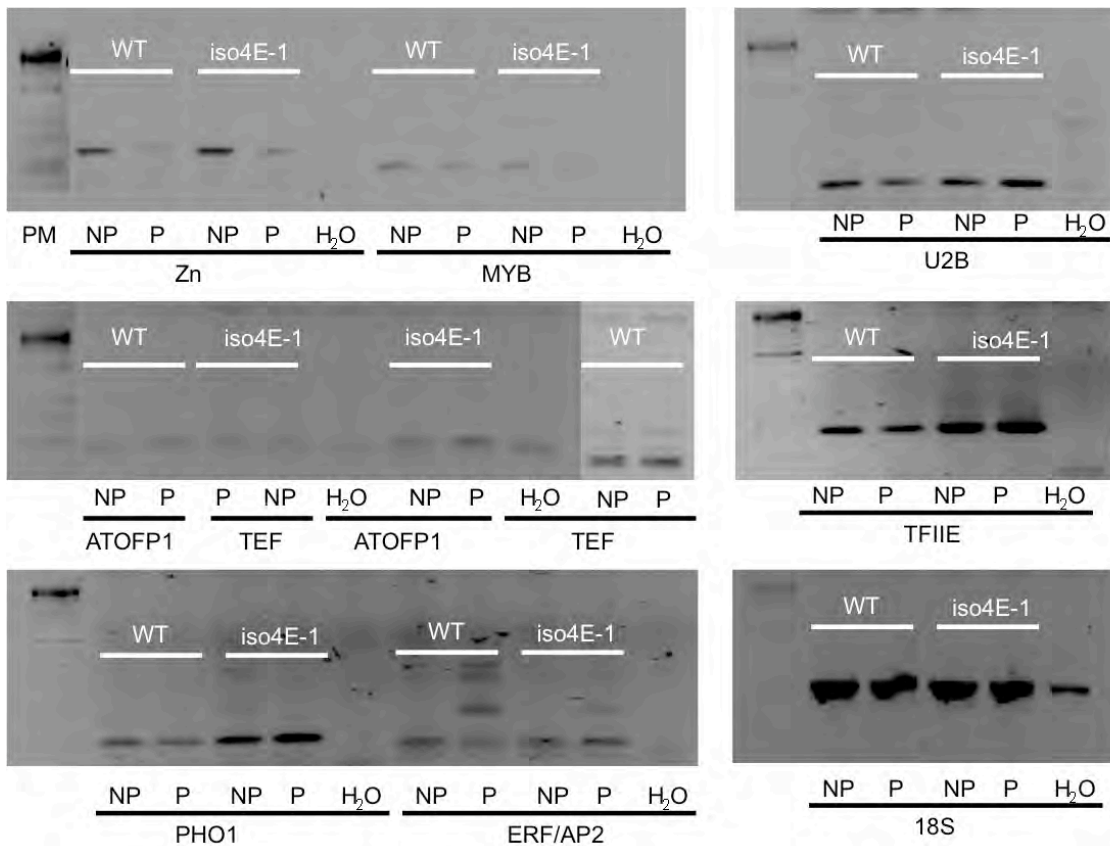


Figura 14. RT-PCR para probar los oligonucleótidos diseñados para PCR en Tiempo Real usando cDNA de las fracciones no polisomales (NP) y polisomales (P), de *A. thaliana* Wt y *AtelFiso4E-1*.

Una vez probados los oligonucleótidos, se realizaron los ensayos de PCR en tiempo real. Los resultados se muestran en la tabla 2, donde se comparan los datos de los microarreglos realizados a partir de RNA polisomal con los datos obtenidos por RT-

PCR en tiempo real (qRT-PCR), además se presentan los valores de cambio encontrados en los microarreglos de RNA total. Se puede observar, que de los 12 genes del Grupo I que analizamos por qRT-PCR, el transportador de fosfatos PHO1, fue el mRNA que mostró una disminución mayor, de 15.77 veces en las fracciones Polisomales, lo que lo hace un fuerte candidato a ser regulado a nivel traduccional por eIF(iso)4E. Otros genes como la proteína de la familia Ubiquitina (At4g02950), el factor de inicio de la transcripción (TFIIE) y el regulador de la condensación cromosomal (RCC1), también mostraron una importante disminución en P, lo que significa que cuando eIF(iso)4E está ausente, la traducción de este grupo de mensajeros disminuye significativamente, es decir, requieren del factor (iso)4E para su óptima traducción.

Por otro lado, de los transcritos del grupo II que analizamos por qRT-PCR, encontramos que At2g27940 fue el gen que presentó el mayor aumento en fracciones P, de 15.56 veces. También At2g28600 y el factor transcripcional de la familia MYB-like mostraron un importante aumento en fracciones P. Con estos resultados, comprobamos que estos mRNAs se traducen activamente en ausencia de eIF(iso)4E probablemente por la sobre-expresión de eIF4E en estas plantas mutantes.

Con los datos obtenidos de qRT-PCR corroboramos que existe un grupo importante de mRNAs que son regulados en su traducción por eIF(iso)4E.

De los 25 transcritos que analizamos por RT-PCR en tiempo real, el resultado de 3 de ellos no corresponde a lo encontrado en el análisis de microarreglos. Los 22 restantes mRNAs, muestran el mismo patrón de expresión reportado en los microarreglos, lo que nos indica que los datos de los microarreglos tienen un 88% de confiabilidad.

Tabla 2. Cuantificación de cambios en mRNAs específicos en plantas mutantes *AtELF(iso)4E-1* al ser comparados con *WT Col-0*.

Número Accession	Función / Nombre del Gen	Niveles relativos de mRNA ^a (microarreglos)			Niveles relativos de mRNA ^b (qRT-PCR)		Cambio
		T	NP	P	NP	P	
At3g23430	Transportador de fosfato (PHO1)	0.587	1.583	-2.324	1.866	-15.77	Disminución
At4g02950	Proteína de la familia Ubiquitina	-0.510	2.802	-2.159	-3.142	-6.783	Disminución
At4g20340	Factor de inicio de la transcripción (TFIIE)	1.152	2.952	-2.758	1.009	-6.210	Disminución
At3g55580	Regulador de la condensación cromosomal (RCC1)	0.646	2.510	-2.579	-2.633	-4.231	Disminución
At2g02860	Transportador de sacarosa (SUC3)	0.975	1.612	-1.94	2.214	-3.449	Disminución
At2g30260	U2 Componente del complejo snRNP (U2B ^{''})	0.276	2.542	-2.567	5.656	-2.928	Disminución
At1g21630	Proteína de unión a calcio con motivo EF	-0.640	3.550	-2.633	3.167	-1.530	Disminución
At2g17630	Piridoxal fosfatasa (PLP) transferasa dependiente	1.246	2.505	-2.157	2.816	-1.432	Disminución
At1g78240	Factor de desarrollo de tumores en tallo 2 (TSD2)	0.887	1.604	-1.550	1.547	-1.000	Disminución
At2g27940	Proteína con caja RING/U	-0.041	-1.980	1.811	-2.297	15.56	Aumento
At2g28600	P-loop hidrolasa que contiene nucleósidos trifosfatados	0.289	-2.087	1.827	-1.282	8.139	Aumento
At1g68670	Factor transcripcional de la familia MYB-like	0.553	-1.831	1.798	1.681	4.287	Aumento

Tabla 1. Continuación.

Número Accession	Función / Nombre del Gen	Niveles relativos de mRNA ^a (microarreglos)			Niveles relativos de mRNA ^b (qRT-PCR)		Cambio
At4g06746	Factor transcripcional ERF/AP2 DREB de la subfamilia A-5 (RAP2.9)	1.635	-1.785	2.075	-1.917	1.923	Aumento
At3g57600	Factor transcripcional ERF/AP2 DREB de la subfamilia A-2 (ERF/AP2)	n.d.	-2.521	1.680	-1.515	1.866	Aumento
At2g05710	Aconitasa (ACO3)	-1.951	-3.258	2.635	-13.32	1.762	Aumento
At5g61430	Proteína con dominio NAC (NAC5)	1.925	-1.841	2.314	-4.946	1.662	Aumento
At1g6880	Factor de transcripción (BRC2)	-0.697	-1.735	1.622	-11.62	1.469	Aumento
At4g18720	Factor de transcripción IIS	0.958	-2.673	3.161	-4.287	1.385	Aumento
At5g15850	Factor de transcripción, constans-like 1 (COL1)	n.d.	-2.044	1.716	-2.234	1.278	Aumento
At4g33250	Factor eucariótico de inicio de la traducción 3K (EIF3K)	n.d.	-1.787	2.587.	5.133	4.938	Aumento
At5g15630	Cobra-like4 (COBL4)	1.567	2.859	-1.642	6.190	1.350	n.c.
At5g01840	Proteína de la familia Ovate 1 (OFP1)	0.590	3.645	-2.832	2.303	5.105	n.c.
At1g64580	Proteína que contiene repeticiones de Pentatricopeptido (PPR)	0.865	1.578	-2.032	2.693	6.283	n.c.

^a Para la cuantificación por RT-PCR en tiempo real (qRT-PCR) fueron considerados mRNAs que presentaron cambios significantes ($p < 0.001$) en Polisomas (P) y no-polisomas (NP) con corte de ± 1.5 de z-score , pero sin cambios en los niveles de RNA total . La selección fue hecha al azar.

^b El qRT-PCR fue realizado con diferentes muestras biológicas de la misma edad que las utilizadas para los microarreglos (15 días de germinación). El resultado fue normalizado usando eIF4A como gen control, se muestran por separado las veces de cambio del nivel de expresión de los mRNAs en NP y P.

n.d.: No detectados

n.c.: No hay coincidencia entre los resultados de microarreglos y qRT-PCR.

EFFECTO DE LA SOBRE-EXPRESIÓN DE eIF(iso)4E EN LA DISTRIBUCIÓN DE LOS mRNAs SELECCIONADOS.

Para conocer si la sobre-expresión de eIF(iso)4E es capaz de causar el efecto contrario en la distribución polirribosomal de los mRNAs estudiados en la tabla 2, se hicieron ensayos de qRT-PCR usando RNA extraído de plántulas de 15 días de germinación de las líneas Wt, *AteIF(iso)4E-1* y *AteIF(iso)4E-2* que pasaron por gradientes de sacarosa (figura 15).

Los mRNAs seleccionados para este ensayo fueron del Grupo I el transportador de fosfatos *PHO1* y el componente de complejo U2 snRNP (*U2B*"), y del Grupo II el factor de transcripción *ERF/AP* y *At4g18720*. Los mRNAs correspondientes al transportador de fosfatos *PHO1* y al componente de complejo U2 snRNP (*U2B*") son candidatos a ser traducidos preferencialmente por eIF(iso)4E, ya que en plantas *AteIF(iso)4E-1* disminuye su expresión en fracciones traduccionalmente activas (P, barras blancas). De manera contraria, se observó en plantas *AteIF(iso)4E-2*, que la expresión de estos transcritos aumenta en estas fracciones, es decir, la sobre-expresión de eIF(iso)4E recupera sus niveles de traducción, y en el caso de *PHO1*, se observaron niveles mayores a los observados en plántulas Wt (Figura 16 A). Lo anterior confirma que los niveles de eIF(iso)4E tienen un efecto directo en la óptima traducción de *PHO1*, ya que cuando este factor esta ausente disminuye su traducción y al encontrarse sobre-expresado la estimula.

En ausencia de eIF(iso)4E, se estimuló la traducción de otros mensajeros como el del factor de transcripción *ERF/AP* y *At4g18720*. En plantas que sobre-expresan al factor *AteIF(iso)4E-2*, la expresión de *At4g18720* tiene un ligero aumento en fracciones no polisomales (barras negras), mientras que *ERF/AP1* no muestra ningún cambio significativo al compararlas con la línea Wt. Lo anterior indica que estos dos mRNAs no están siendo regulados a nivel traduccional por la presencia de eIF(iso)4E, lo que sugiere que la sobre-expresión de eIF4E, pudiera ser la responsable de la alteración en sus niveles de traducción (Figura 16 B).

Los transcritos eIF4A (factor de inicio de la traducción 4A) y eEF-1 α (factor de elongación 1 α) fueron usados como control, debido a que su expresión no se altera en función de los niveles de eIF(iso)4E (Figura 16 C).

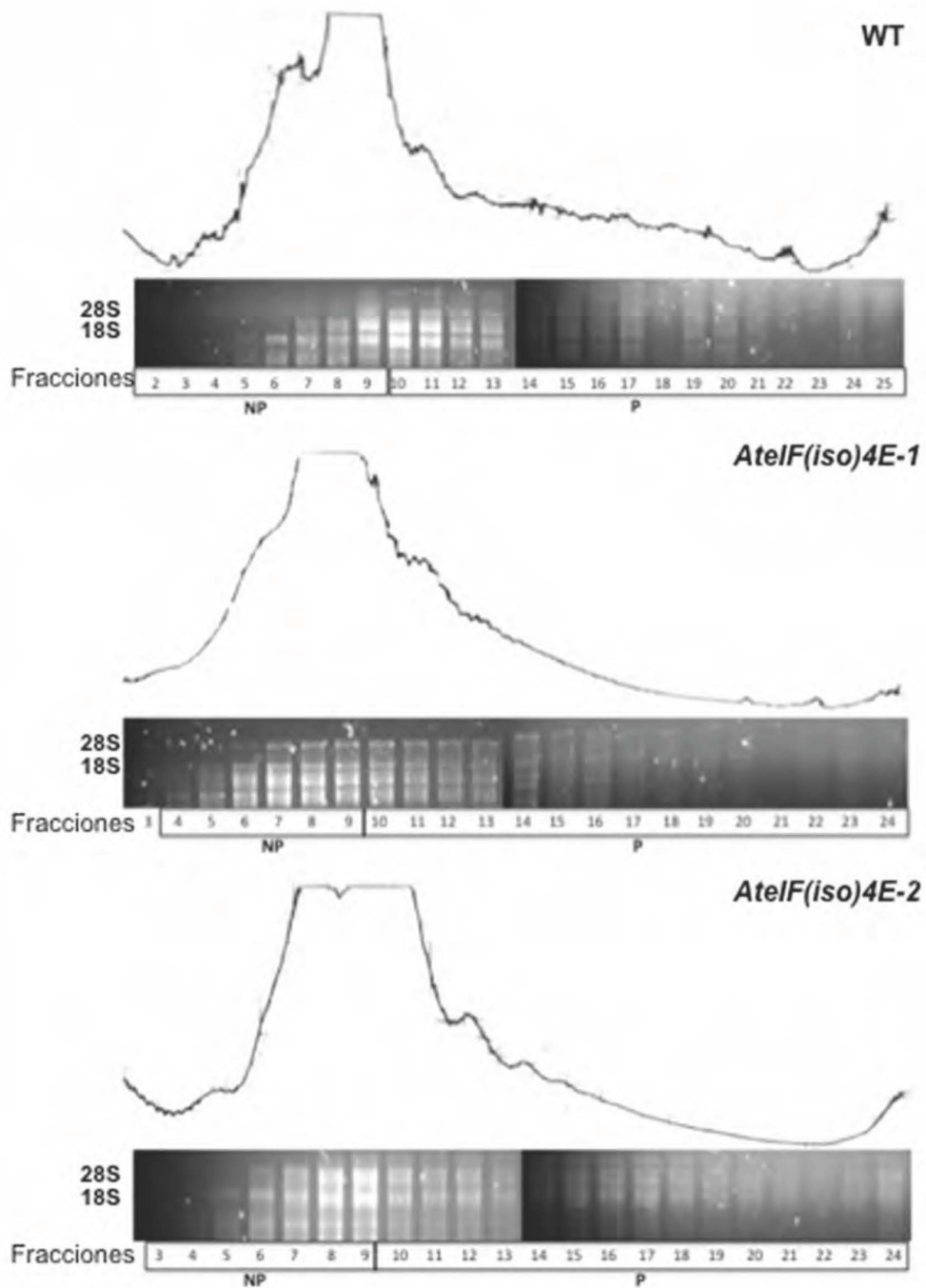


Figura 15. Perfiles polisomales y extracción de RNA polisomal de las fracciones obtenidas del gradiente de sacarosa en gel desnaturizante de agarosa. Extractos de plántulas de dos semanas de germinación.

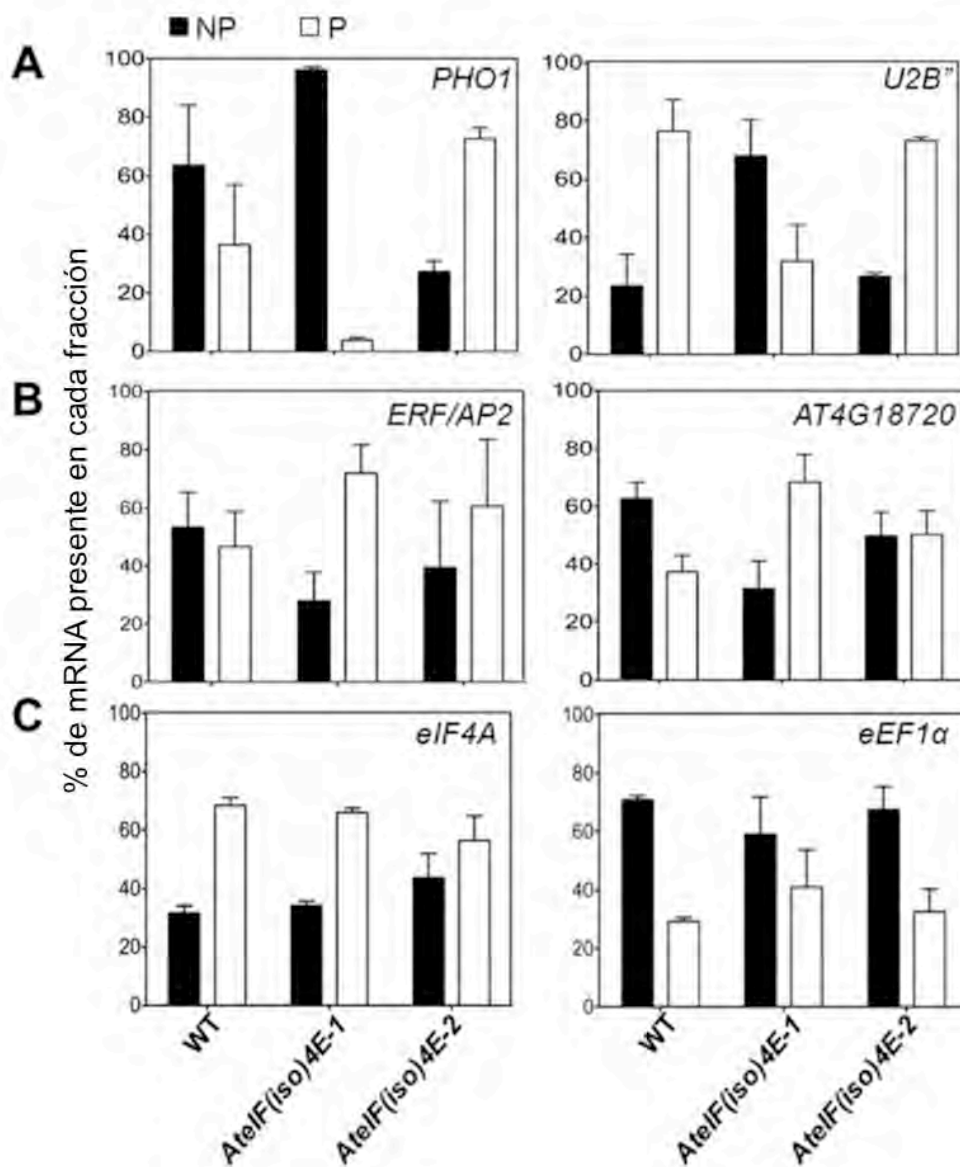


Figura 16. mRNAs específicos muestran reclutamiento preferencial a polisomas dependiendo de los niveles de eIF(iso)4E. **A.** Los mRNAs del Grupo I se movilizan a polisomas en plantas que sobre-expresan eIF(iso)4E. PHO1 y U2B'' disminuyen su expresión en polisomas en ausencia de eIF(iso)4E y PHO1 aumenta en polisomas por arriba del nivel observado en Wt en plantas AtelF(iso)4E-2. **B.** Los mRNAs del Grupo II se acumulan en polisomas en ausencia de eIF(iso)4E. El factor de transcripción ERF/AP2 y At4g18720 se movilizan a polisomas en AtelF(iso)4E-1 pero en AtelF(iso)4E-2 permanecen en niveles similares a Wt. **C.** El factor de traducción eIF4A y eEF1α presentan una distribución polisomal similar en las tres líneas de *A. thaliana* usadas en este estudio, lo que indica que su traducción no depende de los niveles de eIF(iso)4E. Los datos representan el promedio de tres replicas independientes y las barras indican el error estándar.

***AteIF(iso)4E* REGULA LA ASOCIACIÓN A POLISOMAS DEL mRNA *PHO1* EN CONDICIONES NORMALES**

PHO1 es un transportador requerido en deficiencia de fosfato en *A. thaliana*. El transporte de fosfato inorgánico (Pi) en plantas, es un proceso dinámico que ocurre a través de las membranas, entre células y tejidos, así como entre organelos. Una vez importado el fosfato dentro de la epidermis o a las células corticales de la raíz, este debe ser exportado a las vesículas del xilema de la raíz para ser transferido al tallo donde es importado a las células de las hojas. En deficiencia de fosfato, el Pi es redistribuido desde los tejidos viejos, hacia las hojas jóvenes, y es exportado fuera de la vacuola para mantener relativamente estable la concentración de Pi en el citoplasma. La deficiencia de fosfato aumenta la capacidad de importarlo a través de las células aumentando el nivel de expresión de los transportadores como *PHO1*. La mutante *pho1* en *Arabidopsis* es deficiente en llevar Pi de la raíz a los canales del xilema, resultando en una fuerte deficiencia de fosfatos en todos los tejidos. *PHO1* se expresa principalmente en raíz, en células de la estela (incluyendo el periciclo y células de parenquima) y en la parte baja del hipocotilo (Hamburger *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2004; Stefanovic *et al.*, 2007).

Anteriormente pudimos comprobar que el desplazamiento de *PHO1* en el perfil polisomal se modifica al alterar los niveles de eIF(iso)4E. Lo anterior nos hace hipotetizar que eIF(iso)4E pudiera tener un papel importante en la respuesta a el estrés por deficiencia de fosfato por lo tanto, se analizó la expresión de *PHO1* en plántulas Wt y en las líneas transgénicas *AteIF(iso)4E-1* y *AteIF(iso)4E-2* que se germinaron por 15 días en condiciones normales y después fueron transferidas a medio sin fosfatos (-Pi) o a medio control (+Pi) por 10 días. Se determinaron los niveles del transcrito de *PHO1* por PCR semi-cuantitativo en las tres líneas de plantas crecidas en condiciones normales y en deficiencia de fosfato (figura 17). Como esperábamos, las plantas Wt son sensibles al estrés impuesto y responden incrementando los niveles del mRNA de *PHO1*. De manera interesante, la línea mutante *AteIF(iso)4E-1* y la sobre-expresora *AteIF(iso)4E-2* mostraron ligeramente un mayor incremento en el transcrito *PHO1*, lo que indica que son más sensibles en el aumento transcripcional de *PHO1* por la deficiencia de fosfato que las plantas Wt.

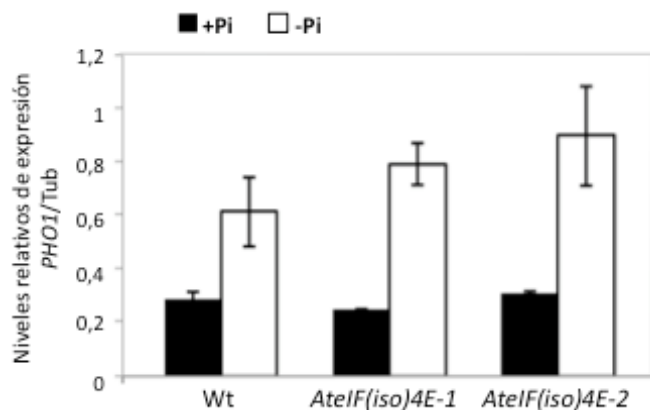


Figura 17. Los niveles del transcrito de *PHO1* se incrementan al someter a las plántulas a un estrés por deficiencia de fosfato durante 10 días. Se observa un mayor incremento en las líneas mutantes *AtelF(iso)4E-1* y *AtelF(iso)4E-2*. Tubulina se uso como control de carga para normalizar los datos.

Analizamos el comportamiento traduccional del transcrito de *PHO1* en plántulas crecidas en condiciones de bajo fosfato (-Pi) o en condiciones normales de fosfato (+Pi) por RT-PCR cuantitativo (PCR en tiempo real) usando RNA extraído de fracciones no polisomales y polisomales obtenidas de gradientes de sacarosa (figura 18).

En concordancia con nuestras observaciones previas, *PHO1* se acumula principalmente (95%) en fracciones NP en plantas mutantes *AtelF(iso)4E-1* crecidas en concentraciones normales de fosfato. (Figura 19A, barras blancas), mientras que en plantas Wt, *PHO1* se distribuye casi igual en fracciones NP y P. De manera opuesta a lo observado en *AtelF(iso)4E-1*, en plantas *AtelF(iso)4E-2* el 65% de *PHO1* se encuentra en fracciones P. En deficiencia de fosfato, la acumulación de *PHO1* en fracciones NP en plantas *AtelF(iso)4E-1* se abate, presentando bajo esta condición, una distribución similar en fracciones NP y P. Por otro lado, la línea *AtelF(iso)4E-2* que sobre-expresa a eIF(iso)4E, muestra un ligero aumento en la distribución polisomal de *PHO1* bajo condiciones de estrés.

Es interesante observar como en deficiencia de fosfato (-Pi) la traducción del transcrito *PHO1* no es estimulada significativamente (Figura 19A, barras negras), contrario a lo que se observa a nivel transcripcional donde hay una importante acumulación del transcrito *PHO1*. Esto sugiere que la selectividad de eIF(iso)4E para traducir a *PHO1* no ocurre bajo estrés, probablemente porque durante el estrés, se está llevando a

cabo una regulación dependiente de otro factor 4E o una regulación cap-
independiente.

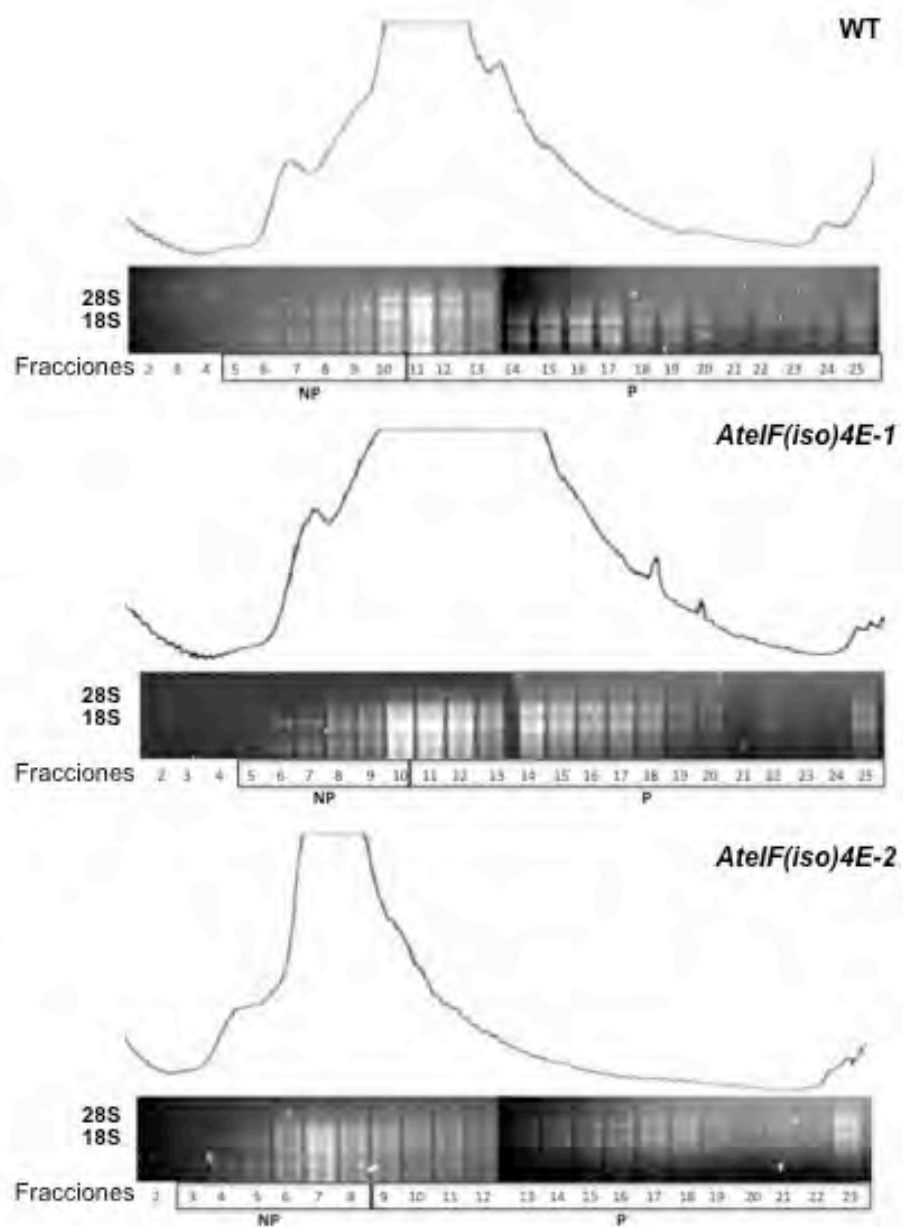


Figura 18. Perfiles polisomales de plántulas sometidas a deficiencia de fosfato y extracción de RNA polisomal de las fracciones obtenidas del gradiente de sacarosa en gel desnaturalizante de agarosa. Las plántulas fueron crecidas 15 días en medio Gamborg's B5 y después transplantadas a medio sin fosfato (-Pi) durante 10 días.

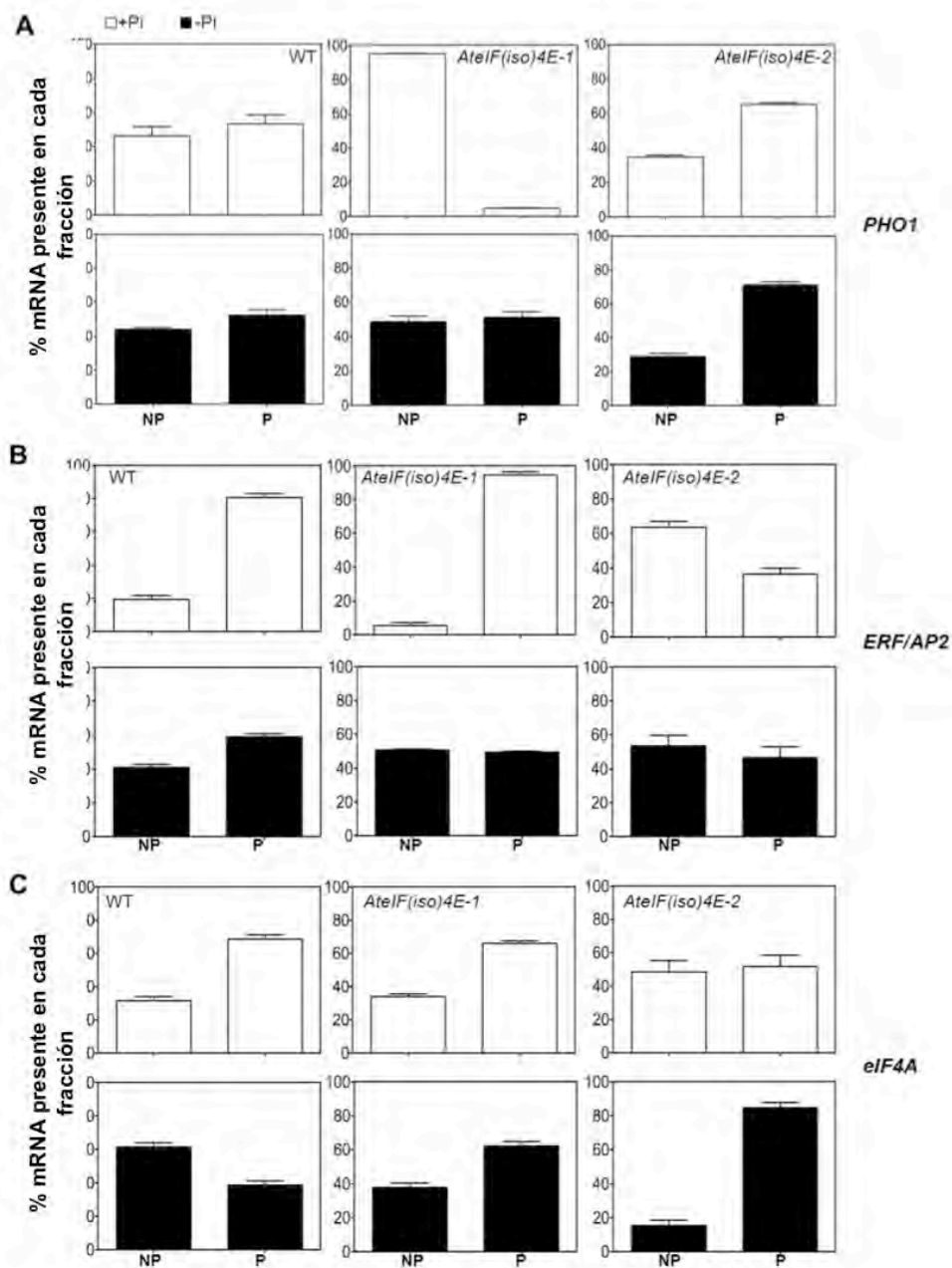


Figura 19. La distribución polisomal de PHO1 depende de los niveles de eIF(iso)4E en condiciones normales, pero no bajo deficiencia de fósforo. Plántulas de *A. thaliana* Wt, *AtelF(iso)4E-1* y *AtelF(iso)4E-2*, de 15 días transplantadas a medios con fósforo (+Pi) y sin fósforo (-Pi) y crecidas durante 10 días. **A.** Análisis de la distribución polisomal de PHO1. **B.** Distribución polisomal de ERF/AP2 y **C.** Distribución polisomal de eIF4A usado como control. Los datos mostrados representan el promedio de tres replicas con barras que indican el error estándar.

Paralelamente a PHO1 se analizaron los cambios en la distribución polisomal en deficiencia de fosfato de otros dos mRNAs, *ERF/AP2* y *eIF4A* como control. (figuras 19B y C). En la línea *AteIF(iso)4E-2*, bajo condiciones normales *ERF/AP2* se acumula principalmente en fracciones NP, mientras que *eIF4A* no presenta cambios al modificarse los niveles de eIF(iso)4E. Cuando se someten las plantas Wt a deficiencia de fosfato, los transcritos *ERF/AP2* y *eIF4A* se movilizan a fracciones NP. Este desplazamiento no se altera para el mRNA *ERF/AP2* en las líneas *AteIF(iso)4E-1* y *AteIF(iso)4E-2*. Sin embargo, el transcrito *eIF4A*, que normalmente no se ve afectado en su distribución polisomal por los niveles de eIF(iso)4E, se moviliza hacia polisomas en las dos líneas de plantas mutantes bajo condiciones de estrés.

eIF(iso)4E ALTERA LOS NIVELES DE PROTEÍNA DE *PHO1*

Se analizaron los niveles de proteína de *PHO1* por western blot en plantas mutantes en eIF(iso)4E y Wt bajo condiciones normales (+Pi) y en deficiencia de fosfato (-Pi). Dado que *PHO1* se expresa principalmente en raíces, para estos experimentos las plántulas fueron separadas en parte aérea y raíz, se extrajo proteína total y se usaron 30 µg de proteína de cada tejido para el experimento. Se detectó la proteína de *PHO1* en raíces de plantas silvestres y mutantes *AteIF(iso)4E-2* en deficiencia de fosfato, pero no en raíces de *AteIF(iso)4E-1* (figura 20). En la parte aérea no se detectó la proteína de *PHO1* en ninguna línea, lo que concuerda con lo reportado previamente para el mismo anticuerpo (Stefanovic *et al.*, 2011). Las raíces que sobre-expresan el factor eIF(iso)4E muestran mayor acumulación de *PHO1* que las Wt bajo deficiencia de fosfato. Sin embargo, en raíces *AteIF(iso)4E-1* la proteína *PHO1* no fue detectada. Bajo condiciones normales de crecimiento (+Pi) los niveles de *PHO1* son menores a la sensibilidad del anticuerpo incluso para la mutante *AteIF(iso)4E-2*. De estos resultados y los obtenidos de la distribución polisomal por qRT-PCR, podemos concluir que eIF(iso)4E es requerido para la traducción selectiva del mRNA de *PHO1* bajo condiciones normales de crecimiento .en *A. thaliana*.

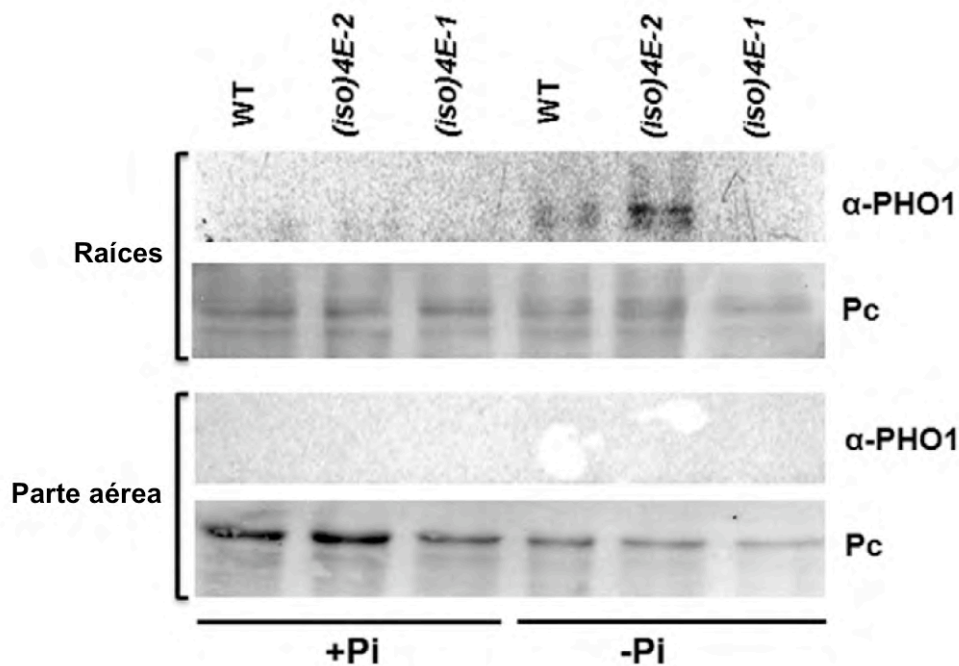


Figura 20. Análisis por Western blot de los niveles de la proteína PHO1 en plántulas crecidas en condiciones normales (+Pi) o en deficiencia de fosfato (-Pi). Plántulas Wt, *AtelF(iso)4E-1* y *AtelF(iso)4E-2* de una semana fueron transferidas a medio líquido con 1 μ M (-Pi) o 10 mM (+Pi) de fosfato y crecidas durante una semana más, la raíces fueron cuidadosamente separadas de la parte aérea de la planta para la extracción de proteína total. Únicamente se detectó la banda correspondiente a PHO1 en raíces de plántulas Wt y *AtelF(iso)4E-2* en deficiencia de fosfato. Como control de carga se muestra la membrana de cada tejido teñida con rojo de Ponceau en el panel inferior (Pc).

CARACTERIZACIÓN DE PLANTAS MUTANTES

Aunque la mutante *AtelF(iso)4E-1*, ya ha sido caracterizada durante el desarrollo por Duprat (2002), quien describió que no hay alteraciones fenotípicas apreciables, decidimos hacer una búsqueda de fenotipo más profunda, por lo que se realizó un análisis detallado del desarrollo de plantas mutantes en condiciones normales y bajo diferentes tipos de estrés. Se probaron diferentes tipos de estrés, como sequía, estrés hídrico y estrés por temperaturas (4° C, 38° C y 45° C). En ningún caso se observaron diferencias significativas entre plantas Wt y plantas mutantes. Además se estudió el efecto de sacarosa y ácido abscísico (ABA) en la germinación y de ABA en plántulas

de dos semanas con y sin sacarosa, tampoco en estos casos encontramos diferencias significativas al comparar las plantas mutantes con las silvestres.

Debido a que un importante porcentaje de transcritos afectados traduccionalmente por ausencia de eIF(iso)4E (figura 13) se expresan preferencialmente en raíz, se realizó un análisis detallado de su desarrollo en plantas mutantes en condiciones normales y bajo diferentes tipos de estrés. Al estudiar el fenotipo bajo condiciones normales, se observó una diferencia en el desarrollo de la raíz principal, las plantas mutantes *AteIF(iso)4E-1* presentaron una raíz principal más larga. Al realizar un análisis más detallado de la fisiología de las plantas mutantes en condiciones normales de desarrollo, se encontró que las raíces de las plantas *AteIF(iso)4E-1* presentan un mayor número de raíces laterales que las silvestres. Este incremento, se correlacionó con un aumento en biomasa, al observar que el peso de la raíz de plantas mutantes nulas es mayor que el de plantas silvestres (figura 21A). Se germinaron semillas *AteIF(iso)4E-1* en medio Hoagland, y se monitoreo el crecimiento de la raíz principal, se encontró que a partir del día 10 post germinación, la raíz de las plantas mutantes comienza a crecer más, y después del día 15, alcanzan una diferencia significativa de aproximadamente un centímetro más en comparación con las plántulas silvestres (figura 21B).

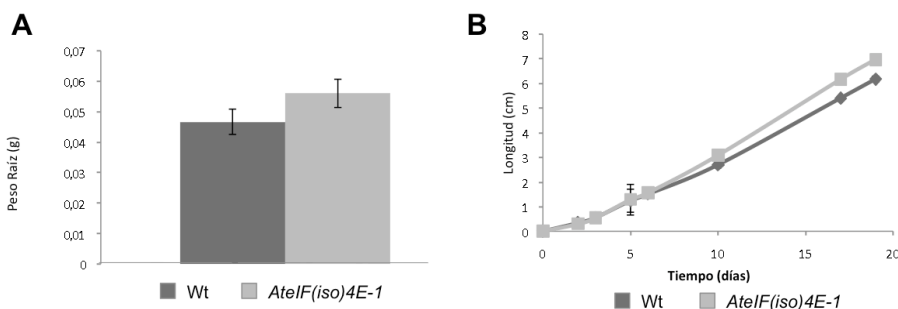


Figura 21. Caracterización del desarrollo de raíz de plantas carentes del factor eIF(iso)4E. **A** Comparación de biomasa de raíces de plántulas silvestres y *AteIF(iso)4E-1*, germinadas durante un mes en medio líquido **B**. Desarrollo de raíz principal de plantas silvestres vs *AteIF(iso)4E-1*.

Dado que la mutante *AteIF(iso)4E-1* presenta una sobre-expresión del factor eIF4E, es necesario confirmar que los cambios en el fenotipo observados en raíz se deben a la ausencia de eIF(iso)4E y no a la sobre-expresión de eIF4E. Para ello, analizamos el desarrollo de la raíz en las mismas condiciones y tiempos en plantas *AteIF(iso)4E-2* y se comparó con lo observado en plantas Wt y *AteIF(iso)4E-1*. Se observó que al sobre-expresar al factor eIF(iso)4E, el desarrollo de raíz principal es menor que el observado en plantas silvestres (Wt) (figura 22). Además, este mismo análisis se realizó en otras líneas sobre-expresoras, *AteIF(iso)4E-3* y *-4*, que contienen la inserción para sobre-expresar a eIF(iso)4E, todas estas líneas presentaron raíces principales cortas. Lo anterior confirma que el fenotipo encontrado, de mayor crecimiento de raíz principal, se debe a la ausencia de eIF(iso)4E ya que al sobre-expresarlo se observó el efecto contrario.

Como *PHO1* es uno de los transcritos que se encuentra reprimido en las fracciones traduccionalmente activas y es un gen que juega un papel crucial en la toma de fosfato inorgánico (Pi) por la raíz, resulta interesante estudiar el efecto de la deficiencia de fosfato en el desarrollo de raíz de nuestras líneas en estudio. Por lo tanto, se realizó un ensayo comparativo del desarrollo de la raíz principal de plantas Wt vs *AteIF(iso)4E-1* vs *AteIF(iso)4E-2*, en presencia y ausencia de fosfato (figura 23). El ensayo consistió en transplantar plántulas germinadas durante dos semanas en un medio Gamborg's B5, a medio Hoagland +Pi (control) y medio Hoagland -Pi y finalmente se midió la longitud de la raíz principal. Se observó que al someter a las plantas mutantes a un déficit de fosfato, la raíz principal de éstas, alcanza una longitud similar o menor que la presentada por las raíces de plantas silvestres, es decir, el fenotipo observado bajo condiciones normales desaparece (figura 23).

Con la finalidad de comprobar que la pérdida de fenotipo en longitud de raíz principal se debe al efecto del fosfato, se repitió el ensayo probando el efecto de la deficiencia de otros nutrimentos como nitrógeno, azufre y hierro. Este consistió en germinar semillas silvestres y mutantes en medio Gamborg's B5 por 15 días y después se transplantaron a diferentes medios, se emplearon medios Hoagland sin nitrógeno (-N), hierro (-Fe) y azufre (-S). Después de 10 días, se midió la longitud de la raíz principal y se compararon con los datos obtenidos del control (todos los nutrientes) y sin fosfato (-Pi). En todos los casos la raíz de las plantas mutantes *AteIF(iso)4E-1* fue aproximadamente 1 cm más grande que la raíz principal de las silvestres, de manera similar al control (figura 24).

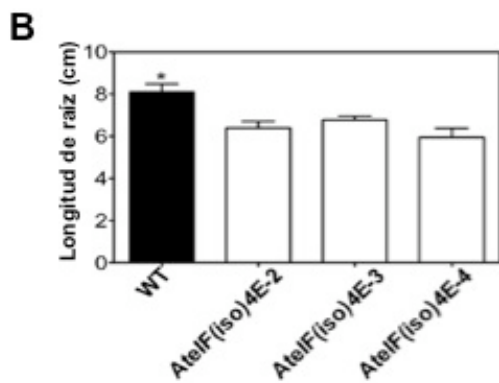
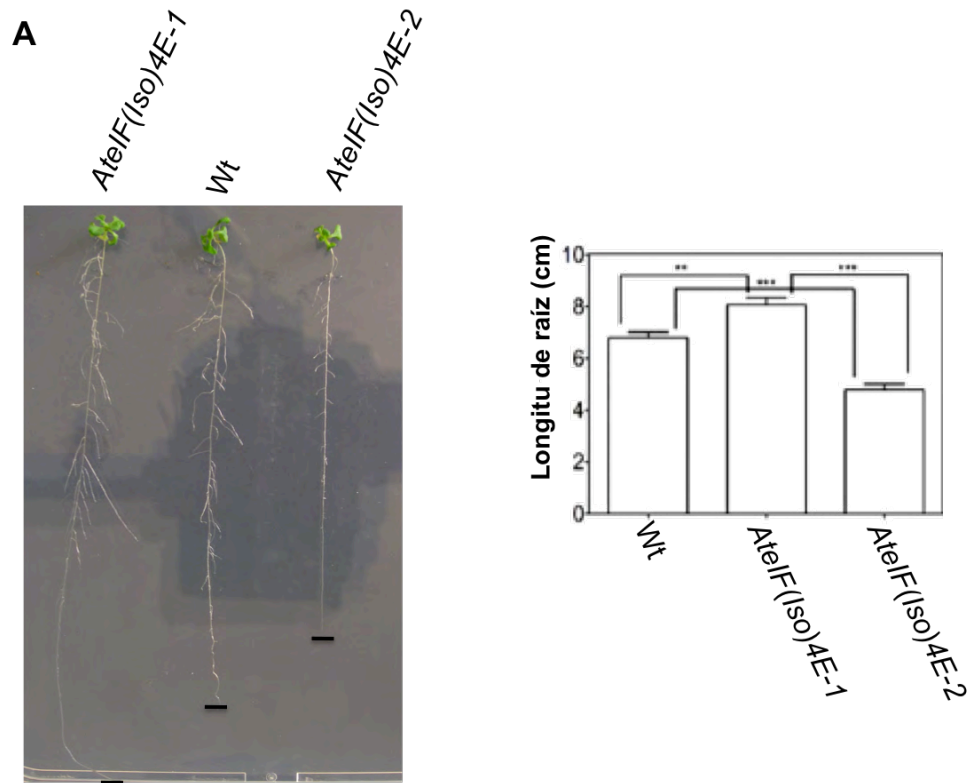


Figura 22. El factor *eIF(iso)4E* tiene efecto negativo en el desarrollo de raíz principal en *A. thaliana*. **A.** En condiciones normales de crecimiento, la raíz de plantas *AtelF(iso)4E-1* es más larga que la *Wt* y cuando *eIF(iso)4E* esta sobre expresado, la longitud de la raíz disminuye significativamente en comparación con *Wt*. **B.** Las tres líneas independientes que sobre-expresan a *eIF(iso)4E* muestran reducción significativa en la longitud de la raíz principal.

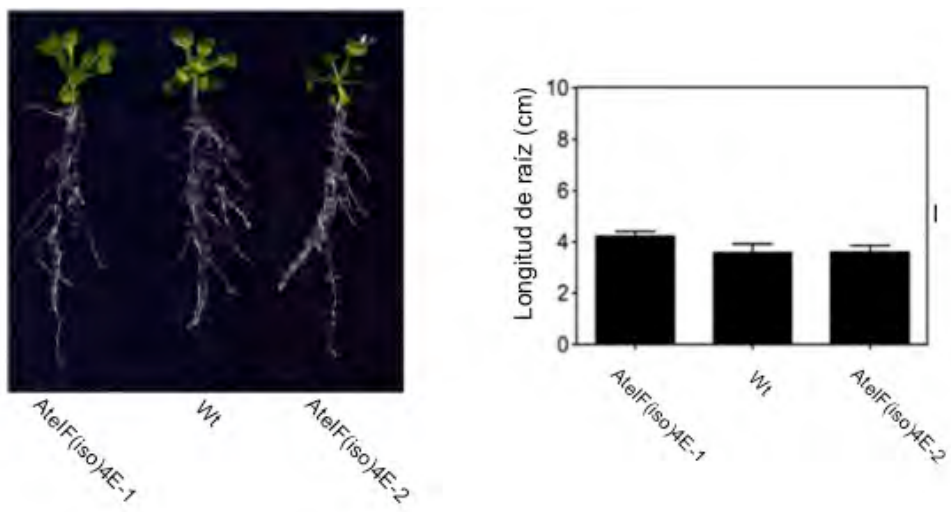


Figura 23. La deficiencia de fosfato revierte el fenotipo observado en longitud de raíz en las dos líneas de *A. thaliana*.

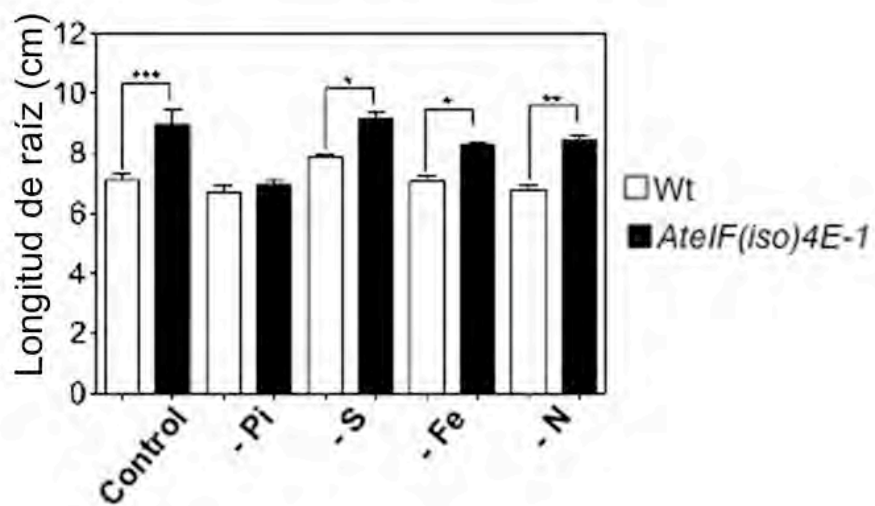


Figura 24. Efecto de la deficiencia de nutrientes en el desarrollo de raíz principal de plántulas silvestres y mutantes nulas *AtelF(iso)4E-1*.

BÚSQUEDA DE CARACTERÍSTICAS COMUNES ENTRE LOS mRNAs PARA DILUCIDAR SU MECANISMO DE REGULACIÓN.

Aunque muchas características de un mRNA pueden contribuir a su traducción, la mayoría de los elementos de control traduccional se encuentran dentro de las estructuras 5' y 3' UTRs. Por esta razón se hizo un análisis de los UTRs de los transcritos candidatos a ser traducidos preferencialmente por eIF(iso)4E y por eIF4E. En cuanto a las regiones 5'-UTRs de los mRNAs traducidos preferencialmente por eIF(iso)4E, se encontró que la gran mayoría son secuencias cortas (menos de 100 pb) y poco estructuradas. Además, pocas de estas secuencias contienen dominios conocidos como IRES y uORF. En cuanto a las estructuras 3'UTR solo una tiene CPE (Cyttoplasmic Polyadenylation Element) y la mayoría son menores a 200 pb. En contraste, las regiones 5'-UTR de los mRNAs cuya traducción se favoreció por la ausencia de eIF(iso)4E y la sobre-expresión de eIF4E son secuencias principalmente grandes (mayores a 100 pb) y altamente estructuradas, lo que coincide con lo reportado previamente en la literatura (tabla 3). En busca de un motivo común entre los mRNAs cuya traducción se ve afectada por la ausencia de eIF(iso)4E, con ayuda del programa UTR scan (www.ba.itb.cnr.it/BIG/UTRScan), se alinearon las regiones 3'UTRs. Se encontró a las secuencias **TTGTTTTG** y **TGTTGG** como posibles cajas comunes para los mensajeros traducidos preferencialmente por eIF(iso)4E. Sin embargo, la relevancia de estas cajas en la traducción selectiva por eIF(iso)4E debe ser comprobada experimentalmente.

Tabla 3. Análisis de las secuencias 5' UTR y 3' UTR de los mensajeros candidatos.

	Transcritos candidatos que requieren eIF(iso)4E	Transcritos candidatos que requieren eIF4E
<u>5' UTR</u> mayores a 100 bp	33 %	47 %
<u>5' UTR</u> menores de 100 bp	67 %	53 %
Estructura secundaria ($\Delta G < -20$)	25 %	47 %
uAUG	6	4
uORF	5	4
IRES	4	4
<u>3' UTR</u> mayores de 100 bp	89 %	87 %
<u>3' UTR</u> menores de 100 bp	11 %	16 %
CPE	1	0
Hexanucleotido (AAUAAA)	6	5

DISCUSION

En organismos eucariontes, incluyendo plantas, es común la presencia de múltiples miembros de la familia eIF4E. En *A. thaliana*, dos proteínas diferentes eIF4E y eIF(iso)4E, participan en el inicio de la traducción cap-dependiente de mRNAs y se desconocía si ambos factores tienen una función redundante o especializada. En este trabajo, analizamos la relevancia fisiológica de eIF(iso)4E usando dos líneas transgénicas de *Arabidopsis*, una con expresión nula de la proteína por la inserción de un transposón en el segundo exón del gen, y la otra, que expresa a la proteína de fusión eIF(iso)4E-GFP bajo el promotor constitutivo 35S en un fondo silvestre. La mutante nula, *AtelF(iso)4E-1* fue caracterizada previamente (Duprat et al., 2002) y no se observó ningún fenotipo evidente, aunque se reportó que los niveles de la proteína eIF4E aumentaba su nivel en esta mutante, sugiriendo que podría estar cumpliendo las funciones de eIF(iso)4E y de esta manera compensar su ausencia. Mediante el análisis de fracciones No Polisomales (NP), Polisomales (P) y RNA total, usando microarreglos de DNA y qRT-PCR, identificamos mRNAs que se traducen diferencialmente en la mutante *AtelF(iso)4E-1*. Específicamente, encontramos 79 transcritos que disminuyen sus niveles en fracciones P acompañado de un aumento en fracciones NP (Grupo I) y 47 transcritos que aumentaron en P y disminuyeron simultáneamente en NP (Grupo II), los transcritos de ambos grupos no presentaron cambios en sus niveles de RNA total, lo cual comprobamos al analizar los microarreglos de DNA realizados a partir de RNA total, lo que nos asegura que los cambios observados en los niveles de expresión de estos mRNAs se deben a un efecto traduccional y no transcripcional ocasionado por la ausencia del factor eIF(iso)4E. Mediante un análisis cuantitativo de RT-PCR en tiempo real (qRT-PCR) realizado a algunos de estos genes comprobamos los cambios en los niveles de transcrito presentes en cada fracción (tabla 2), así, verificamos la confiabilidad de los datos arrojados por los microarreglos, que fue del 88%. El hecho de que algunos genes presenten una traducción deficiente en plantas carentes de eIF(iso)4E, indican que la presencia de este factor es requerida para que se lleve a cabo la eficiente traducción de estos mRNAs. Por otra parte, encontramos algunos mRNAs que se concentran en fracciones polisomales en ausencia de eIF(iso)4E, esto sugiere que su traducción depende en gran medida de eIF4E, ya que al estar sobre-expresado en la mutante *AtelF(iso)4E-1* puede tener un impacto positivo sobre la traducción de estos mensajeros, lo cual explica su traducción favorecida.

Es de interés notar que en la mutante *AtelF(iso)4E-1*, la mayoría de los mRNAs afectados traduccionalmente, se expresan en raíz y son proteínas del sistema endomembranoso, mientras que los que mejoran su nivel traduccional, se expresan principalmente en inflorescencia y tienen actividad de factores de transcripción. Lo anterior correlaciona con lo reportado anteriormente en ***AtProteome***, (<http://www.arabidopsis.org/>); que la proteína eIF(iso)4E se expresa principalmente en raíces jóvenes, mientras que eIF4E es ubicuamente distribuido. Dos candidatos a ser traducidos preferencialmente por eIF(iso)4E, *PHO1* y *U2B*”, ambos del Grupo I, muestran un aumento en su traducción en la mutante sobre-expresora *AtelF(iso)4E-2*, mientras que la traducción de *ERF/AP2* y *At4g18720* que aumenta en ausencia de eIF(iso)4E (Grupo II), no se ve afectada en fracciones polisomales de mutantes *AtelF(iso)4E-2*. Estos resultados apoyan nuestra hipótesis de que algunos mRNAs pueden ser particularmente sensibles a los niveles de eIF(iso)4E cuando tienen que competir con otros transcritos para su traducción, y este es precisamente el caso de los transcritos del Grupo I, entre los que se encuentra *PHO1*, cuya traducción disminuye en ausencia de eIF(iso)4E y aumenta cuando este factor se encuentra sobre-expresado.

Como se ha reportado en *C. elegans* y en *Drosophila melanogaster*, la localización particular de la proteína de cada miembro de la familia 4E a nivel de tejido y/o subcelular puede ser importante para la traducción preferencial de mRNAs. Dado que la mayoría de genes afectados por la ausencia de eIF(iso)4E se expresan en raíz y que cuando se reportó la mutante *AtelF(iso)4E-1* no se incluyó este tejido, decidimos hacer un análisis más detallado de la morfología y desarrollo de dicha estructura en plántulas de *A. thaliana*. En este trabajo encontramos datos consistentes y estadísticamente significativos que demuestran que la longitud de la raíz principal de las mutantes nulas es mayor que la de las plántulas Wt. Además, las tres líneas independientes que sobre-expresan a eIF(iso)4E-GFP bajo el promotor constitutivo 35S, presentan el fenotipo opuesto, raíces primarias significativamente más cortas, lo anterior nos brinda evidencia de que eIF(iso)4E pudiera tener un papel fisiológico en el desarrollo de raíz directamente o como consecuencia de la alteración en los niveles traduccionales de otros genes. Al buscar genes involucrados en la elongación de raíz dentro del grupo de genes alterados en su distribución polisomal obtenidos del análisis de microarreglos, encontramos del Grupo I transcritos como el transportador de fosfatos *PHO1*; la proteína *At4g08455* que contiene el dominio BTB/POZ; la Extensina 3 (*EXT3*) que además de expresarse fuertemente en raíz, como todos los transcritos de las extensinas en *Arabidopsis*, se detecta en la parte baja del tallo y en botones

florales. Su expresión no solo se regula durante el desarrollo, también pueden ser inducida por varios tipos de estrés; ATPAP/PAP5 (purple acid phosphatase 5), un gen regulado por Pi, lo que sugiere un papel en la adquisición de fosfato por la hidrólisis de ésteres como el fitato; entre otros; así como otros transcritos pertenecientes al Grupo II cuya traducción favorecida pudieran estar contribuyendo al fenotipo observado bajo condiciones normales de desarrollo.

PHO1, un transcrito que se encuentra reprimido en las fracciones traduccionalmente activas, resultó de particular interés en nuestro estudio. Es un gen que juega un papel crucial en la toma de fosfato inorgánico (Pi) a la raíz, tiene un extremo N terminal hidrofílico y un extremo C-terminal que contiene al menos seis dominios transmembranales y se expresa principalmente en células de raíz. *PHO1* es regulado por la concentración de Pi presente en el medio, aumentando su expresión en deficiencia de fosfato, favoreciendo el transporte de fosfato a la raíz. El cambio en el perfil traduccional de *PHO1* observado en la mutante nula *AteIF(iso)4E-1* nos hizo pensar que probablemente eIF(iso)4E es particularmente requerido durante el estrés impuesto por deficiencia de fosfato, en donde los niveles de proteína de *PHO1* son cruciales para la sobrevivencia y adaptación de la planta (Hamburger *et al.*, 2002). Observamos que en condiciones de limitación de fosfato, el transcrito *PHO1* se distribuye en fracciones P en ausencia de eIF(iso)4E, contrario a lo que pasa en presencia de fosfato. Analizando otros mRNAs, ERF/AP2 y eIF4A en presencia y ausencia de fosfato, encontramos que su comportamiento traduccional es diferente al de *PHO1*, lo cual nos indica que existen otros mecanismos que regulan la traducción bajo condiciones de estrés por deficiencia de fosfato para estos mRNAs. Este resultado se apoya con lo observado en el análisis de expresión de la proteína *PHO1*, la cuál detectamos únicamente en raíces de plántulas Wt y mutantes *AteIF(Iso)4E-2* de 15 días sometidas a estrés por fosfato, Siendo más abundante en las mutantes sobre-expresoras, lo cual apoya nuestra hipótesis de que la eficiencia traduccional de *PHO1* es sensible a los niveles de eIF(iso)4E.

La disponibilidad de nutrientes en el suelo alteran el desarrollo de raíz, particularmente, la deficiencia de fosfato induce la formación de raíces laterales e inhibe la elongación de la raíz principal formando un sistema radicular denso y muy ramificado. La inhibición del ciclo celular, las bajas concentraciones de auxina en los meristemos apicales de las raíces y la expresión de transportadores de fosfatos dan lugar a un sistema de raíces bien adaptado para la absorción eficiente de Pi. Contrario a nuestra observación del desarrollo de raíz en presencia de Pi, encontramos que la raíz de plántulas *AteIF(iso)4E-1* y *AteIF(iso)4E-2* presentan longitud similar a las Wt

después de crecer 10 días en ausencia de fosfato, esto implica una reducción importante en su desarrollo, y esta disminución es mayor en plantas mutantes *AtelF(iso)4E-1* (superior a 4 cm), que en plantas sobre-expresoras *AtelF(iso)4E-2* donde se observa una reducción de apenas 1 cm. Esto sugiere que los niveles de reducción de longitud de la raíz principal están relacionados con los niveles de eIF(iso)4E en la planta.

No nos es posible confirmar si existe una correlación entre la alteración en la distribución traduccional de *PHO1* provocado por los cambios en los niveles de eIF(iso)4E y el fenotipo observado en raíz, aunque recientemente se ha reportado que la respuesta de la planta a la deficiencia de fosfato implica una reprogramación de genes responsable de los fenotipos generados por déficit de fosfato que son independientes de los niveles de *PHO1*, por lo tanto, los cambios en los niveles de traducción de *PHO1* en condiciones normales de desarrollo puede contribuir, junto con las otras alteraciones en expresión genética, al fenotipo en el crecimiento de las raíces. Por otra parte sabemos que la deficiencia de fosfato es la responsable de la pérdida de fenotipo en raíces de mutantes *AtelF(iso)4E-1* ya que al crecer las plántulas en deficiencia de otros nutrientes la longitud de la raíz principal de las plantas carentes de eIF(iso)4E sigue siendo mayor a la de plantas Wt.

Al analizar todos nuestros resultados, no es posible asegurar que los mecanismos de regulación en respuesta al déficit de fosfato sean impuestos o alterados por la proporción eIF4E/eIF(iso)4E en la raíz. Debemos recordar que en el análisis de microarreglos de DNA a partir de RNA total observamos un gran número de transcritos con cambios en su expresión, muchos de ellos son factores de transcripción que al estar alterados pudieran generar cambios en la expresión de muchos otros mRNAs a nivel transcripcional y no traduccional, y estos cambios pueden contribuir al efecto traduccional y de fenotipo observado. Pero al parecer la presencia de eIF(iso)4E es más relevante durante condiciones normales de desarrollo que en ausencia de fosfato. El análisis computacional de las regiones UTR de los transcritos de los grupos I y II confirmó que ambos grupos difieren principalmente en la longitud y estructura secundaria de sus secuencias 5'UTR. Esto concuerda con lo reportado en estudios *in vitro* donde reportan que eIF(iso)4E y eIF4E formando parte del complejo eIF(iso)4F y eIF4F respectivamente, son capaces de discriminar por longitud y frecuencia o complejidad de estructura secundaria en los 5'UTR de un mRNA para promover el inicio de la traducción con diferentes eficiencias.

Finalmente, los datos obtenidos durante la realización de este proyecto, corroboran que eIF(iso)4E juega un papel importante en la traducción selectiva de algunos mRNAs en *A. thaliana* en condiciones normales de desarrollo.

CONCLUSIONES

Los factores de inicio de la traducción eIF(iso)4E y eIF4E no son totalmente redundantes en su función.

Los niveles de eIF(iso)4E pueden alterar la eficiencia traduccional de un grupo de mRNAs, este efecto se encuentra en condiciones normales de desarrollo y no fue posible correlacionarlo con algún tipo de estrés.

La óptima traducción del mensajero de *PHO1* depende de los niveles de eIF(iso)4E en *Arabidopsis*.

Existe un grupo de mRNAs cuya eficiencia traduccional parece ser afectada por los niveles de eIF4E.

Con lo anterior, comprobamos que los factores de inicio de la traducción de la familia 4E presentan actividad traduccional selectiva para ciertos transcritos.

Fisiológicamente, en condiciones normales de desarrollo, los niveles de eIF(iso)4E afectan la longitud de la raíz principal en *A. thaliana*.

En general, los resultados obtenidos en este trabajo indican que los cambios traduccionales ocasionados por la alteración en los niveles de eIF(iso)4E y el correspondiente ajuste en la proporción relativa de eIF4E son más complejos que simplemente asumir que cada factor recluta un grupo específico de mRNAs para su traducción. Características particulares como el 5'UTR de los mRNAs, la formación de complejos de unión a cap, otros factores de traducción o la interacción con proteínas regulatorias, pueden estar contribuyendo a la plasticidad y complejidad de la selectividad funcional de los factores de la familia 4E.

PERSPECTIVAS

Para obtener mayor información acerca de la selectividad traduccional del factor de inicio eIF(iso)4E sería necesario analizar el efecto de sus niveles en más transcritos candidatos y tratar de relacionar este efecto con algún otro tipo de estrés o en alguna etapa específica de desarrollo. Una vez que se conocieran más transcritos dependientes de eIF(iso)4E para su óptima traducción se buscarían similitudes estructurales o la presencia de motivos o secuencias reguladoras en los extremos 5' y 3'-UTR para de esta manera poder dilucidar el o los mecanismos de regulación traduccional de eIF(iso)4E y lograr entender la preferencia de este factor por un mRNA en particular.

Otra parte muy importante son los transcritos del Grupo II. Empleando plantas que sobre-expresen al factor eIF4E y mutantes nulas, mediante ensayos de qRT-PCR se puede comprobar la selectividad traduccional de eIF4E. Una vez que estén bien definidos los mecanismos de selección de mRNAs para cada factor sería posible hacer una comparación de ambos y establecer las diferentes selectividades traduccionales para cada uno de ellos.

De esta manera podría contestarse la pregunta inicial ¿Por qué existen más de un miembro de la familia eIF4E en plantas? Y ¿De que depende la preferencia traduccional de cada factor 4E?.

BIBLIOGRAFIA

- Aguirre-Martínez C. 2009. Expresión de una proteína de fusión del factor de inicio de traducción eIFiso4E-GFP en plantas de *Arabidopsis thaliana* silvestres y mutantes para eIFiso4E. Tesis de Licenciatura UNAM
- Arava, Y., Wang, Y., Storey, J., Liu, C, Brown, P. and Herschlag, D. 2003. Genome-wide analysis of mRNA translation profiles in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, 3889–3894.
- Besse, F. and Ephrussi, A. 2008. Translational control of localized mRNAs: restricting protein synthesis in space and time. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9, 971-980.
- Breyne, S., Bonderoff, J., Chumakov, K., Lloyd, R. and Hellen, C. 2008. Cleavage of eukaryotic initiation factor eIF5B by enterovirus 3C proteases. *Virology* 378,118–122.
- Browning, K. 2004. Plant translation initiation factors: it is not easy to be green. *Biochem Society Trans.* 32, 589-591.
- Browning, K. 1996 The Plant Translational Apparatus. *Plant Mol Biol* 32,107-44.
- Carberry, S. and Goss, D. 1991. Wheat germ initiation factors 4F and (iso)4F interact differently with oligoribonucleotide analogues of rabbit α -globin mRNA. *Biochem.* 30, 4542-4545.
- Combe, J., Petracek, M., Eldik, G., Meulewaeter, F. and Twell, D. 2005. Translation initiation factors eIF4E and eIFiso4E are required for polysome formation and regulate plant growth in tobacco. *Plant Mol. Biol.* 57, 749-760.
- Culjkovic, B., Topisirovic, I., Skrabanek, L., Ruiz-Gutierrez, M. and Borden, K. 2006. eIF4E is a central node of an RNA regulon that governs cellular proliferation. *J. Cell Biol.* 175, 415-427.
- Day, I. and Reddy V., 2002. Analysis of EF-hand-containing proteins in *Arabidopsis*. *Genome Biol.* 3,10
- Dever, T. 2002; Gene-specific regulation by general translation factors. *Cell.* 108, (4), 545-556.
- Dinkova, T. and Sánchez de Jiménez, E. 1999. Differential expression and regulation of translation initiation factors -4E and -iso4E during maize germination. *Physiol. Plant.* 107, 419-425.
- Dinkova, T., Aguilar, R. and Sánchez de Jiménez, E. 2000. Expression of maize eukaryotic initiation factor (eIF) iso4E is regulated at the translational level. *Biochem. J.* 351, 825-831.

- Dinkova, T., Keiper, B., Korneeva, N., Aamodt, E. and Rhoads, R. 2005. Translation of a small subset of *Caenorhabditis elegans* mRNAs is dependent on a specific eIF4E isoform. *Mol Cell Biol.* 25 (1), 100-113.
- Duprat, A., Cantara, C., Revers, F., Menand, B., Browning, K. and Robaglia, C. 2002. The *Arabidopsis* eukaryotic initiation factor (iso)4E is dispensable for plant growth but required for susceptibility to potviruses. *Plant J.* 32, 927-934.
- Fischer, P., 2009. Perspective. Cap in hand Targeting eIF4E. *Cell Cycle* 8 (16), 2535-2541.
- Freire, M. 2005 Translation initiation factor (iso) 4E interacts with BTF3, the h subunit of the nascent polypeptide-associated complex. *Gene* 345, 271–277
- Gallie, D. 2007. Use of in vitro translation extract depleted in specific initiation factors for the investigation of translational regulation. *Methods in Enzymol.* 429, 35-51.
- Gandin, V., Miluzio, A., Barbieri, A., Beugnet, A., Kiyokawa, H., Marchisio, P. and Biffo, S. 2008. Eukaryotic initiation factor 6 is rate-limiting in translation, growth and transformation. *Nature.* 455 (7213) 684-688.
- Goodfellow, I. and Roberts L., 2008. Eukaryotic initiation factor 4E. *International J of Biochem & Cell Biol.* 40 (12), 2675-2680
- Groppo R., and Richter., J. 2009. Translational control from head to tail. *Current Opinion in Cell Biol.* 21,444–451.
- Hamburger, D., Rezzonico, E., MacDonald-Comber, P., Somerville, C. and Poirier, Y. 2002. Identification and Characterization of the *Arabidopsis* *PHO1* Gene Involved in Phosphate Loading to the Xylem. *The Plant Cell.* 14, 889–902.
- Hedge, P., Qi, R., Abernathy, K., Gay, C., Dharap, S., Gaspard, R., Hughes, J., Snesrud, E., Lee, N. and Quackenbush, J. 2000. A concise guide to cDNA microarray analysis. *Biotechniques.* 29, 548-562.
- Hernández, G., Altmann, M., Sierra, J. M., Urlaub, H., Diez del Corral, R., Schwartz, P. and Rivera-Pomar, R. 2005. Functional analysis of seven genes encoding eight translation initiation factor 4E (eIF4E) isoforms in *Drosophila*. *Mech Dev* 122, 529-543
- Hernández, G. and Vazquez-Pianzola, P. 2005. Functional diversity of the eukaryotic translation initiation factors belonging to eIF4 families. *Mech Dev* 122 (7-8), 865-876.

- Hidalgo-Mejía, A. 2007 Obtención y caracterización de mutantes homocigas de un miembro de la familia eIF4E: nCBP (novel Cap-Binding Protein) en *Arabidopsis thaliana*. Tesis de Licenciatura UNAM.
- Hirokawa, G., Demeshkina, N., Iwakura, N., Kaji, H. and Kaji, A. 2006 The ribosome-recycling step: consensus or controversy? *TRENDS Biochem Sciences* 31 (3), 143-149.
- Holcik, M. and Pestova, T. 2007. Translation mechanism and regulation: old players, new concepts Meeting on Translational Control and Non-Coding RNA. *EMBO reports*. 8 (7), 639-643.
- Jackson, R. 2005. Alternative mechanisms of initiating translation of mammalian mRNAs. *Biochem. Society Transactions*. 33, 1231-1241.
- Joshi, B., Cameron, A. and Jagus, R. 2004. Characterization of mammalian eIF4E-family members. *Eur. J. Biochem*. 271, 2189–2203.
- Kawaguchi, R. and Bailey-Serres, J. 2002. Regulation of translational initiation in plants. *Current Opinion in Plant Biol*. 5, 460-465.
- Kaye ,N., Emmett, K., Merrick, W. and Jankowsky, E. 2009. Intrinsic RNA binding by eukaryotic initiation factor 4F depends on a minimal RNA length but not on the m7G cap. *J.Biol. Chem*. 284, 17742-17750.
- Keiper, B., Lamphear, B., Deshpande, A., Jankowska-Anyszka, M., Aamodt, E., Blumenthal ,T. and Rhoads, R. 2000. Functional characterization of five eIF4E isoforms in *Caenorhabditis elegans*. *J Biol Chem* 275,10590-10596.
- Lachance, P., Miron, M., Raught, B., Sonenberg, N. and Lasko, P. 2002. Phosphorylation of eukaryotic translation initiation factor 4E is critical for growth. *Molec and Cellular Biol*. 22 (6), 1656-1663.
- Lazaris-Karatzas, A., Montine, K. , and Sonenberg, N. 1990. Malignant transformation by a eukaryotic initiation factor subunit that binds to mRNA 5' cap. *Nature*. 345, 544-547.
- Martínez-Silva, A. and Dinkova, T. 2010. Mecanismos de regulación traduccional mediados por el factor de inicio 4E. Las dos caras de la moneda. *REB* . 29(3), 82-91.
- Mathews, M. 2002. Lost in translation. *Trends Biochem Sci*, 27 (5), 267-269.
- Mayberry, L. K., Dennis, M. D., Leah, M. A., Ruud, K. N., Murphy P. A., Patricia A., Campbell, L., y Browning, K. S. 2007. Expression and Purification of Recombinant Wheat Translation Initiation Factors eIF1, eIF1A, eIF4A, eIF4B, eIF4F, eIF(iso)4F, and eIF5. *Methods in Enzymol*, 430, 397–408.

- Mayberry, L., Allen, M., Dennis, M., and Browning, K. 2009. Evidence for variation in the optimal translation initiation complex: Plant eIF4B, eIF4F and eIF(iso)4F Differentially Promote Translation of mRNAs. *Plant Physiol.* 150 (4), 1844-1854
- Melamed, D. and Arava, Y. 2007. Genome-Wide Analysis of mRNA Polysomal Profiles with Spotted DNA Microarrays. *Methods in Enzymol.* 431, 177-201.
- Monzingo, A., Dhaliwal, S., Dutt-Chaudhuri, A., Lyon, A., Sadow, J., Hoffman, D., Robertus, J. and Browning, K. 2007. The structure of eukaryotic translation initiation factor-4E from wheat reveals a novel disulfide bond. *Plant Physiol.* 143 (4), 1504-1518.
- Muench, D., Zhang, C. and Dahodwala, M. 2012. Control of cytoplasmic translation in plants. *Wiley Interdiscip Rev RNA.* 3 (2), 178-194.
- Niedzwiecka, A., Marcotrigiano, J., Stepinski, J., Jankowska-Anyszka, M., Wyslouch-Cieszynska, A., Dadlez, M., Gingras, A., Mak, P., Darzynkiewicz, E. and Sonenberg, N. 2002. Biophysical studies of eIF4E cap-binding protein: recognition of mRNA 5' cap structure and synthetic fragments of eIF4G and 4E-BP1 proteins. *J Mol Biol.* 319,615-635.
- Pain V., 1996. Initiation proteína síntesis in eukaryotic cells. *Eur. J. Biochem.* 236, 747-771.
- Passmore, L., Schmeing, T., Maag, D., Applefield, D., Acker, M., Algire, M., Lorsch, J., and Ramakrishnan, V. The Eukaryotic Translation Initiation Factors eIF1 and eIF1A Induce an Open Conformation of the 40S Ribosome. *Molec Cell.* 26, 41–50.
- Pestova, T., Lorsch, J. and Hellen, C. 2007. *En Translational Control in Biology and Medicine.* Editor: Mathews MB, Sonenberg N. and Hershey JWB, CSHL Press, Cold Spring Harbor, NY, 87-128.
- Pisarev, A., Christopher U., and Pestova V. 2007. Recycling of Eukaryotic Posttermination Ribosomal Complexes. *Cell.* 131, 286–299.
- Prévôt, D., Décimo, D., Herbreteau, C., Roux, F., Garin, J., Darlix, J. and Ohlmann, T. 2003. Characterization of a novel RNA-binding region of eIF4GI critical for ribosomal scanning. *EMBO.* 22 (8), 1909-1921
- Ptushkina, M., Malys, N., and McCarthy, E. 2004. eIF4E isoform 2 in *Schizosaccharomyces pombe* is a novel stress-response factor. *EMBO.* 5, 311-316.
- Raught, B., and Gingras, A. 1999. eIF4E activity is regulated at multiple levels. *Int J Biochem Cell Biol.* 31 (1), 43-57.

- Rhoads, R. 1999 Signal transduction pathways that regulate eukaryotic protein síntesis. *J Biol Chem.* 274 (43), 30337-30340
- Rhoads, R. 2009. eIF4E: New Family Members, New Binding Partners, New Roles. *J. of Biol Chem.* 284 (25), 16711–16715.
- Robalino, J., Joshi, B., Fahrenkrug, S. and Jagus, R. 2004. Two zebrafish eIF4E family members are differentially expressed and functionally divergent. *J Biol Chem.* 279 (11), 10532-10541.
 - Rodríguez, C., Freire, M., Camillero, C. and Robaglia, C. 1998. The *Arabidopsis thaliana* cDNAs coding for eIF4E and eIF(iso)4E are not functionally equivalent for yeast complementation are differentially expressed during plant development. *Plant J.* 13, 465-473.
 - Ruud, K., Kuhlman, C., Goss, D. and Browning, K. 1998. Identification and characterization of a novel cap-binding protein from *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* 273, 10325-10330.
 - Schule, A. and Downward, J. 2001. Navigating gene expression using microarrays--a technology review *Nat Cell Biol.* 3 (8), 190-195.
 - Siddiqui, N., Tempel, W., Nedyalkova, L., Volpon, L., Wernimont, A., Osborne, M., Park, H. and Borden, K. 2011. Structural Insights into the Allosteric Effects of 4EBP1 on the Eukaryotic Translation Initiation Factor eIF4E. *J Mol Biol* 415 (5), 781-792.
 - Sonenberg, N. and Dever, T. 2003; Eukaryotic translation initiation factors and regulators. *Curr Opin Struct Biol.* 13 (1), 56-63.
 - Stefanovic, A., Ribot, C., Rouached, H., Wang, Y., Chong, J., Belbahri, L., Delessert, S. and Poirier, Y. 2007. Members of the PHO1 gene family show limited functional redundancy in phosphate transfer to the shoot, and are regulated by phosphate deficiency via distinct pathways. *Plant J.* 50, 982-994.
 - Stefanovic, A., Arpat, A., Blingny, R., Gout, R., Vidoudez, C., Bensimon, M. and Poirier, Y. 2011. Over-expression of PHO1 in Arabidopsis leaves reveals its role in mediating phosphate efflux. *The Plant J.* 66, 689–699.
 - Sukarieh, R., Sonenberg, N. and Pelletier, J. 2009. The eIF4E-binding proteins are modifiers of cytoplasmic eIF4E relocalization during the heat shock response. *Am J Physiol Cell Physiol.* 296: C1207–C1217.
 - Syntichaki, P., Troulinaki, K. and Tavernarakis, N. 2007. eIF4E function in somatic cells modulates ageing in *Caenorhabditis elegans*. *Letters Nature.* 445, 922-926.

- Topisirovic, I., Siddiqui, N., Lapointe, V., Trost, M., Thibault, P., Bangeranye, C., Piñol-Roma, S. and Borden, K. 2009. Molecular dissection of the eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E) export-competent RNP. *EMBO* 28 (8), 1087-1098.
- Weixlbaumer, A., Sabine Petry, S., Dunham, C., Selmer, M., Kelley, A. and Ramakrishnan, V. 2007 Crystal structure of the ribosome recycling factor bound to the ribosome. *Nature Estructural and Molec Biol.* 14 (8), 733-737.
- Wang, Y., Ribot, C., Rezzonico, E. and Poirier, Y. 2004. Structure and expression profile of the Arabidopsis PHO1 gene family indicates a broad role in inorganic phosphate homeostasis. *Plant Physiol.* 135 (1), 400-411.
- Yanagiya, A., Svitkin, Y., Shibata, S., Mikami, S., Imataka H. and Sonenberg, N. 2009. Requirement of RNA-binding of Mammalian eIF4GI for Efficient Interaction of eIF4E with mRNA Cap. *Mol. Cell. Biol.*, 29(6), 1661-1669.
- Wilkie, G., Dickson, K. and Gray, N. 2003. Regulation of mRNA translation by 5'- and 3'- UTR-binding factors. *Trends in Biochem Sciences.* 28 (4), 182-188.
- www.arabidopsis.org

Apéndice 1. Secuencias de oligonucleótidos usadas para los experimentos de PCR en tiempo real (qRT-PCR).

Gen ID	Otro Nombre	Sentido	Antisentido	Longitud del producto (bp)
<i>At1g21630</i>		CACAACAGGGTTCATT GAGCCAG	AGGTGGACCAGAA GCCGCAC	104
<i>At1g64580</i>		TTCTGATTCATTGTTTC TGCCGATG	CGTTGAGGAGAGA GCCAAGAGTGAC	73
<i>At1g68670</i>		TCGGAAGGAGTTATCT GGTACGACG	AAGACAGGACCAC CACAAACACTTG	84
<i>At1g68800</i>	BRC2	AGGCGAGCAAGACGA TTGAATG	CCTTTCCTCCTCC TTCCGATGC	96
<i>At1g78240</i>	TSD2	CCATTCCCGACTTACC CGAGAAC	TCCCTCTGGACGA AGCAATCG	138
<i>At2g02860</i>	SUC3	CGCAATCGTTATTCCC CAGATG	AAGCAGCAACAGA CGCCAAAAC	107
<i>At2g03710</i>	AGL3	CCTTCTCTACCCAGAC AGCGTGG	CACCCCATCCAGC AACTCCC	80
<i>At2g17630</i>		AACCCAACACCATCAA CCTCACC	AATGCGGCTGGAC CTGCG	121
<i>At2g27940</i>		TTCCGCCACTTCGCAG ACAG	CCTGAGAATCAAG ACCCCTCCG	148
<i>At2g28600</i>		ATGGCGAAAGGAGAC GATAATGTG	ATGGCGGCGATAC GAGCAG	107
<i>At2g30260</i>	U2B"	CCCAACGACCAAACAC GGC	TCGGCTGGAACGA AGGCG	84
<i>At3g23430</i>	PHO1	CCAAACACAGCGTTGC GTTACC	GAGGCTCGGAGG ATGAGGTGG	101
<i>At3g55580</i>	RCC1	CAGTCTGACAACATTG ACCTCTCGG	GTATGACGACCAC CAGCAGCAAC	95
<i>At3g57600</i>	ERF/AP2	TGGAAGAAGGGTCCT GCTCGG	CAAGTCCTTTGCC TGACTCCACG	80
<i>At4g06746</i>	RAP2.9	GTTCATACAAACCGC CGTTGC	TGAGTCTCGCCGA AGGACCAC	81
<i>At4g18720</i>	TEF-R	AGCGAGACAAAGTGC GTGAGATTC	CCACAGATACAGC CACAACCCAAG	123
<i>At4g20340</i>	TFIIE	AGCCGTTTGTCAAGCT GGTGAG	TCTAACCCATTGC CGCCTCG	149
<i>At4g33250</i>	EIF3K	CCAGACTTCAGCCTTT GCCTCTTC	CCAGAACTGTTGG AACCTCCCAG	117
<i>At5g01840</i>	OFP1	GGAACCGTCTTCGTCA CCGAG	ACCTGTTTCTGTG GTAGTGCTGTGCG	80
<i>At5g15630</i>	COBL4	CGGCAGATGGCTATG TGGCTAC	TGTCCAACCTAAT GTCCAACCAGG	89
<i>At5g15850</i>	COL1	ATGCTGCCAATCGTCT TGCTTC	TGCGGAATGAATC TCTGAATCACAG	137
<i>At5g61430</i>	NAC5	CCTGCTTCTCCAACCA AACGG	AATCCTGTGAAAA ATGTCGGCTTG	101

Apéndice 2. Microarreglos de DNA

Fundamentos de la técnica

Los microarreglos de DNA son una herramienta poderosa que analiza la expresión de genes en función de varios factores. Consiste en un pequeño vidrio (porta-objetos) que contiene muestras de un gran número de genes acomodados en un patrón regular. Se puede definir como la inmovilización sistemática de fragmentos de ácidos nucleicos derivados de genes individuales en un soporte sólido, el cual por hibridación específica, permite el análisis simultáneo de miles de genes en paralelo. Los microarreglos se basan en una tecnología en la cuál el DNA es colocado robóticamente en pequeños puntos en una membrana o chip de vidrio, como un arreglo (array) de DNA de cadena sencilla. Un microarreglo de DNA puede contener todos los genes del organismo en estudio. Frecuentemente se emplea este método para comparar la expresión entre organismos mutantes y no mutantes (Hedge *et al.*, 2000; Schulze y Downward, 2001).

El análisis eficiente de la expresión de genes usando microarreglos es un proceso que puede ser dividido en tres etapas: 1) fabricación de los arreglos o chips, 2) preparación de la muestra e hibridación y 3) colecta de datos, normalización y análisis.

Fabricación de microarreglos o chips:

Los microarreglos son construidos acomodando clonas de cDNA amplificadas por PCR en portaobjetos de microscopios derivatizados. Generalmente las clonas de cDNA son seleccionadas para representar un único transcrito, los cDNAs seleccionados se amplifican por PCR y se remueven del producto de reacción los nucleótidos y primers que no se incorporaron (Reacción *Clean-Up*). Una vez amplificados y limpios los productos de PCR amplificados se resuspenden en amortiguadores desnaturalizantes o con alta concentración de sales y se imprimen en el portaobjetos tratados con poly-L-lisina o revestidos con aminosilano usando un sistema robótico de alta velocidad (Hedge *et al.*, 2000).

Preparación de la muestra e hibridación

Los microarreglos de DNA funcionan explotando la habilidad que tienen las moléculas de mRNA de unirse específicamente con el DNA templado del cual son originados, lo que permite que el cDNA de la muestra hibride con el DNA del microarreglo. Básicamente, esta etapa sigue los siguientes pasos: 1) Extracción de RNA del organismo de interés, la calidad y pureza del RNA que se emplee para el ensayo tiene

un efecto significativo en los subsecuentes resultados del ensayo. 2) usando a la transcriptasa reversa, el mRNA se convierte a cDNA, 3) el cDNA es marcado usando diferentes colores de fluorescencia (CY3 y Cy5, entre otros) y 4) los blancos (cDNA marcado) son expuestos al microarreglo por suficiente tiempo para permitir que hibriden (12-16h, figura 25)

Colecta de datos, normalización y análisis.

Después de la hibridación un escáner computarizado detecta la fluorescencia generada. Solo los puntos que contengan genes que se están expresando en la célula pueden fluorescer, los genes que se expresan en el control tendrían fluorescencia de un color (por ejemplo, verde), mientras que las que se expresen en la muestra experimental tendrán fluorescencia de otro color (por ejemplo, rojo). Los genes expresados en ambas muestras presentaran una mezcla de colores (amarillo). La expresión diferencial de genes es evaluada por el escaneo del arreglo hibridado con un láser confocal que es capaz de diferenciar los cDNAs marcados con CY3 y Cy5 y produce archivos de imágenes en TIFF de cada uno. Una vez obtenidas las imágenes, primero se identifica cada punto y su tipo e intensidad de fluorescencia al mismo tiempo que se estima la fluorescencia del fondo de cada punto. Seguido de la identificación de cada punto y la determinación del fondo, se resta al valor de intensidad de cada punto la intensidad del fondo y se calculan la media y los promedios de intensidad de cada punto. Generalmente se usan las relaciones de las intensidades Cy3/Cy5 para identificar los genes que se expresan diferencialmente. Antes de identificar a los genes con expresión diferencial es necesario normalizar los valores de fluorescencia relativa. Esto depende del diseño de experimentos que se siga ya que para lograrlo se toma como referencia las intensidades encontradas en la muestra control. Seguido de la normalización, los datos son analizados para identificar los genes diferencialmente expresados, generalmente se toma un corte (zscore) de 1.5 a 2 veces de cambio positivo o negativo para definir la expresión diferencial (Hedge *et al.*, 2000; Schulze y Downward, 2001).

Aplicaciones.

Los microarreglos de DNA tienen varias aplicaciones, expresión de mRNAs bajo diferentes tratamientos, genotipificación de polimorfismos, identificaciones de lesiones genéticas, diseño y descubrimiento de nuevas drogas terapéuticas y secuenciación de DNA.

Los microarreglos representan un importante avance científico porque pueden contener un número muy grande de genes en un espacio muy pequeño. Se utilizan cuando uno quiere estudiar un gran número de genes rápidamente o cuando la muestra en estudio es pequeña. Los microarreglos pueden ser usados para analizar la expresión de genes en una muestra o para comparar la expresión en diferentes muestras. El uso de microarreglos permiten examinar la integración de la expresión de genes y su función a nivel celular revelando los productos de múltiples genes juntos que pueden producir respuestas físicas y químicas a los cambios celulares (Hedge *et al.*, 2000; Schulze y Downward, 2001).

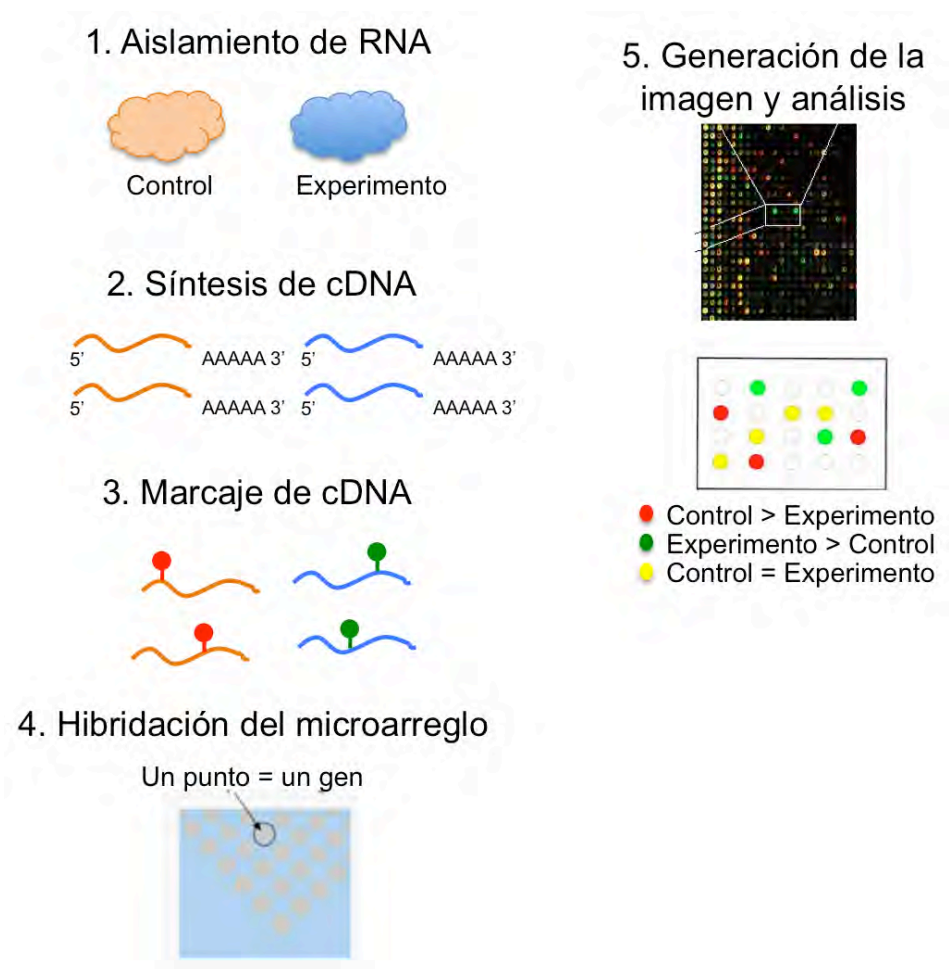


Figura 25. Esquema del protocolo experimental para realizar microarreglos de DNA. Se comienza con la extracción de RNA de las muestras en estudio (1), después se realiza una transcripción reversa para generar cDNA a partir del RNA (2), enseguida se hace el marcaje de los cDNAs con distintos fluoroforos (3). Posteriormente se hibridan los cDNAs marcados con el microarreglo (4) y finalmente se obtiene la imagen y se analizan los datos de intensidad de fluorescencia emitida (5).

Translation Initiation Factor AtElF(iso)4E Is Involved in Selective mRNA Translation in *Arabidopsis thaliana* Seedlings

Ana Valeria Martínez-Silva, César Aguirre-Martínez, Carlos E. Flores-Tinoco, Naholi D. Alejandri-Ramírez, Tzvetanka D. Dinkova*

Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Distrito Federal, México

Abstract

One of the most regulated steps of translation initiation is the recruitment of mRNA by the translation machinery. In eukaryotes, this step is mediated by the 5' end cap-binding factor eIF4E bound to the bridge protein eIF4G and forming the eIF4F complex. In plants, different isoforms of eIF4E and eIF4G form the antigenically distinct eIF4F and eIF(iso)4F complexes proposed to mediate selective translation. Using a microarray analysis of polyribosome- and non-polyribosome-purified mRNAs from 15 day-old *Arabidopsis thaliana* wild type [WT] and eIF(iso)4E knockout mutant [(iso)4E-1] seedlings we found 79 transcripts shifted from polyribosomes toward non-polyribosomes, and 47 mRNAs with the opposite behavior in the knockout mutant. The translationally decreased mRNAs were overrepresented in root-preferentially expressed genes and proteins from the endomembrane system, including several transporters such as the phosphate transporter *PHOSPHATE1* (*PHO1*), Sucrose transporter 3 (*SUC3*), ABC transporter-like with ATPase activity (*MRP11*) and five electron transporters, as well as signal transduction-, protein modification- and transcription-related proteins. Under normal growth conditions, eIF(iso)4E expression under the constitutive promoter 35 S enhanced the polyribosomal recruitment of *PHO1* supporting its translational preference for eIF(iso)4E. Furthermore, under phosphate deficiency, the *PHO1* protein increased in the eIF(iso)4E overexpressing plants and decreased in the knockout mutant as compared to wild type. In addition, the knockout mutant had larger root, whereas the 35 S directed expression of eIF(iso)4E caused shorter root under normal growth conditions, but not under phosphate deficiency. These results indicate that selective translation mediated by eIF(iso)4E is relevant for *Arabidopsis* root development under normal growth conditions.

Citation: Martínez-Silva AV, Aguirre-Martínez C, Flores-Tinoco CE, Alejandri-Ramírez ND, Dinkova TD (2012) Translation Initiation Factor AtElF(iso)4E Is Involved in Selective mRNA Translation in *Arabidopsis thaliana* Seedlings. PLoS ONE 7(2): e31606. doi:10.1371/journal.pone.0031606

Editor: Rajagopal Subramanyam, University of Hyderabad, India

Received: September 26, 2011; **Accepted:** January 10, 2012; **Published:** February 20, 2012

Copyright: © 2012 Martínez-Silva et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This research was supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México (CONACYT) grants 43669 and 81708, and by Programa de Apoyo a la Innovación e Investigación Tecnológica (PAPIIT-UNAM) grant 204309. AVMS was supported by CONACYT Ph.D. fellowship program. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: cesy@servidor.unam.mx

Introduction

Translation initiation factor eIF4E binds to the cap structure (7mGpppN, where N is any nucleotide) present at the 5' end of most eukaryotic mRNAs. Through its high affinity binding to the bridge protein eIF4G, this factor participates in the mRNA recruitment for translation. eIF4G interacts with the multi-subunit complex eIF3 bringing together the mRNA and the 43 S initiation complex formed by eIF3, the ternary complex (eIF2-Met-tRNAMet-GTP), the 40 S ribosomal subunit and other initiation factors [1]. It also recruits the RNA helicase eIF4A to unwind secondary structures in the 5' untranslated region (5'UTR) of the mRNA, and the poly(A) binding protein (PABP) allowing the mRNA circularization for efficient translation re-initiation. In eukaryotes, more than 95% of protein synthesis is initiated involving the cap structure of mRNAs [2] thus making the initiation of step of translation the most controlled event in the process [1].

A change in initiation efficiency has a strong influence on the protein content (quantitative regulation) and the relative levels of

different proteins (qualitative regulation). The cap-binding protein, eIF4E, has highly conserved amino acids across all eukaryotic organisms that interact with the 5' cap structure of mRNAs [3]. eIF4G interacts with eIF4E through a YXXXXLΦ motif (where Φ is any hydrophobic amino acid) and formation of the eIF4G/eIF4E complex (eIF4F) improves the ability to bind the 5' cap, forming a stable eIF4F-mRNA complex [4,5,6]. eIF4E primarily functions in the initiation of translation as part of the eIF4F complex; however, the sequestration of eIF4E may also act to specifically repress translation of mRNAs [7]. During the last few years it became evident that through binding to specific proteins and the cap of mRNAs, eIF4E participates in the nucleocytoplasmic transport, translational repression, and turnover of mRNA [7]. The interaction between the cap and the translational machinery may be prevented by the binding of eIF4E to other cellular proteins through the same domain used for its interaction with eIF4G. By such means cells could modulate either the global translation levels, or specific mRNA recruitment [8].

Multiple eIF4E family members have been identified in a wide range of organisms that include plants, flies, mammals, frogs,

birds, nematodes, and fish [3,9]. These members have been classified into three families: eIF4E-I, eIF4E-II and eIF4E-III [3]. This classification was done according to the conservation of Trp 43 and Trp 56 (numbering according to the human eIF4E-1 sequence) in the protein. Members from class I present Trp43 and Trp 56 conserved, while those from Class II have both residues substituted by Tyr or Phe and Class III only have substituted Trp 56 by Tyr, Phe or Cys. Some eIF4E family members have altered cap-binding affinities or interactions with eIF4G and other proteins, providing clues to their physiological roles. It has been suggested that each organism has at least one class I eIF4E that is ubiquitous and constitutively expressed to carry out general translation and that the other family members are involved in specialized functions [9].

Some eIF4E proteins are required only during particular developmental stages or under particular stress conditions. For example, *Caenorhabditis elegans* expresses four different class I eIF4E proteins; however, only IFE-3 is essential for survival [10]. IFE-1 is required during spermatogenesis [11] and IFE-2 is relevant for longevity and response to oxidative stress [12] and its mutation produces temperature-sensitive defects in meiotic crossover [13]. The single class II family member IFE-4 is involved in proper egg laying [14]. In *Schizosaccharomyces pombe*, there are two class I eIF4E proteins, eIF4E-1 and eIF4E-2, but eIF4E-2 particularly functions under stress conditions such as nutrient depletion, high temperatures, and high salt, to arrest cell growth and division [15]. In *Drosophila melanogaster*, there are seven different eIF4E genes encoding eight isoforms (seven belonging to class I and one to class II). All of them are able to bind cap, but a specialized function has been demonstrated for some [16,17].

In plants, three eIF4E family members have been reported: eIF4E (class I), eIF(iso)4E (plant-specific, class I), and nCBP (novel cap binding protein, class II). The eIF(iso)4E protein interacts with a particular eIF(iso)4G forming the unique plant eIF(iso)4F complex [18]. eIF4F and eIF(iso)4F complexes show selectivity in the recognition of mono and di-methylated cap structures, as well as in *in vitro* translation of 5'UTR structured mRNAs. In most plant species, eIF(iso)4E shows about 50% amino acid identity with eIF4E and the relative abundance of each protein varies depending on the developmental stage and the plant tissue.

In *Arabidopsis*, the eIF(iso)4E transcript and protein are more abundant in roots, floral organs and tissues under development [19,20]. In maize, the eIF(iso)4E protein is present at higher levels than eIF4E in non-germinated seeds [21]. The corresponding transcript is efficiently translated upon imbibition to maintain constant and high levels during the first 24 h of germination, whereas eIF4E levels increase toward germination completion [22]. In addition, each Class I *Zea mays* eIF4E family member displays selective translational activity on the pool of mRNAs stored in the quiescent embryonic axes [23,24]. Other plant reports have indicated that the overall ability of the eIF4F and eIF(iso)4F complexes to support translation of individual mRNAs is readily distinguishable [5,25].

In *Arabidopsis thaliana*, eIF4E has three genes: eIF4E1 (At4g18940), eIF4E2 (At1g29590) and eIF4E3 (At1g 29550), whereas eIF(iso)4E has one gene (At5g35620). eIF4E1 appears to be the primary form as eIF4E2 and eIF4E3 transcripts show very low expression. Depletion of eIF(iso)4E in *Nicotiana tabacum* and *Arabidopsis thaliana*, induces higher eIF4E expression, probably to compensate its function in general translation initiation. Although no obvious developmental phenotype was reported for an eIF(iso)4E knockout (KO) mutant in *A. thaliana*, the absence of this protein conferred resistance to infection by several potyviruses

[26]. The eIF(iso)4F large subunit [eIF(iso)4G], is encoded by two different genes in *A. thaliana*, eIF(iso)4G1 (At5g57870), and eIF(iso)4G2 (At2g24050). Double mutants on these genes are significantly affected in their growth and reproduction indicating an essential function for the eIF(iso)4F complex during plant development [27]. However, single mutants develop similar to wild type plants under control growth conditions and confer specific viral resistance [28]. These data suggest that in addition to general translation, and their role in the eIF(iso)4F complex, each subunit may be part of specific regulatory mechanism for gene expression during plant development.

In this work we asked whether the absence of eIF(iso)4E has a discriminatory activity in mRNA translation during early *Arabidopsis thaliana* plant development. The previously characterized KO insertion mutant, *AteIF(iso)4E-1* (Duprat et al., 2002), hereafter called (iso)4E-1, was used in microarray transcriptional and translational profiling to compare gene expression to wild type (WT; Col-0) 15 day-old plants. Significantly changed genes at the translational level were genes preferentially expressed in roots and the endomembrane system. Analysis on selected genes indicated that the PHO1 transcript is present in polyribosomes of 15 day-old seedlings, but shifted towards free ribonucleoprotein fractions in the (iso)4E-1 mutant. In addition, the (iso)4E-1 mutant primary root was consistently larger at the same developmental stage compared to WT. Under phosphate limitation stress, the PHO1 protein levels were decreased in (iso)4E-1 and increased in an eIF(iso)4E overexpressing transgenic line as compared to WT. These results suggest that the presence of both isoforms, eIF4E and eIF(iso)4E, in a particular proportion is required for selective translation during normal plant growth, as well as in the phosphate limitation stress.

Results

Molecular characterization of the mutant lines (iso4E-1) and (iso4E-2)

To access the functional relevance of the *Arabidopsis thaliana* eIF(iso)4E protein, a previously reported KO mutant, (iso)4E-1, was used [26]. This mutant contains a transposon insertion (*dspm*) bearing the glufosinate ammonium (BASTA) resistance gene into the second exon of *At5g35620* rendering no transcript or protein for eIF(iso)4E. To confirm the stability of the insertion, mutant seedlings were grown in the presence of BASTA and analyzed at RNA and protein levels (Figure 1). No *eIF(iso)4E* RNA or protein was detected for (iso)4E-1, whereas the eIF4E protein was increased in agreement with [26].

Additionally, we generated three *Arabidopsis* transgenic lines, (iso)4E-2, -3, and -4, expressing eIF(iso)4E fused to a GFP tag at the carboxy terminus in the Col-0 WT background (Figure S1, panels A, B). The fusion was separated by 16 amino acids to allow independent folding of the eIF(iso)4E and GFP domains. A structural modeling of the fusion protein indicated no significant alteration in the cap-binding pocket or the surface of eIF(iso)4E expected to interact with eIF4G (Figure S2). The GFP fusion allowed the eIF(iso)4E localization in the transgenic plants (Figure S3). The fusion protein of approximately 55 kDa reacted against *Arabidopsis* eIF(iso)4E and GFP antisera and was able to bind m⁷GTP-Sepharose (Figure 1C), indicating its functionality in binding the capped mRNAs. The three independent transgenic lines expressing eIF(iso)4E-GFP showed increased levels of the eIF(iso)4E RNA as compared to WT in 15 day-old seedlings ranging from 2.5 to 3.5 times (Figure S1, panel C). Therefore, these plants express eIF(iso)4E above its normal level. For some of the further experiments, only the (iso)4E-2 line was selected, whereas for others

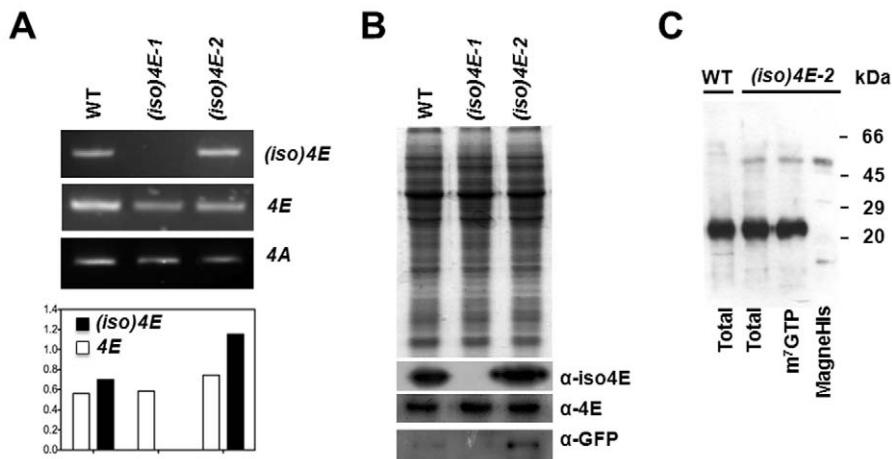


Figure 1. Molecular characterization of *AtEF(iso)4E* mutant plants. Plants from wild type Col-0 [WT], knockout [(*iso*)4E-1] and 35S:eIF(*iso*)4E:GFP [(*iso*)4E-2] lines were grown on Gamborg's B5 media for 15 days and total RNA or proteins were extracted from whole seedlings. **A.** Amplification by RT-PCR indicates that eIF(*iso*)4E mRNA is absent in (*iso*)4E-1 and increased about 2 fold in (*iso*)4E-2, whereas eIF4E mRNA levels remained similar in all lines. The transcript level of eIF4A was used to correct for RNA loading. **B.** Fifty micrograms of total proteins extracted from 15 day-old Arabidopsis seedlings were separated by SDS-PAGE and immunoblotted against eIF(*iso*)4E, eIF4E and GFP using specific antibodies. The absence of a 22 kDa band corresponding to eIF(*iso*)4E is observed in the (*iso*)4E-1 mutant, whereas a 25 kDa band corresponding to eIF4E is increased. The detection of GFP indicates the presence of a 55 kDa band corresponding to the fusion protein eIF(*iso*)4E-GFP in the (*iso*)4E-2 transgenic line. **C.** Protein extracts from (*iso*)4E-2 15 day-old seedlings were subjected to m⁷GTP-Sepharose (GE Healthcare) or MagneHis system (Promega) purification. One fifth of the eluted proteins from each was separated by SDS-PAGE together with the total extracts from WT and (*iso*)4E-2 plants and immunoblotted against Arabidopsis eIF(*iso*)4E. A 55 kDa band corresponding to the eIF(*iso*)4E-GFP fusion carrying a C-terminal His tag was observed in (*iso*)4E-2 total extract, and the m⁷GTP- or MagneHis-purified fractions, but not in WT total extract. The 22 kDa band corresponding to native eIF(*iso*)4E was detected in WT and (*iso*)4E-2 total extracts, as well as in the m⁷GTP-bound fraction. doi:10.1371/journal.pone.0031606.g001

the three transgenic lines were included. Additionally, a transgenic line expressing under a 35 S promoter eIF4E (4E- ϕ) fused to a GFP tag at the carboxy terminus in the Col-0 WT background was used as control for some experiments (Figure S3).

Changes in mRNA association with non-polyribosomal (NP) and polyribosomal (P) fractions in (*iso*)4E-1 null mutant line

Previous reports describing (*iso*)4E-1 did not report any obvious phenotype in leaf development and morphology, plant size, flowering and fertility, inferring that the eIF4E protein is able to function in place of eIF(*iso*)4E. However, even though the two proteins belong to Class I and might perform partially redundant function, changes at the level of selective translation of mRNAs due to the lack of either cap-binding protein may not be ruled out [5,25,29]. The polyribosomal distribution of mRNAs in 15 day-old WT Col-0 and (*iso*)4E-1 mutant seedlings was analyzed using Arabidopsis Oligonucleotide Microarray slides obtained from the University of Arizona (29,000 oligonucleotides AROS V.3.0). The developmental stage was chosen on the basis of enriched eIF(*iso*)4E expression in actively growing tissues [19,30]. On the other hand, at the time of the microarray experiment design, proteomic data from *Arabidopsis thaliana* tissues were not available. The sedimentation profiles on 20–60% sucrose gradients [31] monitored at A₂₆₀ indicated no global differences between wild type and (*iso*)4E-1 mutant plants (Figure S4). The fractions from each profile were pooled as non-polyribosomes (NP), containing free ribonucleoprotein complexes, ribosomal subunits 40 S/60 S, monosomes 80 S (fractions 1–5) or polyribosomes (P) containing two or more ribosomes (fractions 6–12). During translation, mRNAs that are initiated efficiently are found on polysomes, whereas a decrease in

initiation rate relative to elongation results in a shift towards non-polysome fractions [32].

Using the z-score transformation of two normalized microarray data for independent biological samples (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE29386>), significantly changed genes in the mutant NP and P fractions were found on a cutoff of 1.5 fold either up or down. According to this criterion 1474 transcripts decreased and 1621 increased in NP, whereas 1558 transcripts decreased and 1491 increased in P fractions of (*iso*)4E-1 plants. However, from these only 79 transcripts decreased their presence in P with a concomitant increase in NP (Group I, translationally inhibited, Table S2) and 47 transcripts increased in P with a concomitant decrease in NP (Group II, translationally enhanced, Table S3) in the absence of eIF(*iso*)4E.

The 79 translationally inhibited transcripts represent potential candidates to be preferentially recruited by eIF(*iso*)4E for their translation. Of these mRNAs, \approx 33% were preferentially expressed in roots and \approx 25% in inflorescences (Figure 2A), similar to the expression pattern reported for eIF(*iso*)4E mRNA (Figure S5). On the other hand, the 47 transcripts translationally enhanced in the absence of eIF(*iso*)4E, which are potential candidates to be preferentially recruited by eIF4E for their translation, were strikingly enriched in mRNAs expressed in inflorescence (64%). According to the gene product cellular component, Group I (translationally inhibited) was also enriched in endomembrane system proteins, whereas Group II (translationally enhanced) included a high number of nuclear factor genes. In Group I of translationally decreased mRNAs, several transporter proteins were found including the phosphate transporter *PHOSPHATE 1* (*PHO1*), the ABC transporter-like *Arabidopsis thaliana* multidrug resistance associated protein 11 (*MRP11*) with ATPase activity, the sucrose transporter 3 (*SUC3*) and five electron transporters (*At1g12570*, *At5g44410*, *At2g20270*, *At3g20950* and, *At4g08455*).

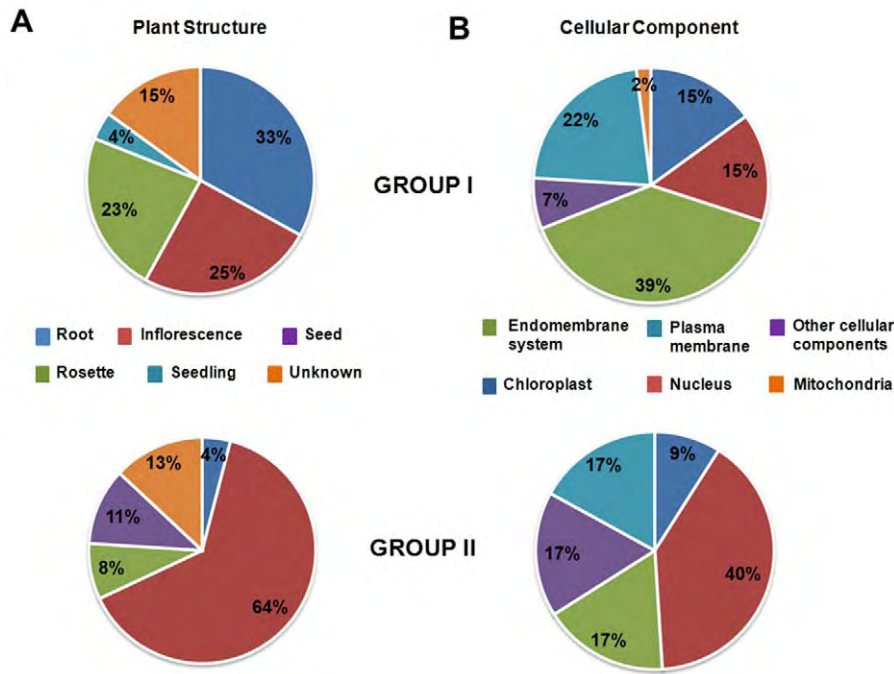


Figure 2. Transcripts differentially translated between WT and *(iso)4E-1* plants are enriched in genes with particular expression and sub-cellular localization patterns. Classification was made according to significant changes ($-1.5 > z\text{-score} > 1.5$) in both, NP and P, fractions obtained from sucrose gradients (Figure S4). Group I is represented by mRNAs with decreased in P and increased in NP levels; Group II includes mRNAs increased in P and decreased in NP. A. Each gene, within the correspondent group, was classified according to the plant structure reported with the highest transcript level using the AtGenexpress Visualization tool (Schmid et al., 2005; TAIR, <http://www.arabidopsis.org/>). B. Classification of translationally changed mRNAs in *(iso)4E-1* according to their subcellular distribution (TAIR, <http://www.arabidopsis.org/>). For the calculation of percentages shown in the graph, only proteins with known subcellular distribution were considered.
doi:10.1371/journal.pone.0031606.g002

Additionally, other plasma membrane and endomembrane system proteins involved in signal transduction and post-translational modification of amino acids were abundant in this group. Genes belonging to Group II included many transcription factors and DNA-binding proteins, as well as two histone acetyl transferases (*At5g56740* and *At1g77540*), translation initiation factor 3 k (*eIF3k*) and the ribosomal protein L12 (*rpL12*). Hence, several of the constituents of Group II may be associated with important changes at transcription level in the *(iso)4E-1* KO mutant.

To separate the effect on transcription from that on translation, Groups I and II of translationally affected mRNAs included only those remaining unchanged at steady-state (total) RNA level. However, the transcriptome analysis accessed by total RNA analysis of the same plants by microarrays, indicated that 496 genes were up-regulated in the *(iso)4E-1* mutant, whereas 296 were repressed with a cutoff of z-score greater than 2 either up or down. Most of the mRNAs that changed corresponded to metabolism and gene information related proteins (Figure S6). Such findings are in accordance with the changes observed in the polyribosomal distribution of transcription factors or DNA binding proteins in the absence of eIF(iso)4E.

Several randomly selected gene IDs from Groups I and II were chosen to confirm the microarray data by real time reverse transcription PCR (qRT-PCR) on a different biological sample. As observed in Table 1, in a qRT-PCR analysis 20 out of 23 assayed mRNAs reproduced the changes observed in the microarray analysis. Three mRNAs from Group I showed a distribution pattern different to the one obtained from microarray data. This suggests about an 87% confidence level for the microarray

analysis. For further analysis, only the mRNAs that were validated by qRT-PCR were considered.

Untranslated region features of group I and group II mRNAs

Previous work with plant eIF4E and eIF(iso)4E as part of their corresponding cap-binding complexes has indicated that they might display selection on mRNA recruitment depending on the 5'UTR length and presence of secondary structure [25,29]. Therefore, we performed computational analysis on mRNAs from Groups I and II to compare their 5'UTR characteristics.

The 5' and 3' UTR regions were downloaded from The Arabidopsis Information Resource (TAIR10: 11/17/10 release) and the longest expressed sequence tag was selected for each UTR. To avoid partial 5' end sequences, further analysis subtracted the gene accessions listed in the Salk-Stanford-PGEC Arabidopsis ORF gene list [33] and they were used to determine their UTR length and characteristics (Table 2). Noticeably, the 5'UTR length and the presence of stable secondary structures were greater for genes belonging to Group II (with expected preferential translation by eIF4E). This is in agreement with *in vitro* experiments performed years ago with wheat eIF4F and eIF(iso)4F complexes [29]. Furthermore, internal initiation (IRES)-like elements, uORFs and uAUGs were more frequent in the same Group of mRNAs, probably due to the length of the 5'UTR. On the contrary, the 3'UTR length showed similar proportion in Group I and II genes. This analysis confirmed that discrimination between mRNAs by plant eIF(iso)4E and eIF4E probably relies on the 5'UTR length and structure, although

Table 1. Quantitation of specific mRNA changes in *(iso)4E-1* Arabidopsis plants.

Accession	Function/Gene Name	Relative mRNA levels					Change
		T ^a	NP ^a	P ^a	NP ^b	P ^b	
At3g23430	Phosphate transport (<i>PHO1</i>)	0.59	1.58	-2.3	1.9	-15.8	Decrease
At4g02950	Ubiquitin family protein	-0.51	2.80	-2.2	-3.1	-6.8	Decrease
At4g20340	Transcription initiation factor (<i>TFIIIE</i>)	1.15	2.95	-2.8	1.0	-6.2	Decrease
At3g55580	Regulator of chromosome condensation, (<i>RCC1</i>)	0.65	2.5	-2.6	-2.6	-4.2	Decrease
At2g02860	Sucrose transporter 3 (<i>SUC3</i>)	0.97	1.6	-1.9	2.2	-3.4	Decrease
At2g30260	Component of the U2 snRNP complex (<i>U2B''</i>)	0.28	2.5	-2.6	5.6	-2.9	Decrease
At1g21630	Calcium ion binding, EF hand protein	-0.64	3.5	-2.6	3.2	-1.5	Decrease
At2g17630	Pyridoxal phosphate (PLP)-dependent transferase	1.25	2.5	-2.2	2.8	-1.4	Decrease
At1g78240	Tumorous shoot development 2 (<i>TSD2</i>)	0.88	1.6	-1.6	1.5	-1.0	Decrease
At2g27940	RING/U-box protein	-0.04	-1.98	1.8	-2.3	15.6	Increase
At2g28600	P-loop containing nucleoside tri-phosphate hydrolase	0.29	-2.09	1.8	-1.3	8.1	Increase
At1g68670	MYB-like transcription factor family	0.55	-1.8	1.8	1.7	4.3	Increase
At4g06746	Transcription factor ERF/AP2 DREB subfamily A-5 (<i>RAP2.9</i>)	1.63	-1.8	2.1	-1.9	1.9	Increase
At3g57600	Transcription factor ERF/AP2 DREB subfamily A-2 (<i>ERF/AP2</i>)	<i>n.d.</i>	-2.5	1.7	-1.5	1.9	Increase
At2g05710	Aconitase (<i>ACO3</i>)	-1.95	-3.2	2.6	-13.3	1.8	Increase
At5g61430	NAC domain containing protein (<i>NAC5</i>)	1.92	-1.8	2.3	-4.9	1.7	Increase
At1g6880	Transcription factor (<i>BRC2</i>)	-0.7	-1.7	1.6	-11.6	1.5	Increase
At4g18720	Transcription factor IIS protein	0.96	-2.7	3.2	-4.3	1.4	Increase
At5g15850	Transcription factor, constans-like 1 (<i>COL1</i>)	<i>n.d.</i>	-2.0	1.7	-2.2	1.3	Increase
At4g33250	Eukaryotic translation initiation factor 3 K (<i>EIF3K</i>)	<i>n.d.</i>	-1.8	2.6	5.1	4.9	Increase
At5g15630	Cobra-like4 (<i>COBL4</i>)	1.57	2.8	-1.6	6.2	1.4	<i>I.c.</i>
At5g01840	Ovate family protein 1 (<i>OPF1</i>)	0.59	3.6	-2.8	2.3	5.1	<i>I.c.</i>
At1g64580	Pentatricopeptide repeat-containing protein (<i>PPR</i>)	0.86	1.6	-2.0	2.7	6.3	<i>I.c.</i>

^amRNAs significantly ($p < 0.001$) changed (± 1.5 cutoff) at both polyribosomal (P) and non-polyribosomal (NP), but not at total (T) RNA levels were considered for quantitation by real time RT-PCR (qRT-PCR). Selection was made randomly.

^bReal time RT-PCR was performed with a different biological sample at the same time point as microarrays (15 day-old seedlings). The results were normalized according to eIF4A control gene and show fold of change of the mRNA level in NP and P separately.

n.d.: not detected.

I.c.: lack of correspondence between microarray and qRT-PCR measurements.

doi:10.1371/journal.pone.0031606.t001

Table 2. Untranslated region (UTR) analysis for mRNAs changed in their polysomal distribution (Group I and II from Figure 2) in the *(iso)4E-1* mutant.

		Group I ^a	Group II ^a	Random selection ^b
5'UTR	≥100 bp length	33	47	43
	<100 bp length	67	53	57
	secondary structure ($\Delta G < -20$ kcal/mol)	25	47	36
	uAUGs	11.5	14.3	-
	uORFs	10	14.3	-
	IRES-like	7.7	14.3	-
3'UTR	≥100 bp length	89	87	83
	<100 bp length	11	13	17
	CPE	2	0	-

^aAll data represent percentages of the total of sequences within the group.

^bRandomly selected *Arabidopsis thaliana* accessions (80) were evaluated for 5' and 3'UTR length and secondary structures to support the significance of percentages for Groups I and II.

uAUGs: upstream AUGs; uORFs: upstream open reading frames; IRES: internal ribosome entry site; CPE: cytoplasmic polyadenylation element.

doi:10.1371/journal.pone.0031606.t002

particular sequences in the 3'UTR having a role in selectivity should not be ruled out.

Effect of expressing AtEF(iso)4E under a 35 S constitutive promoter on the polyribosomal distribution of selected mRNAs

To test whether in the *(iso)4E-2* transgenic line there was an alteration on the polyribosomal distribution of some of the mRNAs shown in Table 1, qRT-PCR was performed on RNA isolated from sucrose gradients performed on different biological samples of 15 day-old seedlings (Figure 3). The transcript corresponding to the translation initiation factor *eIF4A* was used as control mRNA apparently not affected by eIF(iso)4E levels. To evaluate more accurately the distribution of selected mRNAs along the polyribosomal profiles, the NP fraction used for microarray analysis was further divided into monosomes (M) and free ribonucleoproteins, RNPs (NP), whereas the P fraction was divided into low polyribosomes (LP) and high polyribosomes (HP). The mRNA corresponding to the phosphate transporter *PHO1* was shifted to NP and M in the *(iso)4E-1* null mutant whereas it increased in LP and was similar in the HP with respect to WT in the *(iso)4E-2* overexpressing line. This places the *PHO1* mRNA as a strong candidate for eIF(iso)4E dependent translation.

In the absence of eIF(iso)4E, the mRNAs from Group II were modestly enhanced on polysomes (Table 1). Such behavior was reproduced for the transcription factor *ERF/AP2*, which appeared shifted particularly toward the HP fraction in *(iso)4E-1* (Figure 3). On the contrary, in the *(iso)4E-2* overexpressing line this mRNA was increased in the M fraction as compared to the WT profile. These results suggest that the proportion of eIF(iso)4E to eIF4E proteins is relevant for *in vivo* selective mRNA translation.

In the *(iso)4E-1* KO mutant, increased eIF4E protein levels have been reported [26]. Therefore, alterations in eIF4E might also account for the observed shifting of *PHO1* and/or *ERF/AP2* factor in the polyribosomal profile of this mutant. We used a transgenic line overexpressing eIF4E to evaluate the polyribosomal distribution of these mRNAs (Figure S7). The *4E-φ* line presented a slight *PHO1* shift toward the M fraction as compared to WT and did not show changes for the *ERF/AP2* transcription factor distribution along the polyribosomal profile. This further supports the idea that the absence of eIF(iso)4E in the *(iso)4E-1* null mutant is responsible for the observed downregulation of *PHO1* mRNA translation.

PHO1 expression at protein level is altered in eIF(iso)4E mutants

Since *PHO1* is a major phosphate transporter required under phosphate (Pi) deficiency in *Arabidopsis thaliana* [34], we hypothesized

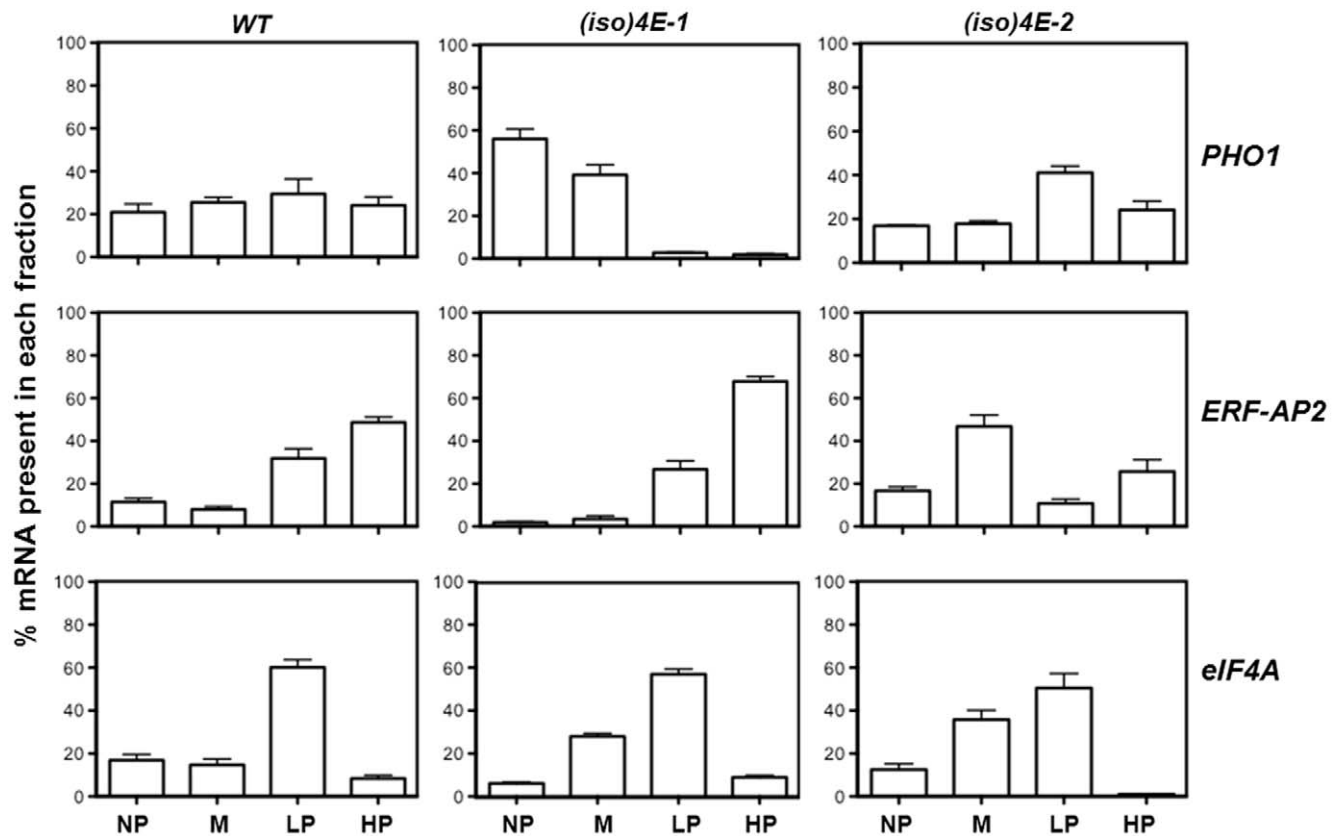


Figure 3. Specific mRNAs show preferential recruitment to polyribosomes depending on eIF(iso)4E levels. The polyribosomal distribution of selected mRNAs was analyzed in the WT, knockout [*(iso)4E-1*] and overexpressing [*(iso)4E-2*] lines at the 15 day-old seedling stage by qRT-PCR. The percentage of mRNA found in free RNP (NP), monosomes (M), low polyribosomes (LP) and high polyribosomes (HP) fractions (collected according to Figure S4) was calculated as described in Material and Methods. *PHO1* reduced its presence in LP and HP fractions in the absence of eIF(iso)4E and increased in LP above the WT level in seedlings overexpressing this eIF4E family member. Transcription factors *ERF/AP2* shifted toward the HP fraction in *(iso)4E-1* and was slightly enriched in the M fraction in *(iso)4E-2* plants as compared to WT. Translation factor *eIF4A* polyribosomal distribution profiles were similar in all *Arabidopsis* lines used in this study, indicating that this transcript was not translationally affected by changes of eIF(iso)4E levels. The data represent average of three independent replicates and bars indicate the standard error. doi:10.1371/journal.pone.0031606.g003

that eIF(iso)4E might have a role under this particular stress. Therefore, we analyzed *PHO1* expression in 15 day-old WT and mutant seedlings transferred for 10 additional days to no (−Pi) or normal (+Pi) phosphate concentration in the medium. As expected, the *PHO1* transcript level was increased in WT phosphate starved plants (Figure S8), indicating that plants were sensing the imposed stress. Interestingly in both, *(iso)4E-1* and *(iso)4E-2*, mutant lines the *PHO1* mRNA levels were similar to WT in the presence of phosphate, but showed only a modest increase under Pi starvation conditions compared to WT suggesting that there might be an indirect effect of eIF(iso)4E levels on transcription or stability of *PHO1* mRNA in response to phosphate starvation. We further analyzed the PHO1 protein levels by western blot in WT and eIF(iso)4E mutant plants under both, +Pi and −Pi conditions (Figure 4). For these experiments seedlings were separated in roots and leaves, since PHO1 is mainly localized in root tissues [35]. Using 30 μg of total root proteins we were able to detect the PHO1 protein under −Pi condition in WT and the *(iso)4E-2* overexpressing mutant, but not in the *(iso)4E-1* KO mutant. Using the same amount of protein from leaves, PHO1 was not detected in accordance with a previous report using the same antibody [35]. Roots overexpressing eIF(iso)4E showed higher accumulation of PHO1 than WT under phosphate deficiency (Figure 4). However, in *(iso)4E-1* roots the PHO1 protein was undetectable. Under normal growth conditions (+Pi) the PHO1 protein levels remained beyond the western blot sensitivity, even for the *(iso)4E-2* overexpressing mutant. Taking into account these results and the previous data on *PHO1* polysomal distribution by qRT-PCR (Figures 3 and S7) we concluded that eIF(iso)4E is required for selective *PHO1* mRNA translation.

The primary root elongation is altered in AtEF(iso)4E mutant plants

Since the PHO1 protein is involved in phosphate uptake and is predominantly expressed in *Arabidopsis* seedling root and lower

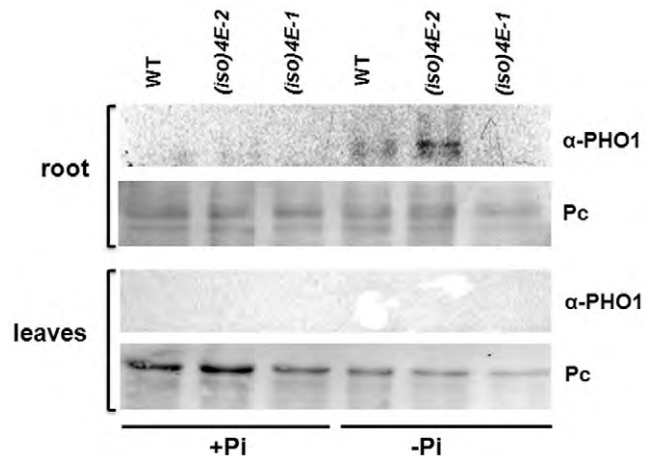


Figure 4. Western blot analysis of PHO1 protein levels in seedlings grown under phosphate sufficiency (+Pi) or deficiency (−Pi). One week -old seedlings from WT, *(iso)4E-1* and *(iso)4E-2* lines were transferred to liquid medium containing 1 mM (+Pi) or 10 μM (−Pi) phosphate and grown for an additional week. After that roots and leaves were carefully separated and total proteins extracted from each tissue. Thirty micrograms of total proteins were used for each sample. A reacting band corresponding to the molecular weight of PHO1 was detected only for roots of WT and the *(iso)4E-2* overexpressing line in the −Pi condition. As protein loading control, a region of the Ponceau stained membrane is shown in the lower panel of each tissue (Pc). doi:10.1371/journal.pone.0031606.g004

hypocotyl, its altered expression levels in *AtEF(iso)4E* mutants may affect the root architecture under normal growth conditions. Analysis of WT and mutant plants, indicated that 25 day-old *(iso)4E-1* seedlings [grown for 15 days on Gamborg's B5 and transferred for 10 additional days on Hoagland (+Pi)] had increased primary root length by 1 cm when compared to WT (Figure 5A). On the contrary, *(iso)4E-2* had a shorter length by approximately 2 cm at the same time. The observed differences were statistically significant at $p < 0.001$. The shorter root phenotype was reproducibly observed for three independent transgenic lines expressing *AtEF(iso)4E* under a constitutive S35 promoter, ruling out that the altered root growth might be a result of a particular transgene insertion site (Figure S9).

Inhibition of primary root growth is a characteristic plant phosphate starvation response [36]. Therefore, we tested the behavior of eIF(iso)4E mutant seedlings under phosphate deficiency compared to WT. Strikingly, there were no obvious differences in primary root length between WT and either *(iso)4E-1* or *(iso)4E-2* seedlings in phosphate starvation (Figure 5B). Statistical analysis indicated that the low phosphate concentration reduced more the primary root growth in *(iso)4E-1* than WT ($p < 0.001$), whereas there was only a slight reduction in growth of an already shorter *(iso)4E-2* root ($p < 0.05$). Hence, the effect on root growth observed under altered eIF(iso)4E levels was surpassed by the condition of Pi deficiency.

Discussion

The presence of multiple eIF4E family members is widespread in eukaryotes including plants. Two different proteins, eIF4E and eIF(iso)4E, have been shown to participate in plant translation initiation through cap-binding of the mRNAs and recruiting other initiation factors [18]. Whether their role is redundant or specialized has remained obscure. Here, the physiological relevance of eIF(iso)4E was analyzed using two *Arabidopsis* mutants, one containing an insertion in the second exon of the gene with null expression of the protein, the other expressing a fusion protein eIF(iso)4E-GFP under a constitutive promoter in a WT background. The KO mutant, *(iso)4E-1*, was previously characterized [26] indicating no obvious phenotype except for enhanced potyviral resistance. Additionally, eIF4E was reported at increased levels in this mutant suggesting that it may fulfill the lacking eIF(iso)4E function. In this work we identified differentially translated mRNAs in the *(iso)4E-1* mutant by examining non-polyribosomal (NP), polyribosomal (P) and total RNA fractions using DNA microarray and qRT-PCR. Specifically, 79 transcripts decreased their levels in P fractions with a concomitant increase in the NP fractions (Group I) and 47 transcripts increased in P simultaneously with a decrease in NP (Group II) without changes in their total RNA levels. Only one mRNA in group II showed a change in its steady-state RNA level in addition to a change in polyribosomal distribution. It was excluded from the analysis since in this case we could not separate the effect of transcription from that of translation. However this mRNA and others, whose translational behavior might have been obscured by important transcriptional changes in the mutant were not included in this study and could also be candidates for eIF(iso)4E selective translation.

The quantitative RT-PCR analysis performed for a limited number of genes confirmed a wide range of the changes between NP and P fractions (Table 1). These results indicate that the presence of eIF(iso)4E, in addition to eIF4E, is required in the plant to achieve translational recruitment of some mRNAs. A computational analysis of the UTR regions of transcripts from

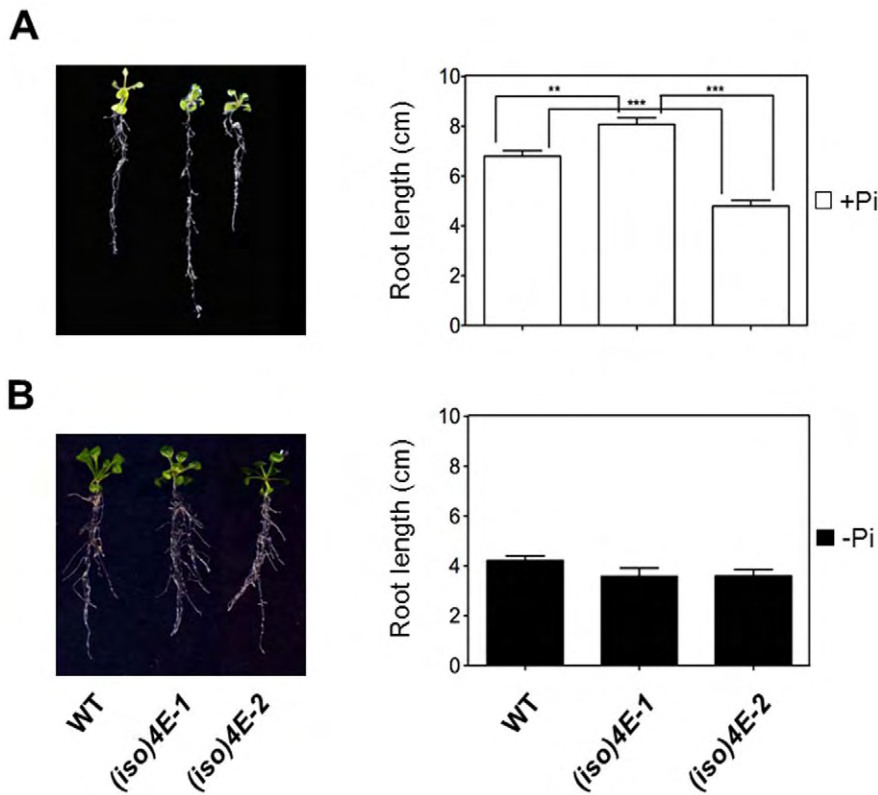


Figure 5. The eIF(iso)4E absence or overexpression is associated with root length alteration in *Arabidopsis thaliana*. Plants from wild type Col-0 [WT], knockout [(iso)4E-1] and overexpressing [(iso)4E-2] lines were grown on Gamborg's B5 for 15 days and then transferred for 10 days to Hoagland medium supplemented with (+Pi) or without (-Pi) phosphate in squared Petri dishes placed vertically in a growth chamber. Data are shown as the mean of 9 biological replicates with 3 technical replicates of each one, with error bars indicating the standard error. One way ANOVA with Tukey's Multiple Comparison Test with a p value < 0.05 was used. Significant differences in primary root length between the 3 lines are indicated by asterisks (**, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$). **A.** In the presence of phosphate, the (iso)4E-1 primary root was significantly larger than WT ($p < 0.01$), whereas (iso)4E-2 was significantly shorter than WT and (iso)4E-1 ($p < 0.001$). **B.** After 10 days under phosphate deficiency, the primary root of all three lines was significantly shorter than the correspondent to plants grown in control conditions and did not display significant differences between lines. doi:10.1371/journal.pone.0031606.g005

Group I and II confirmed that they differ principally in their 5'UTR length and secondary structure. This is in accordance with previous in vitro studies showing that eIF(iso)4E and eIF4E, each in their correspondent eIF(iso)4F and eIF4F complex, are able to discriminate the length and frequency of secondary structure in the 5'UTR of a mRNA [29] and consequently to promote translation initiation at different rates [5,25]. The fact that in the absence of eIF(iso)4E some mRNA recruitment to polyribosomal fractions become enhanced indicates that they mostly depend on eIF4E and the correspondent eIF4F Cap-binding complex for translation initiation. Translation initiation factors, such as eIF4A, eIF4B, eIF3, and others are shared between eIF4F and eIF(iso)4F for translation initiation. Since their presence per se in the initiation complex may also have different impact on selective mRNA translation, an enrichment of these factors particularly for the eIF4F complex in the absence of eIF(iso)4E might also account for the observed mRNA translation enhancement.

According to the developmental stage at which the microarray analysis was performed, it was interesting to notice that in (iso)4E-1 most of the translationally affected transcripts represented root expression and endomembrane system proteins, whereas those translationally enhanced were inflorescence-expressed and transcription factors. Available data on eIF4E and eIF(iso)4E expression patterns are indicative of preferential, albeit not exclusive, localization of the eIF(iso)4E protein in young roots,

whereas eIF4E is more ubiquitously distributed [37]. This may explain why the absence of eIF(iso)4E mostly affected translation of mRNAs expressed in roots. The candidate for eIF(iso)4E preferential translation, PHO1, showed enhanced translation in the (iso)4E-2 mutant, where eIF(iso)4E was expressed under a constitutive S35 promoter, whereas ERF/AP2 whose translation was increased in the absence of eIF(iso)4E, slightly decreased its presence in polyribosomal fractions. This observation supports the notion that some mRNAs may be particularly sensitive to eIF(iso)4E levels when they have to compete with other transcripts for their translation. In addition, a particular localization of each eIF4E class I protein at the tissue and/or sub-cellular level may account for the observed translational preference of mRNAs. The last has been the case of eIF4E family members from other organisms, such as *Caenorhabditis elegans* [11,14] and *Drosophila melanogaster* [16].

Since several root-expressed mRNAs changed their translation profile in the absence of eIF(iso)4E, a logical assumption was to look more closely to the root morphology of 15 day-old *Arabidopsis* WT and mutant seedlings. The previous (iso)4E-1 mutant characterization had not observed the phenotype of roots [26] and we didn't expect obvious defects in root development, since it is closely related to leaf development which proceeds normally in the absence of eIF(iso)4E. However, a consistent and statistically significant larger primary root was observed for 15

day-old seedlings and more lateral root growth was often detected. In addition, for three independent lines expressing eIF(iso)4E under a constitutive promoter, a statistically significant shorter primary root was characteristic. Searching for genes involved in root elongation within the genes corresponding to mRNAs whose polyribosomal distribution was changed in the microarray analysis of (iso)4E-1, we found several accessions in Group I related to altered primary root elongation. These include PHO1, the BTB/POZ domain containing protein At4g08455, the EXTENSIN 3 (EXT3) and the polysaccharide binding protein COBRA-LIKE 4 (COBL4), although the changes of COBL4 were not reproduced in the qRT-PCR experiment. In addition, other proteins whose translation was enhanced in the mutant (Group II) may have contributed to the observed phenotype under normal growth conditions.

The change in specific mRNA polyribosomal distribution in (iso)4E-1, such as that corresponding to PHO1, lead us to propose that eIF(iso)4E might be particularly required during stress conditions such as phosphate deficiency, where PHO1 protein levels are crucial [34]. In WT plants, the PHO1 protein is particularly detected in roots when phosphate availability becomes limiting ([35]; Figure 4). We found that the (iso)4E-1 roots did not show the characteristic PHO1 protein increase upon the $-P_i$ stress, whereas (iso)4E-2 presented higher than WT PHO1 protein levels. This further supports the role of eIF(iso)4E in selective PHO1 mRNA translation.

The availability of soil nutrients can alter root development [36]. Phosphate deficiency induces the formation of lateral roots and inhibits root elongation to achieve a dense, highly branched root system. Inhibition of the cell cycle, low auxin concentrations in the root apical meristems and the expression of phosphate transporter genes result in a root system highly adapted for efficient uptake of P_i . Contrary to our observation on root development in the presence of P_i , we found that the (iso)4E-1 and (iso)4E-2 primary root length was similar to WT after 10 days in the absence of P_i . In addition, none of the eIF(iso)4E mutants showed altered root hair formation with respect to WT roots under control or phosphate limitation conditions. These observations indicate that the regulatory mechanisms in response to phosphate limitation overrule the alterations imposed by a possible unusual eIF4E/eIF(iso)4E proportion in the root.

Regarding a correlation between the *PHO1* altered translational distribution in (iso)4E-1 and (iso)4E-2 mutants and the observed root phenotype, it may exist or not. A couple of recent publications have shown very interesting new concepts about the *PHO1* role in the P_i deficiency related-phenotype and an influence of its transcript expression levels on P_i efflux and cell growth [35,38]. Two major observations derived from these reports: (1) the plant response to P_i deficiency involves a major gene expression reprogramming responsible for the observed phenotypes under this stress which is independent of the *PHO1* levels, and (2) an increase in the *PHO1* transcript levels in shoot induces major P_i efflux from the cell toward the vascular system with a concomitant cell growth reduction. Taking this into account, changes in *PHO1* translational levels under normal growth conditions in the eIF(iso)4E mutants used in this study may have contributed, in addition to other gene expression alterations, to the root growth phenotype.

Overall the results obtained here indicate that selective translation by altering the eIF(iso)4E levels and correspondingly its proportion relative to eIF4E is much more complex, than simply assuming that each factor specifically recruits different group of mRNAs to the ribosome. In addition to the preference of each factor for a particular 5'UTR, eIF4G or eIF(iso)4G within

the eIF4F and eIF(iso)4F cap-binding complexes, other translation factors or regulatory proteins, probably account for the plasticity in the translation profile of a given mRNA in response to stress conditions.

Methods

Plant materials

Seeds of wild type (WT) *Arabidopsis thaliana* ecotype Columbia (Col-0) were obtained from the Arabidopsis Biological Resources Center (ABRC) at Ohio State University. The transposon insertion mutant for the eIF(iso)4E gene, (iso)4E-1, was kindly donated by Dr. Christophe Robaglia from CNRS-CEA Université de la Méditerranée, France. Transgenic lines expressing eIF(iso)4E as GFP fusion protein under the constitutive Cauliflower Mosaic Virus (CaMV) 35 S were generated using the Gateway® cloning technology (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA). The DNA coding region of eIF(iso)4E or eIF4E was first amplified by PCR with the appropriate primers and then cloned into pTOPO-D vector (Invitrogen). Finally, the coding region was introduced by recombination with LR clone (Invitrogen) into the pEarley-Gate103 binary vector [39] as a destination vector. Positive recombinant was confirmed by DNA sequencing. The plasmid, bearing the fusion gene and the ammonium glufosinate (BASTA) resistance gene (Figure S1), was introduced into the GV3101 *Agrobacterium tumefaciens* strain, and used to transform Col-0 plants by floral dip transformation [40]. Several independent homozygous lines were isolated by their BASTA resistance and self-fertilized for at least three generations prior to use. The plant line (iso)4E-2 was selected as representative for the experiments based on mRNA expression levels (Figure S1). The same procedure was followed for eIF4E overexpressing transgenic lines and one of them (4E- ϕ) was selected for some experiments as described in results.

Growth conditions

All reagents were from Sigma-Aldrich Quimica, Mexico unless otherwise stated. *Arabidopsis thaliana* seeds were surface-sterilized in Tween 20 (0.1%) and sodium hypochlorite 20% for 10 minutes and rinsed 5 times with sterile deionized water. The seeds were spread on sterile 0.7% (w/v) agar (Becton Dickinson, Mexico) containing Gamborg's B5 minimal medium with 1% sucrose. The seeds were stratified at 4°C in the dark (Petri dish wrapped in two layers of aluminum foil) for two days and then grown for 15 days at 20°C under 100 μ mol m⁻² sec⁻¹ light intensity in a 8/16 hr light/dark photoperiod.

Plants used for protein analysis were grown for one week in a medium containing half-strength Murashige-Schoog (MS), 1% sucrose and 0.6% gellan. Then, seedlings were transferred to a liquid medium containing 1% sucrose, 2.5 mM KNO₃, 100 μ M Ca(NO₃)₂, 1 mM MgSO₄, 25 μ M Fe-EDTA, 14 μ M MnCl₂, 0.5 μ M CuSO₄, 1 μ M ZnSO₄, 70 μ M H₃BO₃, 0.2 μ M NaMoO₄ and 10 μ M NaCl (final pH 5.7) supplemented with either 1 mM (+ P_i) or 10 μ M ($-P_i$) KH₂PO₄.

For root phenotype studies, seeds were grown in Gamborg's B5 solid medium for two weeks and afterwards transferred to Hoagland medium containing 6 mM KNO₃, 4 mM Ca(-NO₃)₂·H₂O, 2 mM MgSO₄·7H₂O, 0.009 mM MnCl₂·4H₂O, 0.046 mM H₃BO₃, 0.0008 mM ZnSO₄·7H₂O, 0.0003 mM CuSO₄·5H₂O, 0.0001 mM H₂MoO₄·H₂O, 0.005 g/ml Fe-EDTA and 0.5 mM NH₄H₂PO₄ as a phosphate source (+ P_i), or Hoagland medium including all of the above except for the 0.5 mM NH₄H₂PO₄ which was substituted by 0.5 mM (NH₄)₂SO₄ ($-P_i$) for 10 days.

Root length analysis

To scan root development, *Arabidopsis thaliana* seeds were grown in square Petri dishes oriented vertically. At 20 days after germination the plants were carefully removed from the medium and the primary root length was measured using digital ruler (ImageJ). Five plants per line (WT, (iso)4E-1 and (iso)4E-2 mutants) were tested per experiment, and the experiment was repeated 9 times. To analyze the effect of phosphate deficiency on root development, *Arabidopsis* seeds were germinated on Gamborg's B5 for 2 weeks and then transferred to Hoagland medium containing phosphate (+Pi) or without phosphate (−Pi) as described above. Five plants per line were tested per experiment, and the experiment was repeated 5 times. All data were analyzed by one way ANOVA with Tukey's Multiple Comparison Test using a p value < 0.05.

Protein extraction and Western blot analysis

Total protein extracts were prepared by homogenizing frozen leaf or root material in extraction buffer [100 mM HEPES pH 7.5, 5% v/v glycerol, 50 mM KCl, 5 mM EDTA, 5 mM NaF, 0.1% v/v Triton X-100, 1 mM DTT and one Complete EDTA-free protease inhibitor cocktail tablet (Roche Molecular Diagnostics, Pleasanton, CA, USA) per 50 ml] in the ratio of 2 g of tissue to 3 ml buffer. The samples were centrifuged at 13 000 g for 15 min and clear supernatants were collected. The protein concentration was determined using Bradford reagent (Bio-Rad Laboratories, Inc. Hercules, CA) and bovine serum albumin (BSA) as the standard. For cap-binding protein purification, the protocol from [20] was followed. The eIF(iso)4E-GFP fusion protein was purified using the MagneHis system (Promega Corp., Madison, WI, USA).

Thirty micrograms of total protein were separated by SDS-PAGE and electroblotted onto polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane (Millipore Corp., Billerica, MA, USA), which was blocked with 5% (w/v) milk in PBS-Tween and incubated with the primary antibody overnight at 4°C. Rabbit antibodies to *Arabidopsis* eIF4E and eIFiso4E were kindly provided by Dr. Karen Browning (Department of Chemistry and Biochemistry, University of Texas at Austin, TX) and used at 1:10,000 dilution. Rabbit antiserum against *Arabidopsis* PHO1 was kindly donated by Prof. Yves Poirier (Département de Biologie Moléculaire Végétale, Université de Lausanne, Switzerland) and used at 1:1,000 dilution. The secondary antiserum was used at 1:10,000 dilution and incubation for 1.5 h at room temperature. Blots were developed with Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore Corp.).

Polyribosomal Gradients

Two grams of 15 day-old *Arabidopsis thaliana* seedlings were crushed with liquid nitrogen and homogenized in 2 ml of lysis buffer consisting of 200 mM Tris-HCl, 50 mM KAc, 25 mM MgAc, 2 mM EGTA 2, 2% PTE (10 Tridecyl Polyoxyethylene ether), 1% Nonidet P-40, now IGEPAL and 50 mg/ml cycloheximide. After the lysis, samples were centrifuged for 15 min at 12,000 g at 4°C. The supernatant was placed on 60% sucrose in gradient buffer containing 50 mM Tris-HCl, 20 mM KAc, 2 mM EGTA and 50 mg/ml cycloheximide and centrifuged in a Beckman 75Ti rotor at 50,000 rpm for 3 hours at 4°C. The pellet was dissolved in 400 μ l of DEPC water, layered onto 20 to 60% sucrose continuous gradient and centrifuged in a Beckman SW40 rotor at 36,000 rpm for 2.5 h at 4°C. The gradient was fractionated with continuous monitoring of the absorbance at 260 nm.

RNA isolation

For total RNA isolation, 100 mg of 15 day-old seedlings were crushed with liquid N₂ and homogenized in Trizol[®] Reagent (Invitrogen). Chloroform was added at 1/6 (v/v), the mixture was vortexed and then centrifuged at 12,000 g for 15 min at 4°C. The colorless upper aqueous phase was carefully collected and precipitated with 1 volume of isopropanol at room temperature. After centrifugation at 12,000 g for 20 min at 4°C, the RNA pellet was washed with 75% ethanol, the ethanol removed by an additional round of centrifugation and the RNA dissolved in 50 μ l of diethyl pyrocarbonate (DEPC)-treated water.

For RNA isolation from sucrose gradient fractions, each fraction was treated with 0.5% sodium dodecyl sulfate (SDS) and 20 μ g/ml proteinase K (Sigma), then extracted twice with an equal volume of phenol/chloroform/isoamyl alcohol [25:24:1 (v/v/v)] by vortexing. The mixture was centrifuged at 10,000 g for 5 min at 4°C. The aqueous phase was brought to 1.5 M with 10 M LiCl and an equal volume of cold isopropanol was added. The RNA was precipitated at −20°C for 1 h and centrifuged at 12,000 g for 15 min at 4°C. The pellet was washed with 70% ethanol and dissolved in 30 μ l of DEPC-treated water.

Total or fractionated RNA was quantified at 260 nm and its integrity was analyzed on a denaturing agarose gel. The fractionated RNA was pooled in non-polyribosomal (NP) and polyribosomal (P) according to its electrophoretic pattern and the A₂₆₀ profile of the sucrose gradient (Figure S3).

Microarrays

Microarray slides were fabricated by the University of Arizona using the Qiagen-Operon *Arabidopsis* Genome Array Ready Oligo Set (AROS V.3.0) containing 29,000 oligonucleotides (<http://www.arizona.edu/microarray/>). For pre-hybridization, the slides were re-hydrated with water vapor at 60°C, and fixed with two cycles of UV light (1200J). After boiling for two minutes at 92°C, slides were washed with 95% ethanol for one minute and pre-hybridized in 5 × SSC, 0.1% SDS and 1% BSA for one hour at 42°C. The slides were washed and dried for further hybridization. Ten μ g of RNA were used for cDNA synthesis incorporating dUTP-Alexa₅₅₅ or dUTP-Alexa₆₄₇ by the First-Strand cDNA labeling kit (Invitrogen). Incorporation of the fluorophores (dUTP-CY5 and dUTP-CY3) was analyzed by the absorbance at 555 nm for Alexa₅₅₅ and 650 nm for Alexa₆₄₇. Equal quantities of labeled cDNA were hybridized using UniHyb (TeleChem International INC) to the arrays for 14 h at 42°C. Two replicate experiments were performed with RNA obtained from independent plant groups.

Data acquisition and analysis of array images

Acquisition and quantification of array images was performed in ScanArray 4000 with its accompanying software ScanArray 4000 from Packard BioChips. All images were captured using 65% PMT gain, 70 to 75% laser power and 10 μ m resolution at 50% scan rate. For each spot the Alexa₅₅₅ and Alexa₆₄₇ density mean value and the background mean value were calculated with software ArrayPro Analyzer from Media Cybernetics. Microarray data analysis was performed with free software genArise, developed in the Computing Unit of Cellular Physiology Institute of UNAM (<http://www.ifc.unam.mx/genarise/>). GenArise carry out a number of transformations: background correction, Lowess normalization, intensity filter, replicates analysis and selecting differentially expressed genes. The goal of genArise is to identify which of the genes show good evidence of being differentially expressed. The software identifies differentially expressed genes by calculating an intensity-dependent z-score. It uses a sliding window

algorithm to calculate the mean and standard deviation within a window surrounding each data point, and define a z-score where z measures the number of standard deviations from the mean: $z_i = [R_i - \text{mean}(R)] / \text{sd}(R)$, where z_i is the z-score for each element, R_i is the log-ratio for each element, and $\text{sd}(R)$ is the standard deviation of the log-ratio. With this criterion, the elements with a z-score >1.5 standard deviations would be the significantly differentially expressed genes. All detailed protocols and data can be accessed online at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE29386>.

Quantitative real time PCR (qRT-PCR)

Two micrograms of RNA were treated with RQ1 DNase (Promega Corp., Madison, WI, USA) and subjected to reverse transcription using M-MLV-RT (Invitrogen). The PCR was performed with gene-specific primers designed in the MacVector program (nucleotide sequences of gene-specific primers for SYBR Green analysis can be viewed in Table S1). The amplification was performed in a 7500 DNA analyzer (Applied Biosystems, Foster, CA) using the SYBR[®] Green PCR master mix (Applied Biosystems) for signal detection. To normalize the total amount of cDNAs present in reactions from total RNA source, the 18 S rRNA gene was co-amplified as control. The R value (relative expression of the gene) was calculated using the following equation: $R = [(E_{\text{genX}})^{\Delta C_{\text{tgenX}}} (\text{WT} - \text{mutant})] / [(E_{\text{Hkp}})^{\Delta C_{\text{tHkp}}} (\text{WT} - \text{mutant})]$, where E is the efficiency, genX is the gene in study and Hkp is the control gene (18 S). The concentrations of individual mRNAs were calculated by the $2^{-\Delta C_{\text{t}}}$ method described previously [14]. To analyze the distribution of selected mRNAs in polysomes separated by sucrose gradients the percentage of the RNA in NP and P fractions was determined according to the sum of the same RNA in all fractions as total.

UTR analysis

The 5' and 3' UTR regions, based on the longest expressed sequence tags, were downloaded for mRNAs translationally affected in the *(iso)4E-1* mutant using The Arabidopsis Information Resource (TAIR10: 11/17/10 release). The sequences present in the Salk-Stanford-PGEC Arabidopsis ORF gene list [33] were used to determine their UTR length, presence and stability of secondary structures in the 5'UTR [41]; <http://mfold.rut.albany.edu>, and the presence of uORFs, uAUGs, IRES-like sequences and CPE elements by UTRScan (<http://www.ba.itb.cnr.it/BIG/UTRScan>) and RegRNA (<http://regrna.mbc.nctu.edu.tw>).

Supporting Information

Figure S1 Molecular characterization of eIF(iso)4E overexpressing *Arabidopsis thaliana* transgenic plants. (PDF)

Figure S2 Protein structural modeling of eIF(iso)4E-GFP. (PDF)

Figure S3 GFP localization in transgenic plants. (PDF)

References

- Jackson RJ, Hellen CU, Pestova TV (2010) The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11: 113–127.
- Fischer PM (2009) Cap in hand: targeting eIF4E. *Cell Cycle* 8: 2535–2541.
- Joshi B, Lec K, Maeder DL, Jagus R (2005) Phylogenetic analysis of eIF4E-family members. *BMC Evol Biol* 5: 48–68.

Figure S4 Sucrose gradient sedimentation profiles. (PDF)

Figure S5 eIF(iso)4E expression patterns in different *Arabidopsis thaliana* tissues and developmental stages. (PDF)

Figure S6 Classification of transcripts significantly changed at steady-state level in the *(iso)4E-1* mutant according to the biological process where they are involved. (PDF)

Figure S7 Polyribosomal distribution of selected mRNAs in an eIF4E overexpressing transgenic line. (PDF)

Figure S8 Increase in *PHO1* transcript level in response to phosphate deficiency. (PDF)

Figure S9 Primary root length in three independent transgenic *Arabidopsis* lines overexpressing eIF(iso)4E. (PDF)

Table S1 List of oligonucleotides used as primers for real time RT-PCR (qRT-PCR). (PDF)

Table S2 List of mRNAs identified by microarray analysis that significantly decreased their levels in polyribosomes (P) and increased in non-polyribosomes (NP) in the *(iso)4E-1* mutant. (PDF)

Table S3 List of mRNAs identified by microarray analysis that significantly increased their levels in polyribosomes (P) and decreased in non-polyribosomes (NP) significantly in the *(iso)4E-1* mutant. (PDF)

Acknowledgments

We appreciate the technical assistance of José Santillán Torres, Simón Guzmán León and Lorena Chávez González, as well as discussions about the microarray experimental design and results analysis with Dr. Jorge Ramírez from the Microarray Facility at Instituto de Fisiología Celular-UNAM, México. The authors also wish to thank Dr. Christophe Robaglia from CNRS-CEA Université de la Méditerranée, France, for the *(iso)4E-1* mutant, Prof. Yves Poirier from Université de Lausanne for the PHO1 antiserum, and Dr. Karen Browning from the University of Texas at Austin for antibodies against eIF(iso)4E and eIF4E, as well as for valuable comments on the manuscript. We are grateful to Dr. Felipe Cruz from Facultad de Química-UNAM, Mexico, for helpful suggestions on statistical analysis and Dr. Rodrigo Gomez-Toro for valuable help in modeling the protein structure of eIF(iso)4E-GFP.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: TDD AVMS. Performed the experiments: AVMS CAM CEFT TDD. Analyzed the data: TDD AVMS NDAR. Wrote the paper: TDD AVMS.

6. Kaye NM, Emmett KJ, Merrick WC, Jankowsky E (2009) Intrinsic RNA binding by the eukaryotic initiation factor 4F depends on a minimal RNA length but not on the m7G cap. *J Biol Chem* 284: 17742–17750.
7. Rhoads RE (2009) eIF4E: New Family Members, New Binding Partners, New Roles. *J Biol Chem* 284: 16711–16715.
8. Sonenberg N, Hinnebusch AG (2007) New modes of translational control in development, behavior, and disease. *Mol Cell* 28: 721–729.
9. Hernandez G, Vazquez-Pianzola P (2005) Functional diversity of the eukaryotic translation initiation factors belonging to eIF4 families. *Mech Dev* 122: 865–876.
10. Keiper BD, Lamphear BJ, Deshpande AM, Jankowska-Anyszka M, Aamodt EJ, et al. (2000) Functional characterization of five eIF4E isoforms in *Caenorhabditis elegans*. *J Biol Chem* 275: 10590–10596.
11. Amiri A, Keiper BD, Kawasaki I, Fan Y, Kohara Y, et al. (2001) An isoform of eIF4E is a component of germ granules and is required for spermatogenesis in *C. elegans*. *Development* 128: 3899–3912.
12. Syntichaki P, Troulinaki K, Tavernarakis N (2007) eIF4E function in somatic cells modulates ageing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 445: 922–926.
13. Song A, Labella S, Korneeva NL, Keiper BD, Aamodt EJ, et al. (2010) A *C. elegans* eIF4E-family member upregulates translation at elevated temperatures of mRNAs encoding MSH-5 and other meiotic crossover proteins. *J Cell Sci* 123: 2228–2237.
14. Dinkova TD, Keiper BD, Korneeva NL, Aamodt EJ, Rhoads RE (2005) Translation of a small subset of *Caenorhabditis elegans* mRNAs is dependent on a specific eukaryotic translation initiation factor 4E isoform. *Mol Cell Biol* 25: 100–113.
15. Ptushkina M, Malys N, McCarthy JE (2004) eIF4E isoform 2 in *Schizosaccharomyces pombe* is a novel stress-response factor. *EMBO Rep* 5: 311–316.
16. Cho PF, Poulin F, Cho-Park YA, Cho-Park IB, Chicoine JD, et al. (2005) A new paradigm for translational control: inhibition via 5′-3′ mRNA tethering by Bicoid and the eIF4E cognate 4EHP. *Cell* 121: 411–423.
17. Hernandez G, Altmann M, Sierra JM, Urlaub H, Diez del Corral R, et al. (2005) Functional analysis of seven genes encoding eight translation initiation factor 4E (eIF4E) isoforms in *Drosophila*. *Mech Dev* 122: 529–543.
18. Browning KS (2004) Plant translation initiation factors: it is not easy to be green. *Biochemical Society Transactions* 32: 589–591.
19. Rodriguez CM, Freire MA, Camilleri C, Robaglia C (1998) The *Arabidopsis thaliana* cDNAs coding for eIF4E and eIF(iso)4E are not functionally equivalent for yeast complementation and are differentially expressed during plant development. *Plant J* 13: 465–473.
20. Bush MS, Hutchins AP, Jones AM, Naldrett MJ, Jarmolowski A, et al. (2009) Selective recruitment of proteins to 5′ cap complexes during the growth cycle in *Arabidopsis*. *Plant J* 59: 400–412.
21. Dinkova TD, Sanchez de Jimenez E (1999) Differential expression and regulation of translation initiation factors 4E and -iso4E during maize germination. *Physiol Plant* 107: 419–425.
22. Dinkova TD, Aguilar R, Sanchez de Jimenez E (2000) Expression of maize eukaryotic initiation factor (eIF) iso4E is regulated at the translational level. *Biochem J* 351: 825–831.
23. Dinkova TD, Aguilar R, Sanchez de Jimenez E (2003) Translational control by differential CAP-dependency in selected subpopulations of maize stored mRNAs. In: Nicolas G, Bradford KJ, Come D, Pritchard HW, eds. *The Biology of Seeds: Recent Research Advances*. CAB International, pp 181–189.
24. Dinkova TD, Marquez-Velazquez NA, Aguilar R, Lazaro-Mixteco P, Sanchez de Jimenez E (2011) Tight translational control by the initiation factors eIF4E and eIF(iso)4E is required for maize seed germination. *Seed Science Research* 21: 85–93.
25. Gallie DR, Browning KS (2001) eIF4G functionally differs from eIFiso4G in promoting internal initiation, cap-independent translation, and translation of structured mRNAs. *J Biol Chem* 276: 36951–36960.
26. Duprat A, Caranta C, Revers F, Menand B, Browning KS, et al. (2002) The *Arabidopsis* eukaryotic initiation factor (iso)4E is dispensable for plant growth but required for susceptibility to potyviruses. *Plant J* 32: 927–934.
27. Lellis AD, Allen ML, Aertker AW, Tran JK, Hillis DM, et al. (2010) Deletion of the eIFiso4G subunit of the *Arabidopsis* eIFiso4F translation initiation complex impairs health and viability. *Plant Mol Biol* 74: 249–263.
28. Nicaise V, Gallois JL, Chafiai F, Allen LM, Schrudi-Levrard V, et al. (2007) Coordinated and selective recruitment of eIF4E and eIF4G factors for potyvirus infection in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett* 581: 1041–1046.
29. Carberry SE, Goss DJ (1991) Wheat germ initiation factors 4F and (iso)4F interact differently with oligoribonucleotide analogues of rabbit α -globin mRNA. *Biochemistry* 30: 4542–4545.
30. Hruz T, Laule O, Szabo G, Wessendorp F, Bleuler S, et al. (2008) Genevestigator V3: a reference expression database for the meta-analysis of transcriptomes. *Advances in Bioinformatics* 2008, pp 420747.
31. Kawaguchi R, Girke T, Bray EA, Bailey-Serres J (2004) Differential mRNA translation contributes to gene regulation under non-stress and dehydration stress conditions in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 38: 823–839.
32. Lodish HF (1974) Model for the regulation of mRNA translation applied to haemoglobin synthesis. *Nature* 251: 385–388.
33. Yamada K, Lim J, Dale JM, Chen H, Shinn P, et al. (2003) Empirical analysis of transcriptional activity in the *Arabidopsis* genome. *Science* 302: 842–846.
34. Hamburger D, Rezzonico E, MacDonald-Comber Petetot J, Somerville C, Poirier Y (2002) Identification and characterization of the *Arabidopsis* PHO1 gene involved in phosphate loading to the xylem. *Plant Cell* 14: 889–902.
35. Stefanovic A, Arpat AB, Bligny R, Gout E, Vidoudez C, et al. (2011) Overexpression of PHO1 in *Arabidopsis* leaves reveals its role in mediating phosphate efflux. *Plant J* 66: 689–699.
36. Lopez-Bucio J, Cruz-Ramirez A, Herrera-Estrella L (2003) The role of nutrient availability in regulating root architecture. *Curr Opin Plant Biol* 6: 280–287.
37. Baerenfaller K, Grossmann J, Grobei MA, Hull R, Hirsch-Hoffmann M, et al. (2008) Genome-scale proteomics reveals *Arabidopsis thaliana* gene models and proteome dynamics. *Science* 320: 938–941.
38. Rouached H, Stefanovic A, Secco D, Bulak Arpat A, Gout E, et al. (2011) Uncoupling phosphate deficiency from its major effects on growth and transcriptome via PHO1 expression in *Arabidopsis*. *Plant J* 65: 557–570.
39. Earley KW, Haag JR, Pontes O, Opper K, Juehne T, et al. (2006) Gateway-compatible vectors for plant functional genomics and proteomics. *Plant J* 45: 616–629.
40. Clough SJ, Bent AF (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 16: 735–743.
41. Zuker M (2003) Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res* 31: 3406–3415.

MECANISMOS DE REGULACIÓN TRADUCCIONAL MEDIADOS POR EL FACTOR DE INICIO 4E: LAS DOS CARAS DE LA MONEDA*

Ana Valeria Martínez Silva y Tzvetanka D. Dinkova

Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México,
04510 México D.F. Correo E: cesy@servidor.unam.mx

RESUMEN

Casi todos los mRNA eucariontes poseen una estructura llamada CAP en su extremo 5' (m⁷GpppN, donde N es cualquier nucleótido) reconocida por el factor de inicio de la traducción eIF4E y proteínas similares para facilitar su exportación nuclear, determinar su localización citoplasmática y permitir su traducción eficiente. La interacción entre el CAP y eIF4E, así como la unión de otras proteínas determina en gran medida el destino del mRNA recién transcrito: traducción, almacenamiento, o degradación, dependiendo de los estímulos externos celulares y las señales de desarrollo. La presencia de diferentes miembros de la familia eIF4E, su especificidad por diferentes tipos de estructura CAP, expresión selectiva y afinidades por diferentes proteínas constituye un mecanismo fino adicional para la regulación de la expresión genética mediada por este factor.

ABSTRACT

The CAP structure present at the 5' end of eukaryotic mRNAs (m⁷GpppN, where N is any nucleotide) is recognized by translation initiation factor eIF4E and similar proteins to allow nuclear export, particular localization and efficient translation initiation of the transcripts. Interaction of eIF4E with CAP and with other proteins greatly determines the fate of an mRNA: translation, storage, or degradation, depending on external stimuli and developmental cues. The presence of more than one member from the eIF4E family, differing in their CAP specificity, expression patterns, and affinity for binding proteins represents an additional fine tune mechanism to modulate the regulatory role of this factor on gene expression.

INTRODUCCIÓN

El factor de inicio de la traducción eIF4E es el encargado de reconocer a la estructura 5' CAP (7-metilguanosintrifosfato, m⁷GpppN, donde N es cualquier nucleótido) en el extremo 5' de los RNAs mensajeros eucarióticos y reclutar a la maquinaria de síntesis de proteínas para dar inicio a la traducción. En eucariontes, la síntesis de más de 95% de todas las proteínas es iniciada involucrando el CAP de los mRNAs (1-3). Dada su relevancia para la expresión genética, el factor eIF4E es blanco de múltiples mecanismos de regulación que pueden

afectar su función ya sea a nivel general, o solamente para ciertos mRNAs celulares. Utilizando la regulación de eIF4E, la célula mantiene niveles óptimos de crecimiento y división celular, y responde a estímulos externos y señales de desarrollo. Este factor también es blanco de regulación por infecciones virales y por la vía de microRNAs celulares. En esta revisión se analiza la función del factor eIF4E en el contexto de la traducción y de otros aspectos del metabolismo de los mRNAs eucarióticos, exponiendo las particularidades de diferentes miembros de la familia de este factor y de la regulación de su actividad.

PALABRAS CLAVE:

Transporte de RNA, proteínas de unión a CAP, traducción, factores de inicio de la traducción, regulación post-transcripcional.

KEY WORDS:

RNA transport, CAP-binding proteins, translation, translation initiation factors, post-transcriptional regulation.

1. EL PROCESO DE TRADUCCIÓN

La traducción de mRNAs consta de cuatro etapas: iniciación, elongación, terminación y reciclamiento. Cada una de ellas es catalizada por diferentes grupos de proteínas: factores de iniciación, de elongación, y de terminación (Fig. 1). La regulación de las diferentes etapas de traducción permite la síntesis diferencial de proteínas específicas resultando en cambios profundos en la fisiología celular, sin necesariamente estar acompañados por cambios en la transcripción de los genes correspondientes (4).

Inicio. La iniciación de la traducción es un proceso complejo que en eucariontes requiere a más de 12 factores de inicio (eIFs) (Tabla 1). El paso inicial es el ensamblaje de un complejo de proteínas sobre el mRNA circularizado mediante múltiples interacciones RNA-proteína y proteína-proteína. En este proceso, el 5' CAP del transcrito es reconocido por el factor eucarionte de traducción 4E (eIF4E) unido a eIF4G (proteína de anclaje). Este

último recluta a eIF4A, una helicasa dependiente de ATP tipo DEAD que facilita el desenrollamiento de estructuras secundarias en el RNA. El complejo formado por los factores eIF4E, eIF4G y eIF4A es conocido como eIF4F. Una vez unido eIF4F al 5' CAP del mRNA, se recluta eIF4B, una proteína de unión a RNA, en forma de homodímero que estabiliza la unión del ATP con eIF4A. Por último, eIF4G recluta a la proteína de unión a poly(A) (PABP, por sus siglas en inglés) promoviendo la circularización del mRNA y estimulando la actividad de la RNA helicasa. Esto favorece el reinicio múltiple de la traducción sobre el mRNA, protege al transcrito de la acción de nucleasas y facilita el posterior reciclaje de los componentes de la maquinaria de traducción.

El complejo eIF4F unido al 5' CAP, recluta al resto de la maquinaria traduccional mediante la interacción de eIF4G con el factor eIF3, otro factor multimérico (7-12 subunidades) que se encuentra unido al complejo de pre-inicio 43S. Este último está formado por el complejo ternario (GTP, Met-

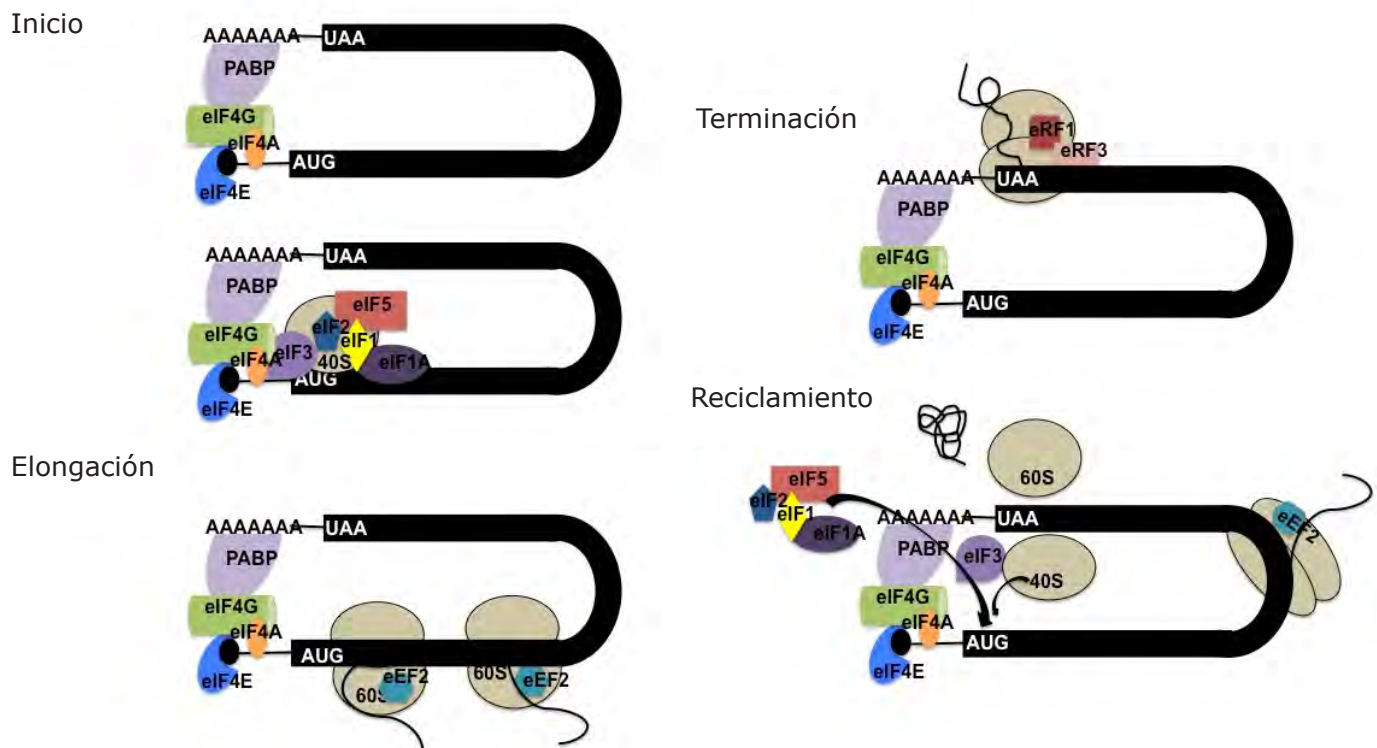


Figura 1. Representación esquemática del proceso de traducción. En eucariontes, la traducción cap-dependiente se realiza en cuatro pasos: iniciación, elongación, terminación y reciclamiento. Durante la iniciación, el mRNA se une al complejo de factores eIF4F (eIF4E, eIF4G, eIF4A) mediante la interacción CAP-eIF4E. El complejo 43S (eIF2, tRNA^{Met}, GTP, 40S, eIF3, eIF1A) se une al mensajero a través de la interacción entre eIF4G y eIF3 para formar el complejo de inicio 48S. Este complejo recorre el mRNA hasta encontrar el codón de inicio en contexto apropiado. Una vez encontrado el AUG, se une la subunidad ribosomal 60S y se liberan los factores de iniciación. La elongación comienza con la formación de la cadena polipeptídica, eEF1A lleva los tRNAs al ribosoma, mientras que eEF2 promueve la traslocación. Al encontrarse un codón de paro, eRF1 se une al ribosoma y estimula la hidrólisis de la cadena peptídica. La posterior unión de eRF3 e hidrólisis de GTP permiten el desensamblaje del ribosoma, tRNA y factores. En el reciclamiento eIF3 promueve la disociación del complejo post-terminación, permitiendo la futura unión de la subunidad 40S con los factores de iniciación para que pueda comenzar otra vuelta de traducción.

TABLA 1
FACTORES DE INICIO DE LA TRADUCCIÓN

FACTOR	TAMAÑO	FUNCIÓN	SITIOS DE UNIÓN
eIF1 (a)	~12 KDa	Forma complejo multi-factor con eIF2, eIF3, eIF5, Met-tRNA _i ^{Met} . Reconocimiento codon-anticodon	Sitio de unión a eIF3
eIF1A (a)	~17 KDa	Análogo a IF1 de bacteria. Se asocia a 40S en sitio A. Retrasa la re-asociación con la subunidad 60S. Puen- te entre los factores de inicio y el ribosoma	Sitio de unión a 40S
eIF2 α eIF2 β eIF2 γ		Recluta al tRNA ^{Met} Análogo IF2-tRNA _i de bacteria. Une el Met-tRNA _i ^{Met} , GTP y la subunidad 40S en sitio P. Forma parte del complejo ternario 43S. Subunidad reguladora: α ; actividad GTPasa: γ ; unión a eIF5B: β	Sitio de unión a tRNA (no identificado) 3 elementos de unión a GTP
eIF2B (a,b,d)		Intercambia GDP/GTP para liberar a eIF2	Sitio de unión a eIF2
eIF3 (11)	~750 kDa	Análogo IF3 de bacteria. Une varios eIFs y a la subun- dad 40S. Estabiliza al complejo de pre-inicio 43S	Motivos de reconocimiento de RNA
eIF4B	~57 kDa	Helicasa que estimula eIF4A	Motivos de reconocimiento a RNA (RRM), dominio DRYG
eIF4A	~50 kDa	Helicasa RNA-dependiente	Motivo de unión a ATP, ATPa- sa A, motivos de unión a RNA. Motivos SAT requeridos para la actividad de helicasa
eIF4E	~24 kDa	Proteína que reconoce y se une 5'CAP (m ⁷ GpppN) del mRNA	Motivos de unión a 5' CAP y a eIF4G
eIF4G	~160 kDa	Puente de anclaje. Une varios factores	Sitio de unión a eIF4E, riboso- mas, eIF4A
eIF4H	~25kDa	Helicasa, junto con eIF4B estimula la actividad de eIF4A	
eIF5	~50 kDa	Parte del complejo multi-factor. Estimula la hidrólisis de GTP por eIF2 actuando como GTPasa	Sitio de unión a eIF3
eIF5B	~180 kDa	Análogo IF2-GTP. Une eIF1A. Actividad GTPasa conjunta con eIF2 durante recono- cimiento codon de inicio	Sitio de unión a eIF1A
eIF6		Se asocia con la subunidad ribosomal 60S previnien- do su asociación con la subunidad 40S, regula la traducción en respuesta a señales extracelulares Es esencial en la biogénesis de ribosomas	Sitio de unión a 60s

tRNA_i^{met}, y eIF2 $\alpha\beta\gamma$), el complejo multifactor (eIF5, eIF1 y eIF1A) y la subunidad ribosomal 40S. Esta interacción permite la formación del complejo de inicio 48S el cual recorre el mRNA en dirección 5' → 3' en busca del codón de inicio AUG en el contexto adecuado. Una vez que el Met-tRNA_i^{met} reconoce el AUG, se hidroliza el GTP unido a eIF2 α por la actividad de GTPasa de la subunidad γ y con la

asistencia de eIF5, ocurriendo la disociación de la mayoría de los factores de inicio y la unión de la subunidad ribosomal 60S para formar el ribosoma 80S listo para comenzar la elongación del péptido. En este evento, el complejo eIF4F permanece unido al mRNA para permitir que la maquinaria de inicio de la traducción pueda reciclarse y comenzar otro evento de iniciación (5, 2, 4).

El inicio de la traducción es el evento más controlado fisiológicamente, lo cual tiene sentido, porque es energéticamente favorable controlar el primer paso de cualquier reacción. Una variación en el inicio tiene influencia tanto en la cantidad de proteína (regulación cuantitativa), como en los niveles relativos de síntesis de diferentes proteínas (regulación cualitativa) (6). Dos pasos de la etapa de inicio de la traducción parecen ser los puntos críticos para la regulación fisiológica: 1) la unión de Met-tRNA^{met} a la subunidad ribosomal 40S, mediada por eIF2 $\alpha\beta\gamma$, y 2) la unión inicial del complejo eIF4F al extremo 5' del mRNA. El primero de estos pasos es limitante porque se requiere de la recuperación de eIF2 unido a GTP con la participación del factor intercambiador de nucleótidos eIF2B para formar un complejo ternario activo. Esto es válido para la mayoría de mRNAs celulares, por lo que constituye un mecanismo de regulación cuantitativa. En cambio el segundo paso, reconocimiento del CAP y unión del mRNA puede ejercer efectos variables en la traducción de diferentes mRNAs (5).

Elongación. En contraste con la iniciación, la elongación es un proceso más simple, que requiere mantener el marco de lectura, seleccionar y entregar correctamente los tRNAs aminoacilados al ribosoma 80S, y formar los enlaces peptídicos. Sólo son requeridos tres factores de elongación: eEF1A, el cual unido a GTP ayuda a cargar los aa-tRNAs correctos al ribosoma, eEF1B necesario para el intercambio de GDP por GTP en eEF1A, y eEF2, el cual mediante hidrólisis de GTP promueve la translocación del ribosoma exactamente tres nucleótidos sobre el mRNA.

Se han encontrado algunos casos de regulación durante la elongación, por ejemplo, para disminuir la síntesis de proteínas cuando las células entran en mitosis. Las células mitóticas contienen polisomas pesados que son menos activos traduccionalmente que los polisomas ligeros. Parece que las células reducen su velocidad de elongación cuando se preparan para dividirse, lo cual es seguido de una rápida síntesis de proteínas una vez que entran a la fase G1 del ciclo celular. Esta reducción en la velocidad de elongación, es probablemente mediada por la fosforilación del factor eEF2 por una cinasa específica (4).

Terminación. La terminación de la traducción eucarionte es mediada por el factor de liberación eRF1, el cual se une al ribosoma en lugar del tRNA para reconocer cualquiera de los tres codones de paro (UAA, UAG o UGA), induciendo la hidrólisis de la proteína recién sintetizada del último tRNA. Posteriormente, eRF3 unido a GTP promueve la liberación de eRF1. De esta manera nuevamente un evento

de hidrólisis de GTP es requerido para el proceso de terminación (7). Existen vías que discriminan a mRNAs que tienen codones de paro aberrantes, sin sentido o que carecen de codones de paro. Algunos autores (4) proponen un modelo donde el ribosoma se instala en la cola de poly(A) permitiendo incrementar la terminación prematura de ribosomas río arriba, resultando en una represión traduccional de un mRNA nonSTOP (sin codón de paro).

Reciclamiento. Después de la terminación de la síntesis de proteínas y la liberación de la cadena polipeptídica, el ribosoma queda con el sitio A vacío y un tRNA desacilado en el sitio P, este es reconocido como complejo de post-terminación (post-TC). Para que el ribosoma pueda comenzar otra vuelta de traducción, este complejo necesita disociarse para permitir la unión de la subunidad ribosomal 40S con los factores de inicio en el sitio donde comienza la traducción del mRNA. En bacterias, se demostró que el desmontaje del complejo de post-terminación, es un proceso activo catalizado por el factor de reciclaje del ribosoma (RRF) el cual, junto con el factor de elongación (EF-G), actúa liberando al ribosoma del mRNA. RRF es esencial para la viabilidad en procariontes, sin embargo, en eucariontes no existe un factor homólogo, y el mecanismo que precede al estado de terminación es diferente. En estos organismos, eIF3 es el factor principal que promueve la disociación de ribosomas en post-terminación en la subunidad 60S, tRNA y mRNA unido a la subunidad 40S. Su actividad es asistida por eIF1 y eIF1A. eIF1 interviene en la liberación del tRNA del sitio P, mientras eIF3 favorece la disociación de mRNA (8).

2. EL COMPLEJO DE UNIÓN A CAP, eIF4F

Antes de que la subunidad ribosomal 40S se una al mRNA, el complejo de unión a CAP eIF4F formado por eIF4E, eIF4A y eIF4G, reconoce el extremo 5' CAP del mRNA y junto con eIF4B funciona desenrollando estructuras secundarias en su región 5' no traducible (UTR). Dado que la longitud y estabilidad de estructuras secundarias en las regiones 5' UTR son variables para los mRNAs, el requerimiento de la actividad del complejo eIF4F también puede ser diferente dependiendo del transcrito.

eIF4E. Es una proteína de ~24 kDa, cuya estructura le permite ser el factor de inicio de la traducción que tiene contacto directo con el CAP. Se ha demostrado que la interacción de esta proteína con eIF4G favorece la estabilidad de la unión a CAP y propicia el reclutamiento del resto de factores al complejo. Además, la presencia de regiones de unión a RNA en eIF4G y eIF4A sugieren que el contacto con el RNA juega un papel importante en el reconocimiento del mRNA por eIF4F (3, 9).

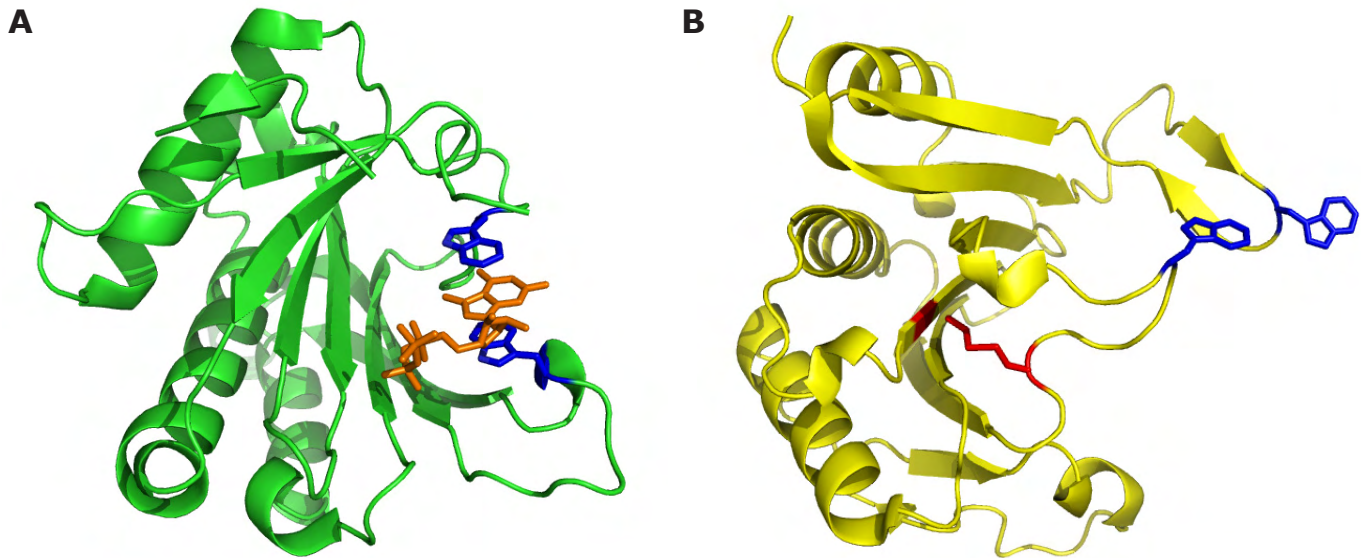


Figura 2. A) Estructura de eIF4E de humano. Los triptofano 53 y 102 involucrados en la unión a cap se muestran en azul, la estructura CAP en naranja (10). B) Estructura de eIF4E de trigo. Los triptofanos involucrados en la unión a CAP se muestran en azul, las cisteínas que forman el puente disulfuro en rojo (Tomada de 11).

eIF4A. Es una proteína de ~50 kDa con motivo DEAD/H prototipo, que une a RNA y tiene actividad de helicasa. La caracterización bioquímica de este factor muestra que exhibe una actividad de ATPasa dependiente de RNA y una actividad para desenrollar dúplex de RNA dependiente de ATP, por lo tanto, su principal función es deshacer estructuras secundarias en el mRNA (5).

eIF4G. Es una proteína modular y multifuncional de ~200 kDa, que co-localiza con las demás proteínas involucradas en el reclutamiento de la subunidad 40S al mRNA. Interacciona directamente con eIF3 y eIF4A mediante su región central y carboxilo terminal, y con PABP y eIF4E mediante su región amino terminal. Además, posee una secuencia de unión a RNA en su región central. eIF4G estimula la traducción por su interacción indirecta con dos regiones del mRNA, el extremo 5' donde estimula la actividad de eIF4E y el extremo 3' donde recluta a la proteína de unión a poly(A) PABP. De esta manera, se circulariza el mRNA, estabilizando la unión poly(A)-PABP-eIF4G-eIF4E-CAP (6).

Se ha demostrado que la estructura CAP es esencial para un eficiente inicio de la traducción en la mayoría de mRNAs, y que el requerimiento de la unión del complejo eIF4F (eIF4E, eIF4G, eIF4A) depende de la longitud de la región 5' UTR del RNA y no tanto del reconocimiento del CAP, el cuál puede funcionar como un paso subsecuente para la unión. Lo anterior sugiere que el reconocimiento del mRNA por la maquinaria de traducción es más compleja que la asociación espontánea de eIF4F con el CAP del mRNA (3).

3. EL FACTOR eIF4E

El factor de inicio de la traducción eIF4E fue descubierto como una proteína que promueve el inicio de la traducción, está involucrado en el reclutamiento de mRNAs al ribosoma y tiene el potencial de influir en la expresión de cada proteína en la célula. Por esta razón, se dice que eIF4E es un potenciador traduccional, aunque en la última década se ha descubierto que también puede actuar como represor traduccional (6).

Estructura. Dadas las funciones que desempeña en la célula, no es sorprendente que la secuencia primaria de aminoácidos de eIF4E sea altamente conservada en todos los organismos donde está presente. Datos cristalográficos obtenidos por Rayos X y resonancia magnética nuclear (NMR) muestran flexibilidad del sitio de unión a CAP en la estructura de eIF4E, la cual se ordena hasta que se une a su ligando. El núcleo de la estructura asemeja a una mano ahuecada y el reconocimiento de CAP ocurre en la cara cóncava vía interacción de dos triptófanos altamente conservados, Trp-56 y Trp-102 correspondientes a la secuencia de eIF4E-1 de humano (Fig. 2A). Esta interacción es estabilizada por tres enlaces de hidrógeno entre la guanina y Trp-102, Glu-103. Aparentemente, la ribosa no contribuye significativamente a la unión, mientras que el grupo trifosfato, participa en muchas interacciones polares con varios aminoácidos de eIF4E. La contribución de la interacción π de los grupos R de los Trp-56 y Trp-102 es determinante en el reconocimiento del CAP por eIF4E (10). Por

otra parte, la mayoría de las proteínas que interactúan con eIF4E, incluyendo a eIF4G, se unen a la cara convexa de la estructura, involucrando a Trp73 (6).

En la proteína eIF4E de trigo, se encontró un puente disulfuro intramolecular entre dos cisteínas que es conservado solo en plantas (11). Esta observación genera la posibilidad de que el entorno celular pueda influir en la función de la proteína mediante la regulación de su estado de oxidación (Fig. 2B).

Regulación. Aunque eIF4E regula la traducción global, contribuye en especial a la traducción de un pequeño grupo de mRNAs que codifican a proteínas claves involucradas en proliferación celular, angiogénesis y sobrevivencia (2). Dado que, la unión a CAP es limitante en el inicio de la síntesis de proteínas, los mRNAs compiten por eIF4E bajo condiciones celulares normales. Si los niveles de eIF4E aumentan, la traducción de mRNAs débiles (poco expresados bajo condiciones normales y con 5'UTR altamente estructuradas) es selectiva y desproporcionadamente aumentada, y los mRNAs fuertes (genes de mantenimiento) siguen siendo expresados a niveles elevados.

La función de eIF4E parece estar regulada por varios mecanismos diferentes. Algunas evidencias sugieren que eIF4E se encuentra poco abundante a diferencia de los otros factores de inicio, y que su disponibilidad es una limitante en el inicio de traducción. En mamíferos y *Drosophila* se han encontrado proteínas de unión a eIF4E llamadas 4E-BP (del inglés 4E-"Binding Protein") que inhiben la traducción al competir con eIF4G por el mismo sitio de interacción en eIF4E, disminuyendo de esta manera la traducción dependiente de CAP para los mRNAs. También se han descrito otras proteínas que interactúan con eIF4E dependiendo de ciertas secuencias en el mRNA. Estas proteínas son diferentes a las 4E-BPs, pero comparten el mismo motivo de interacción YXXXXLΦ (donde Φ es cualquier aminoácido hidrofóbico) también presente en eIF4G. Por ello se ha sugerido que en cualquier organismo pueden existir proteínas de unión a eIF4E no canónicas que controlen la traducción (4).

Aunque la mayoría de mRNAs son traducidos de manera dependiente de CAP, existe un mecanismo alternativo de inicio de la traducción independiente de CAP y de eIF4E, que requiere de una estructura en RNA llamada IRES (sitio de entrada interna del ribosoma). Esta estructura, comúnmente encontrada en algunos virus de eucariontes recluta directamente otros factores de traducción como eIF4G, eIF4A y a la subunidad 40S. Inicialmente se consideró que esta era una vía de inicio de la

traducción específica de virus, pero ahora se sabe que juega un papel importante para la regulación traduccional de mRNAs celulares, especialmente cuando la traducción dependiente de CAP es reducida durante procesos especiales como muerte celular programada, mitosis y bajo ciertas condiciones de estrés (7).

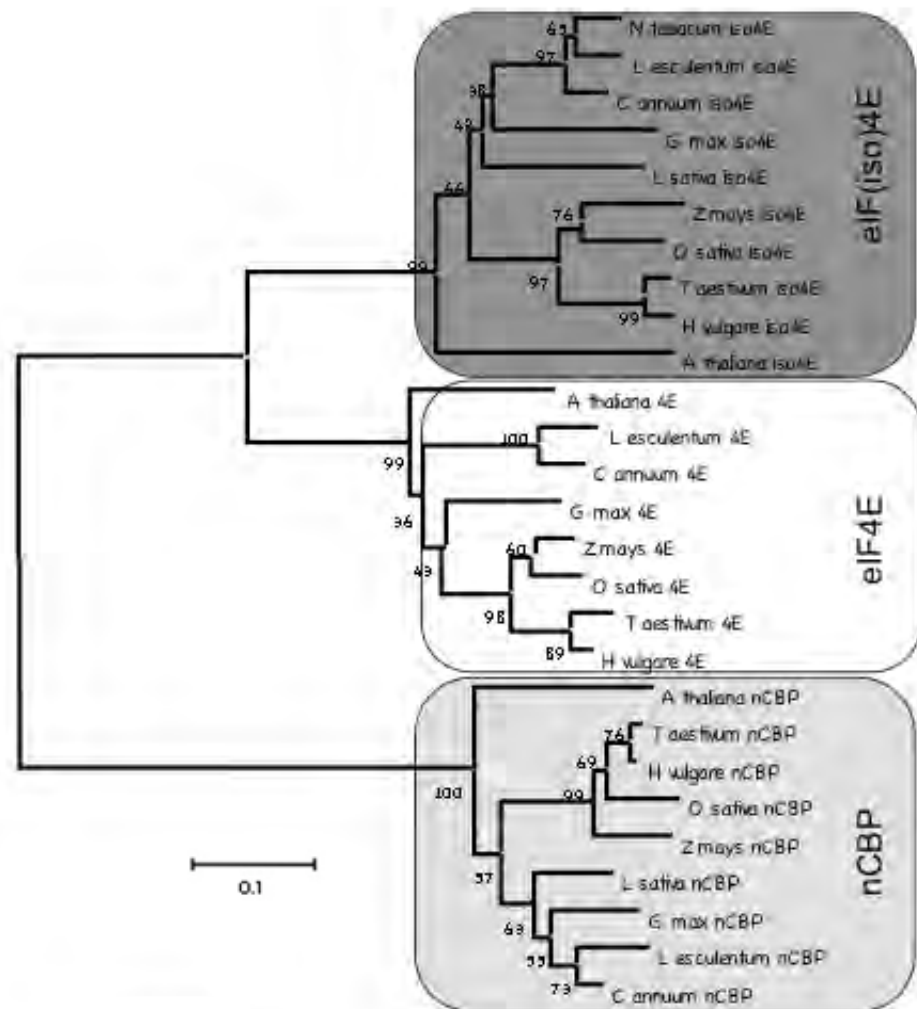
La fosforilación de un residuo conservado en eIF4E, Ser-209 en eIF4E-1 de humano, se ha propuesto como un tercer mecanismo de regulación para la actividad de este factor. Sin embargo las evidencias sobre este mecanismo son controversiales. Mientras algunos trabajos reportan que la Ser-209 fosforilada por la vía de MAP cinasas favorece la unión de eIF4E al CAP, otros reportes indican que dicha fosforilación puede resultar inhibitoria para la traducción dependiendo de la condición y tipo celular.

Uno de los mecanismos menos estudiados sobre la regulación de la traducción mediada por eIF4E es el que involucra la presencia de más de un miembro de la familia eIF4E en un mismo organismo, donde cada uno puede presentar diferentes niveles de expresión, afinidades a CAP o proteínas interactoras. La presencia de isoformas de eIF4E fue primero descubierta en plantas, pero es hasta la década 2000 que se le atribuyó una relevancia generalizada, al descubrir con el creciente número de genomas secuenciados que casi todos los organismos eucariontes (a excepción de algunas levaduras) cuentan con más de una proteína tipo eIF4E (12). Actualmente se ha propuesto que la presencia de diferentes miembros de la familia eIF4E podría contribuir a la traducción selectiva de mRNAs para un organismo. Sin embargo, a pesar de que eIF4E es uno de los factores de traducción más estudiados, poco se conoce sobre la especialización de las funciones de miembros de esta familia.

4. MIEMBROS DE LA FAMILIA eIF4E

En el 2005, Joshi y colaboradores agruparon a los miembros de la familia eIF4E en tres clases de acuerdo a la presencia de residuos correspondientes a Trp-43 y Trp-56 de eIF4E-1 de humano. La clase I contiene Trp en ambas posiciones, la clase II, contiene Tyr, Phe o Leu en la posición 43 y Tyr o Phe en la posición 56, y la clase III contiene Trp en la posición 43 pero Cys o Tyr en la posición 56. En organismos que presentan varios miembros de la familia eIF4E, se ha encontrado que sólo uno de ellos es ubicuo y expresado constitutivamente, siendo responsable de la traducción dependiente de CAP general. Este es representado por eIF4E-1 en *Drosophila* (13), eIF4E-1 en mamíferos. IFE-3

Figura 3. Árbol filogenético de los miembros de la familia eIF4E en plantas. Se han reportado tres miembros de la familia eIF4E en plantas: eIF4E, pertenece a la clase I y es ortólogo a eIF4E-1 de mamíferos; eIF(iso)4E, también incluida en la clase I, específica de plantas; y nCBP, perteneciente a la clase II, que tiene ortólogos en mamíferos y nematodos. El árbol filogenético fue construido con el programa MEGA4 por sus siglas en inglés Molecular Evolutionary Genetics Analysis Versión 4 usando el método Neighbor-Joining con 1000 replicas bootstrap.



en *C. elegans* (14), eIF4E-1A en pez zebra (15) y eIF4E en plantas (16). Los otros eIF4Es son activos en tejidos o etapas de desarrollo particulares, o se unen a ciertos mRNAs. Esto le confiere considerable versatilidad a esta familia de proteínas, y apoya la hipótesis de que no son completamente redundantes al presentar selectividad traduccional.

Selectividad por el tipo de CAP. Algunos miembros de la familia 4E presentan selectividad por diferentes estructuras CAP. Los mRNAs de *C. elegans* contiene dos tipos de CAP, monometilado (m^7GpppN) y trimetilado ($m^{7,2,2}GpppN$). IFE-3 (Clase I), e IFE-4 (Clase II) se unen preferentemente a m^7GpppN , mientras que IFE-1, IFE-2 y IFE-5 (Clase I) se unen a ambos tipos de CAP (14). En plantas, eIF4E y eIF(iso)4E (Clase I) presentan selectividad en el reconocimiento de estructuras CAP mono y di-metiladas, respectivamente; y nCBP (Clase II) presenta una afinidad de unión a CAP mayor que eIF4E y eIF(iso)4E aunque es capaz de estimular la traducción a niveles mucho menores que ellos (17). Los tres miembros de la

familia eIF4E se encuentran presentes en diversas plantas (Fig. 3) pero hasta el momento no se ha podido determinar con certeza su especialización funcional.

Patrones de expresión. Es común que los diferentes miembros de la familia 4E se expresen diferencialmente en cada organismo. Por ejemplo, el pez zebra (*Danio rerio*) cuenta con dos miembros de esta familia, eIF4E-1A que se expresa ubicuamente, y eIF4E-1B que se expresa sólo en embriones y gónadas (15). En *Schizosaccharomyces pombe* se ha observado que hay dos miembros de la familia eIF4E que presentan localización subcelular diferencial (18). En *Arabidopsis thaliana* se encontró que el mRNA de eIF(iso)4E es más abundante en puntas de raíz, órganos florales y en tejidos en desarrollo, mientras que el de eIF4E se expresa a niveles similares en la mayoría de los tejidos de plantas maduras (16). Por otro lado, a nivel de proteína eIF4E es más abundante en células en cultivo y silicuas, eIF(iso)4E en raíces y nCBP en botones florales. En maíz se demostró que

los transcritos de eIF4E y eIF(iso)4E se expresan diferencialmente durante la germinación. Ambos están presentes en semillas secas, sin embargo, eIF(iso)4E es mucho más abundante. eIF4E se transcribe *de novo* después de las 12 h de germinación y se acumula a nivel proteína hasta las 24 h de germinación. La proteína de eIF(iso)4E mantiene niveles elevados y constantes durante las primeras 24 h de germinación para lo cual se requiere de una traducción activa del mRNA correspondiente.

Funciones especializadas. En la mayoría de los organismos se ha reportado que al menos un miembro de la familia eIF4E es esencial para la viabilidad. Tal es el caso de IFE-3 en *C.elegans* (14) y eIF4E-1 en *Drosophila*. Sin embargo, la presencia de otros miembros de la familia en estos organismos es requerida para ciertos eventos específicos durante su ciclo de vida. Por ejemplo en *C. elegans*, la depleción de IFE-1 bloquea la espermatogénesis; mutantes en IFE-2 muestran mayor longevidad y resistencia a estrés oxidativo, y la ausencia de IFE-4 provoca la retención de embriones (6). En *Schizosaccharomyces pombe* se encontró que eIF4E-2 está involucrado en repuestas a estrés por falta de nutrientes, altas temperatura y elevadas concentraciones de sal, deteniendo la división celular y el crecimiento (18). En *Drosophila*, se ha demostrado que eIF4E-1 es esencial para el desarrollo del ovario y del embrión (13).

Selectividad en la traducción de mRNAs. En animales, la mayoría de los mensajes que dependen fuertemente de los niveles de eIF4E disponibles, codifican para proteínas que actúan en la progresión del ciclo celular y supervivencia. Por el contrario, mRNAs correspondientes a reguladores negativos de crecimiento o a genes de mantenimiento no requieren elevadas concentraciones de eIF4E. En *C. elegans*, se demostró que IFE-4 es requerido para la traducción de un grupo de mRNAs específicos durante cierta etapa del desarrollo (19) y en *Schizosaccharomyces pombe* se encontró que eIF4E-2 favorece la traducción de mRNAs con regiones 5'-UTR estructuradas (18). En *Drosophila*, la proteína 4E-HP miembro de la clase II participa en la inhibición traduccional de un mRNA específico "Caudal" para lograr un adecuado desarrollo del embrión (20). Con estos hallazgos se apoya la idea de una función especializada para cada miembro de la familia eIF4E en los organismos que posean más de una de estas proteínas.

En plantas aún no se ha podido demostrar *in vivo* la función particular para los tres factores tipo eIF4E conservados (Fig. 3). En semillas de maíz, se ha observado que eIF4E y eIF(iso)4E traducen *in vitro* mRNAs celulares de manera selectiva (21). De

manera similar, se ha reportado que los complejos correspondientes a cada factor, eIF4F y eIF(iso)4F son capaces de discriminar mRNAs que muestran regiones no traducibles con diferente longitud y grado de estructuración (9).

Regulación de la expresión viral: Además de su importante función en la traducción celular, eIF4E y el complejo de unión a CAP, eIF4F son blanco de regulación durante la infección por diferentes virus, tanto en animales como en plantas. Muchos de los virus cuyo genoma está conformado por RNA de cadena positiva y no poseen CAP en su extremo 5', inician su traducción de manera CAP-independiente utilizando un sitio de entrada interna del ribosoma (IRES). Algunos virus pueden tener en lugar de CAP, unida al extremo 5' una proteína viral llamada VPg que puede reclutar a eIF4E. El sitio de unión a VPg en eIF4E es diferente al sitio de unión a CAP y a las proteínas 4E-BPs. En plantas, eIF4E y eIF(iso)4E se unen a la proteína VPg de la familia de los potyvirus con diferentes afinidades, lo cual correlaciona positivamente con la infección viral. Plantas de *Arabidopsis thaliana* carentes de eIF(iso)4E no presentan un fenotipo distinguible durante el desarrollo, pero la falta de este factor les confiere resistencia a la infección producida por algunos potyvirus (22). En el caso de interacción virus - miembro de la familia eIF4E - planta hospedera se ha encontrado un elevado grado de especificidad, ya que el mismo virus puede requerir diferentes miembros de la familia eIF4E en especies de plantas diferentes.


5. NUEVAS FUNCIONES PARA eIF4E

Recientemente, se ha encontrado que eIF4E también tiene un papel diferente al de inicio de la traducción, en particular en la exportación de algunos mRNAs específicos del núcleo al citoplasma. En células animales, alrededor del 68% de eIF4E se encuentra en el núcleo en sitios conocidos como cuerpos nucleares donde se involucra en la exportación de un grupo de mRNAs que contienen una estructura conocida como elementos sensibles a 4E. eIF4E entra en el núcleo por la unión a la proteína 4E-T (transportador de eIF4E). Una vez en el núcleo, su interacción con numerosas proteínas puede regular la unión a CAP y controlar la exportación de mRNAs (2). eIF4E dirige la progresión del ciclo celular y la proliferación celular mediante la coordinación de la expresión de muchos genes a nivel post-transcripcional y a través de este efecto, se ha encontrado que contribuye al potencial oncogénico celular. Por otro lado, dependiendo de las proteínas con las cuales interacciona, eIF4E puede jugar un papel importante en el secuestro de mRNAs en

partículas ribonucleoprotéicas citoplasmáticas ya sea para mantener la estabilidad de los mRNAs para que sean traducidos cuando sea necesario o para promover su degradación en cuerpos de procesamiento citoplasmáticos (cuerpos P).

CONCLUSIONES

El inicio de la traducción de mRNAs eucariontes es un proceso complejo que involucra la participación de muchos factores protéicos, regiones específicas del mRNA, las subunidades ribosomales y el tRNA iniciador. La formación del complejo 5'CAP-eIF4E, estabilizado por eIF4G unido a PABP-poly(A)3' garantiza múltiples eventos de re-inicio de la traducción sobre la misma molécula de mRNA, protegién-

dolo de la degradación. Estudios durante los últimos 30 años han revelado muchos de los mecanismos de regulación traduccional a nivel global o específico de mRNA que involucran a eIF4E. Sin embargo, aún quedan muchas preguntas por resolver sobre las nuevas funciones especializadas que han sido evidenciadas para diversos miembros de la familia eIF4E. Entre estas se encuentran su participación en el transporte núcleo-citoplasmático de mRNAs, la formación de complejos ribonucleoprotéicos inactivos traduccionalmente, y el significado de la presencia de más de una isoforma de este factor conservada para la mayoría de los organismos vivos a lo largo de la evolución. 

REFERENCIAS

1. Browning KS (2004) Plant translation initiation factors: it is not easy to be green. *Biochemical Society Transactions* 32:589-591.
2. Fischer PM (2009) Cap in hand: targeting eIF4E. *Cell Cycle* 8:2535-2541.
3. Kaye NM, Emmett KJ, Merrick WC and Jankowsky E (2009) Intrinsic RNA binding by the eukaryotic initiation factor 4F depends on a minimal RNA length but not on the m7G cap. *J Biol Chem* 284:17742-17750.
4. Groppo R. and Richter JD (2009) Translational control from head to tail. *Curr Opin Cell Biol* 21:444-451.
5. Pain VM (1996) Initiation of protein synthesis in eukaryotic cells. *Eur J Biochem* 236:747-771.
6. Rhoads RE (2009) eIF4E: new family members, new binding partners, new roles. *J Biol Chem* 284:16711-16715.
7. Pestova TV, Lorsch JR and Hellen CU (2007) *En Translational Control in Biology and Medicine*. Editor: Mathews MB, Sonenberg N. and Hershey JWB, CSHL Press, Cold Spring Harbor, NY, pp. 87-128.
8. Pisarev AV, Hellen CU and Pestova TV (2007) Recycling of eukaryotic posttermination ribosomal complexes. *Cell* 131:286-299.
9. Mayberry LK, Allen ML, Dennis MD and Browning KS (2009) Evidence for variation in the optimal translation initiation complex: plant eIF4B, eIF4F, and eIF(iso)4F differentially promote translation of mRNAs. *Plant Physiol* 150:1844-1854.
10. Niedzwiecka A, Marcotrigiano J, Stepinski J, Jankowska-Anyszka M, Wyslouch-Cieszynska A, Dadlez M, Gingras AC, Mak P, Darzynkiewicz E, Sonenberg N (2002) Biophysical studies of eIF4E cap-binding protein: recognition of mRNA 5' cap structure and synthetic fragments of eIF4G and 4E-BP1 proteins. *J Mol Biol* 319:615-635.
11. Monzingo AF, Dhaliwal S, Dutt-Chaudhuri A, Lyon A, Sadow JH, Hoffman DW, Robertus JD and Browning KS (2007) The structure of eukaryotic translation initiation factor-4E from wheat reveals a novel disulfide bond. *Plant Physiol* 143:1504-1518.
12. Joshi B, Lee K, Maeder DL and Jagus R (2005) Phylogenetic analysis of eIF4E-family members. *BMC Evol Biol* 5:48.
13. Hernandez G, Altmann M, Sierra JM, Urlaub H, Diez del Corral R, Schwartz P and Rivera-Pomar R (2005) Functional analysis of seven genes encoding eight translation initiation factor 4E (eIF4E) isoforms in *Drosophila*. *Mech Dev* 122:529-543.
14. Keiper BD, Lamphear BJ, Deshpande AM, Jankowska-Anyszka M, Aamodt EJ, Blumenthal T and Rhoads RE (2000) Functional characterization of five eIF4E isoforms in *Caenorhabditis elegans*. *J Biol Chem* 275:10590-10596.
15. Robalino J, Joshi B, Fahrenkrug SC and Jagus R (2004) Two zebrafish eIF4E family members are differentially expressed and functionally divergent. *J Biol Chem* 279:10532-10541.
16. Rodriguez CM, Freire MA, Camilleri C and Robaglia C (1998) The *Arabidopsis thaliana* cDNAs coding for eIF4E and eIF(iso)4E are not

- functionally equivalent for yeast complementation and are differentially expressed during plant development. *Plant J* 13:465-473.
17. Ruud KA, Kuhlow C, Goss DJ and Browning KS (1998) Identification and characterization of a novel cap-binding protein from *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* 273:10325-10330.
 18. Ptushkina M, Malys N and McCarthy JE (2004) eIF4E isoform 2 in *Schizosaccharomyces pombe* is a novel stress-response factor. *EMBO Rep* 5:311-316.
 19. Dinkova TD, Keiper BD, Korneeva NL, Aamodt EJ and Rhoads RE (2005) Translation of a small subset of *Caenorhabditis elegans* mRNAs is dependent on a specific eukaryotic translation initiation factor 4E isoform. *Mol Cell Biol* 25:100-113.
 20. Cho PF, Poulin F, Cho-Park YA, Cho-Park IB, Chicoine JD, Lasko P and Sonenberg N (2005) A new paradigm for translational control: inhibition via 5'-3' mRNA tethering by Bicoid and the eIF4E cognate 4EHP. *Cell* 121:411-423.
 21. Dinkova TD, Aguilar R and Sanchez de Jimenez E (2003) En Nicolas G, Bradford KJ, Come D and Pritchard HW (eds.), *The Biology of Seeds: Recent Research Advances*. CAB International pp 181-189.
 22. Duprat A, Caranta C, Revers F, Menand B, Browning KS and Robaglia C (2002) The *Arabidopsis* eukaryotic initiation factor (iso)4E is dispensable for plant growth but required for susceptibility to potyviruses. *Plant J* 32:927-934.