



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**Análisis de la expresión y localización de la proteína nCBP en
respuesta a estrés**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Maestro en Ciencias

PRESENTA:

QFB José Abraham León Domínguez

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Tzvetanka Dimitrova Dinkova
[Facultad de Química](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Patricia León Mejía
[Instituto de Biotecnología](#)

Dra. Martha Patricia Coello Coutiño
[Facultad de Química](#)

Ciudad de México. Enero, 2018



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.

ÍNDICE	Página
1. Dedicatorias y agradecimientos	8
2. Abreviaturas	10
3. Resumen	12
4. Introducción	13
4.1 La proteína de unión a 5´Cap eIF4E	13
4.1.1 Función eIF4E en el inicio de la traducción	14
4.2 Clasificación de los factores tipo eIF4E	16
4.3 Función de eIF4E en otros procesos	18
4.4 Factores eIF4E de clase II	21
4.5 Represión traduccional en estrés	24
4.5.1 Cuerpos de procesamiento (PBs)	26
4.5.2 Gránulos de estrés (SGs)	28
4.5.3 Cuerpos de retículo endoplásmico (ERBs)	30
4.5.4 Gránulos de estrés por calor (HSGs)	33
5. Antecedentes	35
5.1 Función de nCBP en <i>Arabidopsis thaliana</i>	36
6. Hipótesis	42
7. Objetivos	42
7.1 Objetivo general	42
7.2 Objetivos particulares	42
8. Metodología	43
8.1 Material biológico	43
8.2 Tratamientos de estrés osmótico	43

8.2.1	Estrés osmótico en medio líquido	43
8.2.2	Estrés osmótico en medio sólido	44
8.3	RT-qPCR	44
8.3.1	Extracción de RNA total	44
8.3.2	Tratamiento de RNA con DNasa	45
8.3.3	RT y PCR en tiempo real o cuantitativa (RT-qPCR)	46
8.4	Obtención de construcciones con proteínas fluorescentes	47
8.4.1	Diseño de cebadores	47
8.4.2	Reacciones de PCR punto final	47
8.4.3	Purificación de DNA a partir de geles de agarosa	48
8.4.4	Clonación del producto de PCR en el vector pENTR-D-TOPO	48
8.4.5	Obtención de células competentes y su transformación	49
8.4.6	Aislamiento de DNA plasmídico y análisis	50
8.4.7	Recombinación del vector de entrada al vector destino pEarlyGate	51
8.5	Expresión transitoria de las construcciones en protoplastos	52
8.5.1	Aislamiento de protoplastos de hojas de <i>A. thaliana</i>	52
8.5.2	Transfección DNA-PEG-Ca ²⁺	53
8.5.3	Tratamientos de estrés a los protoplastos	54
8.6	Microscopia confocal	55
9.	Resultados	56
9.1	Expresión de nCBP en estrés osmótico	56
9.2	Análisis de las fusiones traduccionales con proteínas fluorescentes obtenidas por el sistema Gateway	59

9.2.1	Clonación de fragmentos de DNA en el vector pENTR-D-TOPO	59
9.2.2	Obtención clonas de expresión	65
9.3	Localización subcelular de nCBP y proteínas marcadoras de gránulos	67
9.4	Co-localización de nCBP con proteínas de estrés	72
10.	Discusión	76
11.	Conclusiones	83
12.	Perspectivas	84
13.	Bibliografía	85
14.	Anexos	99
	Anexo 1. Cebadores empleados en las construcciones y tiempo real	99
	Anexo 2. Mapas de vectores empleados	100
	Anexo 3. Listado de soluciones	101

TABLAS Y FIGURAS

Página

Figura 1. Complejo de pre-inicio 48S de la traducción eucarionte	15
Figura 2. Árbol filogenético radial de los miembros de la familia eIF4E de múltiples especies	17
Figura 3. Participación del factor eIF4E en otros procesos del metabolismo del RNA	19
Figura 4. Represión traduccional de los mensajeros <i>Caudal</i> y <i>HB</i> para el correcto desarrollo del embrión en <i>Drosophila</i>	22
Figura 5. Modelo del “ciclo del mRNA”	25
Figura 6. Composición de PBs en <i>A. thaliana</i>	27
Figura 7. Representación de la distribución, inducción y función de ERBs en <i>A. thaliana</i>	31
Figura 8. Perfil de expresión del mensajero y proteína de nCBP en <i>A. thaliana</i>	35
Figura 9. Fenotipo de plantas mutantes <i>ncbp-1d</i>	37
Figura 10. Localización de nCBP:GFP y comparación con otros gránulos citoplasmáticos descritos.	38
Figura 11. Proteínas que interactúan con nCBP	38
Figura 12. Análisis <i>in silico</i> del nivel de expresión del gen nCBP, a distintos tiempos, bajo condiciones de estrés abiótico	39
Figura 13. Fenotipo del desarrollo de raíz de plantas silvestres y mutantes <i>ncbp-1d</i> , en estrés osmótico y control	40
Figura 14. Expresión relativa de <i>nCBP</i> de plántulas crecidas en estrés osmótico y en condición control	56

Figura 15. Expresión relativa de <i>nCBP</i> de plántulas de <i>A. thaliana</i> , sometidas a estrés con manitol 300 mM, a distintas horas de evaluación	58
Figura 16. Amplificación del ORF de los genes marcadores de gránulos de estrés	60
Figura 17. Comprobación de la correcta clonación del ORF de genes marcadores en el vector pENTR-D-TOPO	61
Figura 18. Alineamiento de la secuencia de PYK10 clonada en el vector TOPO	62
Figura 19. Alineamiento de la secuencia de HSPI y HSP17 clonada en el vector TOPO	63
Figura 20. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de UBP1B, con respecto a la reportada en la base de datos y, con otras secuencias homólogas	64
Figura 21. Fragmentos purificados de la digestión del vector de entrada con la enzima MLU e integridad de los vectores destino	65
Figura 22. Clonación de las secuencias en el vector pEarly	66
Figura 23. Localización subcelular de DCP1 y HSP17, en protoplastos de <i>A. thaliana</i> , en condiciones control y de estrés	68
Figura 24. Localización subcelular de UBP1B y PYK10, en protoplastos de <i>A. thaliana</i> , en condiciones control y de estrés	69
Figura 25. Dinámica de distribución subcelular de <i>nCBP</i> dependiente del estrés	71
Figura 26. Análisis de co-localización de <i>nCBP</i> con la proteína DCP1, marcador de PBs	73
Figura 27. Análisis de co-localización de <i>nCBP</i> con la proteína HSP17, marcador de HSGs	74

Tabla 1. Reacción de ligación	48
Tabla 2. Reacción de recombinación	51
Tabla 3. Lista de cebadores	97

1. DEDICATORIAS Y AGRADECIMIENTOS

Dedicatorias

A la vida, por permitirme llegar hasta aquí y concluir una etapa más. Por brindarme la fuerza suficiente para continuar pese a las adversidades.

A mi familia, por el apoyo incondicional y su amor infinito, por orientarme y motivarme día a día.

A mis amigos, por las risas y momentos compartidos. Gracias a quienes han estado conmigo de manera incondicional.

A mis maestros, por guiarme y aconsejarme, por enseñarme y dejarme aprender. Sin ustedes concluir esta etapa no hubiera sido posible.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada durante mis estudios de maestría.

Al proyecto de Ciencia Básica CONACyT 238439 por la beca complementaria otorgada.

Al proyecto de Ciencia Básica CONACyT 238439 y a la Facultad de Química PAIP 5000-9118 por el financiamiento del trabajo.

A la M. en C. Karina Jiménez Durán y a la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y la Industria USAII, de la Facultad de Química, por los servicios brindados.

A la Dra. Sobeida Sánchez Nieto y a la M. en C. Giovanna Paulina Aguilera Alvarado por su apoyo brindado en los experimentos de obtención de protoplastos y su transformación.

2. ABREVIATURAS

Las abreviaturas usadas en el texto son acorde a su significado en inglés.

3'UTR	Región no traducible 3'
5'Cap	Región no traducible 5'
4ESE	Elemento sensible a eIF4E
4E-T	Proteína transportadora nucleo-citoplasmática de eIF4E
7mGTP	7-metilguanósina-trifosfato o análogo del 5'Cap
43S PIC	Complejo de pre-inicio 43S
ARE	Secuencias con elementos ricos en AU
CFP	Proteína cian fluorescente (azul claro)
DCP 1/2	Proteínas de decapping
eIF	Factor de inicio de la traducción eucarionte
ERBs	Cuerpos derivados de retículo endoplásmico
GFP	Proteína verde fluorescente
HSGs	Gránulos de estrés por calor
HSPs	Proteínas de choque térmico
sHSPs	Proteínas de choque térmico pequeñas
mRNP	Ribonucleoproteínas de mRNA
miRNA	RNA pequeño o microRNA
MeJA	Hormona Metil Jasmonato
NMD	Degradación de mensajeros que contienen mutaciones sin sentido
nCBP	Novedosa proteína de unión al Cap
<i>ncbp-1d</i>	Alelo mutante nulo de nCBP de <i>A. thaliana</i>

PABP	Proteína de unión a poly (A)
PBs	Cuerpos de procesamiento
PYK10	Enzima con actividad β -glucosidasa, componente principal de ERBs
RD21	Proteína de respuesta a desecación
RBPs	Proteínas de unión a RNA
RBD	Dominio de unión a RNA
RE	Retículo Endoplasmático
RFP	Proteína roja fluorescente
RT-qPCR	Transcripción inversa acoplada a PCR cuantitativa
SGs	Gránulos de estrés
TIA1	RBP importante en la formación de SGs
UBP1B	Proteína tipo TIA-1 en <i>A. thaliana</i>
WT	Planta silvestre
XRN4	Exonucleasa 5' \rightarrow 3'
YFP	Proteína amarilla fluorescente

3. RESUMEN

El factor eIF4E desempeña una función primordial en el inicio de la traducción, a través del reconocimiento de la estructura 5'Cap presente en los mRNAs. Además de esta función, se ha encontrado que el factor participa en otros procesos importantes para el metabolismo del mRNA. Por ejemplo, en condiciones de estrés celular eIF4E es reclutado a gránulos citoplasmáticos del tipo cuerpos de procesamiento (PBs) y gránulos de estrés (SGs), para la modulación de la traducción y degradación de mensajeros. Si bien esta función ha sido descrita para la proteína 4E de humanos e isoformas, se ha encontrado que su ortólogo en plantas es también localizado a SGs. nCBP es un miembro no canónico de la familia de factores 4E de *A. thaliana*, capaz de reconocer la estructura 5'Cap y de interactuar con proteínas del complejo traduccional. Sin embargo, su baja actividad en traducción ha sugerido una función diferencial para la proteína. Estudios previos en el laboratorio mostraron que nCBP interactúa con proteínas que participan en procesos de respuesta a estrés y que no forman parte del complejo traduccional. Además, se observó una localización subcelular de la proteína en cúmulos citoplasmáticos definidos. Para determinar su presencia en complejos proteicos de represión traduccional de tipo SGs y/o PBs en este trabajo se llevaron a cabo estudios de localización de nCBP:GFP en distintas condiciones de estrés en protoplastos de *A. thaliana*. Así mismo, se comparó su localización con la de proteínas marcadoras de diferentes gránulos o cuerpos citoplasmáticos de estrés. Por otra parte, se evaluó la expresión del transcrito *nCBP* en estrés osmótico a nivel de plántula. Los resultados no mostraron incremento en la expresión del mensajero en estrés osmótico comparado con el control bajo las condiciones empleadas. Sin embargo, los resultados de co-localización de la proteína mostraron que nCBP es reclutada a PBs, en condiciones de estrés por calor y estrés por hipoxia. Además su dinámica de distribución citoplasmática fue diferencial dependiendo del tipo de estrés, sugiriendo que nCBP podría localizarse en más de un tipo de gránulo, por ejemplo SGs, como se ha observado para la isoforma eIF4E. Estos resultados sugieren una posible función de nCBP en la dinámica de represión traduccional y degradación de mensajeros en respuesta a estrés.

4. INTRODUCCIÓN

La expresión génica en eucariontes es altamente regulada a distintos niveles, desde la transcripción, procesamiento, localización y degradación del mRNA hasta su traducción. Bajo diversas condiciones ambientales adversas la célula requiere un cambio radical en la reprogramación génica y metabolismo del mRNA, para reparar el daño inducido por el estrés y adaptarse a las nuevas condiciones. Durante este proceso la traducción de mensajeros que codifican proteínas constitutivas es reprimido, los mRNAs se desacoplan de los polisomas y se acumulan dentro de localizaciones citoplasmáticas conocidas como gránulos de estrés. Estos gránulos citoplasmáticos de RNA contienen varias subunidades ribosomales, factores traduccionales, enzimas de degradación, helicasas, proteínas de andamiaje y proteínas de unión a RNA que controlan la localización, estabilidad y traducción de los mRNAs reprimidos traduccionalmente. Su ensamblaje implica la agregación conjunta de varias de estas proteínas y enzimas para regular el destino del mensajero blanco durante el desarrollo y adaptación al estrés. Entender el papel que cada uno de los componentes tiene en la agregación de estos cuerpos, y en la respuesta de la célula al estrés, permite conocer no sólo el proceso que lleva a su formación, si no también saber la función que tiene su presencia en estos acúmulos citoplasmáticos. De tal forma, en el presente trabajo se pretende abordar el papel que desempeña nCBP (proteína de la familia de factores eIF4E) en plantas de *A. thaliana*, en respuesta a estrés, y su posible localización en acúmulos citoplasmáticos del tipo gránulos de estrés.

4.1 La proteína de unión a 5'Cap eIF4E

Para la mayoría de los mensajeros eucariontes el reclutamiento de la maquinaria traduccional es un proceso que depende de un factor conocido como eIF4E (ekaryotic Initiation Factor 4E), una proteína de 25 KDa capaz de interactuar con la estructura Cap (m^7GpppN , donde m^7G es 7-metilguanosina, un residuo de guanosina modificado por metilación, ligado a través de un puente de trifosfato, ppp; N es el primer nucleótido del mRNA) presente en el extremo 5' del mRNA. Esta

asociación es mediada por dos residuos aromáticos presentes en eIF4E (Trp 56 y Trp 102, numeración de aminoácidos acorde al eIF4E de humano), que estabilizan la unión al mensajero por puentes de hidrógeno específicos entre la carga positiva de 7-metilguanosina y los residuos ácidos (Fechter *et al.*, 2005; Tomo *et al.*, 2003; Issur *et al.*, 2013). Debido a esta actividad, muchas de las propiedades descritas para la proteína (estructura, función y regulación) están enfocadas en su participación en el inicio de la traducción.

4.1.1 Función de eIF4E en el inicio de la traducción

La síntesis de proteínas es un proceso que puede ser dividido en tres etapas principales: inicio, elongación y terminación (Sonenberg and Hinnebusch, 2009). En eucariontes, la etapa de inicio es un evento que implica dos estados importantes: 1) la formación del complejo 48S, donde el codón de inicio de un mRNA es apareado con el anticodón de un tRNA iniciador, y 2) la unión de la subunidad grande para generar un ribosoma traduccionalmente competente (Sonenberg and Dever, 2003; Alekhina and Vassilenko, 2012). La gran mayoría de los mensajeros eucariontes inician la formación del complejo 48S por un mecanismo que requiere la presencia de la estructura 5'Cap (Figura 1; Topisirovic *et al.*, 2011). Esta estructura es reconocida por el complejo eIF4F, que se compone de los factores eIF4E (proteína encargada de reconocer e interactuar con el Cap), eIF4A (una helicasa de RNA ATP dependiente) y eIF4G, una proteína de andamiaje responsable de interactuar con eIF3, eIF4E y PABP (proteína de unión a Poli A), permitiendo obtener una forma circularizada del mensajero (Figura 1; Robaglia *et al.*, 2006; O'Leary *et al.*, 2013). La unión de eIF4F al mRNA marca el punto de anclaje de la subunidad ribosomal pequeña, lo que lleva al reclutamiento del complejo de pre-inicio 43S PIC, compuesto por la subunidad ribosomal 40S, el complejo ternario eIF2:GTP:Met-tRNA^{Met}, y los factores de inicio eIF3 y eIF5. El complejo 43S PIC, con la asistencia de eIF1 y eIF1A escanea el mRNA en dirección 5' a 3' hasta encontrar un codón (AUG) en un contexto de secuencia apropiado (secuencia Kozac; AGCCAUGG), lo que lleva a la formación del complejo 48S (Hinnebusch and Lorsch, 2012; Alekhina and Vassilenko, 2012).

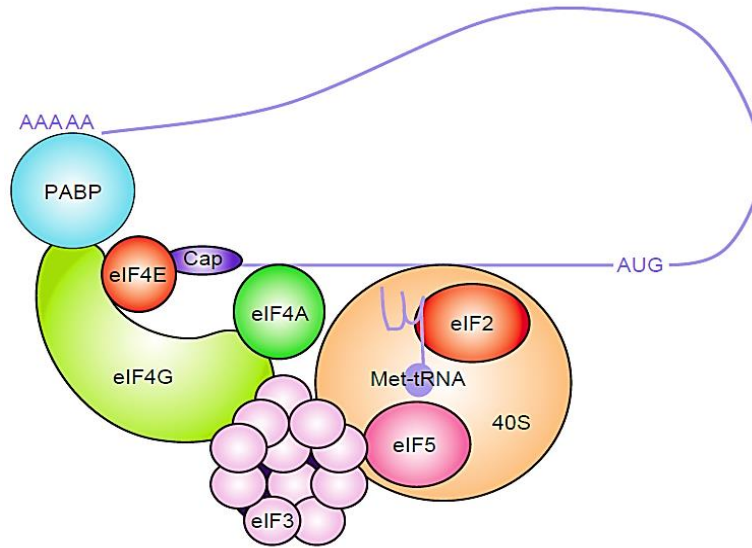


Figura 1. Complejo de pre-inicio 48S de la traducción eucariote. El complejo eIF4F, compuesto de los factores eIF4E, eIF4G y eIF4A, es el responsable de reclutar al mensajero. eIF4E es la proteína de unión al Cap, presente en el extremo 5' del mRNA. eIF4A es una helicasa de RNA ATP dependiente, que desenrolla estructuras secundarias cercanas al Cap. eIF4G es una proteína de andamiaje, con dominios de unión para la proteína de unión al polyA (PABP), eIF4A, eIF4E y eIF3 (complejo de multisubunidades que se une al ribosoma 40S), permitiendo de esta forma circularizar el mensajero y reclutar a los demás factores del inicio de la traducción. Tomado de Robaglia *et al.* (2006).

El apareamiento entre el codón AUG y el anticodón Met-tRNA_i promueve cambios conformacionales en los factores, lo que resulta en la hidrólisis de GTP por eIF2, permitiendo su disociación (así como de otros factores) del complejo, para unir la subunidad ribosomal 60S a la subunidad 40S y formar así el complejo de inicio 80S, encargado de llevar a cabo las siguientes etapas (elongación y terminación) de la traducción (Hinnebusch and Lorsch, 2012).

En eucariotes se conoce que la participación de eIF4E en el inicio de la traducción es regulada a distintos niveles: 1) expresión diferencial tejido-específica; 2) interacción con proteínas inhibitoras, conocidas como 4E-BPs; 3) modificación por fosforilación del residuo Serina 209; y 4) presencia de isoformas parálogas (Goodfellow *et al.*, 2008; Klann and Dever, 2004; Scheper *et al.*, 2002; Richter and Sonenberg, 2005). Todos estos mecanismos permiten modular la síntesis de proteínas, de manera global o particular de ciertos mensajeros, durante el desarrollo normal o en condiciones de estrés. Estos procesos han sido descritos ampliamente

en mamíferos. En plantas, se conoce muy poco sobre el mecanismo de regulación de eIF4E.

4.2 Clasificación de los factores tipo eIF4E

El factor eIF4E se encuentra presente en una gran variedad de taxones (Metazoa, Viridiplantae, Fungi y Protista), donde la mayoría de los genomas presentan múltiples copias génicas que codifican para proteínas similares o isoformas y, aunque algunas de estas están restringidas a ciertos grupos filogenéticos, por ejemplo eIFiso4E se encuentra sólo en plantas (Browning, 1996), todos los organismos poseen un miembro que es expresado de manera constitutiva y que es capaz de llevar a cabo el proceso de traducción global.

Las proteínas eIF4E se encuentran estructuralmente relacionadas ya que todas son capaces de reconocer la estructura 5'Cap de los mensajeros eucariontes. Por ello en su secuencia de aminoácidos contienen residuos conservados incluyendo varios Trp característicos. Acorde a esto, las proteínas de la familia eIF4E se han agrupado en tres clases principales, dependiendo de la conservación de los residuos Trp 43 y 56 (numeración correspondiente al eIF4E-1 de humano): clase I, clase II y clase III (Figura 2; Joshi *et al.*, 2005).

La clase I conserva ambos residuos de Trp, y al menos un miembro de esta clase ha sido identificado en todos los organismos eucariontes. Dentro de esta clase se encuentran eIF4E y eIFiso4E de plantas, eIF4E-1 de humano y eIF4E de hongos. Los miembros de esta clase se consideran canónicos y participan para llevar a cabo la traducción.

La Clase II tiene sustituidos ambos residuos, Trp 43 y Trp 56, por otros residuos hidrofóbicos: Tyr, Phe o Leu. Miembros de esta clase incluyen a la familia eIF4E-2 de metazoarios y a la familia nCBP de Viridiplantae (Figura 2). Estudios genéticos y bioquímicos han revelado que las proteínas de esta clase, tales como eIF4E-2A (*H. sapiens* y *M. musculus*), IFE-4 (*C. elegans*), 4EHP (*D. melanogaster*) y nCBP (*A. thaliana*) son capaces de unirse a la estructura 5'Cap, pero su participación en la traducción es variable. Algunos muestran actividad parcial cuando se comparan con

el eIF4E canónico, otros no son capaces de formar un complejo eIF4F funcional y actúan como inhibidores de la traducción (Cho *et al.*, 2005). Esto ha llevado a plantear que los miembros de la clase II pueden tener una función diferente en el metabolismo del mRNA, probablemente en la regulación de estabilidad, localización o traducción para ciertos mensajeros (Joshi *et al.*, 2005).

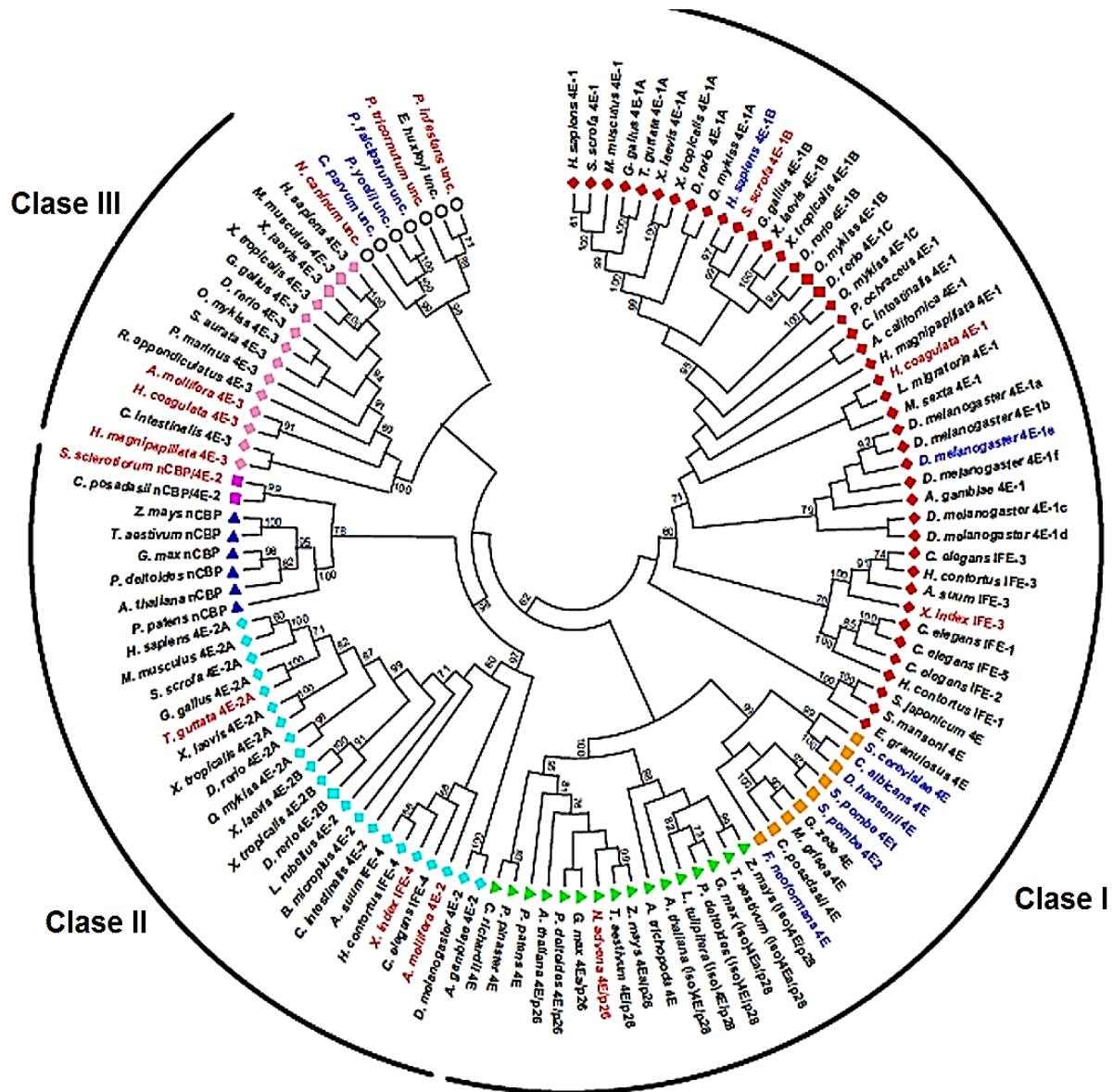


Figura 2. Árbol filogenético radial de los miembros de la familia eIF4E de múltiples especies. El nombre de los miembros de la familia eIF4E se encuentra en letras negras o rojas indicando si hay o no secuencia completa de la región conservada consenso, respectivamente. Las letras en azul indican que datos de secuencia genómica fueron usado para verificar y determinar la secuencia nucleotídica. El icono de la izquierda indica el grupo taxonómico: metazoarios (rombos); hongos (cuadrados); viridiplantae (triángulos) y protistas (círculos). A la derecha del diagrama se indica la clase a la cual pertenecen. Tomado de Joshi *et al.* (2005).

La clase III tiene sustituido sólo uno de los residuos de Trp, el Trp 56, por una Cys o Tyr. Miembros de esta familia han sido encontrados en algunos metazoarios, nidarios, moluscos, insectos o arácnidos y poseen 25-30% de identidad y 45-55% de similitud con miembros de clase I y clase II (Joshi *et al.*, 2005). Poco se conoce acerca de la función de esta clase en traducción. Estudios con eIF4E-3 de mamíferos han mostrado que la proteína es capaz de interactuar con la estructura 5'Cap *in vitro* (Joshi *et al.*, 2005; Osborne *et al.*, 2013). Se ha encontrado que el reconocimiento de esta estructura es llevada a cabo por un arreglo espacial atípico (debido a la sustitución del residuo aromático Trp 56 por una Cys). En estudios de inmunoprecipitación e *in vitro* se encontró que eIF4E-3 es capaz de interaccionar también con el factor eIF4G, aunque a menores niveles que el factor canónico eIF4E-1 (Osborne *et al.*, 2013; Frydryskova *et al.*, 2016). Debido a este tipo de interacciones se ha demostrado que eIF4E-3 actúa como un inhibidor, más que un inductor, de la expresión de ciertos mensajeros (Osborne *et al.*, 2012). Sin embargo, se ha observado de manera reciente que eIF4E3 puede actuar como un factor traduccional de ciertos mensajeros bajo estímulos específicos (London *et al.*, 2014).

4.3 Función de eIF4E en otros procesos

Además de la función canónica del factor eIF4E, antes descrita, este posee otras funciones independientes del proceso de traducción (véase Figura 3): regulación de la exportación nuclear de mensajeros específicos al citoplasma, participación en la susceptibilidad a infecciones virales y, localización a gránulos de estrés (SGs) y cuerpos de procesamiento (cuerpos P o PBs). La función de exportación de mensajeros nucleares ha sido observado en mamíferos, en donde una parte muy significativa de factor eIF4E (alrededor del 68%) está localizado en el núcleo en sitios conocidos como cuerpos nucleares (Strudwick and Borden, 2002; Iborra *et al.*, 2001). Se ha visto que los mensajeros a ser exportados (en particular, mensajeros que participan en la progresión del ciclo celular como ciclina D1), contienen una secuencia de 50 nucleótidos en el extremo 3' UTR conocida como elemento sensible a 4E (4ESE, véase Figura 3; Culjkovic *et al.*, 2007; Culjkovic *et al.*, 2005).

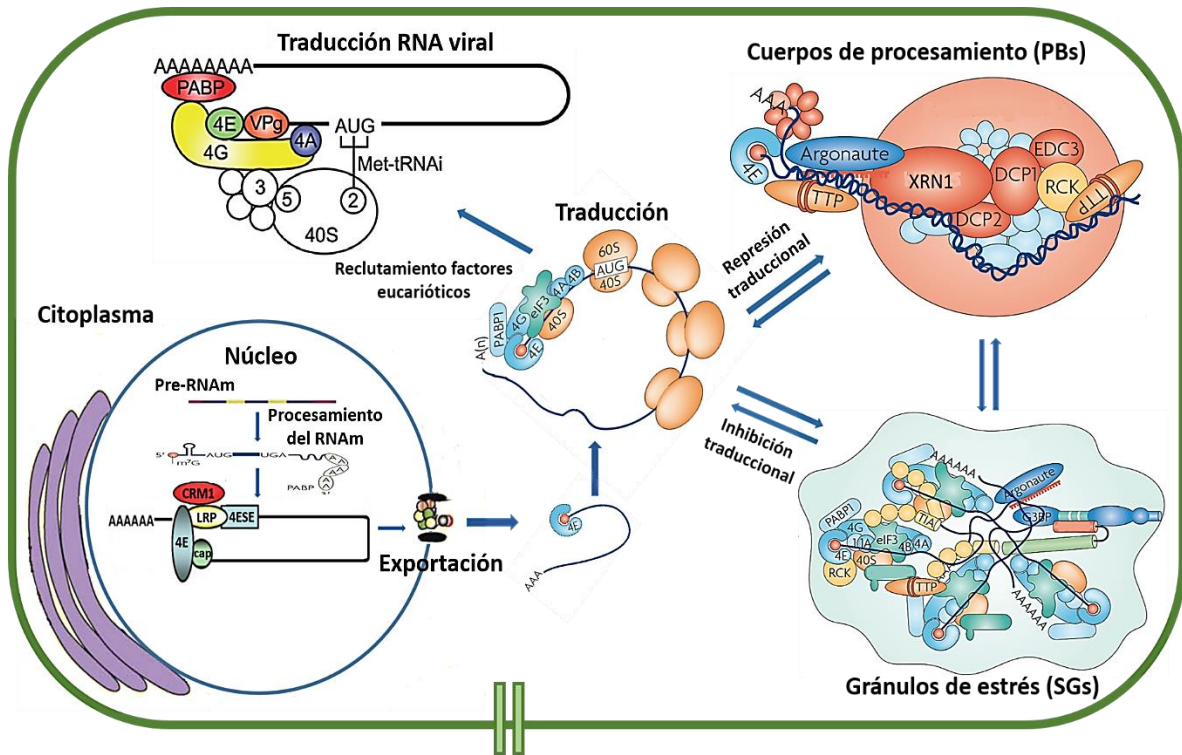


Figura 3. Participación del factor eIF4E en otros procesos del metabolismo del RNA. Una de las principales funciones de eIF4E en el citoplasma es el inicio de la traducción de mensajeros con estructura 5'Cap. Sin embargo, bajo ciertas condiciones el factor localiza a gránulos de estrés (SGs) y cuerpos de procesamiento (PBs). Los primeros contienen maquinaria traduccional y se consideran sitios transitorios de almacenamiento de mRNA. Los segundos se constituyen principalmente de maquinaria con actividad nucleolítica y se consideran sitios de represión y degradación de mensajeros. Dada la cercanía de localización de estos tres estados, se considera que existe un proceso de interconversión de un estado a otro (indicado por flechas). En plantas y mamíferos, se conoce que el factor eIF4E es capaz de reconocer a la proteína VPg unida covalentemente al extremo 5' del genoma de algunos virus, para el reclutamiento de la maquinaria traduccional y la traducción o, estabilización del genoma viral. En el núcleo, eIF4E cumple la función de exportación de mensajeros específicos al citoplasma a partir de la interacción con la estructura 5'Cap y la proteína LRP, que reconoce un elemento sensible (4ESE) presente en el extremo 3'UTR del mRNA. La participación de la proteína CRM1 permite exportar el mRNA. Tomado y modificado de Bailey-Serres *et al.* (2009) y Goodfellow and Roberts (2008).

De manera reciente se ha visto que el reconocimiento de esta secuencia requiere la interacción del factor eIF4E con una proteína de penta-trico-peptidos repetidos ricos en leucina (LRPPRC, Leucine-Rich PentatricoPeptide Repeat protein; Volpon *et al.*, 2017). Esta proteína reconoce el elemento 4ESE presente en el mRNA, formando un complejo LRPPRC-eIF4E-mRNA. La exportación de este complejo requiere la asistencia del receptor de exporte nuclear CRM1/XPO1, que interactúa con la proteína LRPPRC para llevar a cabo la salida al citoplasma de mRNAs específicos.

En plantas la localización de eIF4E parece ser más dinámica. En *A. thaliana* se ha observado la presencia nuclear de eIF4E en células quiescentes, mientras que en células proliferativas se encuentra eIF4E mayoritariamente en el citoplasma (Bush *et al.*, 2009). Sin embargo, se desconoce si pueda llevar a cabo la función de exporte descrita para animales.

Se ha demostrado que eIF4E participa en la localización y estabilidad de mensajeros a localizaciones citoplasmáticas del tipo gránulos de estrés (SGs) y cuerpos de procesamiento (PBs) descritos más adelante (Anderson *et al.*, 2006; Andrei *et al.*, 2005). Aunque la función en estos cuerpos no es del todo conocida, se ha planteado que la proteína eIF4E protege a los transcritos de la degradación y/o participe en su almacenamiento (vía su unión con el 5'Cap) hasta su reentrada a una nueva ronda traduccional (Schwartz *et al.*, 2000). Sin embargo, en estudios recientes en mamíferos se observó que el reclutamiento de eIF4E a PBs o SGs es independiente de la interacción eIF4E-5'Cap, pudiendo ser requerida la interacción con otras proteínas para su participación en la formación de gránulos citoplasmáticos (Ferrero *et al.*, 2012). Pese a que la localización de eIF4E en los gránulos citoplasmáticos está bien documentada en humanos y levaduras (Andrei *et al.*, 2005; Brengues and Parker, 2007), su homólogo en *A. thaliana* ha sido sólo detectado en SGs (Weber *et al.*, 2008).

La participación del factor eIF4E en infecciones virales ha sido descrito en animales (Chaudhry *et al.*, 2006) y numerosas especies de plantas (Ruffel *et al.*, 2002; Nicaise *et al.*, 2003). La ausencia o mutación de residuos de aminoácidos que modifican la estructura proteica de eIF4E llevan a una total o parcial resistencia a infecciones por virus de la familia *Potyviridae* (virus de RNA monocatenario; Sato *et al.*, 2005; Yeam *et al.*, 2007). Esta familia se caracteriza por la presencia de VPg covalentemente unida al extremo 5' del RNA genómico, la cual es capaz de interactuar con la proteína eIF4E, y un extremo 3' poliadenilado (Charron *et al.*, 2008; Jiang *et al.*, 2011; Roudet-Tavert *et al.*, 2007). Se ha considerado que la proteína VPg actúa de manera análoga al 5'Cap, por lo que compite con los mRNA eucariontes por el reclutamiento del complejo traduccional, llevando a cabo así su ciclo de vida y de infección en la planta (Léonard *et al.*, 2000; Khan *et al.*, 2008). Sin

embargo, también se ha visto que la pérdida de la unión covalente entre eIF4E y VPg no siempre correlaciona con pérdida de la susceptibilidad a infecciones virales, lo que plantea la existencia de otros factores o proteínas codificadas por el virus y/o el propio hospedero que permiten una interacción fuerte entre el factor eIF4E y la proteína VPg o bien, que el factor eIF4E posea una función adicional en el ciclo de vida del virus diferente al proceso de traducción (para más detalle revisar Dinkova *et al.*, 2016; Wang and Krishnaswamy, 2012). En este sentido se ha encontrado que las proteínas virales CI y PI actúan como determinantes de virulencia requeridos para la resistencia recesiva mediada por eIF4E (Abdul-Razzak *et al.*, 2009; Nakahara *et al.*, 2010). Además, se ha demostrado que diferentes isoformas del factor eIF4E pueden determinar la susceptibilidad a infecciones por virus dependiendo de la especie de planta, siendo en algunos casos necesaria la ocurrencia de mutaciones tanto en eIF4E como en eIFiso4E para generar resistencia (Ruffel *et al.*, 2006; Hwang *et al.*, 2009). De manera reciente también la isoforma nCBP fue identificada como factor de resistencia a infección por virus (Keima *et al.*, 2016).

4.4 Factores eIF4E de clase II

Si bien todos los miembros de la familia 4E son capaces de reconocer la estructura 5'Cap de los mRNA, muchas proteínas cumplen funciones particulares en el proceso y control de la expresión génica como: promover o inhibir la traducción de ciertos mensajeros, expresión diferencial en ciertos tejidos, traducción específica bajo estímulos de estrés o, mostrar distintas propiedades bioquímicas (Zuberek *et al.*, 2016). En este sentido, se ha observado que miembros de la familia de factores de clase II cumplen una función de represión traduccional de mensajeros específicos. En *Drosophila melanogaster* (*Dm*) existen ocho proteínas relacionadas a eIF4E: 7 de ellas pertenecen a la clase I y solo una, *Dm* 4EHP, a la clase II (Hernández *et al.*, 2005). En humanos existen 4 parálogos de eIF4E: eIF4E (o eIF4-1a) y eIF4E-1b de la clase I, eIF4E-3 de la clase III y, eIF4E2 (o 4EHP) de la clase II (Joshi *et al.*, 2004). *Caenorhabditis elegans* posee 5 miembros de la familia 4E: IFE-1, IFE-2, IFE-3 e IFE-5 de la clase I e, IFE-4 de la clase II (Keiper *et al.*, 2000).

En *A. thaliana* existen 5 isoformas: eIF4E, eIF(iso)4E, eIF4E1b y eIF4E1c de la clase I y, nCBP la única de clase II (Kropiwnicka *et al.*, 2014). La proteína 4EHP de *Drosophila* no contiene un motivo de unión para el factor eIF4G y, ha mostrado participar como un represor al competir con el eIF4E canónico en la interacción con la estructura 5'Cap de mensajeros específicos. En particular se han caracterizado tres mensajeros blancos reconocidos por 4EHP: el mensajero de *caudal* para reprimir la expresión de la proteína durante etapas específicas del desarrollo de *Drosophila* (Cho *et al.*, 2005); la represión del mensajero *hunchback* (*hb*) indispensable también para etapas iniciales del embrión (Cho *et al.*, 2006); y, el mRNA de *belle* (*bel*) requerido para la fertilidad femenina (Vardy and Orr-Weaver, 2007; Yarunin *et al.*, 2011). En cada caso, la represión del mensajero involucra la formación de un complejo inhibitorio mediante la interacción entre 4EHP, el mRNA y proteínas de unión a secuencias específicas del mRNA, pudiendo incluir o no a otras proteínas para establecer una circularización inhibitoria para la traducción (Figura 4, inciso B y C).

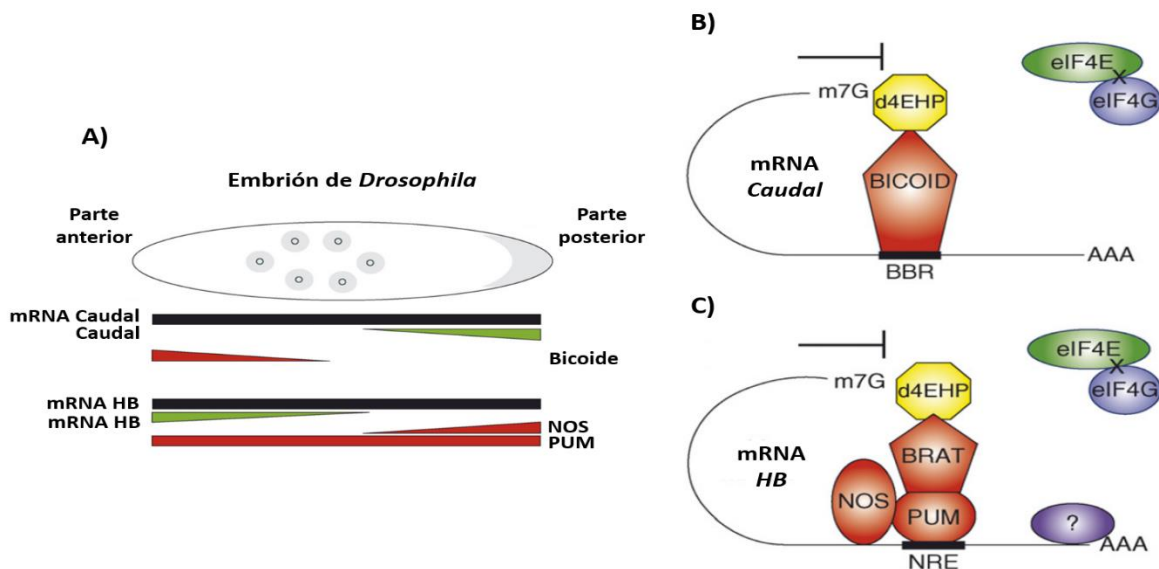


Figura 4. Represión traduccional de los mensajeros *Caudal* y *HB* para el correcto desarrollo del embrión en *Drosophila*. **A)** Localización de los mensajeros y de las proteínas reguladoras. Se observa que la expresión de las proteínas Caudal y HB se encuentra mantenida hacia la parte anterior del embrión, mientras que en la parte posterior su expresión es casi nula, debido a la presencia de las proteínas Bicoide y Nos que reprimen, en complejo con d4EHP, la expresión del mRNA correspondiente. **B)** y **C)** muestran el mecanismo de represión del factor d4EHP, asistido por proteínas de unión a RNA que reconocen una secuencia específica en el extremo 3' (BBR o NRE) presente en cada mensajero. La formación de este complejo inhibe la unión del factor eIF4E canónico, reprimiendo la traducción del mRNA. Tomado y modificado de Vardy and Orr-Weaver (2007).

La formación del complejo permite la expresión correcta de la proteína en un gradiente, a lo largo del embrión (véase Figura 4, inciso A).

La proteína que reconoce la secuencia específica de RNA es diferente para cada mensajero, y su función es identificar un elemento de respuesta presente en el extremo 3'UTR. Por ejemplo, para el caso del mRNA *caudal* esta proteína se conoce como Bicoide que, junto con 4EHP, reprimen la expresión del mensajero en zonas particulares del embrión, permitiendo una distribución correcta de la proteína Caudal para el correcto desarrollo (Figura 4, inciso A y B). Para el caso particular del mensajero de *hb* se requiere la participación de 3 proteínas que cumplen la función de Bicoide: Nanos, Pumilo y Brat. Pum y Nanos interactúan con un elemento de respuesta a Nos (NRE) presente en el extremo 3'UTR del mensajero, mientras que Brat une ambas proteínas, junto con 4EHP, a la estructura 5'Cap para formar el complejo represor (Figura 4, inciso A y C; Cho *et al.*, 2006). Mutantes nulas de cualquiera de estas proteínas ocasionan letalidad en la formación del embrión. En mamíferos 4EHP también ha mostrado tener funciones importantes en el desarrollo embrionario al interactuar con las proteínas GIGYF2 (proteína de unión a secuencias ricas en prolina) y ZNF598 (una proteína con dedos de Zinc). La ausencia de esta interacción lleva a un aumento de la traducción y letalidad perinatal en ratón (Morita *et al.*, 2012). Pese a estas evidencias de función represora para los factores eIF4E de clase II, estudios recientes en células de mamífero han mostrado que bajo condiciones de extrema depleción de oxígeno (hipoxia), las células usan a 4EHP para la traducción de manera alternativa (Timpano *et al.*, 2016; Uniacke *et al.*, 2014). Por ejemplo, se ha visto que las proteínas EGFR (receptor de un factor de crecimiento endotelial) e IGF1R (un receptor de un factor de crecimiento tipo insulina) se acumulan preferencialmente en hipoxia y son sintetizados con ayuda de 4EHP en ausencia de eIF4E canónico, que en condiciones de estrés se encuentra reprimido (David Ho *et al.*, 2016). Este complejo alternativo de traducción permite a las células reprogramar la traducción global de los mensajeros para generar una respuesta adaptativa al estrés. En plantas la función de represión o participación en la traducción de mensajeros específicos, para los factores de clase II, no ha sido demostrada.

4.5. Represión traduccional en estrés

Durante y después de la transcripción en el núcleo, se lleva a cabo una maduración del pre-mRNA que incluye la adición de la estructura 5´Cap, splicing de intrones y poliadenilación, lo que culmina en el exporte de un transcrito funcional al citoplasma. Este proceso involucra a una gran variedad de proteínas de unión a RNA que se unen a los mensajeros para formar gránulos ribonucleoprotéicos de mRNA (mRNP), regulando así la actividad de los transcritos unidos (Franks and Lykke-Andersen, 2008). Una vez en el citoplasma, algunos mensajeros son programados para su inmediata traducción, un proceso que involucra la remoción de las proteínas de unión a RNA y el ensamblado en polisomas. Bajo condiciones de estrés algunos mensajeros son mantenidos en un estado traduccionalmente reprimido y transportados a localizaciones citoplasmáticas específicas hasta que el desarrollo, o señales ambientales particulares, permitan su traducción (Eulalio *et al.*, 2007). De esta manera, los mRNPs pueden encontrarse en tres poblaciones principales: en polisomas, en cuerpos de procesamiento (PBs) y en gránulos de estrés (SGs, veáse Figura 5), las dos últimas consideradas como grandes centros de almacenamiento y degradación de mRNAs (Anderson and Kedersha, 2008; Kedersha *et al.*, 2005).

En humanos y plantas se ha evidenciado que estos tres estados coexisten en una célula, cercanos físicamente uno del otro (Kedersha *et al.*, 2005; Weber *et al.*, 2008). Esta proximidad puede ser necesaria para el intercambio de proteínas y mRNAs que son destinados a un determinado estado de represión traduccional. Por ejemplo, como la formación de SGs es determinada por una condición de estrés en la célula, estos gránulos pueden proteger al transcrito durante el lapso que dure el estímulo, u ocurra un proceso de adaptación, y reiniciar su traducción una vez que las condiciones son más favorables (Maldonado-Bonilla, 2014). Por otra parte, cuando los mRNAs agregados a estos SGs no son requeridos, la proximidad de localización puede facilitar su transporte y degradación en PBs. Se considera que los PBs favorecen un proceso de degradación de mRNAs reprimidos traduccionalmente provenientes de polisomas, SGs o, directamente después del

exporte del núcleo si el mRNA posee mutaciones que generan proteínas truncas (degradación de mensajeros con mutaciones sin sentido, vía NMD: Nonsense Mediated Decay, por sus siglas en inglés). Sin embargo, la presencia del factor eIF4E en PBs indica que los mensajeros agregados en esta localización también pueden ser re-incorporados a rondas traduccionales o a SGs (Andrei *et al.*, 2005; Brengues and Parker, 2007).

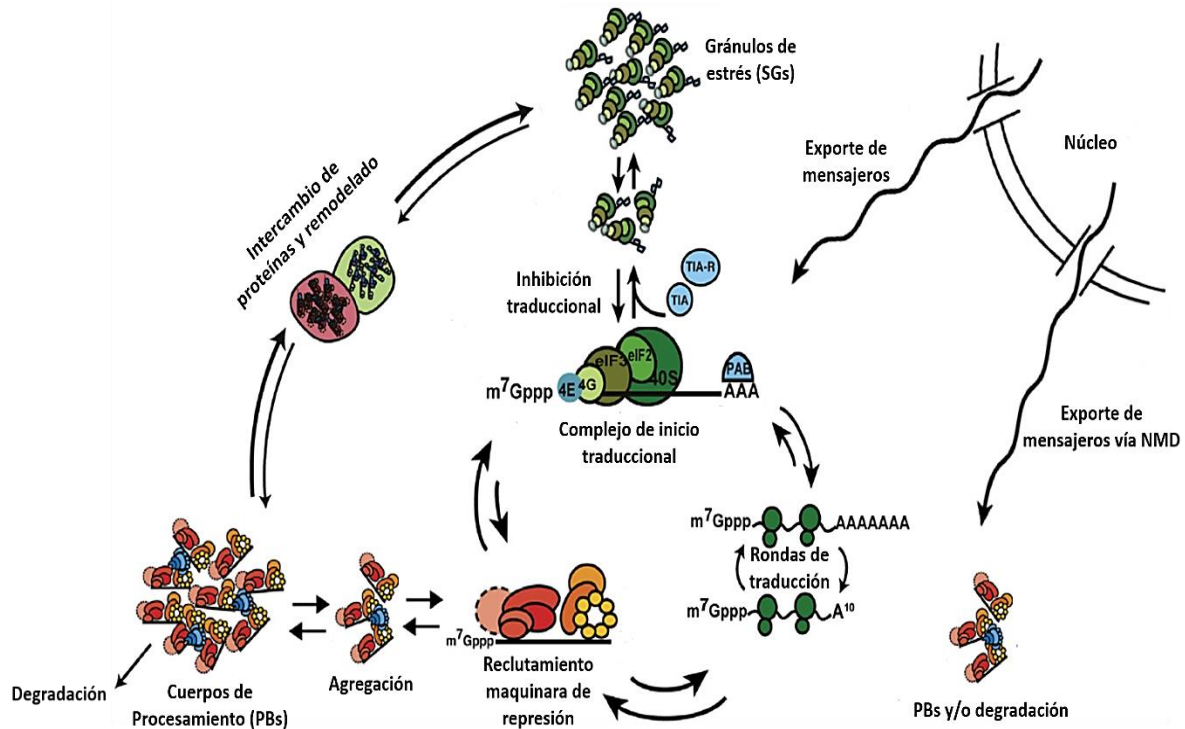


Figura 5. Modelo del “ciclo del mRNA”. En el modelo se muestran los diferentes estados citoplasmáticos de los mRNAs: Polisomas, cuerpos de procesamiento (PBs) y gránulos de estrés (SGs). Los mRNAs en polisomas pueden ser sometidos a varias rondas traduccionales por lo que se consideran traduccionalmente activos. En respuesta a una represión traduccional se favorece la interacción de los mRNAs con la maquinaria de degradación, siendo localizados a PBs. Los mensajeros pueden ser almacenados en estos cuerpos, degradados o reincorporados posteriormente a polisomas. En condiciones de estrés o defectos en el inicio de la traducción, la represión traduccional conlleva a la localización de mRNAs en SGs que contienen una maquinaria del complejo traduccional, parcialmente desensamblada, y otras proteínas. Cuando se recuperan las condiciones óptimas, los mensajeros localizados en estos gránulos pueden regresar a rondas traduccionales o de lo contrario ser enviados a PBs para su degradación. Dada la cercanía física entre los PBs, SGs y complejos de traducción, se considera que existe una remodelación dirigida por proteínas en los tres estados que permite localizar a mRNAs en cada uno de ellos, dependiendo de las condiciones y requerimientos de la célula. Tomado y modificado de Parker and Sheth (2007).

Cuando las condiciones de estrés son más severas (altas temperaturas o períodos prolongados de calor) algunos mensajeros pueden ser re-localizados a otro tipo de gránulos, conocidos como gránulos de estrés por calor (HSGs). Estos gránulos se

componen principalmente de proteínas de choque térmico (HSPs, Heat Shock Proteins) que se acumulan después de un período prolongado de calor. Debido a la actividad de chaperona de estas proteínas, la localización de los mensajeros y proteínas existentes a HSGs previene su desnaturalización, degradación y agregación en complejos irreversibles (Mu *et al.*, 2013). En plantas existe otro tipo de gránulos descritos como cuerpos de retículo endoplásmico (ERBs; Hara-Nishimura and Matsushima, 2003). Estos cuerpos se acumulan de manera constitutiva en plántulas y raíces, son inducidos por daños en hojas y, representan un sistema de defensa importante para la planta en condiciones de estrés biótico. Su composición principal son enzimas con actividad β -glucosidasa; sin embargo, se encuentran rodeados por una gran cantidad de ribosomas debido a la presencia de la membrana de retículo endoplásmico que los rodea (Hayashi *et al.*, 2001). Si bien la composición y formación de cada gránulo es distinta, dependiente del tipo de estrés e intensidad, su presencia permite a la célula adaptarse y sobrevivir hasta que las condiciones sean más favorables.

4.5.1 Cuerpos de procesamiento (PBs)

Los cuerpos de procesamiento, cuerpos P o PBs (Processing Bodies, por sus siglas en inglés), son estructuras altamente dinámicas donde los mRNAs que no están siendo traducidos se acumulan para ser almacenados hasta regresar a la traducción o bien, silenciar su expresión por microRNAs y degradarse (Eulalio *et al.*, 2007). En eucariontes muchas proteínas identificadas como represores traduccionales, parte del complejo de silenciamiento inducido por RNA o, proteínas encargadas del control de calidad y degradación de mRNAs, co-localizan en estos gránulos citoplasmáticos (Thomas *et al.*, 2011). Debido a su composición se les considera como reservorio de represión y degradación de mensajeros. Los PBs se identifican por la presencia de proteínas características, como partículas esféricas uniformes distribuidas en todo el citoplasma de la célula de manera constitutiva. Sin embargo, en condiciones de estrés pueden aumentar de tamaño y número (Kedersha *et al.*, 2005; Teixeira *et al.*, 2005). Su formación se lleva a cabo por el desacoplamiento de mRNAs de los polisomas, en presencia de una vía activa de degradación o, por

degradación directa de mensajeros con mutaciones sin sentido (Teixeira *et al.*, 2005; Eulalio *et al.*, 2007). En distintos organismos (levaduras, plantas, humanos, entre otros) se han descrito proteínas características para los PBs. Entre estas se encuentran las enzimas participantes en la vía general de degradación de mRNAs como: deadenilasas, enzimas de decapping 5'-m⁷GpppN y coactivadores, exonucleasas de RNA 5'-3', así como proteínas de unión a RNA involucradas en la degradación de mensajeros sin sentido o, en el silenciamiento inducido por miRNA (Anderson and Kedersha, 2006; Eulalio *et al.*, 2007; Franks and Lykke-Andersen, 2008; Kedersha *et al.*, 2005). En *A. thaliana* se ha reportado la presencia de enzimas de decapping (DCP1, DCP2 y Varicosa; VCS), proteínas activadoras del complejo de decapping (LSM1-7), exonucleasas 5'-3' (XRN4; homóloga a XRN1 de humano), proteínas encargadas de la de-adenilación de mRNA (CCR4-CAF1 y PARN), así como las proteínas con dedos de Zinc en tándem (TZF, por sus siglas en inglés) y de unión a polipirimidinas (PTB, por su siglas en inglés; véase Figura 6).

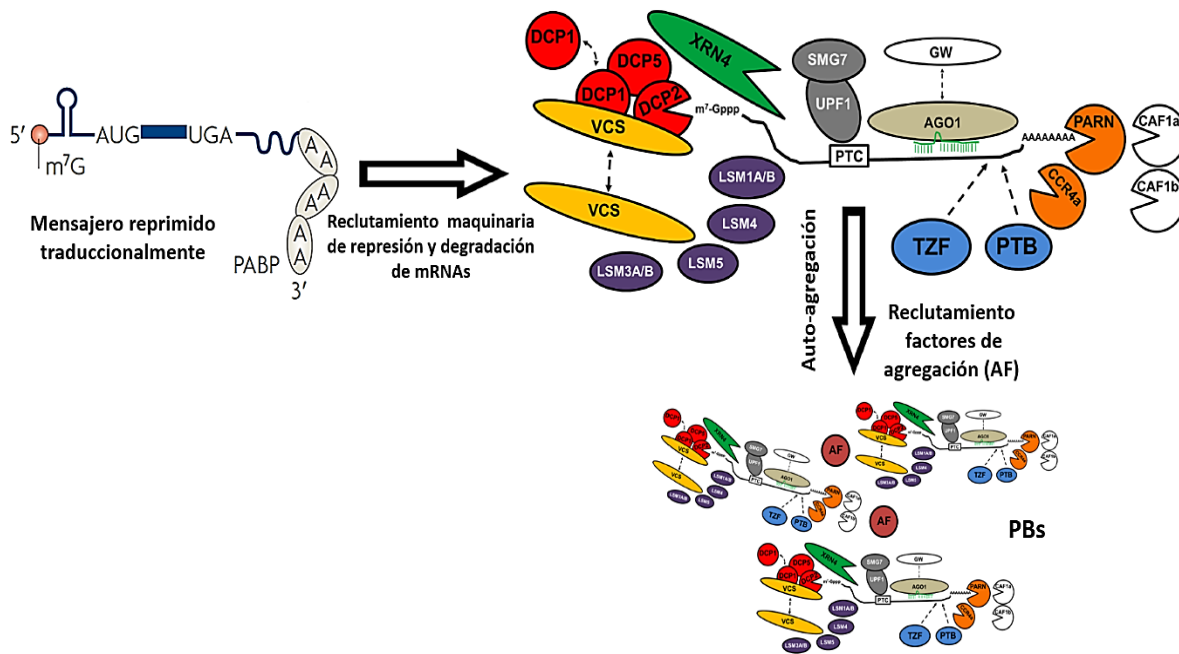


Figura 6. Composición de PBs en *A. thaliana*. Proteínas de decapping (DCP1, DCP5, DCP2, VCS y LSM1-7), deadenilasas (PARN y complejo CCR4-CAF1), exonucleasas (XRN4), proteínas del complejo de silenciamiento de RNA dependiente de miRNA (AGO1), maquinaria de la vía NMD (UPF1 y SMG7), así como proteínas de unión a RNA (TZF y PTB), localizan y forman parte de PBs, gránulos ensamblados y acoplados con la inhibición traduccional de mensajeros. Se sabe que la aglomeración de este complejo inicial requiere la presencia de factores de agregación (AF), aún desconocidos, que medien el auto-ensamblado de las estructuras para formar gránulos más grandes. Tomado y modificado de Maldonado-Bonilla (2014).

Al igual que en la formación de SGs, la aglomeración de PBs pequeños para formar complejos grandes requiere la participación de proteínas con dominios de unión a RNA como factores de nucleación; sin embargo, hasta ahora se desconoce que proteínas participen en este proceso (factores de agregación, AF. Figura 6; para más detalles véase Maldonado-Bonilla, 2014; Xu and Chua, 2011).

Dependiendo de las condiciones de estrés que inducen la formación de los PBs y del tipo de organismo, pueden estar presentes también proteínas como AGO1 y GW182, implicadas en el silenciamiento de RNA dependiente de miRNA, UPF-1 y SMG7 que participan en la vía NMD para reconocer codones de termino prematuros (PTC, por sus siglas en inglés) presentes en el extremo 3' del mRNA (Liu *et al.*, 2005; Parker and Sheth, 2007). El factor de inicio de la traducción eIF4E es el único factor traduccional que ha sido encontrado en PBs de células de mamífero (Anderson and Kedersha, 2006; Parker and Sheth, 2007; Andrei *et al.*, 2005). A diferencia de SGs, los mensajeros reclutados a PBs son principalmente mRNAs de-adenilados, debido a la ausencia de la proteína PABP.

4.5.2 Gránulos de estrés (SGs)

En células de mamífero, diferentes tipos de estrés como calor, estrés oxidativo, estrés osmótico, entre otros, inhiben la traducción de la mayoría de los mensajeros poli-adenilados, que se agregan en localizaciones citoplasmáticas conocidas como gránulos de estrés (SGs, por sus siglas en inglés; Kimball *et al.*, 2003; Anderson and Kedersha, 2006). Estos gránulos son agregaciones de proteínas y RNA dinámicas y transitorias. Después del periodo de estrés se dispersan, enviando a los mensajeros de regreso a complejos polisomales para su traducción o bien, a PBs para degradación (Mahboubi and Stochaj, 2017). Su inducción se produce bajo estrés y no se observan en células que crecen en condiciones favorables o, se observan de manera muy escasa. El tamaño de los SGs es variable, dependiente del tipo y duración del estrés, variando el diámetro desde 0.1 μm hasta 4 μm (Anderson and Kedersha, 2009). La composición de los SGs es dinámica y estrés-específica. Sin embargo, existen componentes siempre presentes en estos gránulos como son los mensajeros poli-adenilados (excepto mensajeros que codifican para

algunas HSPs, como HSP70), miRNAs, factores de inicio de la traducción, componentes de la subunidad pequeña ribosomal y, proteínas que regulan el procesamiento, transporte y estabilidad de los mRNAs (Mahboubi and Stochaj, 2017; Eulalio *et al.*, 2007; Kedersha *et al.*, 2005). Entre las proteínas que se encuentran en SGs están eIF3, eIF4G, eIF4A, eIF4E, PABP, la subunidad ribosomal 40S, antígeno TIA1 (mamíferos) entre otras (Kedersha *et al.*, 2002; Kimball *et al.*, 2003). Debido a la presencia de estos factores, se ha asumido de manera razonable que los mensajeros liberados de polisomas en células estresadas son dirigidos primero a SGs (Kedersha *et al.*, 2005).

El ensamblado de SGs requiere de diversas etapas (Mahboubi and Stochaj, 2017). La primera ocurre cuando los complejos de inicio traduccional son liberados de polisomas y varios complejos comienzan a agregarse en el citoplasma formando una localización inicial. Esta agregación requiere de proteínas de unión a RNA que faciliten el reclutamiento de otras proteínas y mensajeros. En mamíferos, TIA1 y TIA1-related (TIAR) son proteínas con dominios tipo prion que median esta agregación; su ausencia ocasiona pérdida de la formación de SGs (Gilks *et al.*, 2004). La segunda etapa involucra eventos de conglomeración de los complejos de agregación inicial para formar hetero-oligómeros (Anderson and Kedersha, 2007). Se ha visto que en esta etapa se requiere la actividad de proteínas chaperonas que estimulen la agregación secundaria de los SGs, permitiendo su crecimiento. HSP70 es una de las proteínas cuya expresión se ha visto incrementada después de la inducción del estrés y puede localizar en estos gránulos (Mateju *et al.*, 2017). Finalmente en la última etapa se reclutan factores adicionales como moléculas de señalización. La dinámica de formación, crecimiento y movimiento de SGs es debida a la asociación con proteínas motoras, como las miosinas y las formadoras de microtubulos (Thomas *et al.*, 2011; Mahboubi and Stochaj, 2017). Estas proteínas promueven la fusión de SGs pequeños y, cualquier mutación que afecte la dinámica de los microtúbulos afecta a su vez el ensamblado de SGs. En plantas existen también proteínas tipo TIA1, como la proteína 1B de unión a elementos ricos en Uracilo (UBP1B, por sus siglas en inglés), RBP45 y RBP47 (Lambermon *et al.*, 2000). Estas proteínas poseen, al igual que TIA1, tres dominios de unión a RNA del

tipo RBD y una región amino terminal rica en glutamina. Su localización principal es nuclear, donde cumplen la función de incrementar el splicing de intrones de baja eficiencia y la acumulación de mRNAs producidos bajo la regulación de ciertos promotores (Lambermon *et al.*, 2000). En condiciones de estrés por calor las proteínas re-localizan al citoplasma y se incorporan a SGs para prevenir la degradación de mRNAs vía unión al extremo 3'UTR (Weber *et al.*, 2008).

En mamíferos se ha visto que la fosforilación del factor eIF2 α es requerida para el ensamblado de SGs (Anderson and Kedersha, 2006). Esta fosforilación resulta en una inhibición de la formación del complejo de pre-inicio 43S, deteniendo la traducción y dando origen a la formación y acumulación de mRNAs en SGs.

4.5.3 Cuerpos de retículo endoplásmico (ERBs)

El retículo endoplásmico (RE) representa un organelo importante en células eucariotas, responsable de la síntesis y transporte de proteínas. En plantas se desarrollan distintos cuerpos o vesículas derivados del retículo (véase Figura 7, panel A) que permiten acumular proteínas específicas, por ejemplo almacenamiento de proteínas insolubles (cuerpos de proteína), proteasas específicas con señales de retención a RE (vesículas KDEL y ricinosomas) o, vesículas encargadas de transporte protéico (vesículas COP II y PAC; Hara-Nishimura and Matsushima, 2003). Existen otros cuerpos conocidos como cuerpos de retículo endoplásmico o ERBs (Endoplasmic Reticulum Bodies, por sus siglas en inglés) que a diferencia de los cuerpos antes mencionados poseen una forma alargada tipo vacuolar, con un tamaño mayor (~1 μm de diámetro por ~10 μm de longitud) que almacenan principalmente proteínas con actividad enzimática (Yamada *et al.*, 2011; Hayashi *et al.*, 2001). Estos cuerpos se clasifican en dos tipos: ERBs presentes de manera constitutiva y ERBs inducidos por estrés. Los ERBs constitutivos se encuentran presentes en células de epidermis de órganos como cotiledones, hipocotílos y raíces de plántulas de *A. thaliana* (véase Figura 7, panel B; Hara-Nishimura and Matsushima, 2003; Yamada *et al.*, 2011). Su presencia en estos órganos es dependiente del estado de crecimiento: aparecen después de la germinación y desaparecen durante la senescencia del tejido (Matsushima *et al.*, 2002; Hara-

Nishimura and Matsushima, 2003). En otros tejidos, por ejemplo hojas de roseta de planta adulta, la presencia de ERBs es prácticamente escasa en condiciones normales de crecimiento pero, cuando estas hojas son dañadas mecánicamente o por mordedura de insectos (estrés biótico) se induce la formación y acumulación de estos cuerpos (ERBs inducidos por estrés, véase Figura 7 panel C y D; Matsushima *et al.*, 2002).

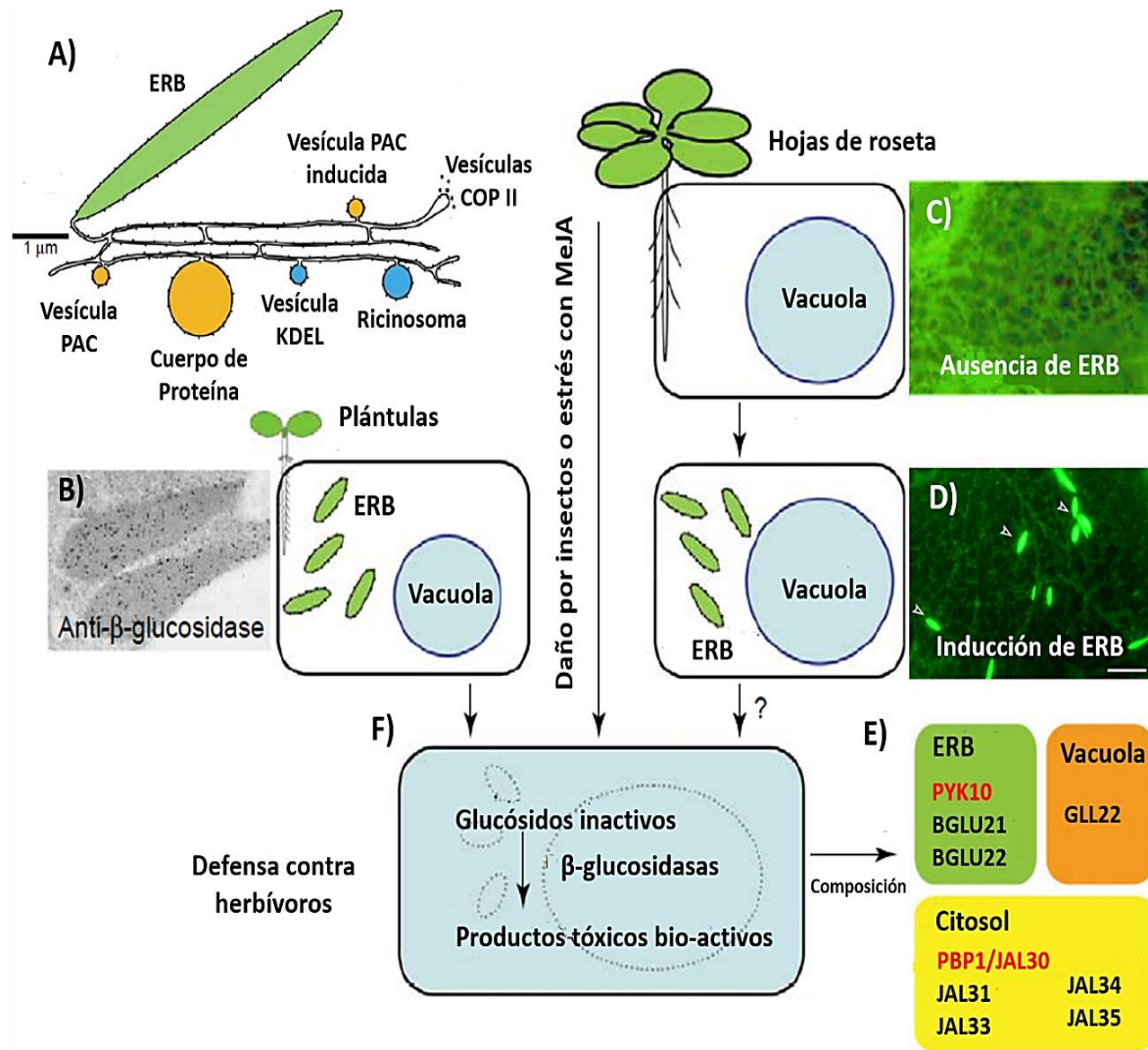


Figura 7. Representación de la distribución, inducción y función de ERBs en *A. thaliana*. (A) Tamaño y forma de ERBs comparado con otros cuerpos derivados de retículo. Se observa que ERBs tienen una forma alargada del tipo vacuolar (1 μm de diámetro por 10 μm de longitud). Los ERBs se encuentran de manera constitutiva en células epidermales de plántulas (B) o inducidos en hojas de roseta en respuesta a daño provocado por insectos o, con la hormona MeJA (C y D). Debido a la composición de estos ERBs y su interacción con otras proteínas de citoplasma y vacuolas (E), su ruptura lleva a la producción de compuestos tóxicos por PYK10 (β -glucosidasa) como mecanismo de defensa (F). Tomado y modificado de Hara-Nishimura and Matsushima (2003).

Se ha visto también que tratamientos de las hojas con la hormona Metil Jasmonato (MeJA, hormona que promueve resistencia contra patógenos) induce la formación de ERBs. Estas observaciones definen a los ERBs como un sistema de defensa importante para la planta contra estrés biótico.

Estudios con una mutante de *A. thaliana* que no desarrolla ERBs (conocida como mutante *nai1*) han mostrado que el principal constituyente de estos cuerpos es la proteína con actividad enzimática PYK10, una β -glucosidasa que posee en su extremo amino un péptido señal de localización y, en su extremo carboxilo una señal de retención a retículo endoplásmico conocida como secuencia KDEL, que permite también su localización a este organelo (Matshusima *et al.*, 2003). PYK10 pertenece a una gran familia de enzimas β -glucosidasas y, en *A. thaliana* se ha visto que otros 8 miembros del tipo PYK10 localizan a ERBs (Ogasawara *et al.*, 2009). Proteasas inducibles por estrés como RD21 (proteína de respuesta a desecación) y γ VPE (enzima de procesamiento vacuolar) también localizan a ERBs (Hayashi *et al.*, 2001).

Los sustratos descritos para PYK10 y otras β -glucosidasas pertenecen a un grupo de compuestos conocidas como glucósidos, moléculas compuestas por un azúcar y otra molécula de distinta naturaleza. Estos compuestos se encuentran almacenados en estructuras vacuolares, cercanas a ERBs, en un estado inactivo. En condiciones de estrés biótico, tanto ERBs como vacuolas son lisados, permitiendo la liberación e interacción sustrato-específico de sus componentes. La actividad enzimática resulta en la obtención de derivados tóxicos que permiten contender contra el daño ocasionado por herbívoros y otros patógenos (véase Figura 7, panel F; Ketudat and Esen, 2010; Yamada *et al.*, 2011). Se ha visto que la actividad de PYK10 requiere la asistencia de otras proteínas del tipo lipasa (GLL, GDSL lipase-like) y lectinas relacionadas a jacalinas citosólicas (JAL, jacalin-related lectin) como PBP1 (véase Figura 7, panel E; Nagano *et al.*, 2005, 2008). PBP1 es una proteína no localizada a ERBs, sin embargo forma junto con PYK10 y las proteínas GLL un agregado protéico en el citosol (una vez inducida la lisis de ERBs). Esta interacción permite aumentar y regular la actividad enzimática de PYK10 (Nagano *et al.*, 2005). Por otra parte, análisis de mutantes de JALs y GLLs ha

mostrado que estas proteínas regulan también el tamaño de los agregados de PYK10 (Nagano *et al.*, 2008). Finalmente se ha descrito que el gen *NAI1* regula la expresión de PYK10 y formación de ERBs (Matsushima *et al.*, 2004; Nakano *et al.*, 2014). Este gen codifica un factor transcripcional del tipo bHLH (basic helix-loop-helix), su disrupción (mutantes *nai1*) anula por completo la formación de ERBs. Además, se ha observado que proteínas como PBP1, JALs y GLLs son expresadas de manera dependiente de *NAI1*, indicando que este factor es un regulador maestro de la formación de ERBs.

4.5.4 Gránulos de estrés por calor (HSGs)

La exposición de un organismo a elevadas condiciones de temperatura, por períodos prolongados de tiempo, lleva a un arresto general de la síntesis de proteínas; sin embargo, bajo estas condiciones aumenta la expresión y acumulación de una clase importante de proteínas que permiten a la célula preservar los mensajeros y proteínas pre-existentes hasta que las condiciones de estrés cesen. Estas proteínas corresponden a una gran familia conocida como proteínas de choque térmico o HSPs (Heat Shock Proteins). Las HSPs están involucradas principalmente en el ensamblado, transporte, correcto plegamiento, protección contra desnaturalización irreversible y, mantenimiento del estado normal de plegamiento de un sinfín de proteínas, así como de promover la degradación de proteínas mal plegadas en distintas condiciones de estrés (Mu *et al.*, 2013; Al-Whaibi, 2010). Debido a estas funciones se conoce a las HSPs como proteínas con actividad chaperona o proteínas chaperonas. En plantas las HSPs se agrupan en 5 clases de acuerdo a su peso molecular (Mu *et al.*, 2013): 1) HSP 100, 2) HSP 90, 3) HSP 70, 4) HSP 60 y 5) sHSP (proteínas de choque térmico pequeñas). Las sHSPs están clasificadas a su vez en 12 sub-familias de acuerdo a la similitud de secuencia de aminoácidos y localización en distintos compartimentos celulares (Siddique *et al.*, 2008): CI-CVII (clase I-VII, con localización núcleo-citoplasma), ER (de retículo endoplásmico), P (de plástidos), PO (de peroxisomas), MI y MII (ambas mitocondriales). La clase I posee más miembros (6 en plantas).

En condiciones de estrés por calor las HSPs se agregan para formar complejos citosólicos conocidos como gránulos de estrés por calor o HSGs (Heat Stress Granules; Nover *et al.*, 1989; Kirschner *et al.*, 2000). Estos gránulos funcionan como sitios de almacenamiento para proteger proteínas y mensajeros termo-sensibles de eventos irreversibles de desnaturalización y agregación debidos al calor. La composición de estos complejos incluye principalmente a sHSPs de la clase I-II (Siddique *et al.*, 2008), aunque también contienen HSPs de mayor tamaño como HSP70 y 40 (Nover *et al.*, 1989; Smýval *et al.*, 2000) y el factor transcripcional inducido en estrés por calor HsfA2 (Scharf *et al.*, 1998). Con excepción de algunos estados de desarrollo (maduración de semillas y germinación, desarrollo de polen y maduración de fruta), la expresión de las sHSPs de CI y CII es inducida principalmente en condiciones de estrés por calor (Scharf *et al.*, 1997). Se ha visto que la formación de HSGs requiere de un proceso específico de ensamblado dependiente de la presencia de homo-oligómeros de proteínas sHSPs de clase II, las cuales a su vez reclutan a proteínas sHSPs de clase I para formar los agregados de alto peso molecular (Kirschner *et al.*, 2000). Cuando las condiciones de estrés cesan, las sHSPs ayudan a re-naturalizar y des-agregar los sustratos con ayuda de otras HSPs, como HSP70/40, proteínas con actividad de chaperona ATP dependiente (Wagner *et al.*, 2005). Se ha demostrado que los HSGs son sitios de almacenamiento para mensajeros housekeeping (Nover *et al.*, 1989).

5. ANTECEDENTES

El gen *nCBP* (At5g18110) de *A. thaliana* está formado por 6 exones que codifican una proteína de 24 KDa. La proteína *nCBP* (novel Cap-Binding Protein) es un miembro de la familia eIF4E, de la clase II, debido a que tiene sustituidos los residuos Trp 43 y Trp 56 (homólogos al eIF4E de humano) por Phe y Tyr, respectivamente (de acuerdo a la clasificación de Joshi *et al.*, 2005). En estudios iniciales se observó que la proteína producida de manera recombinante une con mayor afinidad al 5' Cap, en comparación con eIF4E y eIF(iso)4E (Ruud *et al.*, 1998). Sin embargo, estudios recientes donde utilizaron análogos a la estructura 5' Cap mono, di y tri fosfatados sugirieron una afinidad equiparable con respecto a eIF(iso)4E y, menor respecto a eIF4E (Kropiwnicka *et al.*, 2014). Mediante análisis de doble híbrido, se encontró que *nCBP* es capaz de interactuar con los factores eIF4G y eIF(iso)4G y, que puede recuperar la traducción *in vitro* de un mRNA hasta en un 30% en ausencia de eIF4E y eIF(iso)4E (Ruud *et al.*, 1998). Sin embargo, hasta el momento no ha sido posible aún definir su participación en la traducción *in vivo*. Un análisis de expresión de *nCBP* a nivel de mRNA en diferentes tejidos de *A. thaliana* mostró que su expresión es ubicua (Figura 8), presentando el mayor nivel en raíz. En estudios globales de proteómica, *nCBP* fue detectado principalmente en botones florales, aunque con niveles altos también en raíz, sugiriendo una función tejido específica (Hidalgo, 2007).

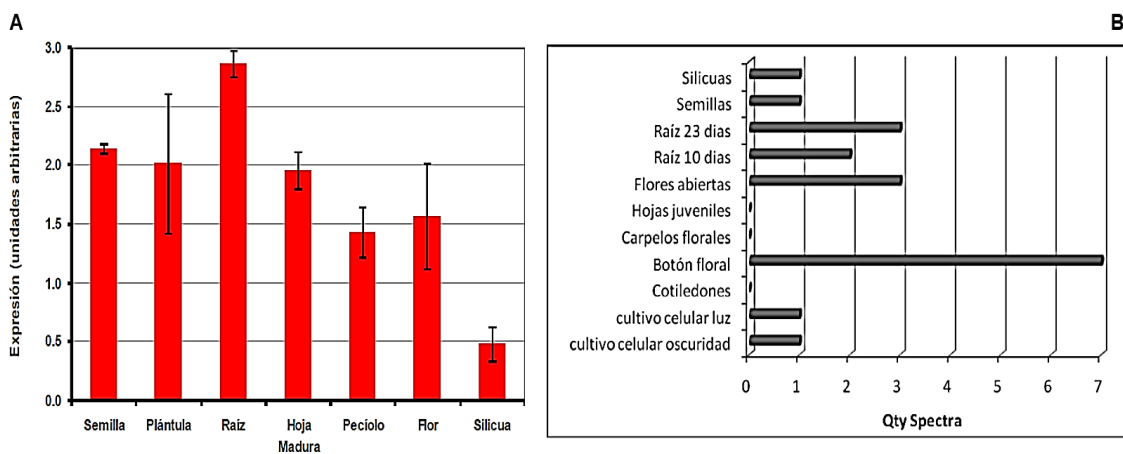


Figura 8. Perfil de expresión del mensajero y proteína de *nCBP* en *A. thaliana*. **A.** Medición de los niveles de mRNA de *nCBP* por densitometría de RT-PCR semicuantitativa en diferentes tejidos de la planta a lo largo de su desarrollo. **B.** Expresión de la proteína *nCBP* en diferentes tejidos de la planta. Tomado de Hidalgo (2007) y De la Torre (2009).

5.1 Función de nCBP en *Arabidopsis thaliana*

Existe muy poca información en la literatura respecto a la proteína nCBP de *A. thaliana*. Además del estudio inicial de Ruud (1998), antes mencionado, existen solo dos reportes adicionales sobre la proteína. Bush *et al.* (2009) reportaron que nCBP es particularmente abundante en complejos de unión a 5´Cap aislados de cultivos celulares en crecimiento activo, así como en zonas meristemáticas de hojas de *A. thaliana*, indicando una participación tejido-específica de la proteína en distintas etapas del desarrollo de la planta. En el segundo trabajo se observó que nCBP es un factor necesario para el eficiente movimiento célula a célula de virus del género *Potexvirus*, ya que su ausencia limita la propagación de la infección en plantas de *A. thaliana* pero no afecta la replicación viral (Keima *et al.*, 2016). Específicamente se observó que en ausencia de nCBP disminuye la expresión de dos proteínas importantes (TGB2 y TGB3), indispensables para el correcto movimiento del virus hacia otras células. Estos resultados indicaron que *nCBP* también puede actuar como un gen de resistencia recesiva en infecciones virales, función que hasta este momento solo había sido descrita para eIF4E y eIFiso4E, probablemente participando en la síntesis (función traduccional) y/o estabilidad de los mensajeros de TGB2 y TGB3.

En nuestro laboratorio se han llevado a cabo experimentos para dilucidar la función que pudiera desempeñar nCBP en el desarrollo normal de la planta. El análisis de una línea mutante homocigota nula de la proteína nCBP (inserción de T-DNA en el exón 4 del gen) arrojó diferencias fenotípicas estadísticamente significativas con respecto a plantas silvestres (WT), en condiciones normales de desarrollo. Estas consistieron en un mayor número de hojas de roseta, hojas caulinares, influorescencias y silicuas, así como un evidente retraso en su tiempo de floración de aproximadamente 10 días (Figura 9; León, 2016). Estos fenotipos sugieren una función de nCBP en el proceso de desarrollo y floración de *A. thaliana*. Debido al retraso en el tiempo de floración de la mutante, previamente se había analizado la expresión de genes representativos para las vías de floración, encontrándose que en ausencia de nCBP se alteran los niveles de mRNA de FCA y FLC (vía autónoma

de floración), fundamentando el fenotipo observado. Sin embargo, hasta el momento no ha sido posible descubrir la función que juega nCBP en la vía autónoma de floración (De la Torre, 2009).

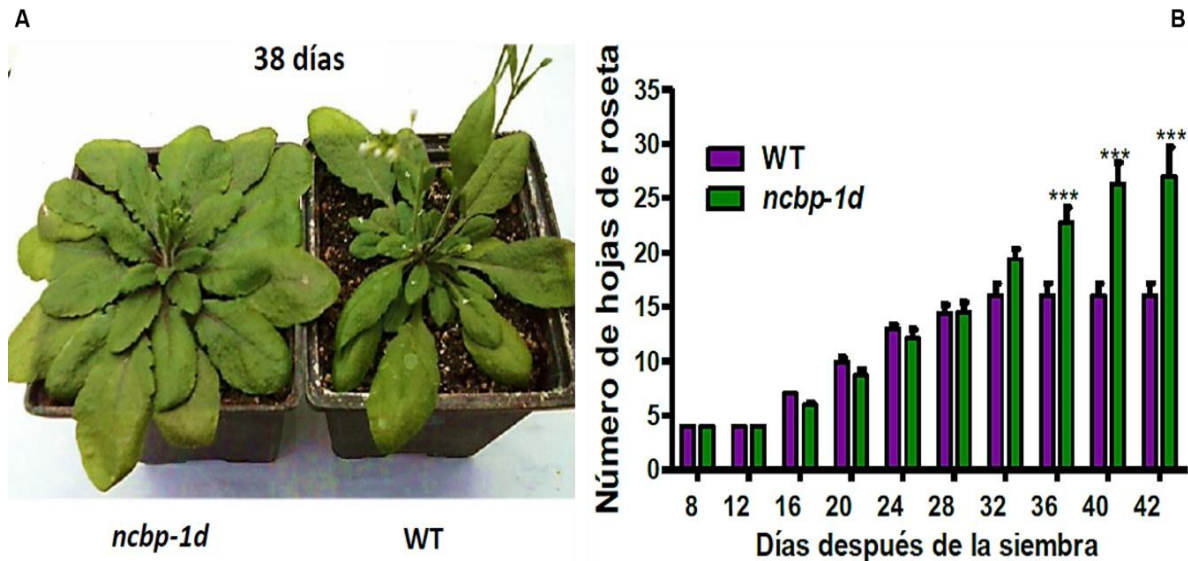


Figura 9. Fenotipo de plantas mutantes *ncbp-1d*. **A.** Fenotipo de plantas representativas *ncbp-1d* y silvestres (WT) a los 38 días de siembra. Se observa que *ncbp-1d* presenta retraso en la emergencia de la inflorescencia y mayor número de hojas de roseta comparada con WT, cuya inflorescencia mide más de 15 cm de altura. **B.** Número total de hojas de roseta contadas en el tiempo después de la germinación. A partir de los 28 días las plantas WT cesan la producción de hojas de roseta y dan paso a la aparición de inflorescencias, mientras que en plantas mutantes esta etapa ocurre aproximadamente 10 días después. Las barras con *** indican diferencia estadísticamente significativa con respecto a WT ($P < 0.001$). Tomado de León, 2016.

Para abordar la posible función de nCBP se realizaron ensayos de localización celular de fusiones en el C-terminal de nCBP y eIF4E con GFP. Las construcciones se expresaron de manera transitoria en protoplastos de hoja de *A. thaliana*, bajo el promotor constitutivo CaMV 35S y observados en microscopía confocal (Figura 10, A; de la Torre, 2009). De manera interesante se observó que la proteína se localiza en el citoplasma, mostrando patrones de acumulación en regiones específicas que asemejan SGs o PBs (Figura 10, B). La distribución particular de nCBP fue observada en diferentes eventos de transformación y, difería de la observada para eIF4E que mostraba patrones de distribución difusos. Esto plantea la posibilidad de que nCBP forma parte de algún complejo relacionado a estrés.

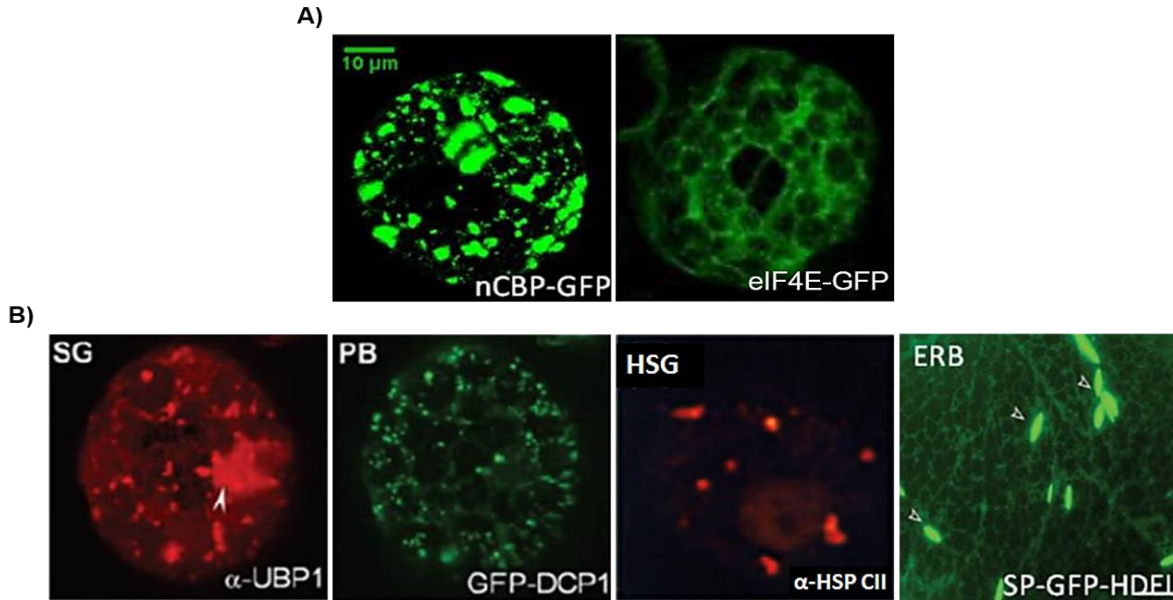


Figura 10. Localización de nCBP-GFP y comparación con otros gránulos citoplasmáticos descritos en plantas. **A)** Se observa que la localización de nCBP-GFP en protoplastos de *A. thaliana* es citoplasmática, en acúmulos preferenciales (aún de naturaleza desconocida), a diferencia de eIF4E-GFP que presenta una distribución citoplasmática difusa. Tomado de de la Torre (2009). **B)** La distribución de nCBP-GFP asemeja la distribución de gránulos de estrés descritos, en especial a SGs y PBs. La expresión de UBP1 y DCP1, marcadores de SGs y PBs respectivamente, es en protoplastos del mesófilo de *Nicotiana*. Tomado de Weber *et al.* (2008). Los ERBs son vistos en células epidermales de *A. thaliana*. Tomado de Hayashi *et al.* (2001). Los HSGs son vistos en protoplastos de *Nicotiana plumbaginifolia*. Tomado de Miroshnichenko *et al.* (2005).

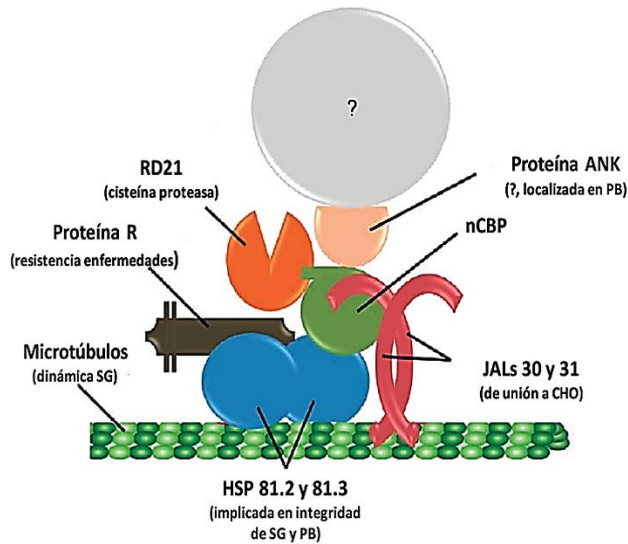


Figura 11. Proteínas que interactúan con nCBP. Dadas las funciones de cada proteína interactora, se plantea un modelo en el que nCBP podría estar interactuando con ellas para formar un complejo o gránulo citoplasmático. Tomado de Flores (2014).

En un trabajo posterior se identificaron proteínas que podrían interactuar con nCBP mediante ensayos de “Pull down”, utilizando nCBP recombinante y extractos proteicos de plantas mutantes *ncbp-1* (Flores, 2014). Entre estas se encontró una predominancia de proteínas que desempeñan funciones en procesos de respuesta a estrés (como JALs, RD21, HSPs, Figura 11) y no en la formación del complejo de inicio de la traducción, lo que sugiere

nuevamente la posible participación de nCBP en procesos diferentes a la traducción. Los hallazgos anteriores dirigieron la atención hacia una posible regulación por nCBP en respuesta a estrés en plantas. Al evaluar los patrones de mRNA de nCBP a partir de datos globales disponibles a partir de microarreglos (Arabidopsis eFP Browser) se observó cambio en la expresión de *nCBP* en estrés osmótico y estrés por calor. De manera interesante se encontró que el nivel de expresión de su mensajero en raíz, bajo condiciones de manitol 300 mM, aumenta desde la primera hora (1.2 veces) e incrementa en los siguientes tiempos hasta mantener un nivel elevado de expresión (véase color rojo en la Figura 12) a lo largo del tiempo de evaluación.

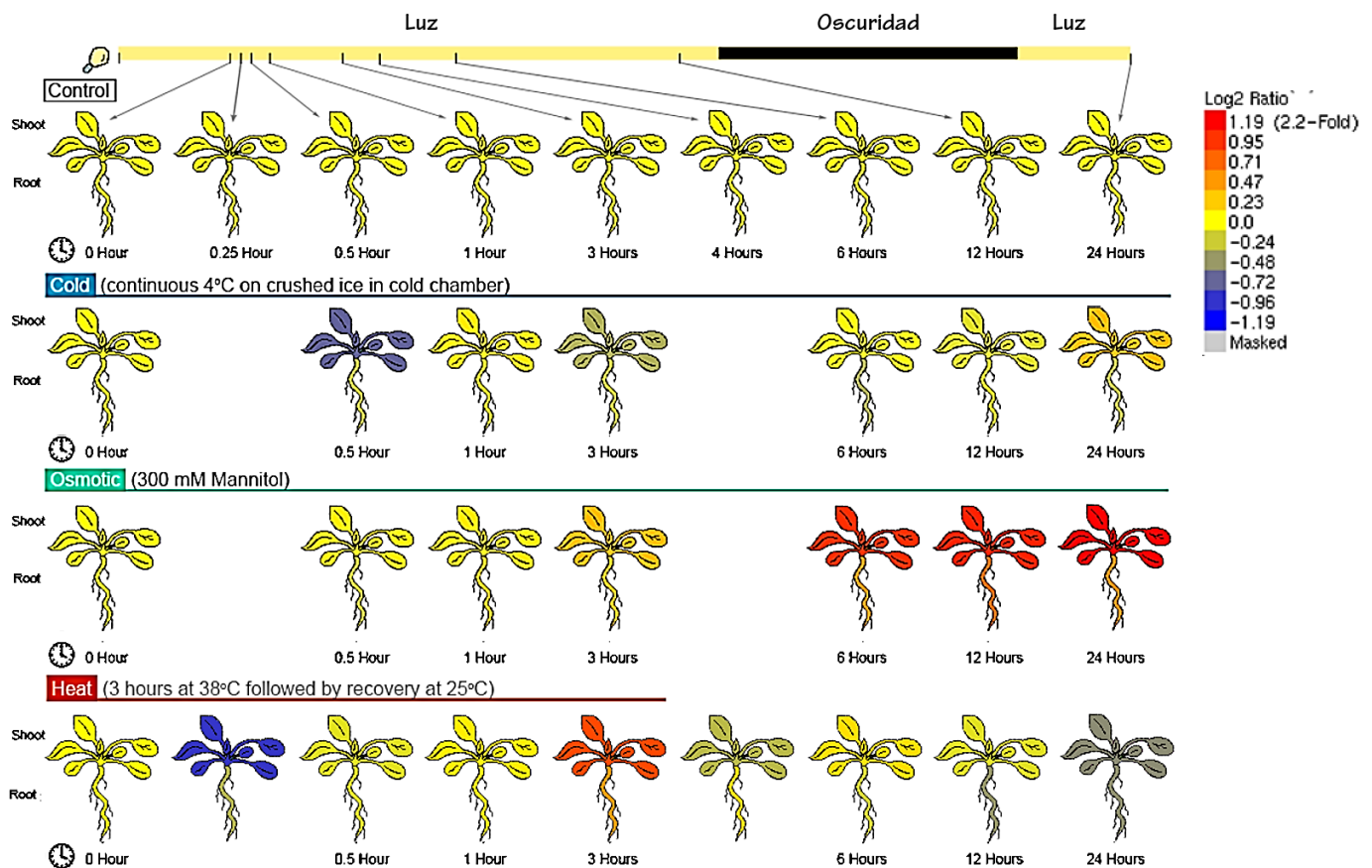


Figura 12. Análisis *in silico* del nivel de expresión del gen *nCBP*, a distintos tiempos, bajo condiciones de estrés abiótico. El análisis fue llevado a cabo en la base de Arabidopsis eFP Browser, que contiene datos de microarreglos de germinación de semillas. El gen *nCBP* (At5g18110) fue probado bajo condiciones de estrés abiótico, en particular por frío a 4°C, por manitol a 300 mM y estrés por calor. Como se observa, bajo condiciones de frío los niveles de expresión del mensajero no cambian con respecto a la condición control, mientras que en estrés osmótico los niveles aumentan desde la primera hora de evaluación. En calor se observa un aumento del transcrito sólo a las 3 horas de evaluación. A lado derecho se muestra la escala de veces de cambio con respecto a la condición control.

Para la condición de estrés por calor sólo se observó un aumento en la expresión a las tres horas y se mantuvo al mismo nivel que la condición control en los tiempos subsecuentes. Por último, en estrés por frío no se observó aumento alguno en la expresión de *nCBP*.

Debido a que se observó un aumento importante en la expresión del mensajero en estrés osmótico, realizamos experimentos de estrés por manitol para evaluar la respuesta de plantas mutantes (nulas a *nCBP*) y silvestres *in vivo*. Como se observa en la Figura 13, bajo condiciones sin estrés, el fenotipo de las plantas WT y *ncbp-1d* es similar, ambas desarrollan plántulas de un mismo tamaño y longitud de raíz. En cambio, bajo condiciones de estrés por manitol, se observó una diferencia importante en el fenotipo de las plantas mutantes, las que desarrollaron una raíz mucho menor que las plantas WT. Pese a que ambas se afectan severamente en su desarrollo, las plantas silvestres resisten más el estrés (mayor longitud de raíz).

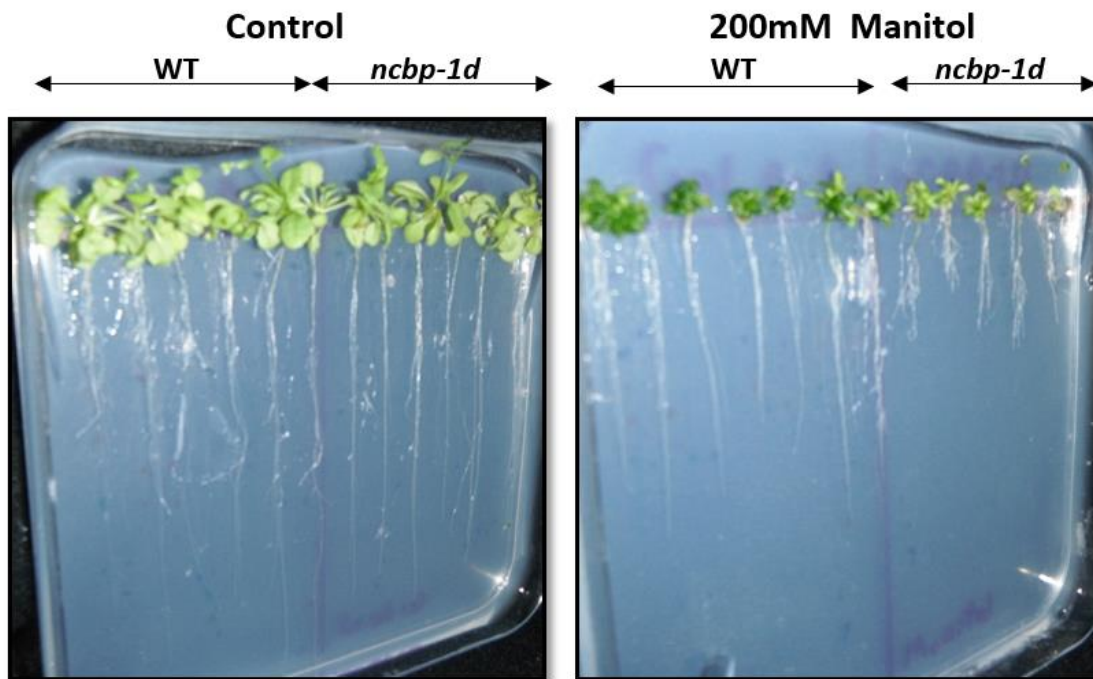


Figura 13. Fenotipo del desarrollo de raíz de plantas silvestres y mutantes *ncbp-1d* en estrés osmótico y control. Fenotipo de plántulas a los 25 días de evaluación, después de la germinación, en condiciones control y con manitol 200 mM. Se observa en las condiciones de estrés que plántulas mutantes desarrollan una longitud de raíz menor que plantas silvestres. Tomado de León (2016).

Estos antecedentes apoyan que nCBP puede estar desempeñando una función importante en la modulación de la respuesta de *A. thaliana* a condiciones de estrés. A nivel molecular no se conoce cómo nCBP podría estar ejerciendo su función, pero dada su afinidad al 5'Cap y su interacción con diversas proteínas, se presume que podría actuar en la exportación nuclear de mRNAs, su localización en gránulos citoplasmáticos debidos al estrés o incluso, ejercer inhibición traduccional.

6. HIPÓTESIS

Si nCBP interacciona con proteínas distintas al complejo traduccional, las cuales poseen funciones de estrés y, presenta una distribución citoplasmática en regiones localizadas, se hipotetiza que la proteína nCBP participe y sea co-localizada a gránulos citoplasmáticos de respuesta a estrés y, que su nivel de expresión aumente en estrés osmótico comparado con las condiciones control.

7. OBJETIVOS

7.1 Objetivo General

Determinar el nivel de expresión de *nCBP* en estrés osmótico y, su localización subcelular en gránulos en respuesta a estrés, en plántulas y protoplastos de *Arabidopsis thaliana*, respectivamente.

7.2 Objetivos Particulares

- Análisis de la expresión de *nCBP* en condiciones de estrés osmótico.
- Determinar la distribución subcelular de la proteína nCBP con el reportero GFP, en condiciones control y de estrés, en protoplastos de *A. thaliana*.
- Determinar el tipo de gránulo que forma nCBP, en protoplastos de *A. thaliana*, mediante co-localización con marcadores de gránulos citoplasmáticos reportados en plantas.

8. METODOLOGÍA

8.1 Material biológico

Se ocupó una línea mutante nula de la proteína nCBP por inserción de T-DNA en el cuarto exón del gen *nCBP* (SALK-131503.32.70), así como plantas silvestres (WT), ambas en ecotipo Col-0. Para los experimentos de estrés osmótico las semillas fueron esterilizadas previamente como se describe a continuación: se colocaron en un microtubo y se les adicionó 1 mL de una solución Cloro 20% + Tween 0.1%. Se mantuvieron en agitación vigorosa durante 20 min y se eliminó el sobrenadante. A continuación, se adicionó 1 mL de cloro al 20% para dejar de nueva cuenta en agitación por 10 min. Una vez concluido el tiempo se eliminó el sobrenadante, se lavaron las semillas cinco veces con 1 mL de agua estéril por 30 s, hasta eliminar completamente el hipoclorito/Tween. Finalmente, después del último lavado se adicionó 1 mL de agua estéril.

8.2 Tratamientos de estrés osmótico con manitol

El estrés osmótico con manitol, aplicado a plántulas de *A. thaliana*, se realizó germinando semillas de plantas WT en medio MS líquido y sólido (con agar).

8.2.1 Estrés osmótico en medio líquido

Entre 15-20 semillas desinfectadas fueron colocadas en 20 mL de medió Murashige y Skoog (MS) 0.5 % (w/v), sacarosa 0.5 % (w/v), MES (amortiguador) 0.02 % (w/v) y vitaminas Gamborg B5 1X, a un pH de 5.7. Los frascos fueron sellados con parafilm e incubados por dos días, a 4°C en oscuridad, para estratificar tiempo de germinación. Después se pasaron a una cámara de incubación a 22 °C con un fotoperiodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad (día largo). Siete días después se cambió de medio de germinación por uno nuevo sin sacarosa (20 mL por frasco). Tres días después se tomó una muestra de las plántulas (tiempo 0; sin estrés) y a los frascos restantes se añadieron 20 mL de medio MS con Manitol 600mM para tener una concentración final de 300 mM (estrés osmótico). Se recolectaron muestras a las 1.5, 3, 6 y 24 h después de la adición de manitol. Las muestras

fueron recolectadas en periodo de luz. Se llevaron a cabo tres réplicas biológicas independientes. Para dos de ellas (segunda y tercer réplica) la adición del manitol se llevó a cabo a las 8 h después de haber iniciado el ciclo de luz, mientras que para la primera réplica biológica la adición se realizó 11 h después de iniciado el fotoperíodo de luz. El tejido obtenido de cada frasco fue considerado como un grupo de plantas y fue almacenado a -70 °C hasta su uso.

8.2.2 Estrés osmótico en medio sólido

Las semillas desinfectadas se sembraron en cajas Petri (de 15 x 15 cm) con medio sólido (la composición fue igual que el medio líquido MS, adicionado con agar al 10 %). Para plántulas sometidas a estrés osmótico se adicionó además manitol a una concentración de 200 mM. Una vez sembradas las semillas en medio sin y con manitol, se sellaron las cajas con parafilm y se cubrieron con papel aluminio para dejarlas a 4 °C por 48 h (sincronización de germinación). Después, se pasaron a una cámara de incubación de manera vertical, a 22 °C con un fotoperiodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad (día largo). A los 10, 14, 18, y 22 días después de la germinación en condición control y en estrés, se recolectó el tejido y se almacenó a -70°C hasta su uso. Se llevaron a cabo dos réplicas biológicas independientes, procurando sembrar en las mismas condiciones de temperatura (25°C) y luz. En cada caja se sembraron aproximadamente 6 plántulas. Se hizo una mezcla de 12 plántulas para la extracción de RNA y posterior evaluación de la expresión de *nCBP*.

8.3 RT-qPCR

8.3.1 Extracción de RNA total

La extracción de RNA se realizó siguiendo la técnica recomendada por el fabricante del reactivo Trizol (Invitrogen Carlsbad CA, USA). Se partió de 100 mg de tejido el cual se pulverizó con ayuda de nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino en un microtubo de 1.5 mL. Enseguida, se adicionó 1 mL del reactivo Trizol y se agitó la mezcla hasta resuspensión total. El homogenizado se dejó incubando por 5 min a temperatura ambiente para permitir la disociación completa de los complejos

nucleoproteína. Después, se adicionaron 200 μL de cloroformo y se agitó vigorosamente por 15 s, dejando incubar por 3 min a temperatura ambiente, seguido por una centrifugación a 12000 x g durante 15 min a 4°C. En esta etapa, la mezcla se separa en dos fases, una inferior compuesta por fenol cloroformo, una interfase, y finalmente una fase superior acuosa que contiene el RNA; esta última se transfirió a un nuevo microtubo de 1.5 mL para precipitar el RNA adicionando 500 μL de isopropanol absoluto. Se dejó incubando por 10 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 12000 x g durante 10 min a 4°C. Se removió el sobrenadante y el precipitado de un color blanco gelatinoso se lavó con 1 mL de etanol al 75 %, centrifugando a 7500 x g a 4 °C durante 5 min. Después, se eliminó el sobrenadante y se dejó secando sobre papel absorbente a temperatura ambiente. A continuación se re-suspendió el RNA en agua libre de RNasa. Finalmente, el RNA se separó en un gel de agarosa al 1.5 % con amortiguador TAE 1X y bromuro de etidio, para observar la integridad y pureza del RNA. El RNA se almacenó a -70 °C hasta su uso.

8.3.2 Tratamiento de RNA con DNasa

Previo a la síntesis del cDNA complementario y su amplificación, se llevó a cabo un tratamiento del RNA total con DNasa libre de RNasa (Promega), para eliminar cualquier cantidad de DNA presente, y asegurar a su vez que el fragmento de interés a amplificar (por qPCR) se obtuviera sólo a partir de cDNA y no de DNA. La reacción de digestión del DNA consistió de:

RNA (a tratar)	1-8 μL
Amortiguador RQ1 DNasa 10X	1 μL
Enzima DNasa	1 μL
H ₂ O (libre de RNasa)	c.b.p. 10 μL

La mezcla se incubó a 37 °C por 30 min. Posteriormente se adicionó 1 μL de solución RQ1 DNase Stop Solution para detener la reacción, incubando por 10 min a 65 °C para inactivar la DNasa.

8.3.3 RT y PCR en tiempo real o cuantitativa (RT-qPCR)

Se realizó la síntesis de DNA complementario (cDNA) y su cuantificación por qPCR en un solo paso mediante el uso del Kit EXPRESS One-Step SuperScript RT-qPCR SuperMix (Thermo Fischer) y el termociclador Applied Biosystems 7500.

Se prepararon reacciones de 10 µL por triplicado con la siguiente composición:

- 0.2 µL SuperScript
- 5.0 µL EXPRESS qPCR SuperMix con ROX
- 0.4 µL de cebadores (forward y reverse 10 µM c/u)
- 3.4 µL de H₂Odd
- 1.0 µL de templado (RNA, dilución de RNA o H₂O como control negativo)
- 2.5 µL de H₂O

Los cebadores empleados fueron diseñados de manera específica para PCR cuantitativa (ver Anexo 1, listado de oligos). El programa del termociclador consistió en las incubaciones: 95°C por 10 min, 40 ciclos de 95 °C por 15 s y 60 °C por 1 min, seguido por un análisis de curva de desnaturalización a 60-95 °C. Debido a que la eficiencia obtenida de los cebadores para amplificar *nCBP* fue menor a 100 % (de 73 %), se ajustó la expresión relativa con respecto a la eficiencia obtenida para el gen constitutivo (HK, housekeeping), empleando la siguiente formula:

$$ER = \frac{10^{\left(\frac{-1}{m \text{ gen interés}}\right)^{(CT \text{ cond } 1 - CT \text{ condición } 2)}}}{\frac{\left(\frac{-1}{m \text{ HK}}\right)^{(CT \text{ cond } 1 \text{ HK} - CT \text{ condición } 2 \text{ HK})}}{10}}$$

Donde: ER = Eficiencia relativa; m = pendiente de la curva de eficiencia (gen de interés o HK); cond 1= condición de referencia; cond 2 = condición de prueba; HK = gen de referencia (housekeeping).

8.4 Obtención de construcciones con proteínas fluorescentes

8.4.1 Diseño de cebadores

Para el diseño de cebadores se utilizó el software Primer3Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus.cgi>; Untergasser, 2007) y el software Sequence Manipulation Suite (http://www.biomol.unb.br/sms2/pcr_primer_stats.html), para verificar que los cebadores no formaran dímeros o estructuras secundarias. También se realizó una búsqueda mediante Blast para asegurar que estos reconocieran sólo la secuencia del gen de interés. Para ello se empleó Primer-Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Los cebadores diseñados (ver Anexo 1, listado de oligos) flanquean la región codificante de los genes, sin incluir el codón de paro, y poseen en el extremo 5' una secuencia adicional de CACC usada para clonar el DNA recombinante en un vector pENTR-TOPO (de entrada) y, por recombinación, llevar el producto génico a un vector destino (sistema GATEWAY) con la proteína reportera de interés CFP o YFP.

8.4.2 Reacciones de PCR punto final

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo empleando un termociclador Veriti Thermal Cycler, de Applied Biosystems. La composición de cada reacción consistió de: 2 µL de amortiguador 10X, 1.8 µL de MgCl₂ 25 mM, 0.4 µL de dNTPs 10 mM, 0.2 µL de cebador Forward 10 mM y 0.2 µL de cebador Reverse 10 mM, 0.3 µL de Taq DNA Polimerase (recombinante) de Fermentas, DNA (50 ng por reacción) y, agua grado PCR para un volumen final de 20 µL. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 1 ciclo de pre-desnaturalización de 5 min a 94 °C, seguido por 30 ciclos de amplificación del fragmento: desnaturalización a 94 °C por 15 s, alineamiento entre 60-62 °C (dependiendo de los cebadores y su temperatura óptima) por 30 s y, extensión a 72 °C por 2 min. Por último, un ciclo de extensión final de la cadena a 72 °C por 8 min. Cada producto de PCR fue separado en un gel de agarosa al 1.5 %, en solución TAE 1X, teñido con bromuro de etidio para visualizarlos en UV.

8.4.3 Purificación de DNA a partir de geles de agarosa

Los productos obtenidos por PCR fueron purificados a partir de geles de agarosa, ocupando el kit QIAquick Gel Extraction, siguiendo las recomendaciones dadas por el proveedor (Qiagen). El fragmento de DNA del gel se cortó y pesó. Se adicionaron 3 volúmenes de buffer QG por cada volumen de gel ($100 \text{ mg} = 100 \mu\text{L}$). Se incubó la muestra a $50 \text{ }^\circ\text{C}$ por 10 min, mezclando por inversión cada cierto tiempo durante la incubación. Se adicionó 1 volumen de gel de isopropanol absoluto a la muestra y se mezcló por pipeteo. Después, la muestra fue colocada en una columna QIAquick y se centrifugó 1 min a 13000 rpm, descartando el líquido del tubo colector. Para lavar se adicionaron $750 \mu\text{L}$ de Buffer PE a la columna y se centrifugó por 1 min. Finalmente para la elución se adicionaron $30 \mu\text{L}$ de agua estéril a la columna, dejándola incubar por 5 min, para después centrifugar por 1 min. La muestra de DNA se almacenó a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ hasta su uso.

8.4.4 Clonación del producto de PCR en el vector pENTR-D-TOPO

Para llevar a cabo la reacción de ligación del producto de PCR se siguió el protocolo establecido por el proveedor del vector, cuidando de seguir todas las indicaciones especiales para aumentar la eficiencia de la reacción. La reacción de ligación se describe a continuación:

Tabla 1. Reacción de ligación

Reactivo	Cantidad
Producto de PCR	$0.2 - 2 \mu\text{L}$ ($5 - 10 \text{ ng}$)
Solución salina	$0.5 \mu\text{L}$
Agua estéril	c.b.p $3 \mu\text{L}$
Vector TOPO	$0.5 \mu\text{L}$
Volumen final	$3 \mu\text{L}$

Se mezclaron gentilmente todos los componentes indicados en la tabla 1 y se dejó incubando la reacción 24 h a temperatura ambiente. Después, se prosigió a

transformar células quimio-competentes de *E. coli* (TOP10 o DH5 α). También se llevó a cabo a la par la ligación del producto de PCR que contiene el kit, como control positivo de ligación y transformación.

8.4.5 Obtención de células competentes y su transformación

Se llevó a cabo la obtención de células competentes *E. coli* por el método de cloruro de calcio. De manera breve: se inoculó una colonia de la cepa *E. coli* a emplear (DH5 α , Top 10 o DB3.1) en 10 mL de medio LB sin antibiótico. Se dejó crecer toda la noche a 37 °C en agitación de 250 rpm. De este pre-cultivo se tomó 1 mL para inocular 100 mL de medio LB, para de nueva cuenta dejar incubando a 37 °C y 200 rpm hasta alcanzar una densidad óptica de 0.37 (a 590 nm). Una vez alcanzada la densidad se repartió el cultivo en 4 tubos falcón de 50 mL estériles (pre-enfriados) y dejó incubando por 10 min. Después, se centrifugó a 3000 rpm por 7 min a 4 °C. El sobrenadante se descartó y el botón se resuspendió en 10 mL de solución de CaCl₂ 100 mM (con 15 % de glicerol) fría, para después centrifugar de nueva cuenta a 3000 rpm, 7 min, a 4 °C. De nueva cuenta se descartó el sobrenadante y se resuspendieron los botones en 10 mL de la solución de CaCl₂ 1000 mM fría. Todos los botones resuspendidos fueron juntados en un solo tubo falcón, dejando incubar en hielo durante 30 min. Después de este tiempo, se centrifugó a 3000 rpm por 7 min a 4 °C, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el botón en 2.5 mL de solución de CaCl₂ fría. Finalmente se repartió en alícuotas de 50 μ L en tubos eppendorf de 1.5 mL, congeladas con ayuda de N₂ líquido y almacenadas a -70 °C hasta su uso.

La transformación se describe de manera breve a continuación:

1. De la reacción de ligación (producto en el vector pENTR-D-TOPO) se tomó un volumen de 2 μ L y se colocó en un tubo de 1.5 mL estéril, dejándolo en hielo. Para el vector control se ocupó 0.1 ng de plásmido.
2. Las células competentes (células *E. coli* Top 10 o DH5 α) fueron descongeladas 5 min antes de usar.

3. Se agregaron 50 μL de las células al tubo de reacción del producto de ligación (paso 1) y se mezcló gentilmente.
4. Se dejó incubando por 30 min la reacción para después calentar el tubo por 30-35 s en un baño a temperatura exacta de 42 °C. Inmediatamente se regresó a hielo.
5. Se adicionó 250 μL de medio SOC a cada reacción de ligación y dejó incubando por 1.5 h a 37 °C con agitación (150 rpm).
6. Una vez concluido el tiempo de incubación se plaqueó toda la reacción (300 μL) en dos placas con medio LB más kanamicina 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$.
7. Las placas se dejaron incubando toda la noche a 37 °C, para después seleccionar colonias positivas y verificar su transformación con el vector.

8.4.6 Aislamiento de DNA plasmidico y análisis

Para la extracción del DNA plasmidico se ocupó el kit GenElute Plasmid Miniprep de SIGMA. El procedimiento seguido se describe a continuación:

1. Se partió de un cultivo celular líquido (5 mL), en medio LB con antibiótico, obtenido a partir de una colonia positiva.
2. Se centrifugó el cultivo por 1 min a 12 000 x g. El sobrenadante se descartó y las células se resuspendieron en 200 μL de solución de resuspensión, mezclando por pipeteo.
3. Las células fueron lisadas agregando 200 μL de solución de lisis, mezclando gentilmente hasta obtener una mezcla clara y viscosa.
4. Se adicionó 350 μL de solución de neutralización y se invirtió el tubo 4 – 6 veces para mezclar. Después, se centrifugó a 12 000 x g por 10 min para separar el debris celular.
5. El lisado aclarado se transfirió a la columna y se centrifugó a 12 000 x g por 1 min. Se realizó una segunda centrifugación por 2 min para remover el exceso de etanol.
6. Finalmente para la elución se adicionaron 50 μL de solución de elución (o agua DEPC) a la columna centrifugando por 1 min.
7. El plásmido eluido se almacenó a -20 °C hasta su uso.

El plásmido ocupado para las transfecciones fue obtenido también con kit pero, en este caso con un MaxiPrep, que permitió tenerlo en mayor concentración y con una mejor calidad para la expresión en la célula.

La confirmación de inserción y correcta orientación del gen en el vector fue llevada a cabo por digestión enzimática, en todos los casos por una doble digestión. Para ello se ocuparon 5 µg de DNA plasmídico para un volumen final de 20 µL de reacción. Por cada reacción se adicionó además el amortiguador indicado para ambas enzimas en una concentración 1X, la enzima correspondiente de acuerdo a los sitios de corte del inserto y del vector y, agua estéril para alcanzar el volumen final. La reacción fue incubada a 37 °C por 2 h, para después correr los fragmentos obtenidos en un gel de agarosa al 1.5 %, y buffer TAE 1X, teñido con bromuro de etidio. Las imágenes fueron tomadas en un fotodocumentador ChemiDoc de la marca Bio-Rad, procesadas con el software Image Lab.

8.4.7 Recombinación del vector de entrada al vector destino pEarlyGate

Una vez confirmada la inserción del gen de interés en el vector pENTR-D-TOPO, en la orientación correcta y sin modificaciones en la secuencia de bases, se prosiguió a recombinar el vector de entrada con el vector destino el cual posee la proteína reportera de interés (CFP o YFP). Para llevar a cabo la reacción se ocupó la enzima LR Clonase de Invitrogen, siguiendo el protocolo indicado por el proveedor. La mezcla de reacción se describe a continuación:

Tabla 2. Reacción de recombinación

Plásmido (clona entrada)	150 ng
Vector destino	70 ng
Buffer LR Clonase	2 µL
Buffer TE, pH = 8	c.b.p 8 µL
Volumen final	8 µL

Se adicionaron los reactivos indicados en un microtubo de 1.5 mL y, se mezcló brevemente con vortex por 2 s. A continuación se añadió 2 µL de la enzima LR Clonase a la reacción y se mezcló brevemente. La reacción se centrifugó y se incubó a 25 °C por 3 h. Una vez transcurrido el tiempo se añadió 1 µL de Proteinase K y se incubó a 37 °C por 10 min para así inactivar la reacción. Finalmente se procedió a transformar células *E. coli* Top10 o DH5α con el volumen total (10 µL) de la reacción. El marcador de selección en este vector fue de nueva cuenta kanamicina (50 µg/mL).

8.5 Expresión transitoria de las construcciones en protoplastos

Para la co-localización de la proteína nCBP con las proteínas marcadoras de gránulos de estrés se llevó a cabo su expresión transitoria en protoplastos aislados a partir del mesófilo de hojas de *A. thaliana*. El protocolo empleado para el aislamiento de los protoplastos es el descrito por Yoo *et al.*, 2007.

8.5.1 Aislamiento de protoplastos de hojas de *A. thaliana*

- 1- Se utilizaron plantas de 3-4 semanas de edad (es muy importante que se utilicen antes de la floración). Las plantas también deben de estar completamente sanas.
- 2- Con una navaja se cortaron los terceros y cuartas partes de las hojas. La parte superior e inferior de la hoja se desechó y la parte media se cortó en pequeñas tiras de aproximadamente 0.5-1.0 mm de ancho, teniendo el cuidado de no maltratar las hojas.
- 3- Las tiras obtenidas se sumergieron inmediatamente en la **solución de enzimas** (ver Anexo 3, listado de soluciones), con ayuda de unas pinzas delgadas. En este paso fue importante sumergir ambos lados de la tira para permitir mayor contacto con la solución.
- 4- Se aplicó vacío con ayuda de un desecador (protegido de la luz) durante 25 min.
- 5- Posteriormente se retiró el vacío y se continuó con la digestión durante 90 min más en agitación suave (40 rpm, 25 °C, oscuridad). La solución después

de este tiempo se tornó verde, lo que indica la liberación de los protoplastos (se puede agitar a 80 rpm, 25 °C durante 5 min, o menos, para facilitar la liberación de los protoplastos). En el período de esta incubación se debe preparar la **solución PEG** (ver Anexo 3).

- 6- Se agregó 1 volumen de la **solución W5** (ver Anexo 3) y se filtró a través de una malla de nylon mesh de 37-75 μm , humedecida previamente con agua y con la solución W5.
- 7- Se centrifugó durante 2 min, 200 x g, 4 °C. El sobrenadante se desechó y el botón se resuspendió agitando suavemente.
- 8- Con ayuda de un microscopio se verificó la integridad de los protoplastos. Si estos se encuentran en buenas condiciones, se realiza el conteo en un hematocitómetro.
- 9- Se ajustó el volumen de los protoplastos con la **solución W5** para tener 2 X $10^5/\text{mL}$ (es importante que se tome en cuenta el volumen en el que están resuspendidos los protoplastos).
- 10- Se centrifugó nuevamente durante 2 min, 200 x g, 4 °C, se descartó el sobrenadante y el botón se resuspendió con la **solución W5** para tener 2 x $10^5/\text{mL}$ de protoplastos.
- 11- Los protoplastos se incubaron en hielo y oscuridad durante 30 min.
- 12- Finalmente se centrifugó durante 2 min, 200 x g, 4 °C, se descartó el sobrenadante y el botón se resuspendió con la **solución MMg** (ver Anexo 3) para tener 2 x $10^5/\text{mL}$ de protoplastos.

8.5.2 Transfección DNA-PEG- Ca^{2+}

Todo el proceso de transfección se realizó a temperatura ambiente. Los pasos que se siguieron se describen a continuación:

- 1- En un tubo de 2 mL con fondo redondo se adicionó:
 - a) 10 μL de DNA (10-20 μg)
 - b) 100 μL de protoplastos (Nota: mezclar suavemente el tubo de los protoplastos cada vez que se tome una alícuota)

- 2- Se mezcló golpeando suavemente la parte inferior del tubo y se adicionaron 110 μ L de la **solución PEG** (ver Anexo 3). Se tapó el tubo y se mezcló por inversión.
- 3- La mezcla de transfección se incubó durante 30 min a 25 °C, en oscuridad.
- 4- Para detener la reacción, se agregaron 440 μ L de la **solución W5** y se mezcló por inversión.
- 5- Se centrifugó durante 2 min, 200 x g, 25 °C. El sobrenadante se desechó y, el botón se resuspendió gentilmente en 100 μ L de la **solución W5**.
- 6- Los protoplastos resuspendidos se agregaron en un pozo de una placa de cultivo celular.
 - a) Para evitar que los protoplastos se adhieran a la superficie de la placa, los pozos se cubrieron durante 1 s con 1 mL de una solución de suero bovino fetal al 5 %.
 - b) El suero se retiró y se agregó un volumen de la **solución W5** (dependiendo de la capacidad de la placa: 1 mL para 6 pozos, 0.5 mL para 12 pozos ó 0.25 mL para 24 pozos).
- 7- La placa se cubrió con parafilm y se incubó 16 h a 25 °C en oscuridad, para permitir un tiempo basal de expresión del gen.
- 8- Finalmente, después de la incubación y los tratamientos de estrés (ver siguiente punto), los protoplastos fueron trasladados a un tubo de fondo redondo para centrifugar durante 2 min, 200 x g, 25 °C. El sobrenadante fue desechado y el botón resuspendido gentilmente en 100 μ L de la **solución W5**. Inmediatamente después de la cosecha se prosiguió a su observación en un microscopio confocal.

8.5.3 Tratamientos de estrés a los protoplastos

Previamente a la cosecha de los protoplastos se aplicaron diversos tratamientos para permitir la adecuada formación de los gránulos de estrés y así, co-localizar la proteína nCBP. Los tratamientos aplicados han sido reportados de manera previa, donde se ha estudiado las condiciones que favorecen su formación. De manera breve: para la formación de los gránulos de estrés (SGs) los protoplastos fueron

incubados a 40°C por un periodo de 45 min, previo a su observación en microscopio (Weber *et al.*, 2008). La inducción de formación de los cuerpos de procesamiento (PBs) fue llevada a cabo incubando los protoplastos en el porta con el cubreobjetos por un periodo de 20 min previo a su observación (Weber *et al.*, 2008). El estrés aplicado para la formación de los gránulos de choque térmico (HSGs) consistió de un periodo de incubación de 15 min a 40 °C, seguido de un periodo de recuperación a 25 °C por 2 h para después incubar de nueva cuenta a 40 °C por una 1 h más. Se ha visto que en esta condición se favorece la expresión y acumulación de las proteínas de choque térmico (HSPs), principal constituyente de este tipo de gránulos (Nover *et al.*, 1989; Lyck *et al.*, 1997; Kirschner *et al.*, 2000). Finalmente, la formación de los cuerpos derivados de retículo endoplásmico (ERBs) fue inducida por tratamiento con MeJA a una concentración de 100 µM por un periodo de 3 h previo a su observación (Pomeranz *et al.*, 2010; Matsushima *et al.*, 2002). Para la condición control, los protoplastos fueron observados al microscopio después de la cosecha y sin un tratamiento posterior.

8.6 Microscopia confocal

Para la observación de los protoplastos y localización de los genes con las proteínas reporteras, se ocupó el microscopio confocal Olympus FluoView™ 1000, equipado con el software FV10-ASW 3.0. Los protoplastos fueron colocados en un portaobjetos cóncavo con su correspondiente cubreobjetos. Todas las imágenes fueron tomadas con un objetivo de inmersión 60 X. Las longitudes de excitación y emisión para las proteínas de fusión empleadas son: CFP fue excitado a 458 nm y detectado en un rango de 470-500 nm; GFP fue excitado a 488 nm y detectado entre 500-525 nm; YFP fue excitado a 514 nm y detectado en un rango de 520-550 nm; RFP fue excitado a una longitud de 543 nm y detectado en un rango de 553-630 nm. Finalmente, se consideró la autofluorescencia de la clorofila. Para ello se ocupó una longitud de excitación de 488 nm y un rango de detección de 630-690 nm. Estas señales fueron tomadas como fondo para asegurar que las longitudes emitidas fueran debidas solo a la excitación de la proteína reportero y no a la excitación de la clorofila.

9. RESULTADOS

9.1 Expresión de *nCBP* en estrés osmótico

Uno de los objetivos de este trabajo fue evaluar de manera cuantitativa la expresión del mensajero de *nCBP* en estrés osmótico. De acuerdo con los datos disponibles a partir de microarreglos de *A. thaliana* (eFP Browser) su expresión en este tipo de estrés aumenta. Además, en un trabajo previo se observó que en ausencia de *nCBP* se afecta el desarrollo de raíz de plántulas que crecen en medio con manitol 200 mM (León, 2016). Por tal motivo los niveles de mRNA de *nCBP* fueron evaluados por RT-qPCR en plántulas que germinaron y crecieron en medio MS al que se adicionó manitol 200 mM (estrés osmótico) a diferentes tiempos post-germinación. La expresión fue comparada respecto a plántulas crecidas en los mismos días en medio sin manitol (sin estrés). La Figura 14 muestra los resultados de la expresión relativa de *nCBP* obtenida para cada día evaluado.

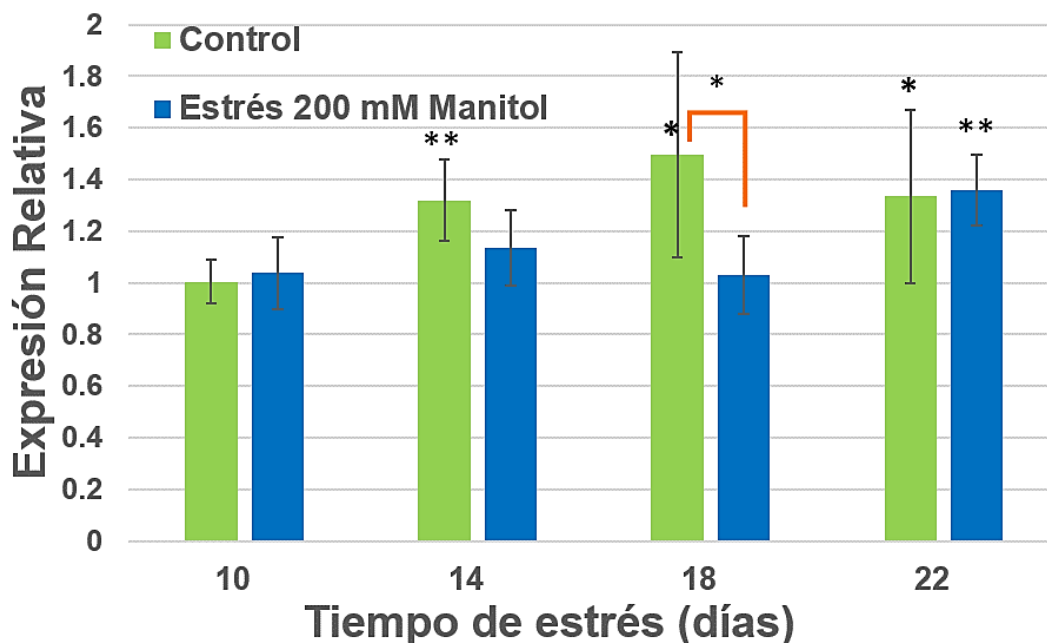


Figura 14. Expresión relativa de *nCBP* de plántulas crecidas en estrés osmótico y en condición control. Mediante RT-qPCR se evaluó la expresión del transcrito de *nCBP* a distintos días de crecimiento en condiciones control y en estrés con manitol 200 mM. Los valores de expresión fueron normalizados con respecto al gen endógeno 18S (housekeeping). La cuantificación relativa de cada muestra fue calibrada con respecto a la muestra 10 días control, la cual fue considerada como muestra de referencia. Asterisco (*) indica diferencia estadística significativa: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$, analizado con una t-student. Con línea naranja se muestra los grupos que mostraron diferencia significativa en el día evaluado. Las barras de error indican el error estándar de la media ($n = 6$). Dos réplicas biológicas fueron evaluadas.

Se observa que la expresión del mensajero en condición control aumenta a lo largo de los días evaluados con respecto al día 10. En estrés osmótico, el mensajero también aumenta con respecto al día 10, pero solo de manera significativa en el día 22. La comparación de la expresión de *nCBP* entre control y estrés, por día, muestra que solo al día 18 hay una diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$), debida a una menor expresión del mensajero en estrés. Estos resultados indican que la expresión de *nCBP* no se modifica de manera importante (incrementa o disminuye) por la concentración de manitol utilizada, ya que no existe cambios significativos con respecto a la condición control (excepto al día 18 donde disminuye significativamente en estrés). Por otra parte, el aumento significativo del mensajero en el crecimiento de la plántula bajo condición control indica que su expresión es regulada por el desarrollo.

Considerando que las plántulas están desde germinación, hasta día 22 en medio con manitol, puede ocurrir que la respuesta de *nCBP* haya sido temprana tal que en días tardíos no se detecten cambios apreciables entre condición control y estrés. Por tal motivo se decidió evaluar la expresión a tiempos cortos del estímulo (horas), de manera similar a las condiciones evaluadas en los análisis por microarreglos depositados en el eFP Browser de *A. thaliana*. Para ello se ocuparon plántulas de 12 días después de la germinación (crecidas en medio líquido, sin manitol) las cuales se sometieron a estrés osmótico (manitol 300 mM), determinando la expresión de *nCBP* a distintas horas del estímulo. La Figura 15 muestra los resultados de expresión relativa de dos réplicas biológicas independientes. Como se aprecia, los resultados obtenidos entre las réplicas no son tan reproducibles, existiendo variaciones significativas en algunas horas de evaluación (indicado con líneas azules), pese a que el tiempo de inicio del estrés y la recolección de muestras fueron realizados en horario similar pero días diferentes. A pesar de esto fue posible encontrar algunos datos interesantes. En primer lugar se observa que para cada tiempo de estrés, en la réplica biológica 2 (2RB), existe un cambio significativo en la expresión de *nCBP* con respecto al tiempo 0 o control sin manitol. En el caso de la réplica 1 no hubo diferencia significativa a las 3 y 24 horas de estrés con respecto a la expresión en el tiempo 0, mientras a las 1.5 y 6 horas sí.

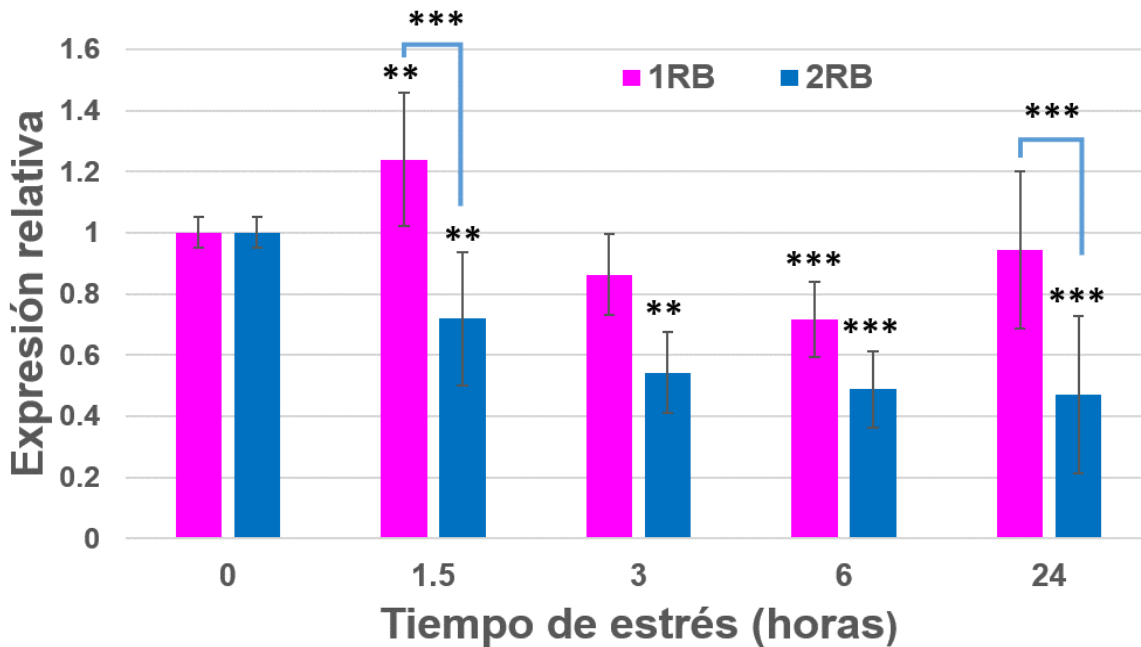


Figura 15. Expresión relativa de *nCBP* de plántulas de *A. thaliana*, sometidas a estrés con manitol 300 mM, a distintas horas de evaluación. Mediante RT-qPCR se evaluó la expresión del transcrito de *nCBP* a distintas horas en presencia de manitol 300 mM. Los valores de expresión fueron normalizados con respecto al gen endógeno 18S (housekeeping). La cuantificación relativa de cada muestra biológica fue calibrada con respecto a la muestra a tiempo 0, la cual fue considerada como muestra de referencia. Asterisco (*) indica diferencia estadística significativa: ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$, analizado con una t-student. Las barras de error indican el error estándar de la media ($n = 9$). Dos réplicas biológicas (RB) independientes fueron empleadas para evaluar la expresión del mensajero (1RB y 2RB). Con línea azul se indica los puntos en los que existe diferencia estadística significativa entre replicas biológicas.

Por otra parte, se observa una tendencia general entre réplicas biológicas de una baja en la expresión de *nCBP* a partir de las 3 h, que se mantiene hasta las 24 h de la evaluación. También se observa que existe un período entre 0 y 1.5 h en el que aumenta la expresión del transcrito, excepto para la réplica biológica 2 en la que desde el tiempo 1.5 h comienza la bajada de expresión. Estos resultados indican que existe un periodo de tiempo (entre 0 y 1.5 h) en la que posiblemente se requiere un mayor nivel de expresión de *nCBP* en respuesta al estrés, probablemente para regular el destino (represión o traducción de ciertos mensajeros) que permita responder de manera rápida a la condición. En cambio, a tiempos más largos, su expresión no sostiene la estimulación inicial, probablemente debido a la acción de otros factores que podrían participar en la respuesta al estrés.

9.2 Análisis de las fusiones traduccionales con proteínas fluorescentes obtenidas por el sistema Gateway

9.2.1 Clonación de fragmentos de DNA en el vector pENTR-D-TOPO

Para dilucidar la naturaleza de los cuerpos citoplasmáticos formados por nCBP, reportados previamente (De la Torre, 2009), fue necesario obtener construcciones de proteínas marcadoras de gránulos citoplasmáticos, fusionadas a una proteína fluorescente para facilitar su detección.

Se diseñaron cebadores para amplificar la región codificante de los siguientes genes de interés (ver Anexo 1, listado de oligos): DCP1 y XRN4 para PBs; RBP47 y UBP1B para SGs; RD21 y PYK10 para ERBs; HSPI y HSP17 para HSGs. Las secuencias fueron amplificadas a partir de DNA genómico y de cDNA, obtenido a partir de RNA extraído de plántulas de *A. thaliana* de 22 días en condiciones control o de estrés con manitol (véase Figura 16). Se observa en la figura que ningún gen pudo ser amplificado con cDNA de plántulas crecidas en condición control pero, si a partir del cDNA obtenido de plántulas crecidas en estrés, indicando que esta condición permitió mayor expresión del mensajero de estos genes. Por otra parte, a excepción de PYK10 y UBP1B, también fue posible amplificar las secuencias genómicas de cada gen (DNA con intrones, véase Figura 16). A la derecha de la imagen se enlista el tamaño esperado para cada fragmento amplificado. Cabe destacar que no se observa en la imagen la amplificación de DCP1 y XRN4 debido a que se contaba con las construcciones apropiadas para estas proteínas, donadas por el Dr. Marcus Fauth, del Instituto Molecular de Biociencias de la Universidad Goethe en Frankfurt, Alemania (Weber *et al.*, 2008). Para dichas construcciones se realizó la comprobación apropiada mediante patrones de digestión enzimática (véase Figura 22).

Una vez amplificadas las secuencias los fragmentos se clonaron en el vector pENTR-D-TOPO. Se clonaron los fragmentos genómicos (es decir, secuencia con intrones) para la mayoría de las proteínas, a excepción de PYK10 y UBP1B donde fueron clonadas las secuencias de cDNA. En la Figura 17 se muestran los

resultados obtenidos para la doble digestión de cada plásmido aislado, a partir de colonias transformantes positivas.

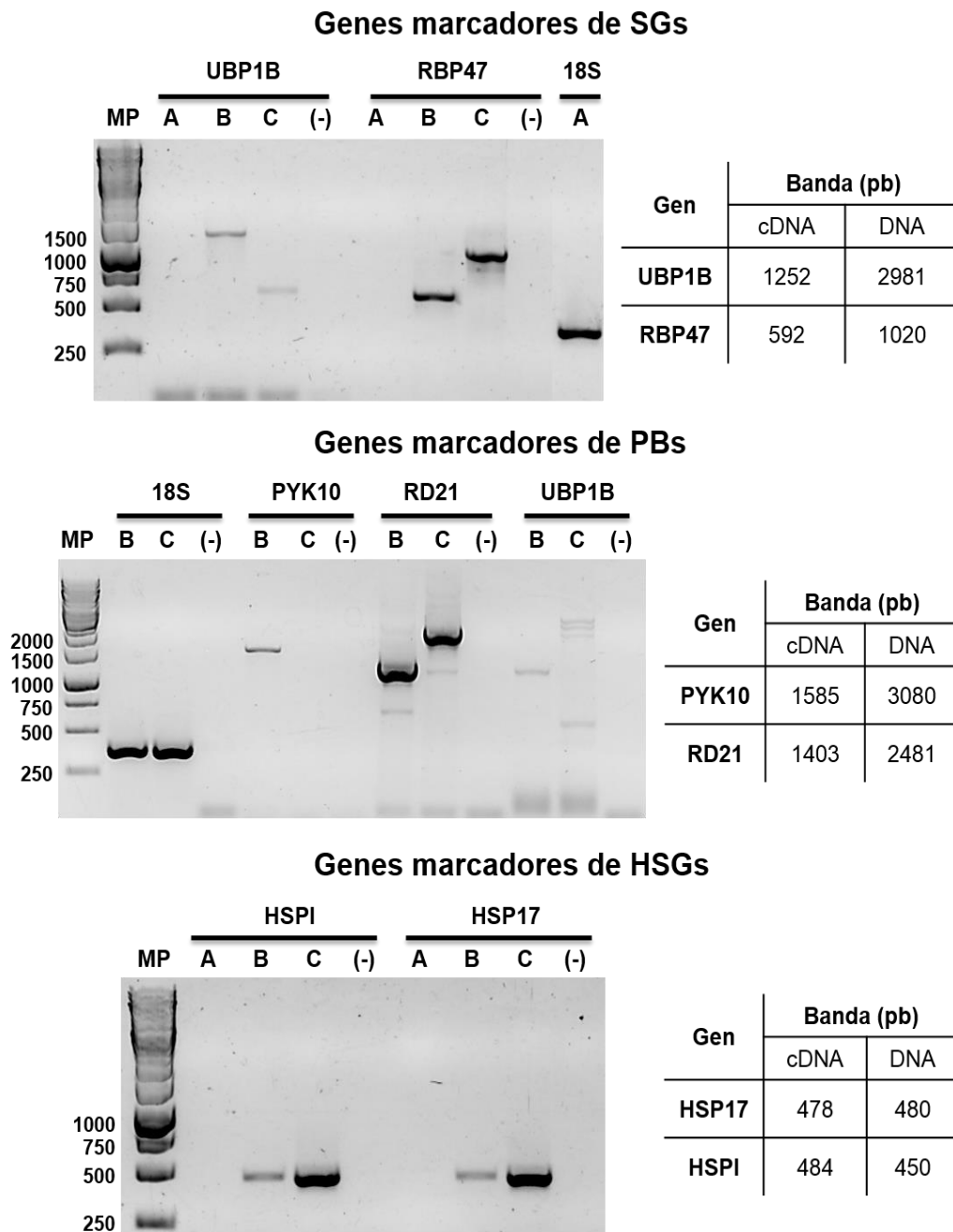


Figura 16. Amplificación del ORF de los genes marcadores de gránulos de estrés. En cada imagen se observa las bandas obtenidas de la amplificación de los fragmentos por PCR o RT-PCR. **A** = fragmento amplificado por RT-PCR con RNA de plántulas de *A. thaliana* crecidas en condiciones control. **B** = fragmento amplificado por RT-PCR con RNA de plántulas de *A. thaliana* crecidas en estrés osmótico. **C** = fragmento amplificado por PCR con DNA genómico. **(-)** = control negativo de la reacción. En la parte inferior se enlista los tamaños esperados para cada amplicon. El rRNA18S fue amplificado como control positivo (290 pb) para DNA y cDNA. **MP** = marcador de peso molecular.

En cada digestión se utilizó la enzima NotI que corta dentro de la secuencia del vector TOPO (véase Anexo 2, mapa del vector) junto con una enzima que corta solo en la secuencia del gen clonado (véase el listado de la Figura 17). En cada caso se confirmó la inserción de la secuencia génica en la correcta orientación, es decir con el ATG de inicio río abajo del sitio attL1 de recombinación presente en el vector TOPO (véase Anexo 2, mapa del vector).

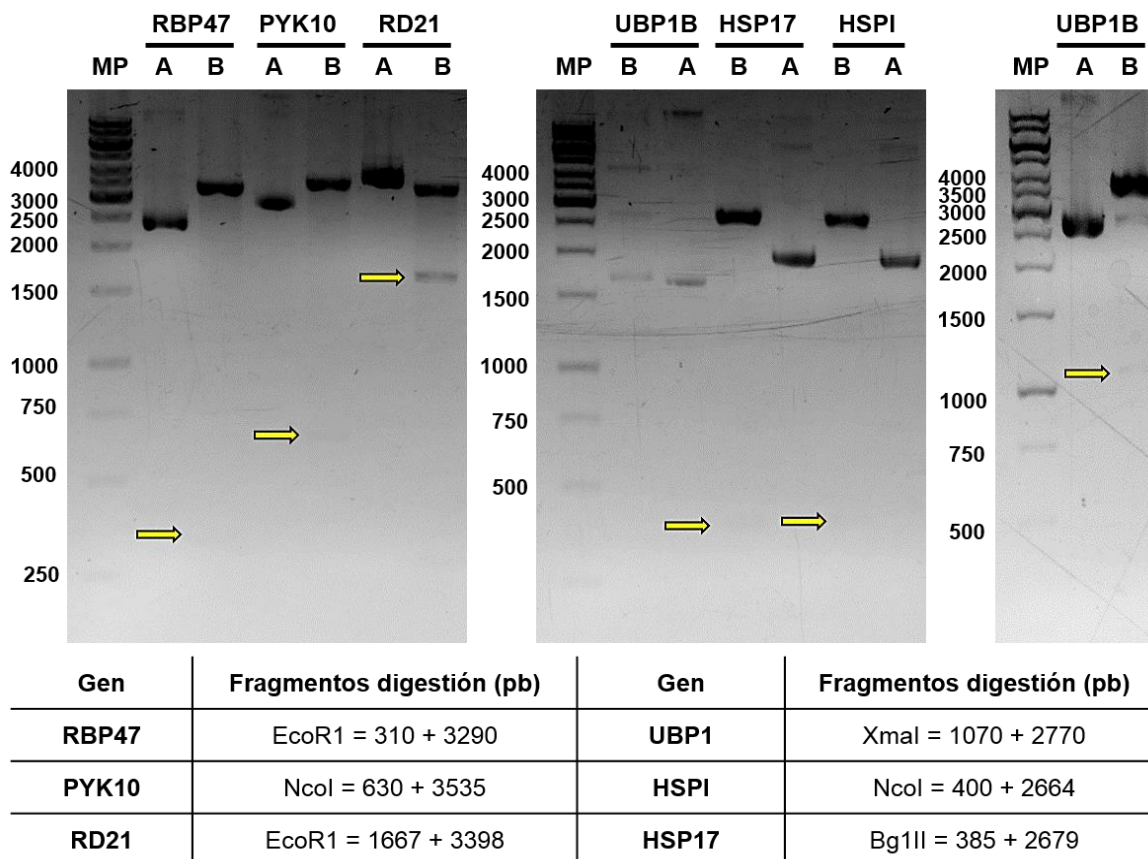


Figura 17. Comprobación de la correcta clonación del ORF de genes marcadores en el vector pENTR-D-TOPO. Digestión enzimática de DNA plasmídico con la enzima Not I más la enzima especificada en el listado de la parte inferior de la imagen, acorde al gen clonado. El carril **A** corresponde al plásmido sin digerir. El carril **B** corresponde al plásmido digerido. En cada caso se observan las bandas esperadas de los fragmentos obtenidos por la digestión enzimática. En flechas amarillas se señala la posición de la banda de menor peso, apenas perceptible. **MP** = marcador de peso molecular.

Una vez confirmada la inserción del producto génico, se comprobaron las secuencias de los marcos de lectura correctos en los plásmidos por secuenciación, en la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM. Para ello, se emplearon los cebadores M13 y T7, que flanquean en la orientación

sentido y antisentido del vector TOPO. Los resultados obtenidos de la secuenciación para cada construcción se detallan a continuación:

Plásmidos RD21 y PYK10, marcadores para ERBs. El Blast obtenido para RD21 indicó un 100 % de identidad en secuencia de nucleótidos con respecto a la depositada en la base de datos. La secuencia mostró un correcto marco de lectura, por lo que a nivel de secuencia de aminoácidos también presentó un 100 % de identidad. Con respecto a PYK10 hubo un porcentaje de identidad del 99 % como consecuencia de un cambio de base (T por C en el exón 13). Al traducir la secuencia y realizar el alineamiento correspondiente se observó que el cambio provocó a su vez un cambio de aminoácido, de fenilalanina (F) a serina (S; véase Figura 18), presente en el extremo carboxilo de la secuencia.

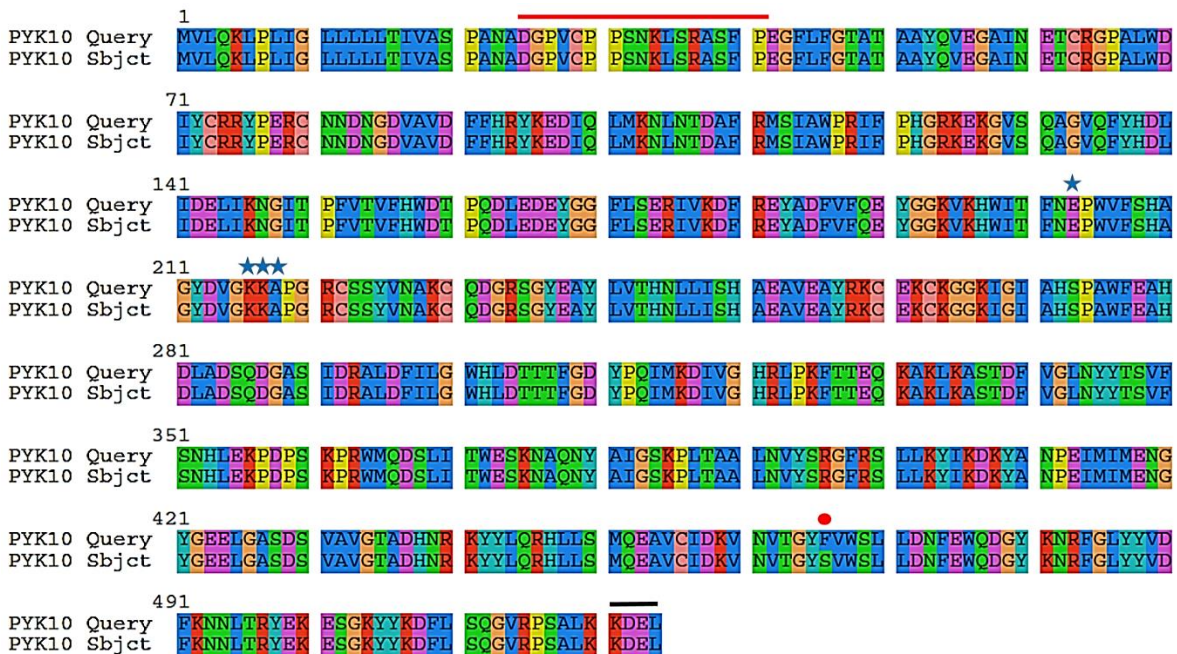


Figura 18. Alineamiento de la secuencia de PYK10 clonada en el vector TOPO. El resultado obtenido por secuenciación fue alineado con la secuencia depositada en la base de datos. En punto rojo se indica el cambio de aminoácido que se presentó en la secuencia clonada (F a S). En estrella azul se indica los aminoácidos que interactúan con el sustrato en la región catalítica de la enzima. En línea roja se indica el péptido señal. En línea negra se indica la secuencia de retención a retículo (KDEL).

Si bien el cambio es de un grupo aromático no polar por un aminoácido polar (ambos sin carga), este cambio no se encuentra dentro de las regiones correspondientes a los dominios catalíticos de la enzima ni dentro de la secuencia KDEL de retención

a retículo, señal indispensable para su reclutamiento y localización a ERBs (véase Figura 18; Nakano *et al.*, 2017).

Plásmidos HSPI y HSP17, marcadores para HSGs: el porcentaje de identidad de nucleótidos mostró para ambas secuencias un 99 % con respecto a la secuencia depositada en la base, debida también a un cambio de nucleótido. En el caso de HSPI esta variación cambio la lectura de codón de una leucina (L) por una isoleucina (I; véase Figura 19); sin embargo, ambos aminoácidos pertenecen al mismo grupo de aminoácidos hidrofóbicos (100 % similitud). Por otra parte el cambio de base en la secuencia de HSP17 no derivó en ningún cambio en la secuencia traducida, ya que el nuevo codón siguió codificando para el mismo aminoácido, presentándose un 100 % de identidad a nivel de secuencia de aminoácidos (Figura 19).

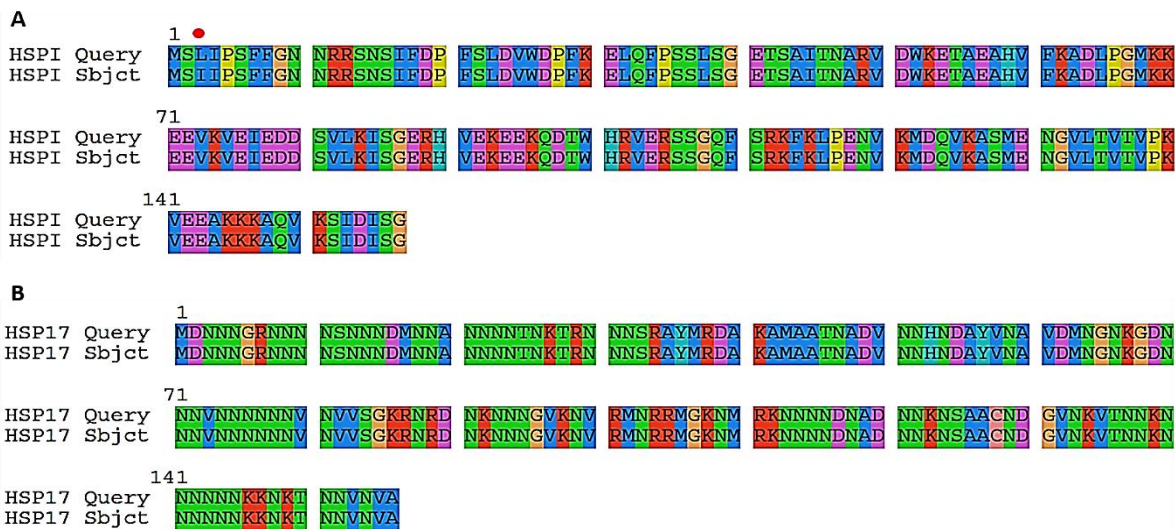


Figura 19. Alineamiento de la secuencia de HSPI y HSP17 clonada en el vector TOPO. El resultado obtenido por secuenciación fue alineado con la secuencia depositada en la base de datos. **A.** alineamiento de HSPI. En punto rojo se indica el cambio de aminoácido que se presentó en la secuencia HSPI (L a I), obteniéndose un 99 % de identidad (156/157) y un 100 % de similitud. **B.** alineamiento de HSP17. Se observa 100 % de identidad de la secuencia clonada con respecto a la reportada en la base de datos.

Plásmidos RBP47 y UBP1B, marcadores para SGs: el porcentaje de identidad para la secuencia de RBP47 indicó un 99 % debido a dos cambios de bases. Sin embargo, el Blast con la secuencia traducida mostró que los codones modificados siguen codificando para los mismos aminoácidos (100 % de identidad). Respecto a UBP1B el porcentaje obtenido también fue del 99 % derivado de dos cambios de base. El alineamiento con la secuencia traducida mostró que ambas variaciones

derivaron en cambios de 2 aminoácidos, uno en el extremo amino y otro muy cercano al extremo carboxilo (véase Figura 20).

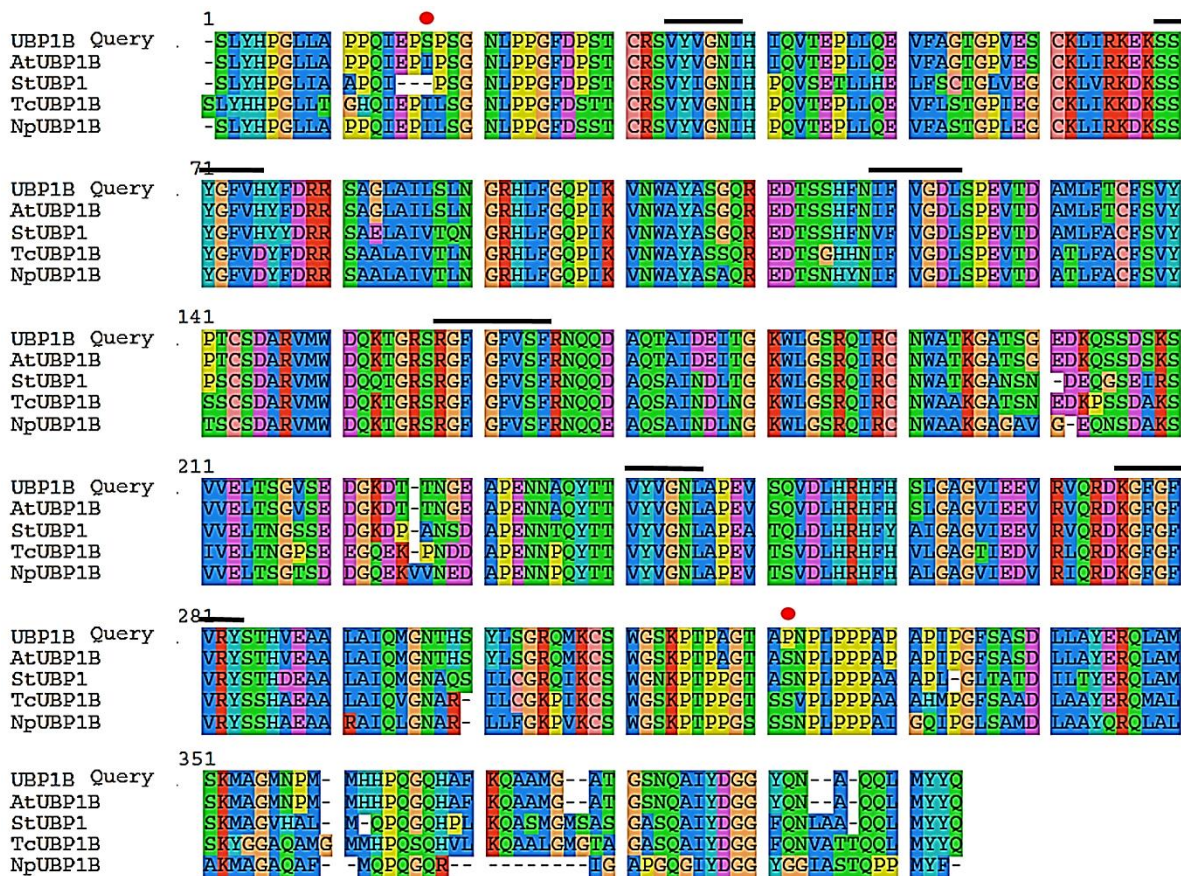


Figura 20. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de UB1B con respecto a la reportada en la base de datos y, con otras secuencias homólogas. Con un punto rojo se indica el aminoácido cambiado en la secuencia clonada. La barra negra subraya los 6 motivos de los dominios de unión a RNA que se encuentran conservados entre especies. At = *A. thaliana*; St = *Solanum tuberosum* (papa); Tc = *Theobroma cacao*; Np = *Nicotiana plumbaginifolia*.

El primero, en el extremo amino, se cambió una isoleucina (I) por una serina (S, no polar a polar). El segundo (cercano al extremo carboxilo) fue un cambio de serina (S) por una prolina (P, polar a no polar). Como se observa en el alineamiento (Figura 20) los cambios obtenidos en la secuencia no caen dentro de los motivos de unión a RNA que se han reportado para estas proteínas (Lambermon *et al.*, 2000; Chau *et al.*, 2016) y, que se encuentran conservados entre distintas especies (Waris *et al.*, 2014). Tampoco se vio afectado el dominio tipo prion presente en el extremo amino de la secuencia que permite la auto agregación de UB1B con complejos

proteicos para la formación de los gránulos debidos a estrés (SGs; Lambermon *et al.*, 2000). Si bien las variaciones no afectaron las regiones mencionadas indispensables para la función de UBP1B y formación de SGs, se puede ver que los aminoácidos cambiados se encuentran conservados en secuencias homólogas en otras especies (véase Figura 20); sin embargo, se comprobó que la proteína UBP1B mantuvo su función y localización a SGs (véase sección 9.3), motivo por el cual la secuencia fue clonada.

9.2.2 Obtención de clonas de expresión

Una vez analizadas las secuencias clonadas en el vector TOPO, estas fueron transferidas al vector destino pEarly de acuerdo a la proteína fluorescente deseada. Para ello se ocuparon los vectores pEarly 101 (con YFP), 102 (con CFP) y 104 (con YFP en el extremo amino). Debido a que tanto el vector de entrada como el de destino poseen resistencia a kanamicina se eliminó, previo a la reacción de recombinación, la secuencia de resistencia a dicho antibiótico en el vector de entrada para así facilitar la selección de clonas positivas recombinantes. Para ello se ocupó la enzima Mlu que digiere al vector en dos sitios que flanquean la secuencia clonada y los sitios attL1 y attL2, necesarios para la recombinación. En la Figura 21 se muestra el fragmento digerido y purificado que contiene la secuencia de interés junto con los sitios de recombinación, así como la integridad de los vectores destino empleados.

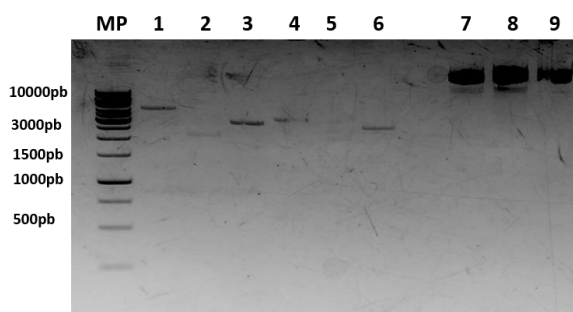
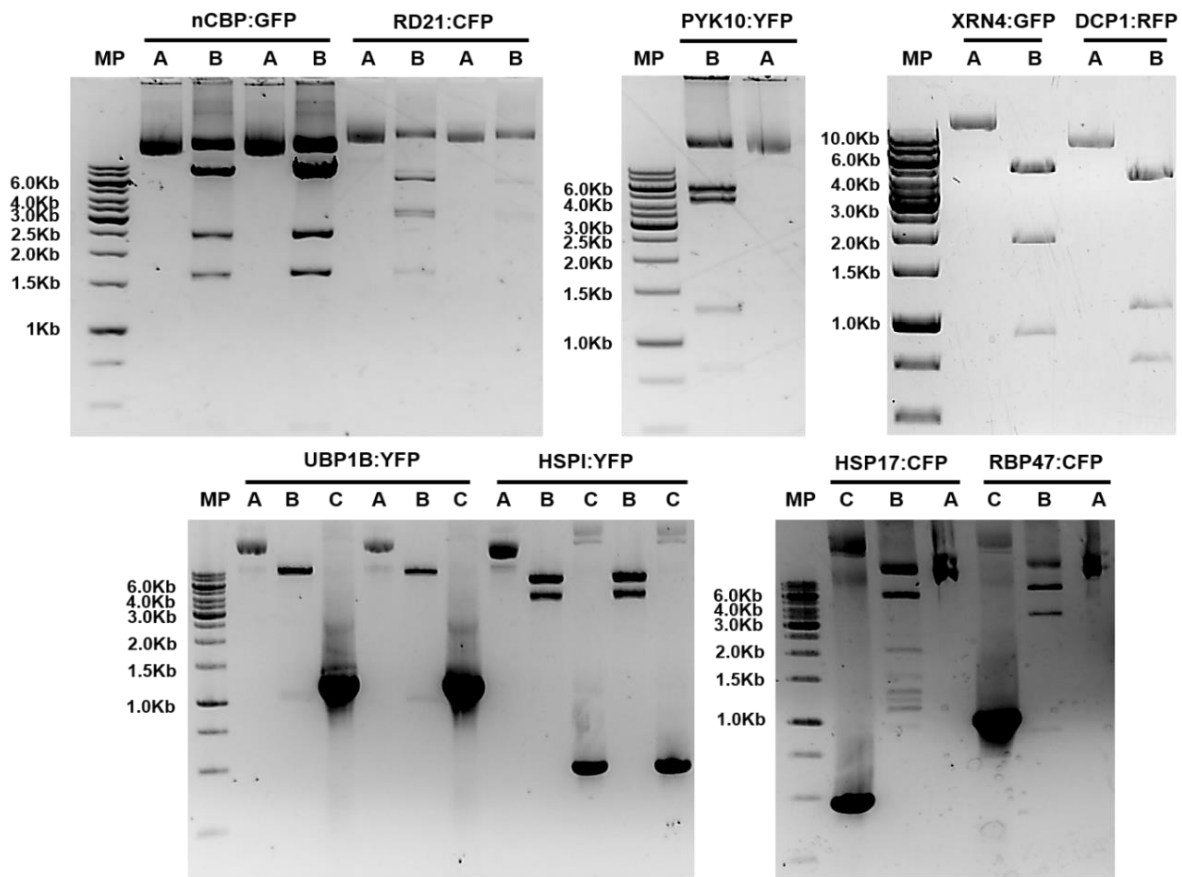


Figura 21. Fragmentos purificados de la digestión del vector de entrada con la enzima Mlu e integridad de los vectores destino. De izquierda a derecha (1-9) se tiene: 1. RD21; 2. HSPCl; 3. UBP1B; 4. PYK10; 5. HSP17; 6. RBP47; 7. pEarly 101; 8. pEarly 102 y 9. pEarly 104. **MP** = marcador de peso de 1Kb.

Una vez purificado el fragmento digerido, se llevó a cabo la reacción de recombinación empleando la enzima LR Clonase. Se seleccionaron varias colonias positivas para aislar plásmido y verificar por digestión que el vector destino tiene la secuencia de interés con el tag deseado. La Figura 22 muestra los resultados obtenidos de las digestiones. En la parte inferior de la imagen

se enlistan las enzimas empleadas para la reacción así como el tamaño de los fragmentos esperados. Se incluye también el resultado de la digestión de los vectores que contienen la secuencia de DCP1 y XRN4 (marcadores de PBs) fusionados a RFP y GFP, respectivamente, así como la digestión del vector pEarly 103 que contiene la secuencia codificante de nCBP fusionada a GFP, clonación hecha previamente por de la Torre (2009). En todas las construcciones se lograron obtener los fragmentos esperados, por digestión o PCR (en algunos casos).



Gen	Fragmentos digestión (Kb)	Gen	Fragmentos digestión	Producto PCR
nCBP:GFP	EcoRV + EcoRI = 1.6, 2.5, 7.5	HSPI:YFP	EcoRV = 4.4, 7.1	0.5Kb
RD21:CFP	EcoRV + EcoRI = 1.6, 2.4, 3, 6.2	HSP17:CFP	PvuII = 1.1, 1.3, 2.1, 6.8	0.5Kb
PYK10:YFP	NheI + XhoI = 0.8, 1.3, 4.6, 5.8	RBP47:CFP	SacI = 0.9, 3.6, 7.4	1.0Kb
DCP1:RFP	NheI + NcoI = 0.9, 1.1, 5	UBP1B:YFP	XmaI = 1.0, 11.0	1.2Kb
XRN4:GFP	NheI + NcoI = 1.0, 2.8, 6.5			

Figura 22. Clonación de las secuencias en el vector pEarly. En cada construcción se confirmó la recombinación de la secuencia con la proteína fluorescente de interés. En la parte inferior se detallan las enzimas utilizadas y los tamaños de los fragmentos esperados. En algunos casos se llevó a cabo PCR para amplificar también la secuencia. **A.** plásmido sin digerir. **B.** plásmido digerido con las enzimas indicadas; **C.** producto de PCR. **MP.** marcador de peso.

9.3 Localización subcelular de nCBP y proteínas marcadoras de gránulos

Una vez confirmada la obtención de las clonas de expresión (el gen de interés fusionado a la proteína fluorescente) se comprobó que dichas clonas fuesen funcionales para la expresión de la proteína en el modelo (protoplastos). Para ello, se transfectaron protoplastos de *A. thaliana* con cada construcción dejando un tiempo para la expresión de 18 h a 25 °C (condición control) previo a su observación al microscopio. Para observar la formación de gránulos y, localización de algunas proteínas en estos, se utilizaron las condiciones de estrés específico reportadas en la literatura (véase metodología). En las Figuras 23 y 24 se observa la localización de: DCP1 (marcador de PBs), HSP17 (marcador de HSGs), UBP1B (marcador de SGs) y PYK10 (marcador de ERBs). En cada caso se observó una dinámica diferencial en la distribución y acumulación de la proteína entre la condición control y el estrés. Así, la proteína DCP1 en condición control mostró una acumulación en gránulos pequeños distribuidos en el citoplasma, mientras que en hipoxia se observaron gránulos que aumentaron en tamaño considerablemente (véase Figura 23). En cambio, en estrés por calor DCP1 se acumula en mayor número de gránulos comparado con la condición control (ver Figura 26, localización subcelular de DCP1 en dicho estrés). La proteína HSP17 presentó también una localización en gránulos pequeños en el citoplasma en condición control (menores a 1 μm) que aumentaron de tamaño después del choque térmico (Figura 23), distribución característica debida a la acumulación y formación de HSGs por las proteínas HSPs (Scharf *et al.*, 1998; Weber *et al.*, 2008). En cuanto a la proteína UBP1B esta presentó una distribución semejante entre las condiciones control y de estrés, acumulándose una parte importante en el núcleo, región en la que cumple la función de maduración de pre-mRNAs (Lambermon *et al.*, 2000; Lorkovic *et al.*, 2000). Para esta proteína se observó que los gránulos en el citoplasma son pequeños y aumentan en número en el estrés por calor (Figura 24). Finalmente PYK10 fue expresada en todo el citoplasma, bordeando a cada cloroplasto, sin una localización puntual aparente, mientras que la adición de MeJA (estrés hormonal) dió origen a la formación de ERBs como consecuencia de la acumulación localizada de la proteína (véase Figura 24).

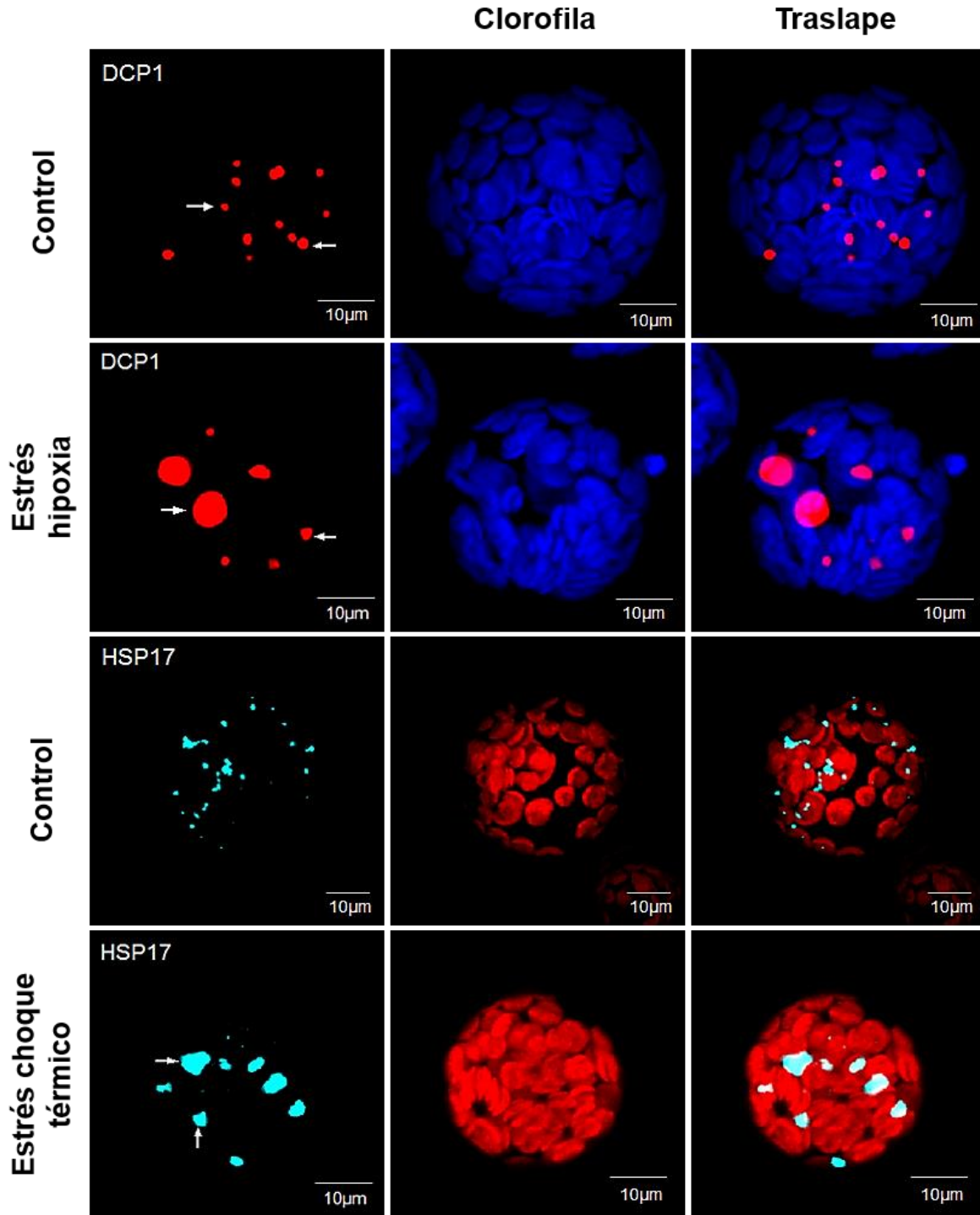


Figura 23. Localización subcelular de DCP1 y HSP17, en protoplastos de *A. thaliana*, en condiciones control y de estrés. Protoplastos del mesófilo de hojas de *A. thaliana* fueron transfectedados con los plásmidos de expresión indicados, puestos en condiciones control o estrés (hipoxia, 20 min en portaobjetos; choque térmico, 15 min a 40 °C, seguido por 2 h a 25 °C y 1 h a 40 °C). Las proteínas están fusionadas con RFP (DCP1) o CFP (HSP17). Se observa que la acumulación y distribución cambia entre condición control y estrés para ambas proteínas. Con flechas blancas se indica la acumulación de DCP1 y HSP17 en PBs y HSGs, respectivamente. Las imágenes son representativas del comportamiento observado de cada proteína. En rojo se muestra la autofluorescencia de la clorofila. Escala = 10 µm.

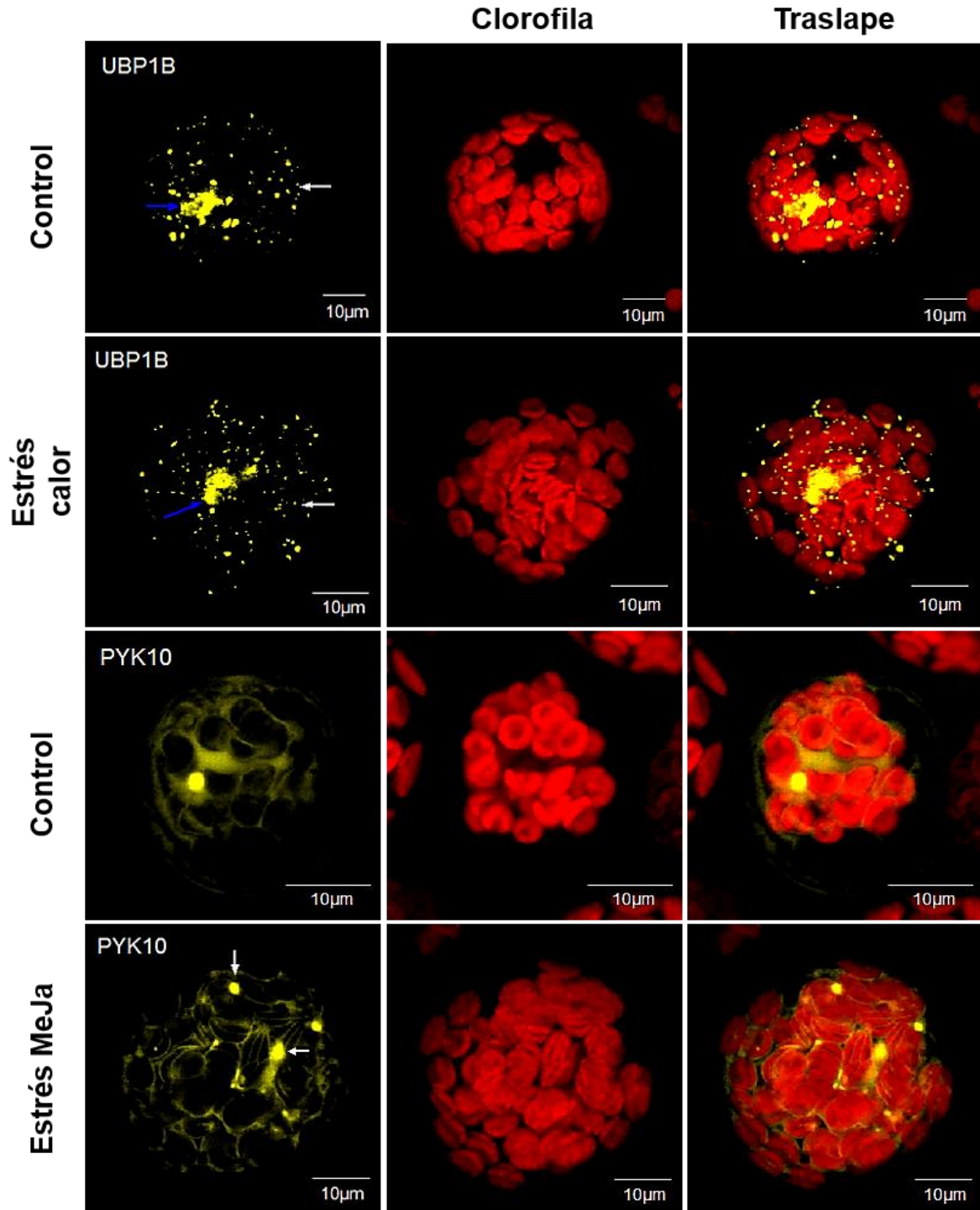


Figura 24. Localización subcelular de UBP1B y PYK10, en protoplastos de *A. thaliana*, en condiciones control y de estrés. Protoplastos del mesófilo de hojas de *A. thaliana* fueron transfectados con los plásmidos de expresión indicados, puestos en condiciones control o estrés (calor, 40 min a 40 °C; MeJA, 100 μ M por 2.5 h). Ambas proteínas se encuentran fusionadas con YFP. Se observa que la localización de PYK10 en condición control es difusa en todo el citoplasma mientras que en estrés comienza la formación de los ERBs (marcado por flechas). Para UBP1B el estrés permite mayor formación de SGs (indicado por flechas), comparado a la condición control. En flecha azul se indica localización nuclear de la proteína. Las imágenes son representativas del comportamiento observado. Escala = 10 μ m.

Estos resultados concuerdan con lo reportado previamente (Matsushima *et al.*, 2003; Nagano *et al.*, 2005). Para cada una de las proteínas analizadas, el estrés aplicado permitió la formación de los gránulos que han sido reportados, siendo consistentes los resultados con datos publicados en la literatura acerca de la participación de las proteínas DCP1, HSP17, UBP1B y PYK10 en estrés (Xu *et al.*, 2006; Weber *et al.*, 2008; Scharf *et al.*, 1998; Matsushima *et al.*, 2003). Cabe resaltar que existieron diferencias menores para las condiciones control con respecto a lo reportado, debidas probablemente al sistema experimental (protoplastos de *A. thaliana* en lugar de tabaco que ha sido el modelo más utilizado) y al procedimiento general de obtención de dichos protoplastos. Por otra parte, debido a que las fusiones empleadas mostraron expresión y localización de acuerdo a lo reportado, no se probaron las otras clonas generadas, para las cuales haría falta ver previamente su expresión transitoria y así poder ser empleadas también para futuros experimentos.

Una vez establecidas las condiciones óptimas de estrés para la formación de cada tipo de gránulo, se prosiguió a observar la localización de nCBP en condiciones control así como bajo la influencia del estrés (hipoxia, calor o choque térmico) sin la co-expresión con otra proteína. Los resultados obtenidos mostraron una dinámica distinta de acumulación de la proteína dependiendo del estrés (véase Figura 25). En condición control nCBP mostró una distribución en gránulos citoplasmáticos con pocas localizaciones, algunas de ellas pequeñas (menores a 1 μm) y otras de mayor tamaño (entre 1 a 2 μm). Este resultado fue reproducible acorde a lo obtenido por el laboratorio en trabajo previo (De la Torre, 2009). En estrés por hipoxia nCBP mostró también una acumulación definida en el citoplasma formando gránulos pequeños (menores a 1 μm) y algunos grandes (2-3 μm) pero, comparado con la condición control, mostró un número mayor de gránulos pequeños. Por otra parte, el estrés por calor (40 min a 40 °C) afectó de manera apreciable la distribución de nCBP. Esta distribución fue mayor, abarcando prácticamente todo el citoplasma de la célula, en localizaciones muy pequeñas (menores a 1 μm) comparado con la acumulación de nCBP en las anteriores condiciones.

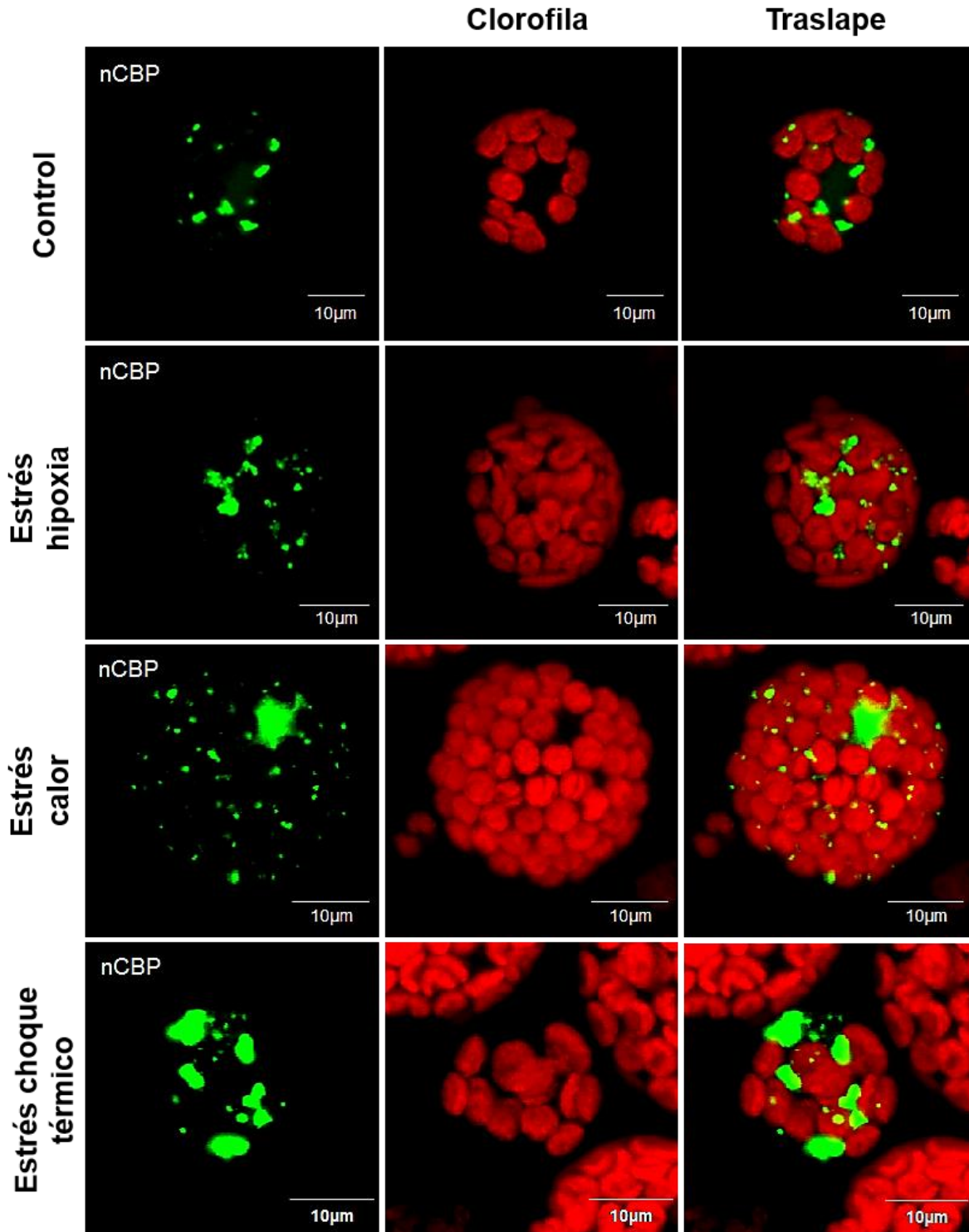


Figura 25. Dinámica de distribución subcelular de nCBP dependiente del estrés. Protoplastos del mesófilo de hojas de *A. thaliana* fueron transfectados con la construcción nCBP:GFP. Se observa que la distribución de nCBP cambia dependiendo del estrés, formando gránulos de mayor o menor tamaño. Estrés hipoxia = 20 min de incubación en porta. Estrés calor = 40 min a 40 °C. Estrés choque térmico = 15 min a 40 °C, 2 h a 25 °C, 1 h a 40 °C. Las imágenes son representativas del comportamiento observado para la proteína en cada estrés. En rojo se muestra la autofluorescencia de la clorofila. Escala = 10 µm.

Finalmente, en estrés por choque térmico nCBP presentó acumulación en gránulos de tamaño mucho mayor comparado con los anteriores estrés (algunos mayores a 5 μm), aunque también presentó localizaciones pequeñas (menores o iguales a 1 μm). Cabe resaltar que falta aún por determinar si la dinámica de localización de nCBP también es dependiente de la presencia de la hormona MeJA, un experimento que se ha planteado como perspectiva para trabajo futuro.

9.4 Co-localización de nCBP con proteínas de estrés

Para determinar si nCBP co-localiza con uno o varios tipos de gránulos de estrés previamente descritos, se co-transfectaron protoplastos de *A. thaliana* con el plásmido de nCBP fusionado a GFP (o CFP en algunos casos) junto con el plásmido marcador para el gránulo de estrés a probar. De esta manera se realizaron co-transfecciones de: nCBP:GFP con DCP1:RFP; nCBP:GFP con HSP17:CFP; nCBP:CFP con UBP1B:YFP; y, nCBP:CFP con PYK10:YFP. Los resultados obtenidos se muestran en las Figuras 26 y 27. Para el caso de las co-transfecciones de nCBP:CFP con UBP1B y PYK10 no fue posible visualizar la expresión de nCBP debido a la baja señal emitida por la proteína CFP, siendo imposible su detección por el microscopio.

Como se aprecia en la Figura 26, nCBP co-localizó con DCP1 en las condiciones control y de estrés. Se aprecia que en condiciones control existe formación de PBs (como lo obtenido en la expresión individual de DCP1, véase Figura 23) debido probablemente a que pese a las condiciones adecuadas de incubación (25 °C) los protoplastos captan más fácilmente estímulos externos debido a la ausencia de la pared celular. Por otra parte en estrés por hipoxia aumenta el número y tamaño de los PBs, como consecuencia de la baja en el contenido de O_2 en el micro-ambiente (incubación en porta y cubreobjetos). En ambas condiciones se observa que nCBP co-localizó en un 100 % con DCP1. En estrés por calor se observó para ambas proteínas la acumulación en gránulos pequeños ($\leq 0.5 \mu\text{m}$), menores en tamaño con respecto a la condición control e hipoxia, así como gránulos de mayor tamaño a estos; sin embargo, a diferencia de los otros tratamientos ya descritos, se observó que existe gránulos donde no co-localizan las proteínas, particularmente las

acumulaciones pequeñas (véase Figura 26, puntos verdes y rojos, correspondientes a la localización individual de nCBP y DCP1, respectivamente).

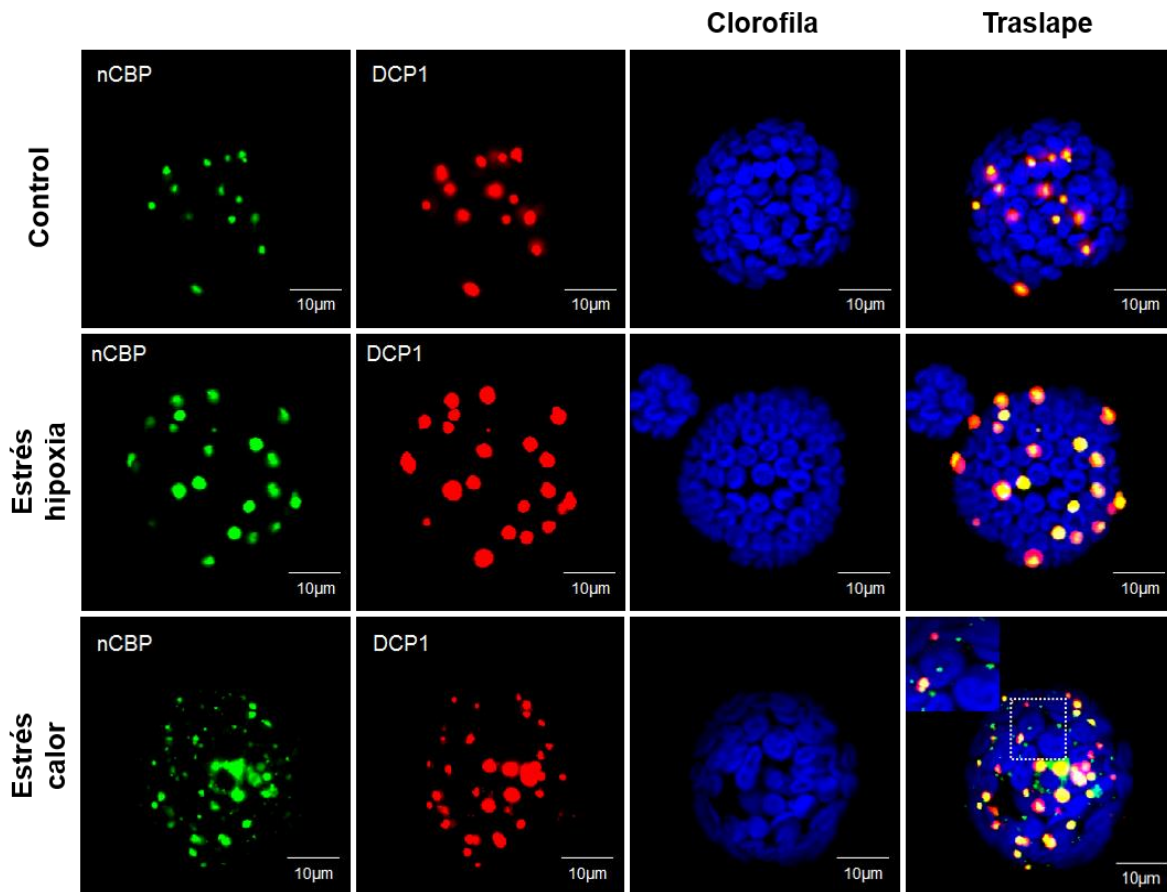


Figura 26. Análisis de co-localización de nCBP con la proteína DCP1, marcador de PBs. Protoplastos del mesófilo de *A. thaliana* fueron co-transfectados con ambas construcciones (nCBP:GFP y DCP1:RFP), incubados en condiciones control y de estrés (hipoxia: incubación en porta y cubre por 20 min; estrés por calor: 40 min a 40 °C). Las regiones donde ambas proteínas coexisten están marcadas como puntos amarillos. Se observa que en estrés por calor existen localizaciones en las que nCBP y DCP1 (puntos verdes y amarillos, véase zoom de la imagen) no co-localizan, formando nCBP otro tipo de gránulos de estrés. Las imágenes son representativas del comportamiento observado. En azul se muestra la autofluorescencia de la clorofila. Escala = 10 µm.

Los resultados obtenidos con respecto a la co-localización de nCBP con la proteína HSP17, constituyente principal de HSPs, mostró que ambas proteínas coexisten en ciertas regiones en respuesta a estrés por choque térmico (véase Figura 27, regiones marcadas con azul claro). Sin embargo, hay muchas regiones en las que nCBP no co-localiza (gránulos citoplasmáticos grandes, marcados con color verde). Este resultado pudo deberse a que la expresión de HSP17 en este experimento, con respecto a lo observado previamente en el mismo estrés (compárese con la

Figura 1, HSP17 en choque térmico) mostró una distribución diferente formando gránulos más pequeños, debido probablemente a factores externos (como temperatura, soluciones nuevas, etc.) e internos propios del sistema (edad de las hojas para la obtención de los protoplastos, etc.). En consecuencia, la baja expresión y poca acumulación de HSP17 pudo influir en los patrones de co-localización observados. Por otra parte, nCBP mostró una presencia abundante en gránulos de mayor tamaño (mayores a 5 μm) pudiendo dar lugar a la observación de una aparente co-localización debido al sobrelapamiento de señal con HSP17 en las zonas donde se acumuló nCBP (véase Figura 27, zoom de la imagen). Cabe también la posibilidad de que efectivamente nCBP esté siendo agregado a HSGs, debido a la severidad del estrés (choque térmico), siendo así protegida la proteína de eventos de desnaturalización y de formación de agregados por las HSPs.

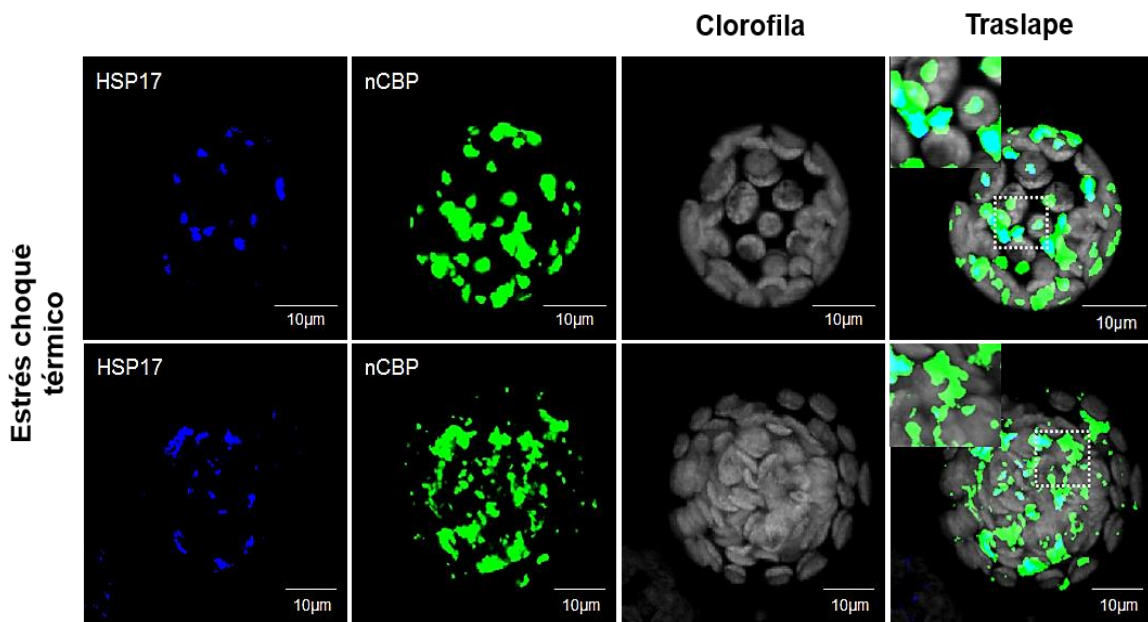


Figura 27. Análisis de co-localización de nCBP con la proteína HSP17, marcador de HSGs. Protoplastos del mesófilo de *A. thaliana* fueron co-transfectados con ambas construcciones (nCBP:GFP y HSP17:CFP), incubados en condiciones de estrés por choque térmico (15 min a 40 °C, seguido por 2 h a 25°C y 1 h a 40 °C). Las regiones donde ambas proteínas co-localizan están marcadas como zonas azul claro. Las imágenes son representativas del comportamiento observado. En gris se muestra la autofluorescencia de la clorofila. Escala = 10 μm .

En las imágenes se observa que nCBP mantiene la formación de gránulos pequeños (menores a 1 μm) en la condición de estrés, sugiriendo que puede estar localizada a otro tipo de gránulo en la condición de este estrés, PBs o SGs.

Finalmente cabe señalar que no se evaluó la co-expresión y localización de HSP y nCBP en condiciones control, debido a que se ha reportado que la formación de HSGs es consecuencia de un tratamiento por choque térmico severo.

10. DISCUSIÓN

Se conoce que en diversas condiciones de estrés debe existir una adecuada regulación de la síntesis de proteínas (principalmente a nivel de la etapa inicial), así como una correcta homeostasis de las proteínas existentes, que permita obtener una respuesta adaptativa en la célula para sobrevivir hasta que las condiciones sean más favorables. En este sentido los organismos han desarrollado a lo largo de la evolución distintas variantes de la proteína eIF4E (de clase I, clase II y clase III), proteína indispensable en el reconocimiento de la estructura 5'Cap del mensajero y reclutamiento de la maquinaria traduccional para la síntesis de proteínas. Las características particulares de cada variante, así como su expresión diferencial, derivan en la formación de complejos alternativos que permiten una adecuada selección de los mensajeros a ser traducidos o reprimidos (muchos de ellos en gránulos citoplasmáticos), en condiciones normales de desarrollo o en condiciones de estrés. Por ejemplo, se ha encontrado que en el desarrollo normal de las células de mamífero los mensajeros traducidos son preferencialmente reclutados por el eIF4E canónico, mientras que ciertos mensajeros que son reprimidos traduccionalmente, se unen a miembros de clase II de eIF4E (Cho *et al.*, 2005). Por el contrario, en condiciones de estrés el factor canónico se encuentra reprimido por fosforilación (principalmente) que le impiden formar el complejo traduccional. Esto lleva a proteínas de clase II a participar en la traducción de mensajeros específicos que permitan una respuesta adaptativa en la célula (David Ho *et al.*, 2016).

De tal forma, en este trabajo se indagó la participación de nCBP, isoforma del factor eIF4E canónico, en la regulación de la respuesta a estrés en *A. thaliana*. A nivel mensajero de *nCBP* se encontró de manera intrigante que su expresión de en estrés osmótico no se ve aumentada, en comparación de una condición control, incluso se observó cierta disminución en contraste con datos previos (análisis de microarreglos, EFP Browser) que mostraban mayor expresión del transcrito en este tipo de estrés. Se sabe que en condiciones de estrés ambiental las células requieren una rápida señalización para iniciar cambios en el desarrollo y expresión génica, como mecanismo de protección (Kawa and Testerink, 2017). En este sentido, se ha

visto que los cambios fisiológicos son generados por complejas vías de transducción de señales que permiten regular la transcripción de ciertos genes y su abundancia. Sin embargo, la abundancia de estos mRNAs depende no solo del control transcripcional, sino también de la velocidad de degradación del transcrito (Narsai *et al.*, 2007; Kawa and Testerink, 2017). Por ejemplo, en levaduras se ha visto que la regulación de la degradación de mensajeros en estrés osmótico es una importante vía de señalización (Romero-Santacreu *et al.*, 2009). En este trabajo demostraron que la estabilidad del mRNA depende de la severidad del estrés y, cuando hay un choque osmótico severo, puede resultar en una represión global de mensajeros en PBs. En *A. thaliana*, mRNAs que codifican para proteínas involucradas en respuesta a estrés osmótico han sido encontrados por ser transcritos que se degradan rápidamente (Jiao *et al.*, 2008). Así, lo que podría estar ocurriendo con el mensajero de nCBP es que este siendo degradado en el transcurso del tiempo de estrés. Sin embargo, aún cuando no se observa un aumento en la expresión del mensajero de nCBP podría ser que la expresión a nivel de proteína sí este siendo favorecida, pues no siempre existe una correlación proporcional entre nivel de mensajero y nivel de proteína traducida. Además, quien lleva a cabo la función de traducción/represión de mensajeros es la proteína y no el mensajero. Esto plantea la opción de que la proteína nCBP pueda llevar a cabo el reconocimiento y modulación de la expresión génica de mensajeros específicos que sean inducidos (o requeridos) en estrés osmótico, pues antecedentes apuntan a que la ausencia de esta proteína afecta el desarrollo de raíz de plántulas de *A. thaliana* (León, 2016). Si bien evaluar los niveles de proteína en plántulas sometidas a estrés osmótico fue planteado como objetivo particular, no fue posible completarlo, quedando como perspectiva a futuro.

El análisis a nivel de distribución citoplasmática de nCBP se realizó utilizando construcciones fusionadas a proteínas fluorescentes. Los resultados permitieron evaluar la participación de nCBP en otros tipos de estrés, en específico en condiciones de hipoxia, estrés por calor y estrés por choque térmico (véase Figuras 26 y 27). Mediante microscopia confocal se observó que la distribución citoplasmática de la proteína nCBP, fusionada a GFP, es diferencial en cada tipo de

estrés (véase Figura 25). Al co-transfectar con los marcadores de gránulos citoplasmáticos se encontró que en hipoxia y estrés por calor nCBP co-localiza con DCP1 a PBs (gránulos involucrados en la represión traduccional y degradación de mensajeros), mientras que la proteína en choque térmico co-localiza con HSP17 a HSGs (gránulos involucrados en el mantenimiento del correcto plegamiento y prevención de desnaturalización de proteínas; véase Figuras 26 y 27).

En plantas la proteína eIF4E canónica ha sido localizada solo en SGs (Weber *et al.*, 2008), mientras que en mamíferos la localización de la proteína eIF4E ha sido ampliamente reportada en SGs y PBs (Parker and Sheth, 2007; Andrei *et al.*, 2005; Fujimura *et al.*, 2012). Así, los resultados obtenidos permiten enriquecer el amplio espectro de roles atribuidos para los factores eIF4E, al exhibir nCBP una localización con gránulos de RNA de distinta composición y función, bajo distintos tipos de estrés, sobre todo cuando los gránulos a los que localizó no ha sido reportado en plantas (en el caso de PBs) o en algún organismo (con respecto a HSGs). En estudio reciente de localización de distintas isoformas de eIF4E presentes en células de mamífero (todas de distinta clase) se encontró que en condiciones de estrés por calor el homólogo de nCBP, eIF4E2 (también miembro de la clase II), se localiza a PBs y SGs, mientras que en estrés oxidativo localiza solo a PBs (Frydryskova *et al.*, 2016). Resultados similares fueron observados en otro estudio en el que confirmaron que en estrés oxidativo eIF4E2 no re-localiza a SGs como lo hace eIF4E1, permaneciendo localizado solo a PBs (Kubacka *et al.*, 2013). Estos datos apoyan la participación descrita para factores clase II en procesos de represión más que de inducción traduccional, y permiten proponer una función particular para la proteína nCBP de plantas en la regulación post-transcripcional de mensajeros específicos en condiciones de hipoxia y estrés por calor, mediante su localización en PBs y la composición de este tipo de complejos. Además, su función y localización a PBs, al parecer, es un proceso conservado entre homólogos de la misma clase en distintas especies.

La participación de nCBP en la represión traduccional localizada a PBS podría involucrar el complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC, por sus siglas en inglés) que ha sido reportado en la represión de la traducción de mensajeros blanco.

Recientemente se encontró que el factor eIF4E2 de animales desempeña una función principal en el proceso de represión traduccional mediado por miRNAs (Chen and Gao, 2017). En ese trabajo se encontró que la proteína TNRC6A (componente principal del RISC) interactúa y recluta directamente a eIF4E2 al mensajero blanco para bloquear el inicio de la traducción. Esta función está determinada por el reconocimiento de la estructura 5'Cap, compitiendo entonces esta proteína con el factor canónico eIF4E1 por su unión. Además, se observó que cuando baja la expresión de eIF4E2 se reduce la represión mediada por miRNA de mensajeros blanco. También se reportó recientemente que la participación de eIF4E2 en la represión es mediada por un complejo de proteínas que interactúan con la proteína TNRC6A (Chapat *et al.*, 2017). Una proteína importante de este complejo es la proteína 4E-T, que puede interactuar tanto con eIF4E1 como con eIF4E2 (Chapat *et al.*, 2017; Kubacka *et al.*, 2013). Si bien en plantas se desconoce si existe una interacción directa del factor eIF4E con la maquinaria del complejo RISC, en trabajos previos se ha encontrado que nCBP es capaz de interactuar con proteínas distintas al complejo de traducción (Flores, 2014), dando posibilidad a que esta proteína pueda interactuar directa o indirectamente con el complejo RISC en la represión de mensajeros específicos. Apoyando esta idea, se ha observado también en mamíferos que la sobre-expresión de DCP1 (marcador empleado en este trabajo) inhibe la síntesis de proteínas lo que induce la formación de diversos agregados (PBs), a los que son reclutados distintos miRNAs, facilitando así el reconocimiento del mensajero blanco a ser reprimido (Wang *et al.*, 2017).

Cabe resaltar que pese a que la localización de nCBP a PBs en estrés por calor se observó en distintas zonas, se apreció también una localización citoplasmática individual de la proteína que no co-localizó con DCP1 (véase Figura 26). Estas localizaciones individuales de nCBP (puntos verdes) indican que esta proteína este formando parte de otro tipo de gránulos en este estrés por calor, pudiendo ser los SGs por la semejanza en tamaño y distribución. Si se compara la distribución de UBP1B (marcador de SGs; véase Figura 24) en estrés por calor, con respecto a la distribución de nCBP en el mismo estrés (sin co-transfección con otro gen; Figura 25) es de apreciarse que la distribución de esta última asemeja la localización de

UBP1B, pudiendo ser que nCBP esté formando parte de complejos SGs. Como se ha mencionado ya, en plantas se ha reportado la presencia del factor eIF4E canónico en SGs debidos a estrés por calor (Weber *et al.*, 2008) y, el homólogo a nCBP en humanos (eIF4E2) ha mostrado también localizar a SGs en la misma condición (Frydryskova *et al.*, 2016). Además, se ha visto que en estrés las proteínas de clase II pueden formar complejos traduccionales alternos (maquinaria componente de SGs) que permiten la expresión de mensajeros específicos para regular la homeostasis durante el tiempo que dure el estrés (David Ho *et al.*, 2016). Estos hallazgos proponen una función diferencial para factores de clase II dependiente del estrés y de los mensajeros específicos que reconozcan, participando posiblemente como proteínas involucradas en traducción cuando localizan a SGs o, mayoritariamente como proteínas de represión traduccional cuando localizan a PBs, una función que ha sido ampliamente descrita para proteínas clase II de mamíferos.

Por otra parte, también es de apreciarse en la Figura 25 (distribución de nCBP en estrés por calor) una región de mayor acumulación, debida a la agregación de la proteína o bien, a una localización subcelular distinta, en este caso nuclear. Podría ser posible esta localización ya que se ha visto en animales que el eIF4E canónico se encuentra presente en gran porcentaje en el núcleo (Culjkovic *et al.*, 2007; Iborra *et al.* 2001) donde desempeña la función de exporte de mensajeros hacia el citoplasma, mientras que la variante eIF4E2 es localizada principalmente en el citoplasma, pero re-localiza a núcleo por una vía independiente al transportador 4E-T (proteína encargada del transporte de eIF4E desde citoplasma a núcleo; Kubacka *et al.*, 2013). En plantas eIF4E ha mostrado también acumulación nuclear en células quiescentes (Bush *et al.*, 2009). Sin embargo, queda pendiente confirmar la posible localización nuclear de nCBP con un marcador adecuado así como aumentar el número de repeticiones experimentales, debido a que no siempre en todos los protoplastos observados nCBP mostró esta distribución.

Con respecto a la localización de nCBP en gránulos de choque térmico (HSGs), si bien no hay reportes sobre la co-localización de proteínas eIF4E con HSPs, se ha visto que en condiciones de estrés a altas temperaturas existe una coordinación

entre el control traduccional y la homeostasis de proteínas. En un estudio en levaduras se observó que en condiciones de estrés severo por calor (por arriba de los 40 °C), existe una agregación inicial de proteínas mal plegadas, sensibles al calor, que a medida que aumenta el tiempo en estrés va inhibiéndose más la traducción y promoviéndose la formación de SGs que co-localizan con estos agregados proteicos (Cherkasov *et al.*, 2013). Aún más, encontraron que estos complejos de proteínas agregadas-SGs co-localizan también con HSPs pequeñas (sHSPs) y con HSPs con actividad de desagregación. Además mediante ensayos de co-inmunoprecipitación observaron que también se encuentran como componentes de estos complejos factores traduccionales, entre ellos eIF4E y eIF4G. Resultados similares fueron encontrados en otro trabajo (Cherkasov *et al.*, 2015). Se plantea que esta asociación provee un eficiente mecanismo para coordinar la actividad traduccional con el estado de plegamiento del proteoma citosólico. Además, la asociación con proteínas HSPs previene por un lado la desnaturalización y degradación de las proteínas termo-sensibles y, por otro lado promueve la des-agregación y liberación de maquinaria y proteínas atrapadas en estos complejos, una vez que las condiciones son más favorables (Mateju *et al.*, 2017). Así, pese a que no había sido reportado anteriormente la localización de proteínas eIF4E a HSGs, no es de extrañarse este resultado dada la importancia de la coordinación entre la estabilidad proteica y la actividad traduccional, sobre todo porque así se evita que proteínas mal plegadas dañen a la célula al unirse con las HSPs y, a su vez inhibiendo la traducción de más proteínas. En plantas, si bien no ha sido demostrada la relación directa de proteínas agregadas-SGs-HSPs se ha encontrado que es necesaria la presencia de HSPs (en específico de la familia HSP 100) para liberar complejos mRNA-proteínas y restaurar la maquinaria de traducción para producir nuevas proteínas (Merret *et al.*, 2017; McLoughlin *et al.*, 2016). Por otra parte, se ha visto también en células de mamífero que HSP27, una sHSP, inhibe la traducción durante choque térmico al unirse directa y específicamente al factor traduccional eIF4G, inhibiendo así la formación del complejo traduccional y, reclutando al eIF4G a gránulos de choque térmico (Cuesta *et al.*, 2000). Se observó que esta asociación sHSP-eIF4G es específica, debido a que no hubo interacción

con otros factores (entre ellos eIF4E) y por tanto, ninguna otra proteína traduccional fue reclutada a HSGs. Esto plantea la opción de que nCBP pueda estar interaccionando también de manera directa con HSP17 para la represión traduccional de mensajeros que sean blanco de nCBP o bien, simplemente para proteger a nCBP de eventos de desnaturalización y degradación durante la condición de choque térmico. Recientemente en plantas se observó que sHSPs de clase I (HSP17.4) y clase II se asocian con factores traduccionales específicos (de manera directa o indirecta) para reclutarlos a gránulos de estrés citosólicos (HSGs) en condiciones de estrés por choque térmico, para mantenerlas estables y solubles durante y después del estrés, estando funcionales para la traducción normal (McLoughlin *et al.*, 2016). Aun cuando los factores encontrados no incluyen a eIF4E, no se descarta la posibilidad de que pueda interaccionar con sHSPs. Además, en trabajo previo se observó que nCBP es capaz de interaccionar con HSP81.2 y HSP81.3 (ambas de la familia de las HSP 90) en complejos citoplasmáticos (Flores, 2014). Se ha reportado que HSP90 juega una función importante en la formación de SGs y PBs y, es requerida para la localización de eIF4E en estos gránulos (Suzuki *et al.*, 2009; Matsumoto *et al.*, 2011). Así, la localización de nCBP a HSGs puede ser debida a su estabilización durante el estrés, como se discutió antes, o bien, para formar parte de complejos SGs y PBs asociados con HSPs y agregados proteicos.

Finalmente, cabe señalar que para cada gen empleado como marcador de gránulos de estrés se comprobó que bajo las condiciones de estrés probado se logró formar el gránulo de estrés deseado. Esto es importante ya que se ha visto que bajo distintas condiciones de estrés y en distintos organismos, puede o no ser estimulada su formación, además de ser su composición estrés específica (Aulas *et al.*, 2017).

11. CONCLUSIONES

- En estrés osmótico, en las condiciones experimentales empleadas, se observó ligera, aunque estadísticamente significativa, disminución de la expresión del mensajero de *nCBP* en tiempos tardíos (3, 6, 24 h y días de estrés). En cambio, hubo un ligero aumento en la expresión en un tiempo muy corto (1.5 h) para la primer réplica biológica. Este resultado podría estar reflejando la regulación de la estabilidad o transcripción del mensajero pero no refleja necesariamente el comportamiento de la proteína *nCBP* en el estrés.
- La proteína *nCBP* presenta una distribución citoplasmática diferencial dependiente del estrés, sugiriendo que esta pueda desempeñar funciones particulares de acuerdo a los mecanismos de adaptación que requiera la célula.
- *nCBP* co-localiza con DCP1 a PBs en condiciones control y de estrés por hipoxia y calor. Su localización a estos gránulos sugiere la participación de la proteína en procesos de represión y degradación de mensajeros.
- *nCBP* co-localiza con HSP17 a HSGs en condiciones de choque térmico. La localización a estos cuerpos plantea la posibilidad de que *nCBP* este regulando la traducción de sus mensajeros blanco, aún sin ser identificados, al interactuar directa o indirectamente con HSP17 o bien, esté simplemente siendo estabilizada para su correcta función y plegamiento con ayuda de la actividad chaperona de las HSPs.
- El reclutamiento de *nCBP* a gránulos (PBs y HSGs) contribuye a elucidar su función celular en estrés en *A. thaliana*, permitiendo dirigir su estudio hacia el mecanismo de represión de mensajeros blanco (como ocurre para homólogos en otras especies) más que a su participación en traducción.

12. PERSPECTIVAS

- Fusionar a la secuencia de nCBP con la proteína mCherry para llevar a cabo los experimentos de co-localización de la proteína con marcadores de gránulos de SGs y ERBs.
- Inmunolocalización de la proteína nCBP, expresada bajo su propio promotor, con los marcadores de gránulos de estrés fusionados a la proteína reportera (vectores generados en este trabajo), para asegurar la localización de nCBP a estos cuerpos debidos a estrés.
- Análisis de complejos citoplasmáticos en los que este asociado nCBP, mediante ensayos de co-inmunoprecipitación, a partir de extractos celulares de plántulas sometidas a distintos tipos de estrés.

13. BIBLIOGRAFÍA

Abdul-Razzak A., Guiraud T., Peypelut M., Walter J., Houvenaghel M. C., Candresse T., Le Gall O. and German-Retana S. Involvement of the cylindrical inclusion (CI) protein in the overcoming of an eIF4E-mediated resistance against lettuce mosaic potyvirus. *Mol. Plant Pathol.*, 2009. Vol. 10: 109-113.

Alekhina O. and Vassilenko K. Translation initiation in eucaryotes: versatility of the scanning model. *Biochemistry (Moscow)*, 2012. Vol. 77: 1465-1477.

Anderson P. and Kedersha N. RNA granules. *Journal of Cell Biol.*, 2006. Vol. 172: 803-808.

Anderson P. and Kedersha N. Stress granules: the Tao of RNA triage. *Cell*, 2007. Vol. 33: 141-148.

Anderson P. and Kedersha N. Stress granules. *Current Opinion Biol.*, 2009. Vol. 19: R397-R398.

Andrei M., Ingelfinger D., Heintzmann R., Achsel T., Rivera-Pomar R. and Luhrmann R. A role for eIF4E and eIF4E-transporter in targeting mRNPs to mammalian processing bodies. *RNA*, 2005. Vol. 11: 717-727.

Aulas A., Fay M., Lyons S., Achorn C., Kedersha N., Anderson P. and Ivanov P. Stress-specific differences in assembly and composition of stress granules and related foci. *The Company of Biologists*, 2017. Vol. 130: 927-937

Bailey-Serres J., Sorenson R. and Juntawong P. Getting the message across: cytoplasmic ribonucleoprotein complexes. *Cell*, 2009. Vol. 14: 443-453.

Biamonti G. and Vourc'h C. Nuclear stress bodies. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2010. DOI: 10.1101/cshperspect.a000695

Brengues M. and Parker R. Accumulation of polyadenylated mRNA, Pabp1, eIF4F and eIF4G with P-bodies in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell*, 2007. Vol. 18: 2592-2602.

Bush M. S., Hutchins A.P., Jones A. M., Naldrett M.J., Jarmolowski A., Lloyd C.W. and Doonan J.H. Selective recruitment of proteins to 5'Cap complexes during the growth cycle in Arabidopsis. *Plant J.*, 2009. Vol. 59: 400-412.

Chapat C., Jafarnejad S., Matta-Camacho E., Hesketh G., Gelbart I., Attig J., Gkogkas C., Alain T., Stern-Ginossar N., Fabian M., Gringas A. C., Duchaine T. and Sonenberg N. Cap-binding protein 4EHP effects translation silencing by microRNAs. *PNAS*, 2017. Vol. 114: 5425-5430.

Chau C., Nakaminami K., Matsui A., Kobayashi S., Kurihara Y., Toyooka K., Tanaka M. and Seki M. Oligouridylate Binding protein 1b Play an Integral role in Plant Heat Stress Tolerance. *Frontiers in Plant Science*, 2016. Vol. 7: 1-9.

Chaudhry Y., Nayak A., Bordeleau M. E., Tanaka J., Pelletier J., Belsham G., Roberts L. and Goodfellow I. G. Calciviruses Differ in Their Functional Requirements for eIF4F Components. *The Journal of Biological Chemistry*, 2006. Vol. 281: 25315-25325.

Charron C., Nicolai M., Gallois J. L., Robaglia C., Moury B., Palloix A. and Caranta C. Natural variation and functional analyses provide evidence for co-evolution between plant eIF4E and potyviral VPg. *The pLant Journal*, 2008. Vol. 54: 56-68.

Chen S. and Gao G. MicroRNAs recruit eIF4E2 to repress translation of target mRNAs. *Protein Cell*, 2017. DOI 10.1007/s13238-017-0444-0

Cherkasov V., Grousl T., Theer P., Vainshtein Y., Gläßer C., Mongis C., Kramer G., Stoecklin G., Knop M., Mogk A. and Bukau B. *FEBS Letters*, 2015. Vol. 589: 3654-3664.

Cherkasov V., Hofmann S., Druffel-Augustin S., Mogk A., Tyedmers J., Stoecklin G. and Bukau B. Coordination of Translational and Protein Homeostasis during Severe Heat Stress. *Current Biology*, 2013. Vol. 23: 2452-2462.

Cho P., Gamberi C., Cho-Park Y., Cho-Park I., Lasko P. and Sonenberg N. Cap-Dependent Translational Inhibition Establishes Two Opposing Morphogen Gradients in *Drosophila* Embryos. *Current Biology*, 2006. Vol. 16: 2035-2041.

Cho P., Poulin F., Cho-Park Y., Cho-Park I., Chicoine J., Lasko P. and Sonenberg N. A new Paradigm for Translation Control: Inhibition via 5'-3' mRNA Tethering by Bicoid and the eIF4E Cognate 4EHP. *Cell*, 2005. Vol. 121: 411-423.

Cuesta R., Laroia G. and Schneider R. Chaperone Hsp27 inhibits translation during heat shock by binding eIF4G and facilitating dissociation of cap-initiation complexes. *Genes and Development*, 2000. Vol. 14: 1460-1470.

Culjkovic B., Topisirovic I. and Borden K. Controlling gene expression through RNA regulons: the role of the eukaryotic translation initiation factor eIF4E. *Cell Cycle*, 2007. Vol. 6: 65-69.

Culjkovic B., Topisirovic I., Skrabanek L., Ruiz-Gutierrez M., Borden KL. eIF4E promotes nuclear export of cyclin D mRNAs via an element in the 3'UTR. *Journal of Cell Biological*, 2005. Vol. 169: 245-256.

David Ho J., Wang M., Audas T., Kwon D., Carlsson S., Timpano S., Evangelou S., Brothers S., Gonzalo M., Krieger J., >chen S., Uniacke J. and Lee S. Systemic Reprogramming of Translation Efficiencies on Oxygen Stimulus. *Cell Reports*, 2016. Vol. 14: 1293-1300.

De la Torre DS (2009) Papel de la proteína de unión a Cap, nCBP, en la floración de *Arabidopsis thaliana*. Tesis de Maestría, Facultad de Química, UNAM.

D. Dinkova T., Martínez-Castilla L. and Cruz-Espíndola M. The diversification of eIF4E Family Members in Plants and Their Role in the Plant-Virus Interaction. *Evolution of the Protein Synthesis Machinery and Its Regulation*, 2016. DOI 10.1007/978-3-319-39468-8_9

Dinkova T and Sanchez de Jimenez E. Differential expression and regulation of translation initiation factors -4E and -iso4E during maize germination. *Physiol Plant*, 1999. Vol. 107: 419-425.

Duprat A., Caranta C., Revers F., Menand B., Browning K.S. and Robaglia C. The *Arabidopsis* eukaryotic initiation factor (iso)4E is dispensable for plant growth but required for susceptibility to potyviruses. *Plant J.*, 2002. Vol. 32: 927-934.

Eulalio A., Behm-Ansmant I and Izaurralde E. P bodies: at the crossroads of post-transcriptional pathways. *Molecular Cell Biology*, 2007. Vol. 8: 9-22.

Ferrero P., Layana C., Paulucci E., Gutiérrez P., Hernández G. and Rivera-Pomar R. Cap binding-independent recruitment of eIF4E to cytoplasmic foci. *Molecular Cell Research*, 2012. Vol. 1823: 1217-1224.

Flores A. (2014) Análisis de complejos ribonucleoprotéicos formados por la proteína de unión a Cap, nCBP de *Arabidopsis thaliana*. Tesis de Maestría, Facultad de Química, UNAM.

Franks T. and Lykke-Andersen. The control of mRNA Decapping and P-Body Formation. *Molecular Cell*, 2008. Vol. 32: 605-615.

Frydryskova K., Masek T., Borcin K., Mrvova S., Venturi V. and Pospisek M. Distinct recruitment of human eIF4E isoforms to processing bodies and stress granules. *BMC Molecular Biology*, 2016. Vol. 17: 1-19.

Gilks N. et al. Stress granule assembly is mediated by prion-like aggregation of TIA-1. *Mol. Biol. Cell*, 2004. Vol. 15: 5383-5398.

Goodfellow I. and Roberts L. Eukaryotic initiation factor 4E. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 2008. Vol. 40; 2675-2680.

Hayashi Y., Yamada K., Shimada T., Matsushima R., Nishizawa N., Nishimura M and Haranishimura I. A proteinase-storing body that prepares for cell death or stresses in the epidermal cells of *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.*, 2001. Vol. 42: 894-899.

Hernández G., Altmann M., Sierra J. M., Urlaub H., Diez del Corral R., Schwartz P. et al. Functional analysis of Seven genes encoding eight translation initiation factor 4E (eIF4E) isoforms in *Drosophilla*. *Mech. Dev.*, 2005. Vol. 122: 520-543

Hidalgo A. (2007). Obtención y caracterización de mutantes homocigas de un miembro de la familia de eIF4E: nCBP (novel Cap-Binding Protein) en *Arabidopsis thaliana*. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM.

Hinnebusch A. and Lorsch J. The mechanism of eukaryotic translation initiation: new insights and challenges. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2012. 4:a011544.

Hwan J., Li J., Liu W. Y., An S. J., Cho H., Her N., Yeam I., Kim D. and Kang B. C., Double mutations in eIF4E and eIFiso4E confer Recessive Resistance to Chilli Veinal Mottle Virus in Pepper. *Mol Cells*, 2009. Vol. 27: 329-336.

Iborra F., Jackson D. and Cook P. Coupled transcription and translation within nuclei of mammalian cells. *Science*, 2001. Vol. 293: 1139-1142.

Jiang J. and Laliberté J. F. The genome-linked protein VPg of plant viruses – a protein with many partners. *Current Opinion in Virology*, 2011. Vol. 1: 347-354.

Jiao Y., Riechmann J. L. and Meyerowitz E. M. Transcriptome-wide analysis of uncapped mRNAs in *Arabidopsis* reveals regulation of mRNA degradation. *Plant Cell*, 2008. Vol. 20: 2571-2585

Joshi B., Cameron A. and Jagus R. Characterization of mammalian eIF4E-family members. *Eur. Journal of Biochemistry*, 2004. Vol. 271: 2189-2203

Joshi B., Kibwe L., Dennis L. M. and Jagus R. Phylogenetic analysis of eIF4E- family members. *BMC Evolutionary Biology*, 2005. Vol. 5: 1-20.

Kawa D and Testerink C. Regulation of mRNA decay in plant responses to salt and osmotic stress. *Cell Mol. Life Sci.*, 2017. Vol. 74: 1165-1176.

Kedersha N. and Anderson P. Stress granules: sites of mRNA triage that regulate mRNA stability and translatability. *Biochem. Soc. Trans.*, 2002. Vol. 30: 963-969.

Kedersha N. Stress granules and processing bodies are dynamically linked sites of mRNP remodeling. *J. Cell Biol.*, 2005. Vol. 169: 871-884.

Keima T., Hagiwara-Komoda Y., Hashimoto M., Neriya Y., Koinuma H., Iwabuchi N., Nichida S., Yamaji Y. and Namba S. Deficiency of the eIF4E isoform nCBP limits the cell-to-cell movement of a plant virus encoding triple-gene-block proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Scientific Reports*, 2016.

Keiper B. D., Lamphear B. J., Deshpande A. M., Jankowska-Anyszka M., Aamodt E. J., Blumenthal T. et al. Functional characterization of five eIF4E isoforms in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Biological Chemistry*, 2000. Vol. 275: 10590-10596.

Ketudat J. and Esen A. β -glucosidases. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2010. Vol. 67: 3389-3405.

Khan M., Miyoshi H., Gallie D., Goss D. Potyvirus genome-linked protein, VPg, directly affects wheat germ in vitro translation: interactions with translation initiation factors eIF4F and eIFiso4F. *Journal Biological Chemistry*, 2008. Vol. 283: 1340-1349.

Kimball S., Horetsky R., Ron D., Jefferson L. and Harding H. Mammalian stress granules represent sites of accumulation of stalled translation initiation complexes. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 2003. Vol. 284: C273-C284.

Kirschner M., Winkelhaus S., Thierfelder J. and Nover L. Transient expression and heat-stress-induced co-aggregation of endogenous and heterologous small heat-stress proteins in tobacco protoplasts. *The Plant Journal*, 2000. Vol. 24: 397-411.

Klann E. and Dever T. Biochemical mechanisms for translation regulation in synaptic plasticity. *Nature Reviews, Neuroscience*, 2004. Vol. 5: 931-941.

Kropiwnicka A., Kuchta K., Lukaszewicz M., Kowalska J., Jemielity J., Ginalski K., Darzynkiewicz E. and Zuberek J. Five eIF4E isoforms from *Arabidopsis thaliana* are characterized by distinct features of Cap analogs binding. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2014. 1-6.

Kubacka D., Kamenska A., Broomhead H., Minshall N., Darzynkiewicz E. and Standart N. Investigating the Consequences of eIF4E2 (4EHP) Interaction with 4E-Transporter on Its Cellular Distribution in HeLa Cells. *Plos One*, 2013. Vol. 8: 1-14.

Lambermon M., G. Simpson G., Wieczorek D., Hemmings-Mieszczak M., Khlare U. and Filipowicz W. UBP1, a novel hnRNP-like protein that functions at multiple steps

of higher plant nuclear pre-mRNA maturation. *The EMBO Journal*, 2000. Vol. 19: 1638-1649.

Lellis A., Kasschau K., Whitham S. and Carrington J. Loss of susceptibility mutants of *Arabidopsis thaliana* reveal an essential role for eIF(iso)4E during Potyvirus infection. *Curr Biol.*, 2002. Vol. 12: 1046-1051.

León A. (2016). Caracterización molecular y fenotípica de plantas de *Arabidopsis thaliana*, mutantes de la proteína nCBP, en condiciones de estrés. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM.

Léonard S., Plante D., Wittmann S., Daigneault N., Fortin M. G., Laliberté J. Complex formation between potyvirus VPg and translation eucaryotic intitation factor 4E correlates with virus infectivity. *Journal Virologi*, 2000. Vol. 74: 7730-7737.

Liu J., Valencia-Sánchez M., Hannon G. and Parker R. MicroRNA dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies. *Nature Cell Biol.*, 2005. Vol. 7: 719-723.

London A., Muniandy A., Shetty A., Lehrmann E., Volpon L., Houng S., Zhang Y., Dai B., Peroutka R., Manzan-Mamczarz K., Steinhardt J., Mahurkar A., Becker K., Borden K. and Gartenhaus R. MNKs act as regulatory switch for eIF4E1 and eIF4E3 driven mRNA translation in DLBCL. *Nature Comunnications*, 2014. DOI: 10.1038/ncomms6413.

Mahboubi H. and Stochaj U. Cytoplasmic stress granules: Dynamic modulators of cell signaling and disease. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2017. Vol. 1863: 884-895.

Maldonado-Bonilla L. Composition and function of P bodies in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Science*, 2014. Vol. 5: 1-11.

Mateju D., Franzmann T., Patel A., Kopach A., Boczek E., Maharana S., Lee H., Carra S., Hyman A. and Alberti S. An aberrant phase transition of stress granules triggered by misfolded protein and prevented by chaperone function. *The EMBO Journal*, 2017. Vol. 36: 1669-1687.

Matsumoto K., Minami M., Shinozaki F., Suzuki Y., Abe K., Zenno S., Matsumoto S. and Minami Y. Hsp90 is involved in the formation of P-bodies and stress granules. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2011. Vol. 407: 720-724.

Matsushima R., Fukao Y., Nishimura M. and Hara-Nishimura I. NAI1 gene encodes a basic-helix-loop-helix-type putative transcription factor that regulates the formation of an endoplasmic reticulum-derived structure, the ER body. *Plant Cell*, 2004. Vol. 16: 1536-1549.

Matsushima R., Hayashi Y., Kondo M., Shimada T., Nishimura M. and Hara-Nishimura I. An Endoplasmic Reticulum-Derived Structure That Is Induced under Stress Conditions in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 2002. Vol. 130: 107-1814.

Matsushima R., Kondo M., Nishimura M. and Hara-Nishimura I. A novel ER-derived compartment, the ER body, selectively accumulates a β -glucosidase with an ER retention signal in Arabidopsis. *Plant Journal*, 2003. Vol. 33: 493-502.

McLoughlin F., Basha E., Fowler M., Kim M., Bordowitz J., Katiyar-Agarwal S and Vierling E. Class I and II Samll Heat Shock Proteins Together with HSP101 Protect Protein Translation Factors during Heat Stress. *Plant Physiology*, 2016. Vol. 172: 1221-1236.

Merret R., Carpentier M. C., Favory J. J., Picart C., Descombin J., Bousquet-Antonelli C., Tillard P., Lejay L., Deragon J. M. and Charng Y. Y. Heat Shock Protein HSP101 Affects the Release of Ribosomal Protein mRNAs for Recovery after Heat Shock. *Plant Physiology*, 2017. Vol. 174: 1216-1225.

Miroshnichenko S., Tripp J., Nieden U., Neumann D., Conrad U. and Manteuffel R. Immunomodulation of function of small heat shock proteins prevents their assembly into heat stress granules and result in cell death at sublethal temperatures. *The plant Journal*, 2005. Vo. 41: 269-281.

Morita M., Leer L., Fabian M., Siddiqui N., Sonenberg N. et al. A Novel 4EHP-GIGYF2 Translational Repressor Complex Is Essential for Mammalian Development. *Molecular and Cell Biology*, 2012. Vol. 32: 3585-3593.

Mu C., Zhang S., Yu G., Chen N., Li X. and Liu H. Overexpression of Small Heat Shock Protein LimHSP16.45 in *Arabidopsis* Enhances Tolerance to Abiotic Stresses. *Plos One*, 2013. Vol. 8: 1-9.

Nagano A., Fukao Y., Fujiwara M., Nishimura M. and Hara-Nishimura I. Antagonistic jacalin-related lectins regulate the size of ER body-type β -glucosidase complexes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.*, 2008. Vol. 49: 969-980.

Nagano A., Matsushima R. and Hara-Nishimura I. Activation of an ER-body-localized beta-glucosidase via a cytosolic binding partner in damaged tissues of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.*, 2005. Vol. 46: 1140-1148.

Nakano R., Pislewska-Bednarek M., Yamada K., Edger P., Miyahara M., Kondo M., Böttcher C., Mori M., Nishimura M., Sculze-Lefert P., Hara-Nishimura I. and Bednarek P. PYK10 myrosinase reveals a functional coordination between endoplasmic reticulum bodies and glucosinolates in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 2016. Vol. 5: 1-17.

Nakano R., Yamada K., Bednarek P., Nishimura M. and Hara-Nishimura I. ER bodies in plants of the Brassicales order: biogenesis and association with innate immunity. *Frontiers in Plant Science*, 2014. Vol. 5: 1-17.

Nakahara K. S., Shimada R., Choi S. H., Yamamoto H., Shao J., Uyeda L. Involvement of the P1 cistron in overcoming eIF4E-mediated recessive resistance against Clover yellow vein virus in pea. *Mol. Plant-microbe Interact*, 2010. Vol. 23: 1460-1469.

Narsai R., Howell K. A., Millar A. H., O'Toole N., Small I. and Whelan J. Genome-wide analysis of mRNA decay rates and their determinants in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, 2007. Vol. 19: 3418-3436.

Nicaise V., German-Retana S., Sanjuan R., Dubrana M. P., Mazier M., Maisonneuve B., Candresse T., Caranta C. and Le Gall O. The eukaryotic translation initiation factor 4E controls lettuce susceptibility to the potyvirus Lettuce mosaic virus. *Plant Physiol*, 2003. Vol. 132: 1272-1282.

Nover L., Scharf K. and Neumann D. Cytoplasmic heat shock granules are formed from precursor particles and are associated with a specific set of mRNAs. *Mol Cell Biol.*, 1989. Vol. 9: 1298-1308.

O'Leary S., Petrov A., Chen J. and Puglisi J. Dynamic recognition of the mRNA Cap by *Saccharomyces cerevisiae* eIF4E. *Cell Press Structure*, 2013. Vol. 21: 2197-2207.

Ogasawara K., Yamada K., Christeller J., Kondo M., Hatsugai N., Hara-Nishimura I., et al. Constitutive and inducible ER bodies of *Arabidopsis thaliana* accumulate distinct β -glucosidases. *Plant Cell Physiol.*, 2009. Vol. 50: 480-488.

Osborne M., Volpon L., Kornblatt J., Culjkovic-Kraljacic B., Baguet A. and Borden K. eIF4E3 acts as tumor suppressor by utilizing an atypical mode of methyl-2-guanosine cap recognition. *PNAS*, 2013. Vol. 110: 3877-3882.

Parker R. and Sheth U. P Bodies and the Control of mRNA Translation and Degradation. *Molecular Cell*, 2007. Vol. 25: 635-646.

Pomeranz M., Hah C., Lin P., Kang S., Finer J., Blackshear P. and Jang J. The *Arabidopsis* Tandem Zinc Finger Protein AtTZF1 Traffics between the Nucleus and Cytoplasmic Foci and Binds Both DNA and RNA. *Plant Physiology*, 2010. Vol. 152: 151-165.

Richter J. and Sonenberg N. Regulation of cap-dependent translation by eIF4E inhibitory proteins. *Nature*, 2005. Vol. 433: 477-480.

Rodríguez C., Freire M., Camilleri C. and Robaglia C. 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 Journal*, 1998. Vol. 13: 465-473.

Romero-Santacreu L., Moreno J., Perez-Ortin J. E. and Alepuz P. Specific and global regulation of mRNA stability during osmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA*, 2009. Vol. 15: 1110-1120.

Roudet-Tavert G., Michon T., Walter J., Delaunay T., Redondo E., LeGall O. Central domain of a potyvirus VPg is involved in the interaction with the host translation

initiation factor eIF4E and the viral protein HcPro. J. Gen. Virol., 2007. Vol. 88: 1029-1033.

Ruffel S., Dussault M. H., Palloix A., Moury B., Bendahmane A., Robaglia C. and Caranta C. A natural recessive resistance gene against Potato virus Y in pepper corresponds to the eucaryotic initiation factor 4E (eIF4E). Plant Journal, 2002. Vol. 32: 1067-1075.

Ruffel S., Gallois J., Moury B., Robaglia C., Palloix A. and Caranta C. Simultaneous mutations in translation initiation factors eIF4E and eIF(iso)4E are required to prevent pepper vein mottle virus infection of pepper. Journal Gen Virol, 2006. Vol. 87: 2089-2098.

Ruud K., Kuhlow C., Goss D. and Browning K. Identification and Characterization of a Novel Cap-binding Protein from *Arabidopsis thaliana*. The journal of Biological Chemistry, 1998. Vol. 273: 10325-10330.

Sato M., Nakahara K., Yoshii M., Ishikawa M. and Uyeda I. Selective involvement of members of the eucaryotic initiation factor 4E family in the infection of *Arabidopsis thaliana* by potyviruses. FEBS Letter, 2005. Vol. 579: 1167-1171.

Scharf K., Heider H., Höhfeld I., Lyck R., Schmidt E. and Nover L. The tomato Hsf system: HsfA2 needs interaction with HsfA1 for efficient nuclear import and may be localized in cytoplasmic heat stress granules. Mol Cell Biol., 1998. Vol. 18: 2240-2251.

Scheper G., van Kollenburg B., Hu J., Luo Y., Goss D. and Proud C. Phosphorylation of eukaryotic initiation factor 4E markedly reduces its affinity for capped mRNA. J. Biol. Chem., 2002. Vol. 277: 3303-3309.

Schwartz D. and Parker R. mRNA decapping in yeast requires dissociation of the cap binding protein, eukaryotic translation initiation factor 4E. Mol. Cell. Biol., 2000. Vol. 20: 7933-7942.

Siddique M., Gernhard S., Koskull-Döring P., Vierling E. and Scharf K. The plant sHSP superfamily: five new members in *Arabidopsis thaliana* with unexpected properties. *Cell Stress and Chaperones*, 2008. Vol. 13: 183-197.

Smýval P., Hrdý I. and Pechan P. High-molecular-mass complexes formed in vivo contain smHSPs and HSP70 and display chaperone-like activity. *Journal of Biochemistry*, 2000. Vol. 267: 2195-2207.

Sonenberg N. and Dever T. Eukaryotic translation initiation factors and regulators. *Current Opinion in Structural Biology*, 2003. Vol. 13: 56-63.

Sonenberg N. and Hinnebusch A. Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets. *Cell*, 2009. Vol. 136: 731-745.

Strudwick S. and Borden K. L. The emerging roles of translation factor eIF4E in the nucleus. *Differentiation*, 2002. Vol. 70: 10-22.

Suzuki Y., Minami M., Suzuki M., Abe K., Zenno S., Tsujimoto M., Matsumoto K and Minami Y. The Hsp90 inhibitor Geldanamycin Abrogates Colocalization of eIF4E and eIF4E-Transporter into Stress Granules and Association of eIF4E with eIF4G. *The Journal of Biological Chemistry*, 2009. Vol. 284: 35597-35604.

Teixeira D., Sheth U., Valencia-Sánchez M., Brengues M. and Parker R. Processing bodies require RNA for assembly and contain nontranslating mRNAs. *RNA*, 2005. Vol. 11: 371-382.

Thomas M., Loschi M., Desbast M. and Boccaccio G. Rna granules: The good, the bad and the ugly. *Cellular Signalling*, 2011. Vol. 23: 324-334.

Timpano S., Uniacke J. Human cells cultured under physiological oxygen utilize two cap-binding proteins to recruit distinct mRNAs for translation. *Journal of Biological Chemistry*, 2016.

Topisirovic I., Kentsis A., M. Pérez J., Guzman M., T. Jordan C. and B. Borden K. Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E Activity is Modulated by HOXA9 at Multiple Levels. *Molecular and Cellular Biology*, 2005. Vol. 25: 1100-1112.

Uniacke J., Perera J. K., Lachance G., Francisco C. B., Lee S. Cancer cells exploit eIF4E2-directed synthesis of hypoxia response proteins to drive tumor progression. *Cancer research*, 2014. Vol. 74: 1379-1389.

Uniacke J. and Zerges W. Stress induces the assembly of RNA granules in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Journal Cell Biol.*, 2008. Vol. 182: 641-646.

Vardy L. and Orr-Weaver T. Regulating translation of maternal messages: multiple repression mechanisms. *Trends in Cell Biology*, 2007. Vol. 17: 547-554.

Volpon L., Culjkovic-Kraljacic B., Sohn H., Blacett-Cohen A., Osborne M. and B. Borden L. A biochemical framework for eIF4E-dependent mRNA export and nuclear recycling of the export machinery. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2017. *RNA* 23: 927-937.

Wagner D., Schneider-Mergener J. and Forreiter C. Analysis of Chaperone Function and Formation of Hetero-oligomeric Complexes of Hsp 18.1 and HSP 17.7, representing two Different Cytoplasmic sHSP Classes in *Pisum sativum*. *Journal of Plant Growth Regulation*, 2005. Vol. 24: 226-237.

Wang A. and Krishnaswamy S. Eukaryotic translation initiation factor 4E-mediated recessive resistance to plant viruses and its utility in crop improvement. *Molecular Plant Pathology*, 2012. Vol. 13: 795-803.

Wang X., Chang L., Wang H., Su A. and Wu Z. Dcp1 and GW182 Induce Distinct Cellular Aggregates and Have Different Effects on microRNA Pathway. *DNA and Cell Biology*, 2017. Vol. 36: 1-6.

Waris S., James M. and Wilce J. RNA Recognition and Stress Granule Formation by TIA proteins. *Int. J. Mol. Sci*, 2014. Vol.15: 23377-23388.

Weber C., Nover L. and Fauth M. Plant stress granules and mRNA processing bodies are distinct from heat stress granules. *The Plant Journal*, 2008. Vol. 56: 517-530.

Xu J. and Chua N. H. Processing bodies and plant development. *Current Opinion in Plant Biology*, 2011. Vol. 14: 88-93.

Yarunin A., Harris R., Ashe M. and Ashe H. Patterning of the *Drosophila* oocyte by a sequential translation repression program involving the d4EHP and Belle translational repressors. *RNA Biology*, 2011. Vol. 85: 904-912.

Yeam I., Cavatorta J., Ripoll D., Kang B. C and Jahn M. Functional Dissection of Naturally Occurring Amino Acid Substitutions in eIF4E that Confers Recessive Potyvirus Resistance in Plants. *The Plant Cell*, 2007. Vol. 19: 2913-2928.

Yoo S., Cho Y. and Sheen J. *Arabidopsis* mesophyll protoplasts: a versatile cell system for transient gene expression analysis. *Nature Protocols*, 2007. Vol. 2: 1565-1572.

Zuberek J., Kuchta K., Hernández G., Sonenberg N. and Ginalski K. Diverse cap-binding properties of *Drosophila* eIF4E isoforms. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2016. Vol. 1864: 1292-103.

14. ANEXOS

Anexo 1. Cebadores empleados en las construcciones y tiempo real

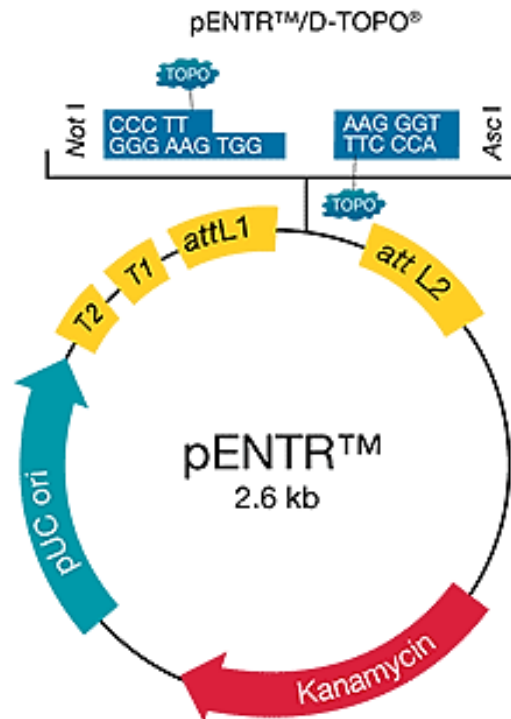
Tabla 3. Lista de cebadores

Nombre	Orientación	Secuencia 5'----- 3'	Uso
RD21cds	Forward	CACCCACTGAAGAAGAAATGGGGTTCCCT	C
RD21cds	Reverse	GGCAATGTTCTTTCTGCCTTGTGACCAG	C
UBP1cds	Forward	CACCATGCAGAGGTTGAAGCAGCAGCAGCA	C
UBP1cds	Reverse	CTGGTAGTACATGAGCTGCTGCGCGTT	C
PBP1cds	Forward	CACCAAGAAGCAGAAGATGGCCCAAAGG	C
PBP1cds	Reverse	TGCGTTGGATAAAGGACGAACATGGACTCC	C
HSPC17cds	Forward	CACCAGAATGGATTTGGAGTTTGGAAAGG	C
HSPC17cds	Reverse	GGCAGCGACTTGAACCTGTATAGTC	C
PYK10cds	Forward	CACCACGAGAATGGTTTTGCA	C
PYK10cds	Reverse	GGCAAGCTCATCCTTCTTGAGCGC	C
18s	Forward	TCC TAT TGT GTT GGC CTT CGG	TR
18s	Reverse	TCC TTG GCA AAT GCT TTC GC	TR
nCBP_TR_1	Forward	GGAATCGCAATGCTTCTGACC	TR
nCBP_TR_1	Reverse	GCAACTTCAAATGCCGCTTG	TR
nCBP_TR_2	Forward	GCTTCTGACCATCAGGCAGT	TR
nCBP_TR_2	Reverse	GAGAGAAGCATCGTGTGGCT	TR
RBP47cds	Forward	CACCGAGAGAGCGATGTCGTCAAAGATGGT	C
RBP47cds	Reverse	TGCCTCCGGGTAAGATAGCATTGTG	C
HSPC1cds	Forward	CACCTCGAGAATGTCGCTTATTCCAAG	C
HSPC1cds	Reverse	TGCGCCAGAGATATCAATAGACTTAACTTGAGCC	C
pENTRYPYK10	Forward	CACCGGATCCTAAATCTACGGCGAAACAG	C
RD21 inter	Forward	CTTGGTTACAGGCTCACAGCATTTTC	C

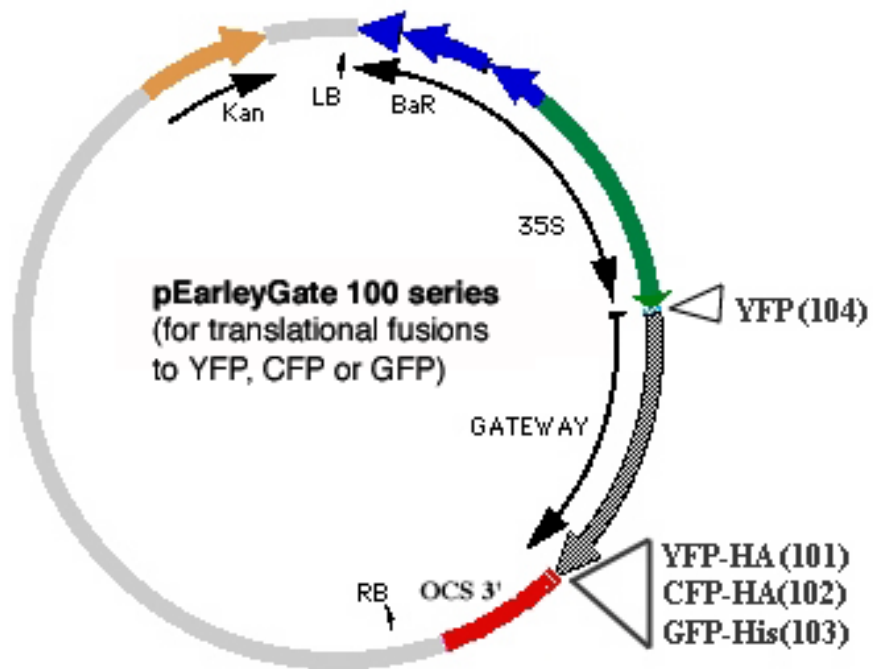
Nota: TR= Tiempo Real; C = Clonación

Anexo 2. Mapas de vectores empleados

Vector pENTR-D-TOPO



Vector pEarly 101, 102 y 104



Anexo 3. Listado de soluciones

Solución enzimas

Reactivo	Concentración	15mL
Celulasa R10	1.5%	0.225g
Macerozima R10	0.4%	0.06g
Manitol	0.4M	7.5 mL (stock 0.8M)
KCl	20 mM	150 μ L (stock 2M)
MES	20 mM	1.5 mL (stock 0.2M)
CaCl ₂	10 mM	150 μ L (stock 1M)
H ₂ O	-	c.b.p. 15 mL

Solución PEG

Reactivo	1mL
PEG 4000	0.4 g
H ₂ O	300 μ L
Manitol 0.8M	250 μ L
CaCl ₂ 1M	100 μ L

Solución W5

Reactivo	Concentración	40mL
NaCl	154 mM	1.54 mL (stock 4M)
CaCl ₂	125 mM	5 mL (stock 1M)
KCl	5 mM	100 μ L (stock 2M)
MES	2 mM	400 μ L (stock 0.2M)
H ₂ O	-	c.b.p. 40 mL

Solución MMg

Reactivo	Concentración	15mL
Manitol	0.4 M	7.5 mL (stock 0.8M)
MgCl ₂	15 mM	225 μ L (stock 1M)
MES	4 mM	300 μ L (stock 0.2M)
H ₂ O	-	c.b.p. 15 mL

Medio LB pH 7.0

Reactivo	Cantidad
Bactotripton	10 g/L
Extracto de Levadura	5 g/L
NaCl	5 g/L
Agar (medio solido)	10 g/L
Agua	c.b.p 1 L
Esterilizar por autoclave	