



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**ANÁLISIS DE LA REGULACIÓN TRADUCCIONAL EN LA  
EXPRESIÓN DE GENES DE RESPUESTA A ESTRÉS POR  
FRÍO EN *ARABIDOPSIS THALIANA***

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA FARMACÉUTICO BIÓLOGA

PRESENTA

MAYRA AQUINO LUNA

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX.

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.

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** J. ELEAZAR MARTÍNEZ BARAJAS  
**VOCAL:** MARTHA PATRICIA COELLO COUTIÑO  
**SECRETARIO:** TZVETANKA DIMITROVA DINKOVA  
**1er. SUPLENTE:** NURIA VICTORIA SÁNCHEZ PUIG  
**2° SUPLENTE:** VERÓNICA GARROCHO VILLEGAS

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:** LABORATORIO 103,  
CONJUNTO E, DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA, FACULTAD DE QUÍMICA,  
UNAM.

**ASESOR DEL TEMA:**

**Dra. Tzvetanka Dimitrova Dinkova**

**SUSTENTANTE:**

**Mayra Aquino Luna**

## Contenido

<b>1. AGRADECIMIENTOS .....</b>	<b>5</b>
<b>2. RESUMEN.....</b>	<b>7</b>
<b>3. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>8</b>
<b>3.1. Traducción en eucariontes.....</b>	<b>8</b>
3.1.1. Inicio de la traducción .....	8
3.1.2. Elongación.....	10
3.1.3. Terminación y reciclamiento.....	11
3.1.4. Polisomas .....	12
<b>3.2. Estructura 5' Cap.....</b>	<b>13</b>
<b>3.3. Factores eucarióticos de inicio de la traducción .....</b>	<b>15</b>
<b>3.4. <i>Arabidopsis thaliana</i> como modelo de estudio.....</b>	<b>17</b>
3.4.1. Localización y función de los factores eucarióticos de inicio de la traducción eIF4E y eIF(iso)4E.....	18
<b>3.5. Estrés por frío en plantas.....</b>	<b>19</b>
3.5.1. Genes de tolerancia al frío.....	20
3.5.2. Regulación de la traducción en respuesta a estrés.....	21
<b>4. ANTECEDENTES .....</b>	<b>24</b>
<b>4.1. Genes preferencialmente traducidos por los factores eIF4E y eIF(iso)4E.....</b>	<b>25</b>
<b>5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....</b>	<b>27</b>
<b>6. HIPÓTESIS .....</b>	<b>28</b>
<b>7. OBJETIVOS.....</b>	<b>28</b>
7.1. Objetivo general .....	28
7.2. Objetivos particulares.....	28
<b>8. METODOLOGÍA .....</b>	<b>29</b>
<b>9. RESULTADOS.....</b>	<b>34</b>
<b>9.1. Comparación de los perfiles de polirribosomas entre plantas crecidas en condiciones de temperatura normal (22°C) y de aclimatación (4°C).....</b>	<b>34</b>
<b>9.1. Cambios en la distribución de mRNAs correspondientes a los factores eIF4E en perfiles de polirribosomas. ....</b>	<b>36</b>
<b>9.2. Regulación de la distribución polirribosomal de mRNAs correspondientes relacionados con la respuesta a estrés por frío. ....</b>	<b>40</b>
<b>10. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....</b>	<b>48</b>
<b>11. CONCLUSIONES.....</b>	<b>52</b>
<b>12. PERSPECTIVAS .....</b>	<b>53</b>

<b>13.</b>	<b>ANEXOS .....</b>	<b>54</b>
13.1.	Anexo 1. Perfiles polisomales réplica 2.....	54
13.2.	Anexo 2. Geles de integridad del RNA extraído de perfiles polisomales.....	55
13.3.	Anexo 3. -RT muestras perfiles polisomales .....	56
13.4.	Anexo 4. Geles de agarosa cuantificados.....	57
<b>14.</b>	<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>62</b>

## 1. AGRADECIMIENTOS

Este proyecto de Tesis fue realizado gracias al apoyo de los siguientes proyectos de financiamiento:

-Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) Proyecto de Ciencia Básica 238439.

-Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) IN214118.

-Programa de Apoyo a la Investigación y Posgrado (PAIP) 5000-9118.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada dentro del Proyecto de Ciencia Básica CB 2014/238439 durante la realización de esta tesis.

A mis padres, Mayra y Salvador. Ustedes son mi más grande ejemplo a seguir y las personas que más admiro en este mundo. Gracias porque siempre me impulsaron a ser dedicada en la escuela y me brindaron todo su apoyo desde el día en que fui aceptada en esta Universidad. Gracias a eso y muchas cosas más todo esto fue posible.

A mis hermanos Mónica y Adrián, mis cómplices de vida, sé que tener un hermano estudiando lejos implica sacrificios para toda la familia y ustedes siempre fueron solidarios, los quiero mucho, gracias.

A mi primo Jose Juan, te convertiste en uno de mis mejores amigos y te agradezco mucho todo el apoyo que me has brindado desde que llegué a esta ciudad.

A Alan, mi gran amigo y hermano, gracias por siempre estar ahí cuando necesito un consejo, eres la definición perfecta de lo que un verdadero amigo es, no sabes lo agradecida que estoy de que aceptaras ser mi equipo en laboratorio de Orgánica 2, tuve suerte.

A Samy, Andie, Merino, Aldo, Richie y David, en poco tiempo se convirtieron en personas especiales y amigos muy queridos, muchas gracias.

A Efrén, la persona que más lecciones me enseñó en este camino, gracias por hacerme querer ser mejor persona día con día.

A mis compañeros del laboratorio 103, en especial a Allan y Eduardo, porque siempre logran alegrarme el día haciéndome reír muchísimo, gracias porque me hacen sentir muy feliz con su compañía. A Kenia, por ser mi guía en todo el proyecto, y a mi tutora Cesy, porque gracias a usted conocí lo increíble que es la biología molecular.

Y a la UNAM y mi querida Facultad de Química, gracias por haberme brindado todas las herramientas para formarme como profesionista y permitirme vivir la experiencia más maravillosa de toda mi vida.

## 2. RESUMEN

Para contender contra el frío las plantas han desarrollado diversos mecanismos que las protegen contra los daños ocasionados en estas condiciones, uno de estos mecanismos es la regulación de los transcritos que son destinados a traducción. En condiciones de frío, los factores eucarióticos de inicio de la traducción tienen un papel importante en la selección de los mRNAs que deben traducirse. Por medio del análisis de perfiles polisomales encontramos que la traducción global de *Arabidopsis thaliana* incrementa en respuesta a la temperatura de 4°C, o aclimatación. La traducción de *eIF4E* y su isoforma, *eIF(iso)4E*, es altamente inducida en plantas de *Arabidopsis thaliana* aclimatadas al frío, indicando que son de suma importancia para la célula en estas condiciones. También encontramos que los genes *DREB2F* y *MYB HHO2* responden a este estímulo por medio de un incremento en su traducción, sugiriendo que estos tienen una función en los mecanismos de respuesta al frío. La traducción de estos transcritos incrementa en plantas que sobreexpresan a *eIF4E* y no se afecta en plantas mutantes de *eIF(iso)4E*. Esto sugiere que *eIF4E* promueve traducción selectiva en respuesta a la aclimatación. *DREB1A* no se encontró en polisomas de plantas aclimatadas WT. Sin embargo, en las plantas sobre-expresoras de *eIF4E* se detectó el transcrito en estas fracciones, apoyando el papel de este factor en la traducción selectiva de transcritos relacionados con estrés. El mRNA *TCF1* es altamente inducido por frío y es posible observar su reclutamiento a polisomas sólo en plantas aclimatadas. Curiosamente, el transcrito se traduce a menores niveles en las plantas mutantes para *eIF(iso)4E*, sugiriendo que también esta isoforma participa en el estímulo de traducción de *TCF1* en aclimatación. Estos resultados apoyan el papel de *eIF4E* y *eIF(iso)4E* en la traducción selectiva de mRNAs relacionados con la respuesta a estrés, particularmente en aclimatación por frío.

### 3. INTRODUCCIÓN

#### 3.1. Traducción en eucariontes

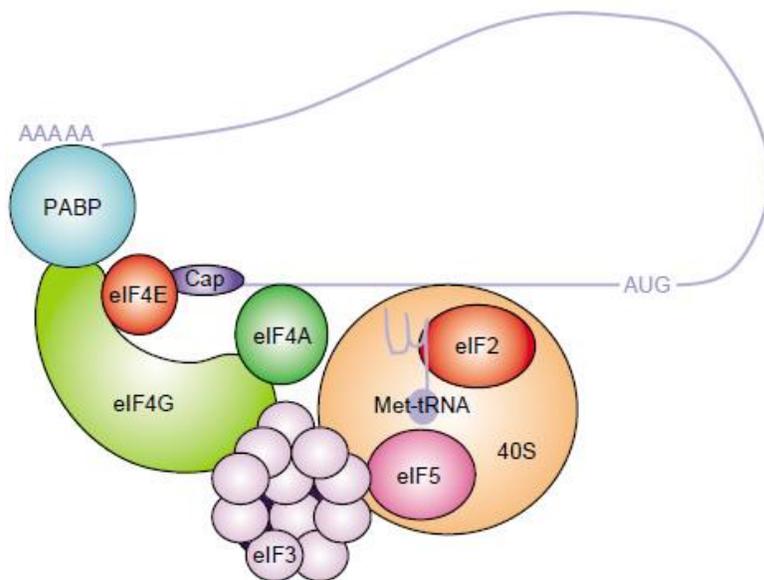
La expresión génica se puede regular de diversas maneras y entre ellas se encuentra el control de la traducción de los mRNAs a proteínas. La traducción es el proceso mediante el cual, la información genética codificada en los nucleótidos del mRNA es empleada para sintetizar proteínas (Shirokikh & Preiss, 2018). La región del mRNA que codifica para una proteína consiste en una serie de unidades de tres nucleótidos llamados codones, los cuales indican el orden en el cual serán colocados los aminoácidos. A diferencia del proceso de transcripción, en donde existe una complementariedad directa entre los nucleótidos que componen el DNA y los ribonucleótidos del mRNA, en la traducción, los aminoácidos no poseen afinidad por la secuencia de mRNA, sino que estos son incorporados a moléculas de tRNA. Estas moléculas proporcionan una relación espacial entre los aminoácidos que se añaden a la cadena polipeptídica creciente y los codones del mRNA (Watson et al., 2004).

El proceso de traducción se puede dividir en 4 etapas: iniciación, elongación, terminación y reciclamiento ribosomal (Sonenberg & Hinnebusch, 2009). Diversas características de la traducción han sido conservadas a lo largo de la evolución; tanto la elongación y la terminación en procariontes y eucariontes consisten en mecanismos parecidos, involucrando factores similares de elongación y de liberación (Frank & Gonzalez, 2010; Gross et al., 2018). Sin embargo, algunas características difieren entre estos organismos; mientras que en los organismos eucariontes existe una separación espacial entre la transcripción, que se lleva a cabo en el núcleo, y la traducción, la cual ocurre en el citoplasma, en procariontes los mRNAs son traducidos cotranscripcionalmente. Otra diferencia notable es que los organismos procariontes requieren únicamente de tres factores de iniciación, mientras que los eucariontes han evolucionado de tal manera que poseen una gran cantidad de eIFs (Marintchev & Wagner, 2004).

##### 3.1.1. Inicio de la traducción

El inicio de la traducción comienza con el reconocimiento de la estructura 7-metilguanosina en el extremo 5' del mRNA, estructura conocida como 5'Cap. Este reconocimiento es llevado

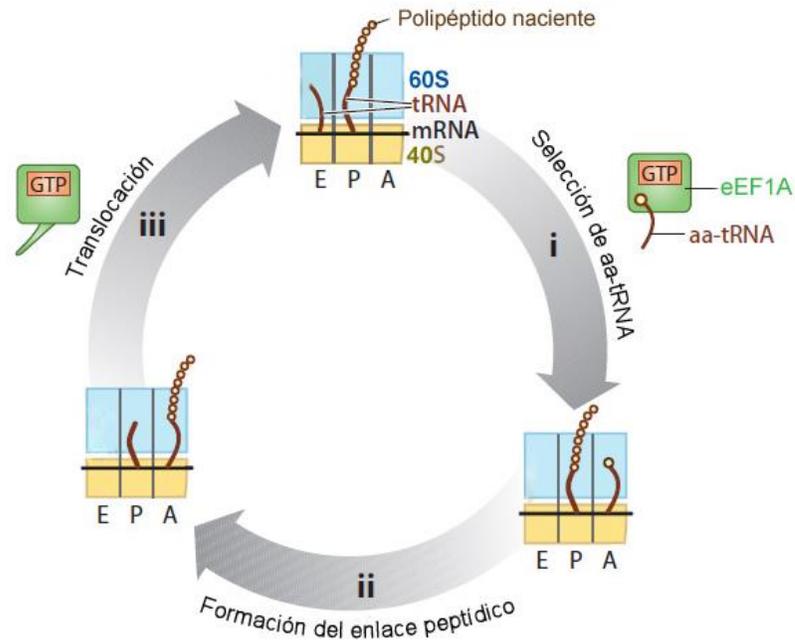
a cabo por el factor eucariótico de inicio de la traducción 4E (eIF4E) (Sesma et al., 2017). La interacción de eIF4E con la proteína de andamiaje eIF4G permite el reclutamiento de otros componentes de inicio de la traducción al extremo 5' del mRNA. Gracias a la afinidad entre los factores de inicio eIF4G y eIF3, es posible la unión del complejo de pre-inicio 43S (PIC), constituido por eIF3, el complejo ternario eIF2-met-tRNA-GTP y la subunidad ribosomal 40S. A su vez, eIF4G posee dominios de unión a la helicasa eIF4A, la cual es necesaria para disociar las estructuras secundarias del mRNA que pudieran formarse en el extremo 5', y dominios de unión a la proteína de unión a Poli-A (PABP, por sus siglas en inglés); esto permitirá la circularización del transcrito y, por ende, el reinicio del proceso de traducción (Martínez-Silva et al., 2012). Una vez realizado este ensamblaje, el complejo de inicio 43S comenzará la búsqueda del codón de inicio río abajo del extremo 5' cap (Figura 1).



**Figura 1. Complejo eucariótico de inicio de la traducción.** Los mRNAs son reclutados por el complejo eIF4F, el cual se compone de dos subunidades, eIF4E y eIF4G. eIF4E se une a la estructura Cap en el extremo 5' de los mRNAs, mientras que eIF4G sirve como proteína de andamiaje e interactúa con otros factores de iniciación, la proteína de unión a poli A (PABP), eIF4A (helicasa que desenrolla estructuras secundarias) y eIF3 (complejo de diversas subunidades que se une a la subunidad ribosomal 40S). Una vez que el mRNA se une a la subunidad 40S ribosomal, este, junto con el complejo ternario (eIF2-met-tRNA-GTP), y otros factores, comienzan el escaneo río abajo del mRNA en búsqueda del codón de inicio. La hidrólisis de GTP mediada por eIF5 ocurre durante la unión de la subunidad 60S ribosomal, para formar el ribosoma 80S. Tomada y modificada de (Robaglia & Caranta, 2006).

### 3.1.2.Elongación

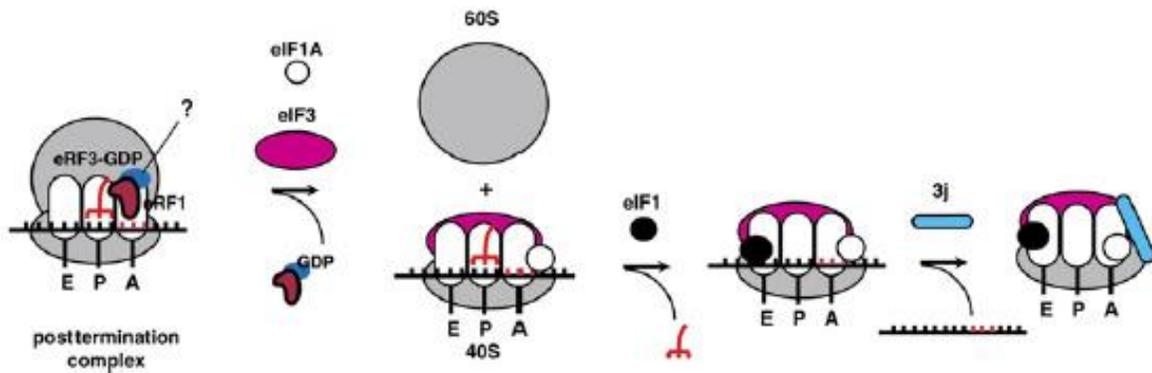
Al terminar la etapa de inicio, el ribosoma 80S es posicionado sobre el mRNA, cuyo codón de inicio será colocado en el sitio P del ribosoma, donde será apareado con el anticodón del Met-tRNA, mientras que el segundo codón del marco abierto de lectura se encontrará en el sitio A, a la espera del siguiente aminoacil-tRNA (Dever & Green, 2012). Durante la elongación, un aa-tRNA se asocia al sitio A del ribosoma y, si se establece un adecuado apareamiento entre las bases del codón en el sitio A y el anticodón del tRNA, se forma un enlace peptídico con el péptido asociado al sitio P. Esto es acompañado por la transferencia del péptido, con un aminoácido más, al sitio A tRNA. Posteriormente, el peptidil tRNA es removido del sitio A al sitio P, y el tRNA deacilado del sitio P es transferido al sitio E, desplazando al tRNA deacilado del ciclo previo (Figura 2). El mRNA es translocado un codón manteniendo así el correcto marco de lectura (Marintchev & Wagner, 2004). A diferencia de la iniciación, la elongación únicamente requiere de tres factores: eEF1A, el cual cargará los aminoacil-tRNAs al ribosoma de manera GTP dependiente, eEF1B, cuya función es restaurar GDP a GTP en eEF1A y, por último el factor eEF2, que cataliza la translocación del ribosoma sobre exactamente un codón del mRNA empleando GTP (Martínez-Silva & Dinkova, 2010).



**Figura 2. El ciclo de elongación de la síntesis de proteínas.** Se muestran los pasos principales del ciclo de elongación, (i) La selección del aminoacil-tRNA (aa-tRNA), (ii) la transferencia del peptidilo y (iii) la translocación del mRNA. Tomada y modificada de (Frank & Gonzalez, 2010)

### 3.1.3. Terminación y reciclamiento

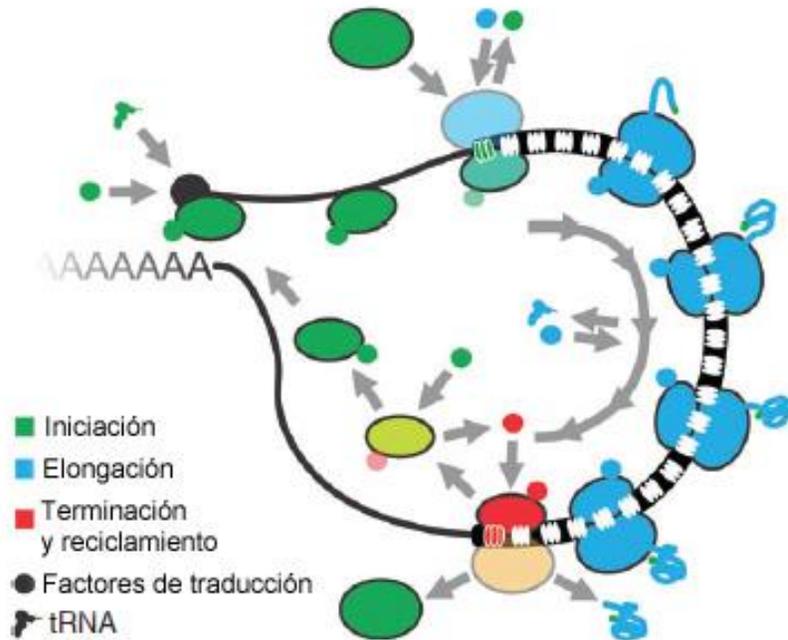
La traducción finaliza cuando un codón de paro UAA, UGA o UAG ingresa en el sitio A del ribosoma. En eucariontes, la terminación es catalizada por los factores eRF1 y eRF3. El primero reconoce el codón de paro e hidroliza el peptidil-tRNA. Una vez que se libera la cadena polipéptica, los factores de reciclamiento eRF3 y eRF1 se unen al complejo post-terminación y disocian tal complejo en las subunidades 60S y 40S unido a un tRNA y al mRNA. En seguida, eIF1 promueve la disociación del tRNA desaminoacilado del sitio P y posteriormente, eIF3 cataliza la liberación del mRNA (Pisarev, Hellen, & Pestova, 2007).



**Figura 3. Modelo de reciclamiento ribosomal en eucariontes.** eIF3, su subunidad eIF3j, eIF1 y eIF1A separan los ribosomas en la subunidad 60S y la subunidad 40S unida al mRNA. eIF1 promueve la liberación del sitio P del tRNA deacilado, y a continuación eIF3j disocia el mRNA. Tomada de (Pisarev et al., 2007).

### 3.1.4. Polisomas

Durante la traducción hay varios ribosomas unidos a lo largo de una cadena de mRNAs, este complejo se denomina polirribosoma o polisoma. En cuanto un ribosoma se moviliza una distancia suficiente a lo largo del transcrito a partir del codón de inicio, otro ribosoma se fija al mRNA y comienza su actividad de traducción (Figura 4). Esta traducción simultánea del mismo mRNA por un gran número de ribosomas incrementa en gran cantidad la tasa de síntesis de proteínas dentro de la célula (Karp, 2011). Los polisomas se forman como resultado de una iniciación secuencial de ribosomas. Una reducción en el número de ribosomas por mRNA es indicio de una restricción en el inicio de la traducción (Proud, 2007) y aquellos mRNAs que no están siendo traducidos son capturados por un complejo citosólico ribonucleoproteico de mRNA donde son estabilizados o degradados (Hoyle, Castelli, Campbell, Holmes, & Ashe, 2007; Parker & Sheth, 2007). Debido a que la adición de cada aminoácido a la cadena nascente polipeptídica requiere un consumo de cuatro nucleótidos trifosfatados, cualquier reducción en la traducción favorece la conservación de energía (Proud, 2007). Técnicas como la centrifugación por gradiente para la obtención de perfiles polisomales son útiles para el estudio del estado global traduccional en diversos organismos.

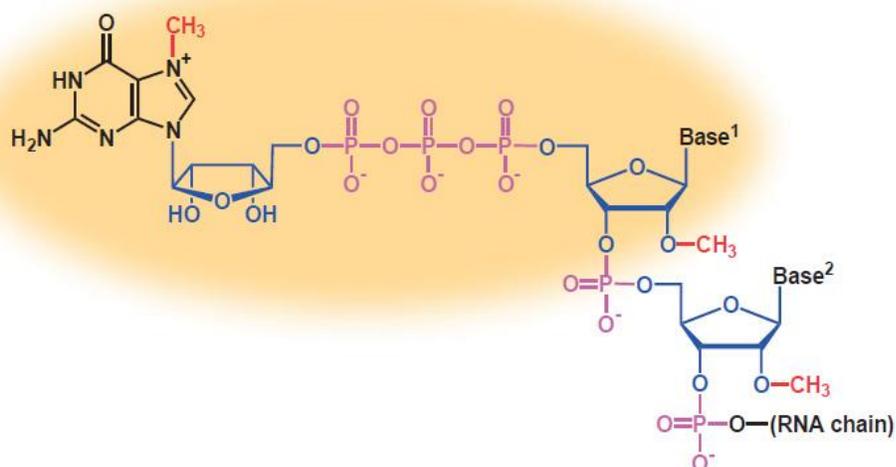


**Figura 4. Dibujo esquemático del ciclo de traducción mostrando un mRNA traducido por múltiples ribosomas formando un polisoma.** Iniciación (verde). Elongación (azul), el ribosoma se mueve a través del ORF y sintetiza el polipéptido, ayudado por los factores de elongación (eEFs). Terminación (rojo), ocurre en codones de paro, los factores de liberación (eRFs) ayudan a liberar la proteína sintetizada y las subunidades ribosomales, las cuales se pueden reciclar para rondas adicionales de traducción. Tomada y modificada de (Shirokikh & Preiss, 2018).

### 3.2. Estructura 5' Cap

Distintas características de las moléculas de RNA, como la capacidad de formar diversas estructuras secundarias (hélices, asas, bucles y pseudonudos), la estructura 5'Cap y el contenido de uORFs, juegan un papel importante en el reconocimiento específico y la unión de proteínas. (Koromilas, Lazaris-Karatzas, & Sonenberg, 1992). La estructura  $m^7GpppN^m pN^m$  se encuentra en los extremos 5' de la gran mayoría de los mRNAs eucarióticos. Esta estructura es añadida a los mRNAs sintetizados por la RNA polimerasa II y a transcritos de virus que se replican en el núcleo (Furuichi, 2015). El Cap se añade durante la fase inicial de la transcripción y antecede a otros eventos de procesamiento de RNA, como la metilación, la adición del 3' poli A y el splicing (Weaver, 2008). Esta estructura se añade cortando el gamma-fosfato del extremo 5' del mRNA, seguido de la transferencia de GMP de

un GTP, por una guaniltransferasa y la metilación en la posición N-7 por una guanina-7-metiltransferasa (Furuichi, 2015).



**Figura 5. Estructura Cap.** m<sup>7</sup>GpppN<sup>m</sup>pN<sup>m</sup> (Cap 2) representando el m<sup>7</sup>G asociado al extremo 5' del transcrito primario por medio de un enlace 5'-5' trifosfato. Tomada de Furuichi 2015.

En general, los mRNAs poseen un único grupo metilo en la posición N-7 del residuo G terminal, sin embargo, los nucleótidos adyacentes pueden estar 2'-O-metilados (Figura 5), dando lugar a variantes de esta estructura, las cuales se denominan de la siguiente manera: Cap 0 (m<sup>7</sup>GpppN), Cap 1 (m<sup>7</sup>GpppN<sup>m</sup>) y Cap 2 (m<sup>7</sup>GpppN<sup>m</sup>pN<sup>m</sup>) (Furuichi & Shatkin, 1989). Los grupos metilo del Cap 0 y Cap 1 son añadidos dentro del núcleo, mientras que la metilación del Cap 2 ocurre en el citoplasma. En organismos como las levaduras, los transcritos únicamente poseen Cap 0, mientras que organismos más complejos poseen Caps más metilados (Furuichi, 2015; Weaver, 2008). Las estructuras Cap tienen un rol biológico importante; estas incrementan la estabilidad de los mRNAs al proteger de la degradación exonucleolítica 5'-3' (Hsu & Stevens, 1993; Shimotohno, Kodama, Hashimoto, & Miura, 1977). A su vez, la precisión y eficiencia del splicing incrementan en presencia del 5'Cap, lo cual se atribuye a la participación de proteínas nucleares de unión a Cap, análogas a los factores de inicio de la traducción citoplásmicos (Lewis & Izaurralde, 1997; Schwer & Shuman, 1996; Sonenberg, 1988). Esta estructura participa en otros pasos críticos en la

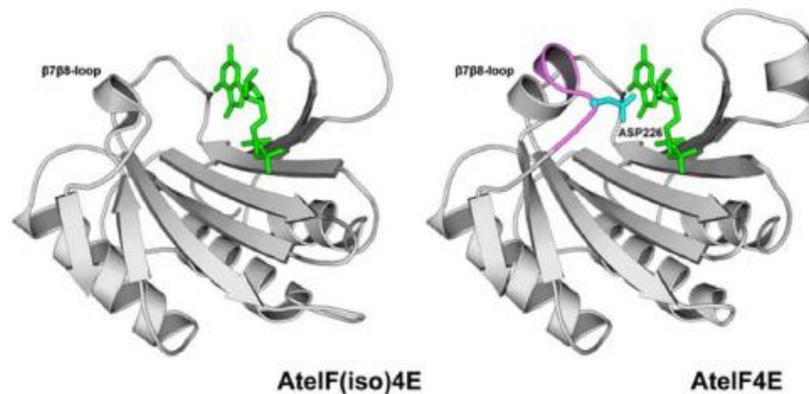
expresión génica, incluyendo el transporte del núcleo al citoplasma. El 5'Cap y el 3' poli A son estructuras particulares de los mRNAs eucarióticos y no están presentes en el rRNA, tRNA o mRNA procarionte.

### 3.3. Factores eucarióticos de inicio de la traducción

Como ya se mencionó, la traducción comienza con el reconocimiento de la estructura Cap del mRNA por medio de eIF4E. En muchos organismos se han identificado homólogos de eIF4E, los cuales han sido agrupados en tres clases (Joshi, Lee, Maeder, & Jagus, 2005). Las angiospermas conservan dos factores de inicio de la traducción (eIF) canónicos: eIF4E y eIF(iso)4E, ambos pertenecientes a la clase I, y un eIF no canónico perteneciente a la clase II, denominado nCBP. *Arabidopsis thaliana* posee tres genes que codifican para eIF4E: eIF4E1 (At4g18040), eIF4E2 (At1g29590) y eIF4E3 (At1g29550), siendo eIF4E1 el transcrito principal, y un gen que codifica para eIF(iso)4E (At5g35620) (Robaglia & Caranta, 2006). eIF(iso)4E junto con eIF(iso)4G integran una isoforma de eIF4F específica de plantas, denominada eIF(iso)4F (Patrick & Browning, 2012). En algunas especies de plantas se han identificado otros parálogos de eIF4E, tales como eIF4E1b y eIF4E1c en *Arabidopsis* (Patrick et al., 2014). En levadura y en extracto de germen de trigo se ha comprobado que ambos promueven el inicio de la traducción. Sin embargo, debido a los niveles bajos de expresión que presentan eIF4E1b, eIF4E1c y nCBP, no se considera que estos funcionen como factores generales de inicio de la traducción. A eIF4E1b y eIF4E1c se les adjudica un papel en procesos de reproducción, debido a su expresión en polen y embriones en desarrollo. Mientras que nCBP posee niveles altos de expresión en etapas tempranas del crecimiento celular (Bush et al., 2009).

Las estructuras cristalográficas de eIF4E de humano, ratón, levadura, entre otros, ya han sido resueltas. En ellas se demuestra que esta proteína consiste en ocho láminas  $\beta$  apoyadas por tres  $\alpha$  hélices que forman una estructura tipo “mano ahuecada”. La estructura posee dos residuos de Trp conservados, los cuales corresponden al Trp-56 y Trp-102 de eIF4E de *H. sapiens*; estos residuos se unen al residuo de guanina de la estructura Cap por medio de enlaces  $\pi$ . Al comparar la secuencia de eIF4E entre mamíferos y plantas se encontró que es

posible que los extremos N y C terminal del factor no sean indispensables para la traducción, sino que son aproximadamente 170 residuos, entre His-37 a His-200 en *H. sapiens*, los suficientes para el reconocimiento de la estructura Cap y la interacción con eIF4G y proteínas de unión a 4E (4E-BP) (Joshi et al., 2005). eIF4E de *Arabidopsis* tiene la mayor afinidad por la estructura Cap, junto con la isoforma eIF4E1c. Le sigue en afinidad eIF(iso)4E, cuya afinidad por el Cap es de 4-10 veces más débil que eIF4E (Kropiwnicka et al., 2015). Esta diferencia en las afinidades se atribuye a un acortamiento del asa entre las láminas  $\beta$ -7 y  $\beta$ -8, las cuales forman parte de la cavidad de unión a Cap, y a la ausencia de un residuo de aspartato (Asp226 en AteIF4E), el cual interactúa con la ribosa del Cap. Estudios con análogos a la estructura Cap indican que todas las isoformas de la clase I son específicas a Caps monometilados. Al igual que eIF(iso)4E, la isoforma nCBP interactúa débilmente con la estructura Cap (Kropiwnicka et al., 2015).



**Figura 6. Comparación entre las proteínas eIF4E de Arabidopsis.** En violeta se muestra la inserción de seis aminoácidos en el asa entre las láminas  $\beta$ 7 y  $\beta$ 8. Tomada de (Kropiwnicka et al., 2015).

eIF4E puede existir tanto en forma fosforilada como no fosforilada. La fosforilación de eIF4E puede influir en los niveles de traducción, dependiendo de tejidos o condiciones de crecimiento. Esta modificación sucede en su mayoría en la Ser-53 correspondiente a eIF4E de humano y se ha demostrado que mutantes de este sitio no logran asociarse al complejo 48S, lo cual resulta en una menor traducción (Joshi-Barve et al., 1990).

### 3.4. *Arabidopsis thaliana* como modelo de estudio

*Arabidopsis thaliana* se convirtió en el organismo modelo para una gran diversidad de estudios debido a que, no solamente es útil para elucidar la biología de plantas, sino para entender aspectos fundamentales de la biología estructural y funcional común a todas las plantas. *Arabidopsis* pertenece a la familia Cruciferae o Brassicaceae, la cual posee una amplia distribución natural a lo largo de Europa, Asia y Norteamérica. Existen diversos ecotipos que son empleados para estudios genéticos y moleculares, entre los que destacan Columbia y Landsberg. El ciclo de vida de *Arabidopsis* tiene una duración de seis semanas, en fotoperiodo de día largo, desde la germinación de la semilla, la formación de la roseta, la salida del tallo principal, hasta la floración y maduración de las semillas (Meinke, Cherry, Dean, Rounsley, & Koornneef, 1998). Las plántulas dan lugar a rosetas de 2 a 10 cm de diámetro, sus hojas poseen un recubrimiento de pequeños pelos unicelulares denominados tricomas, los cuales son útiles en el estudio de la morfogénesis y la diferenciación celular. Estas plantas se pueden cultivar en cajas de Petri o en macetas, tanto en invernadero o bajo luz fluorescente en el laboratorio. Su desarrollo no depende de la temporada, por lo tanto, a diferencia de otros organismos modelo como el maíz, en un año es posible producir diversas generaciones de *Arabidopsis*, lo cual facilita el rápido análisis genético. Otra ventaja de *Arabidopsis* es que se pueden producir cientos de semillas por planta, lo cual aunado a su pequeño tamaño hace que esta planta sea ideal para experimentos de mutagénesis (Anderson & Wilson, 2000).

El genoma de un organismo modelo para estudios genéticos idealmente debiera ser pequeño, pero aún así debe conservar las características genómicas de los organismos a los cuales representa. *A. thaliana* cumple con este requisito; su genoma de 125 Mb es uno de los más pequeños conocidos en plantas, y cabe señalar que es más pequeño que el de otras angiospermas, entre ellas, el maíz, cuyo genoma es aproximadamente 45 veces más grande que el de *Arabidopsis*. El genoma de *Arabidopsis* es similar en tamaño al genoma de *Caenorhabditis elegans*, y se aproxima en un 60% al tamaño del genoma de *Drosophila melanogaster*. La principal razón por la cual el genoma de *A. thaliana* es tan pequeño es debido a su bajo contenido de DNA repetido; cerca del 60% del DNA nuclear de *Arabidopsis* codifica para proteínas. Este se encuentra organizado en cinco cromosomas, los cuales contienen aproximadamente 20,000 genes. La secuenciación del genoma completo de

Arabidopsis fue completada a finales del año 2000 (Russell, Hertz, & McMillan, 2016; The Arabidopsis Genome Initiative, 2000).

#### **3.4.1. Localización y función de los factores eucarióticos de inicio de la traducción eIF4E y eIF(iso)4E.**

eIF4E se expresa de manera ubicua en todos los tejidos de Arabidopsis, a excepción de algunas células en raíz; mientras que eIF(iso)4E abunda en órganos florales y tejidos en desarrollo (Monzingo et al., 2007). eIF4E de Arabidopsis complementa funcionalmente a levaduras mutantes de este factor, lo cual no sucede con eIF(iso)4E (Rodriguez et al., 1998). En semillas de maíz eIF(iso)4E es la isoforma más abundante, y durante las primeras horas de germinación su traducción es alta, mientras que eIF4E incrementa cuando la germinación está próxima a finalizar (Dinkova & Sánchez de Jimenez, 1999). Estudios en trigo revelaron que a diferencia de eIF4F, eIF(iso)4F tiene una preferencia por estructuras Cap hipermetiladas (Balasta et al., 1993; Gallie & Browning, 2001). Estos datos sugieren que, a pesar de poseer similitud en sus propiedades bioquímicas, eIF4E y eIF(iso)4E tienen distintas funciones dentro de la célula.

Aunque fenotípicamente mutantes de eIF(iso)4E en Arabidopsis no presentan diferencias respecto a las silvestres, esta delección ocasiona el incremento en la expresión de eIF4E (lo cual se atribuye a que este factor posiblemente compensa la función de eIF(iso)4E en el inicio de la traducción), y otorga resistencia a la infección por virus (Duprat et al., 2002). Sin embargo, la delección de la subunidad eIF(iso)4G sí genera alteraciones en el crecimiento y la reproducción, lo cual sugiere que el complejo eIF(iso)4F tiene un papel importante en el desarrollo (Lellis et al., 2010). Un estudio en plántulas de Arabidopsis reveló que la ausencia de eIF(iso)4E afecta los niveles traduccionales de genes expresados preferencialmente en raíces y pertenecientes al sistema endomembranal, debido a cambios en la distribución polisomal de diversos mRNAs. Estos cambios indicaron que en ausencia de eIF(iso)4E existen dos grupos de mRNAs cuyos niveles traduccionales se ven afectados; mientras que un grupo incrementa sus niveles traduccionales (sugiriendo que estos son traducidos preferencialmente por eIF4E), el otro grupo de transcritos presenta un declive en este proceso (indicando son preferencialmente reconocidos por eIF(iso)4E para su traducción). Estos

últimos incluyen algunos genes codificantes para transportadores de fosfato, sacarosa o de electrones, a diferencia de los genes cuya traducción incrementa en ausencia de eIF(iso)4E, los cuales codifican factores de transcripción y proteínas de unión a DNA, es decir, genes relacionados a cambios a nivel transcripcional (Martínez-Silva et al., 2012). Estudios *in silico* e *in vitro* revelan que en su mayoría, los mRNAs traducidos preferencialmente por eIF4E presentan un extremo 5'UTR de mayor longitud y con estructuras secundarias estables, además de presentar con mayor frecuencia secuencias denominadas sitios internos de entrada al ribosoma (IRES), tales como marcos abiertos de lectura río arriba del ORF principal (uORFs) y codones alternativos de inicio (uAUGs). De manera interesante, no se encontraron diferencias en las características de los extremos 3'UTR entre ambos grupos de genes (Carberry & Goss, 1991; Martínez-Silva et al., 2012). Estos resultados indican que la preferencia de eIF4E o eIF(iso)4E por la traducción de distintos mRNAs posiblemente se deba a la longitud y estructura de los extremos 5'UTR.

### **3.5. Estrés por frío en plantas**

Dado que los mRNAs selectivamente traducidos por eIF4E y eIF(iso)4E corresponden en una elevada proporción a genes de respuesta a estrés, es posible que estos factores sean importantes para que la planta pueda adaptarse a condiciones de crecimiento adversas. Entre las condiciones ambientales que mayor impacto tiene sobre el crecimiento y desarrollo de las plantas se encuentra la exposición a las bajas temperaturas (Medina et al. 2011). Cuando las temperaturas comienzan a descender y la duración del día disminuye, las plantas llevan a cabo un proceso llamado aclimatación, el cual les otorga la capacidad de resistir al frío del invierno. Esta combinación de luz y temperatura funciona como señal para la planta de que se acercan eventos de congelamiento. Dependiendo de la planta, la aclimatación puede durar varios días hasta semanas para ser completada. La aclimatación involucra diversos cambios metabólicos, y la mayoría de estas respuestas son mediadas por cambios en la expresión génica durante el proceso de aclimatación (Oakenfull, Baxter, & Knight, 2013).

La membrana celular es la principal estructura dañada debido al frío. Cuando las temperaturas descienden por debajo de 0°C comienza la formación de hielo en los espacios intercelulares. La formación de hielo provoca un gradiente osmótico, y el agua al interior de

la célula se moviliza hacia el espacio intercelular, lo que genera un fluido intracelular concentrado y por lo tanto la lisis celular (Steponkus, 1984). Una de las funciones de la aclimatación es estabilizar las membranas para evitar el daño por congelamiento; la acumulación de sacarosa y otros azúcares simples y la participación de polipéptidos hidrofílicos contribuyen a la estabilización de las membranas (Anchordoguy, Rudolph, Carpenter, & Crowe, 1987; Strauss & Hauser, 1986). Las temperaturas congelantes también favorecen la producción de especies reactivas de oxígeno, las cuales, interrumpen el metabolismo de las plantas pues oxidan lípidos de membrana, proteínas y ácidos nucleicos (Soengas, Rodríguez, Velasco, & Cartea, 2018). De la misma forma, el hielo intercelular forma adhesiones entre las paredes celulares y las membranas, lo cual ocasiona una ruptura de la célula (Olien & Smith, 1977). Por tanto, mejorar los mecanismos antioxidativos, incrementar los niveles de azúcares en el apoplasto e inducir genes codificantes de chaperonas moleculares pueden tener efectos protectores. Otras sustancias involucradas en la adaptación ante el frío son las fitohormonas, las cuales tienen la función de integrar y reprogramar las diversas vías de señalización relacionadas al desarrollo o ante numerosos estímulos. El ácido abscísico (ABA) es una hormona que funciona como un regulador central en la activación de la adaptación de la célula ante condiciones de salinidad y poca disponibilidad de agua, además de actuar como inhibidor del crecimiento (Golldack, Li, Mohan, & Probst, 2014). ABA tiene un papel en la respuesta de las plantas ante el estrés y en el metabolismo celular primario, pues desencadena la reprogramación transcripcional de diversos mecanismos de adaptación a estrés abiótico como el metabolismo de carbohidratos y lípidos, en plantas de *Arabidopsis* la deficiencia de ABA o su insensibilidad a esta hormona impide su adecuada aclimatación al frío (Gilmour & Thomashow, 1991; Golldack et al., 2014).

### **3.5.1. Genes de tolerancia al frío**

Una gran cantidad de genes que han sido identificados como inducibles por frío codifican para proteínas con actividad enzimática que potencialmente contribuye a su tolerancia. En *Arabidopsis* el gen *FAD8* codifica una desaturasa de ácidos grasos que puede contribuir a la tolerancia al congelamiento mediante la alteración en la composición lipídica. Genes de respuesta a frío como *hsp70* de espinaca y *hsp90* de *Brassica napus* codifican para chaperonas moleculares que contribuyen a la tolerancia al congelamiento mediante la estabilización de

proteínas en contra de la desnaturalización inducida por frío. Otros genes de respuesta a frío codifican proteínas reguladoras y transductoras de señales, incluyendo proteínas cinasas activadas por mitógeno (MAPK), proteínas relacionadas a calmodulina y proteínas 14-3-3 (Thomashow, 1999). La contribución de estas proteínas en la tolerancia al congelamiento puede ser a nivel del control de la expresión de genes de tolerancia al frío o la regulación de la actividad de proteínas involucradas en la tolerancia al congelamiento.

En *Arabidopsis* se ha caracterizado un grupo de genes regulados por frío (Cold regulated, *COR*) los cuales son altamente inducidos debido a este estrés. Estos genes son blanco de los factores de transcripción DREB1, los cuales activan la expresión de los genes *COR* mediante la unión de elementos en *cis* en sus promotores y generando así, aclimatación al frío y tolerancia al congelamiento (Oakenfull et al., 2013). Durante el congelamiento, las células de la planta se deshidratan debido a la formación de hielo en el espacio apoplástico. El descenso en las temperaturas ocasiona que las moléculas se aglomeren dentro de la célula, además de generar un acercamiento entre las membranas intracelulares. En condiciones fisiológicas las proteínas COR15 no están estructuradas, y frente a la deshidratación estas cambian parcialmente su conformación a  $\alpha$ -hélices. En esta conformación son capaces de interactuar con la membrana interna del cloroplasto a través de los motivos hidrofóbicos de la hélice anfipática. Esta asociación mejora el plegamiento de COR15, exponiendo una fase hidrófoba capaz de interactuar con los lípidos de membrana. La estabilización de esta hélice es potenciada por su interacción con moléculas MGDG (galactolípidos específicos del cloroplasto); la presencia de MGDG hace que las membranas sean sensibles a la congelación y por lo tanto se considera son el componente que más las desestabiliza. La incorporación de COR15 estabiliza las membranas internas y previene la fusión con la envoltura adyacente y la membrana plasmática (Thalhammer & Hinch, 2014).

### **3.5.2.Regulación de la traducción en respuesta a estrés**

En respuesta a una gran cantidad de amenazas, la célula eucariótica reacciona por medio de una inhibición del inicio de la traducción (Sonenberg & Hinnebusch, 2009). En mamíferos y en levaduras, los mecanismos de represión de la traducción que han sido mejor caracterizados afectan la actividad de los factores de inicio eIF2 y eIF4E (Clemens, 2001;

Wek, Jiang, & Anthony, 2006). En eucariontes, eIF2a es regulado por medio de la fosforilación de su subunidad  $\alpha$ , la cual es llevada a cabo por cinasas de eIF2a. La fosforilación de eIF2a impide la formación del complejo ternario, lo que da lugar a una inhibición de la traducción (Wek et al., 2006). Sin embargo, existen mRNAs en mamíferos y levadura cuya traducción no es afectada por esta fosforilación (Harding et al., 2000; Hinnebusch, 2005). En plantas únicamente se ha encontrado una cinasa de eIF2a, *GNC2*. En *Arabidopsis*, *GNC2* se activa en diversas condiciones de estrés abiótico, entre ellas, escasez de aminoácidos y purinas, luz UV, frío, heridas, entre otras (Lageix et al., 2008; Zhang et al., 2008). En estos organismos se desconoce si existen mRNAs cuya traducción no sea afectada por la fosforilación de eIF2a, tal como en mamíferos y levadura. Sin embargo, existen algunos casos de estrés abiótico en los cuales la inhibición de la traducción no está mediada por la fosforilación de eIF2a, tal es el caso del estrés por NaCl, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y choque térmico en trigo (D. Gallie et al., 1997; Lageix et al., 2008).

La regulación de eIF4E ante condiciones de estrés abiótico ha sido ampliamente estudiada en diversos eucariontes. En mamíferos y levaduras, una forma de regulación de eIF4E es mediante su secuestro por 4E-BPs. En estos organismos, bajo diversas condiciones de estrés, la cinasa blanco de rapamicina (TOR) es inhibida, dando lugar a la desfosforilación de las 4E-BPs. Las 4E-BPs en su estado no fosforilado interactúan con eIF4E, lo cual evita su unión a eIF4G y el consiguiente reclutamiento del ribosoma al 5'Cap del mRNA. Debido a que no se han encontrado homólogos de las 4E-BPs en plantas, es posible que este mecanismo de regulación no se lleve a cabo en estos organismos (Echevarría-Zomeño et al., 2013).

Entre otros factores de inicio de la traducción que se han relacionado con el estrés abiótico se encuentra eIF1A. La sobreexpresión de eIF1A de *Beta vulgaris* en *Arabidopsis* le otorga tolerancia a la salinidad; de manera similar, un ortólogo de eIF4A lo hace en tabaco (Rausell et al., 2003; Sanan-Mishra et al., 2005). La fosforilación de esta helicasa en respuesta a hipoxia y estrés por calor ha sido considerada como regulatoria, puesto que puede inhibir el reclutamiento del 5'Cap o el desenrollamiento de estructuras secundarias de algunos mRNAs (Webster, Gaut, Browning, Ravel, & Roberts, 1991). Un mecanismo de regulación exclusivo de plantas consiste en el uso selectivo de eIF(iso)4F para traducir mRNAs específicos. eIF(iso)4F permite un reclutamiento más eficiente de mRNAs con estructuras Cap

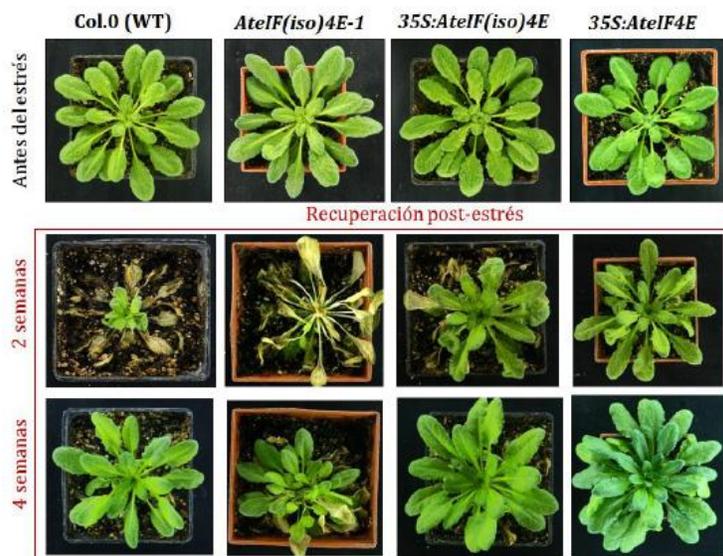
hipermetiladas (Carberry, Goss, & Darzynkiewicz, 1991) y aunque la mutación de eIF(iso)4G en *Arabidopsis* no cambie los niveles traduccionales de esta planta, esta alteración ocasiona defectos fenotípicos importantes, lo cual sugiere que estas isoformas son necesarias para la traducción de mRNAs específicos (Lellis et al., 2010).

Además del papel de los eIFs en la regulación de la traducción, otro mecanismo de control es el llevado a cabo por los microRNAs (miRNAs). Los miRNAs son pequeñas secuencias de RNA capaces de hibridar con mRNAs endógenos a través de una complementariedad de secuencias, seleccionando así mRNAs para su degradación o represión traduccional (Hutvagner & Zamore, 2002; Voinnet, 2009). Los miRNAs maduros de una sola cadena se asocian con proteínas Argonauta (AGO) y forman el complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC). Este complejo es guiado al mRNA blanco, el cual puede ser cortado y degradado o bien, puede ser sujeto a un mecanismo de regulación traduccional conocido como represión no endonucleolítica por miRNA (Brodersen et al., 2008). El mecanismo de regulación de la traducción mediado por miRNAs en respuesta al estrés abiótico en plantas ha sido poco estudiado, sin embargo este mecanismo es habitual en procesos de desarrollo (Aukerman & Sakai, 2003; Park, Li, Song, Messing, & Chen, 2002). Se ha demostrado que la presencia de miRNAs y AGO1 en polisomas está relacionada a una represión de la traducción en plantas (Lanet et al., 2009). La regulación traduccional mediada por miRNAs no es del todo clara, por lo cual es necesario realizar más estudios para lograr descifrar los mecanismos moleculares involucrados en ella.

A pesar de poseer una gran cantidad de información acerca de la regulación a nivel transcripcional que se lleva a cabo durante la tolerancia al estrés, existen pocos trabajos que aborden la respuesta a estrés a nivel traduccional, en particular al estrés por congelamiento y la tolerancia al frío. Por lo tanto, identificar cómo se lleva a cabo la regulación traduccional de genes que tienen roles en el estrés por congelamiento nos ayudará a elucidar los mecanismos de tolerancia al frío en las plantas y posiblemente nos proporcionarán herramientas útiles para mejorar la tolerancia al congelamiento en plantas.

#### 4. ANTECEDENTES

En nuestro laboratorio se demostró que los factores de inicio de la traducción 4E poseen un papel importante en la resistencia al estrés abiótico. Estos tienen la capacidad de reconocer de manera preferencial ciertos grupos de transcritos que tienen un rol en la respuesta al estrés por congelamiento (Martínez-Silva et al., 2012). Además, su sobreexpresión otorga a plantas adultas de *Arabidopsis thaliana* un fenotipo de mayor resistencia a las temperaturas congelantes, mientras que la mutación del factor eIF(iso)4E provoca una mayor sensibilidad a este tipo de estrés (Figura 7; Salazar-Díaz, 2017). Esta condición de estrés estimula la expresión de ambos factores de inicio de la traducción, y posiblemente se relacione con el incremento de los polisomas reportado previamente, el cual sucede cuando las plantas son sometidas a bajas temperaturas (Perras & Sarhan, 1990). El incremento de los polisomas ante la exposición al frío fue comprobado en *Arabidopsis*, y ese se vincula al aumento de la síntesis de proteínas durante este periodo de estrés, las cuales podrían estar implicadas en procesos de tolerancia al frío (Salazar-Díaz, 2017).



**Figura 7. Fenotipos correspondientes a plantas de *Arabidopsis thaliana*.** Fenotipos previos al tratamiento de estrés por frío (1h a  $-20^{\circ}$ ) y posteriores a un periodo de recuperación de 2 y 4 semanas. Plantas silvestres (Col-0 WT), plantas sobreexpresoras del factor eIF4E (*35s:AteIF4E*), plantas sobreexpresoras del factor eIF(iso)4E (*35s:AteIF(iso)4E*) y plantas knockout para el factor eIF(iso)4E (*AteIF(iso)4E-1*). Tomada de (Salazar-Díaz, 2017)

#### 4.1. Genes preferencialmente traducidos por los factores eIF4E y eIF(iso)4E.

Entre los genes que son reconocidos preferencialmente por el factor eIF4E se encuentran los factores de transcripción de tipo CBF/DREB (AV Martínez-Silva et al., 2012). Estas proteínas pertenecen a la familia de factores de transcripción AP2/ERF, los cuales activan la transcripción de genes que poseen los elementos DRE (dehydration-responsive element) y CRT (C-repeat) en sus promotores. La secuencia A/GCCGAC es el elemento central de la secuencia DRE y se encuentra conservada en promotores de genes de respuesta a estrés abiótico (Lata & Prasad, 2011). En Arabidopsis se han identificado los factores *DREB1* y *DREB2*, de los cuales, *DREB1A/CBF3*, *DREB1B/CBF1* y *DREB1C/CBF2*, son inducidos por frío y su sobreexpresión favorece la transcripción de genes de respuesta a estrés abiótico, otorgando tolerancia al congelamiento, a la salinidad deshidratación (Mizoi, Shinozaki, & Yamaguchi-Shinozaki, 2012).

A diferencia de los factores *DREB1*, la mayoría de los factores pertenecientes a la subfamilia *DREB2* que han sido reportados responden a estrés por déficit de agua o choque térmico. En Arabidopsis y arroz, los factores *DREB2C*, *DREB2D* y *DREB2F* responden a altas concentraciones salinas, mientras que *DREB2A* y *DREB2B* se inducen tanto por esta última condición, como por estrés por deshidratación. No obstante, en diferentes pastos, los genes *DREB2* también responden al estrés por frío. En general, los *DREB2* que se han reportado como inducibles por estrés pertenecen al subtipo 1, y en el caso de los subtipos 2 y 3 cabe la posibilidad de que su expresión no sea inducida por estrés (Mizoi et al., 2012). En *A. thaliana* se encontró que la expresión del gen *DREB2F* perteneciente al subtipo 3 de los *DREB2*, no cambia en respuesta al frío, sin embargo, esto no descarta que su expresión sea regulada a nivel traduccional o post-traduccional (Salazar-Díaz, 2017).

Diversos factores de transcripción modulan los genes CBF/DREB, entre ellos destacan ICE/2, CAMTA1-3, HY5, MYB88, MYB124 y BZR1. Estos promueven la transcripción de los genes CBF y mejoran la tolerancia al frío. Por otro lado, las proteínas MYB15, NAC047 y PIF3/4/7 son conocidas como moduladores negativos, al reprimir la transcripción de los CBF (An et al., 2018). *MYB HHO2* es un segundo tipo de factor de transcripción que es traducido preferencialmente por eIF4E. Los factores de transcripción de tipo MYB han sido identificados en diversas especies de plantas, incluyendo Arabidopsis, maíz, arroz, y

manzana. Estos participan en el metabolismo de las plantas, el desarrollo y la respuesta al estrés abiótico (Dubos et al., 2010). En Arabidopsis, el factor de transcripción *AtMYB41* es inducido ante condiciones de salinidad, poca disponibilidad de agua y ABA. La sobreexpresión de *AtMYB41* reveló que este tiene una función en la protección y supervivencia de Arabidopsis ante la baja disponibilidad de agua, las cuales actúan a través del metabolismo primario de lípidos y la formación de cutícula (Gollmack et al., 2014). En manzana los genes MYB son inducidos o reprimidos en su expresión en respuesta al frío, entre ellos los genes *MdSIMYB1* y *MdoMYB121* (An et al., 2018; Xie et al., 2018). *MYB HHO2* es uno de los 6 homólogos en Arabidopsis del factor de transcripción HRS1 (HYPERSENSITIVITY TO LOW PHOSPHATE-ELICITED PRIMARY ROOT SHORTENING1), el cual se encuentra relacionado a la familia MYB. En Arabidopsis, *MYB HHO2* es inducido en respuesta a la deficiencia de fósforo en hojas y raíces, y tiene un papel en el desarrollo de las raíces laterales, así como en la adquisición y la movilización de fósforo, además de regular la expresión de diversos genes involucrados en las vías señalización de este compuesto (Nagarajan, Satheesh, Poling, Raghothama, & Jain, 2016). En Arabidopsis *MYB HHO2* muestra poco cambio en su expresión en respuesta a las bajas temperaturas (Salazar-Díaz, 2017).

Existen otros mecanismos además de la vía de señalización CBF/DREB1 que regulan la aclimatación en plantas y que dan lugar a la acumulación de proteínas y compuestos diversos, que ayudan a disminuir los depósitos intracelulares de hielo, incrementar la tolerancia a la deshidratación y a mantener la estabilidad e integridad de la membrana celular. En Arabidopsis el gen *Tolerant to Chilling and Freezing 1 (TCF1)*, perteneciente a la familia RCC1, tiene un papel en el ajuste de la acumulación de lignina de la pared celular durante la aclimatación; TCF1 regula la expresión de genes involucrados en la biosíntesis de este carbohidrato, tales como *Phenylalanine ammonia-lyase 1-4 (PAL)* y *Blue copper binding gene (BCB)*. La mutación de *TCF1* disminuye la lignina de la pared celular durante la aclimatación y el congelamiento, incrementando así la permeabilidad y elasticidad de la pared, protegiendo a la célula contra daños (Ji et al., 2015). La exposición a bajas temperaturas estimula la expresión de *TCF1*, y en ausencia del factor eIF(iso)4E su expresión disminuye, lo cual sugiere que este es seleccionado preferencialmente por eIF(iso)4E para su traducción (Martínez-Silva et al., 2012; Salazar-Díaz, 2017).

## 5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Debido a que las plantas son la principal fuente de alimentación en nuestro planeta, comprender cómo estas crecen y se reproducen nos es de gran importancia para lograr la obtención de cultivos con mayor valor nutricional frente a cualquier tipo de ambiente (Hartwell et al., 2000). Gracias a la biotecnología es posible mejorar las plantas para que estas sean más tolerantes a condiciones adversas y, para lograrlo, es necesario conocer los mecanismos moleculares de respuesta al estrés de estos organismos. El estrés por frío es una de las condiciones ambientales a las cuales se enfrentan las plantas dada su naturaleza de organismos sésiles. El frío influye en la distribución geográfica de muchos cultivos y tiene un impacto negativo en la calidad y productividad de estos (Agarwal et al., 2017). Muchas plantas tienen la capacidad de adquirir tolerancia al congelamiento por medio de una previa exposición a bajas temperaturas no congelantes, proceso que recibe el nombre de aclimatación (Xie et al., 2018). El control de la traducción es de suma importancia durante el crecimiento, la proliferación, diferenciación y el metabolismo celular. Debido a que la traducción es regulada principalmente en la etapa de iniciación, el reconocimiento selectivo de los diversos mRNAs por eIF4E y su isoforma eIF(iso)4E nos es de gran interés durante un proceso tan relevante para el mantenimiento de la integridad celular como lo es la aclimatación al frío.

## 6. HIPÓTESIS

- La exposición de *Arabidopsis thaliana* al frío favorecerá la traducción de los factores de inicio de la traducción eIF4E y eIF(iso)4E, en las líneas Col-0 (silvestre), 35S:AteIF4E y *ateIF(iso)4E-1*, y esto contribuirá a la traducción diferencial de genes de respuesta a estrés por frío.

## 7. OBJETIVOS

### 7.1. Objetivo general

Analizar la traducción de eIF4E y eIF(iso)4E en respuesta a la aclimatación y el efecto del cambio en sus niveles sobre la traducción selectiva de mRNAs correspondientes a genes asociados a tolerancia al estrés por frío en *Arabidopsis thaliana*.

### 7.2. Objetivos particulares

- Realizar el análisis semicuantitativo de la distribución de los transcritos de los factores de inicio de la traducción eIF4E y eIF(iso)4E, en perfiles polisomales de plantas aclimatadas y no aclimatadas de *Arabidopsis thaliana* de las líneas Col-0 (silvestre), 35S:AteIF4E (sobrexpresora de eIF4E) y *ateif(iso)4e-1* (mutante).
- Analizar la distribución en perfiles polisomales de los mRNAs de los genes *DREB1A*, *DREB2F*, *MYB HHO2* y *TCF1*, involucrados en la resistencia al estrés por frío, en las líneas Col-0 (silvestre), 35S:AteIF4E y *ateif(iso)4e-1*, de plantas aclimatadas y no aclimatadas.

## 8. METODOLOGÍA

Para analizar el comportamiento de la síntesis de proteínas durante el proceso de aclimatación de *Arabidopsis thaliana* se emplearon tres líneas del ecotipo Columbia:

- Col-0, silvestre.
- 35S:AteIF4E
- *ateif(iso)4e-1*

La línea sobreexpresora del factor eIF4E fue generada en nuestro laboratorio (Flores-Ceja, 2014) y la línea *ateif(iso)4e-1* fue donada por el laboratorio del Dr. Christoph Robaglia de la Universite Montpellier, Francia (Duprat et al., 2002).

Las plantas mencionadas fueron cultivadas en tierra, en condiciones de 22°C con fotoperiodo de día corto (8 horas de luz y 16 horas de oscuridad) durante 7 semanas. Al finalizar este periodo, la mitad de las plantas de cada línea fueron aclimatadas a 4°C durante una semana (aclimatadas), mientras que el resto continuó en las condiciones normales de crecimiento (no aclimatadas).

Previamente en el laboratorio se obtuvieron los perfiles polisomales de las líneas mencionadas. Se maceró aproximadamente 1.2 g de tejido de hoja de cada línea, y se adicionó de 3 mL a 5 mL buffer de lisis. En seguida, se aplicó vórtex y las muestras se centrifugaron a 12,000g durante 15 min a 4°C. Se obtuvo el sobrenadante y se repitió la centrifugación en tubos nuevos. Al sobrenadante se adicionaron 2 mL de buffer de gradiente y se ajustó el peso de los tubos con buffer de lisis. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 50,000 rpm durante 3h. El sobrenadante de resuspendió en buffer de lisis y se aplicó un gradiente de 20% a 60% de sacarosa, en seguida se centrifugó a 45,000 rpm durante 2h a 4°C. Finalmente se colectaron 10 fracciones de 500 µL de cada perfil polisomal, las cuales corresponden a concentraciones crecientes de sacarosa, por lo cual los polirribosomas están presentes en la segunda mitad del gradiente (véase Figura 9). La metodología de obtención de los perfiles polisomales se describe con mayor detalle en Salazar-Díaz, 2017.

En el presente trabajo se extrajo el RNA de las fracciones polisomales recolectadas anteriormente. Para ello, cada fracción (2-10) fue tratada con SDS y proteinasa K e incubada a 37°C. Enseguida se adicionó fenol ácido y cloroformo, se centrifugó la mezcla y se obtuvo

la fase acuosa; este paso se realizó dos veces. De la última fase acuosa se precipitó el RNA con LiCl e isopropanol frío. El precipitado se lavó con etanol, se secó y resuspendió en agua libre de RNAsas. La integridad del RNA fue verificada en un gel de agarosa al 1.5%, empleando como buffer de corrida TBE 0.5x (pH= 8, Tris, ácido bórico y EDTA), ver **Anexo 2**. La concentración del RNA fue cuantificada en un equipo NanoDrop2000. Posteriormente, las muestras fueron tratadas con RQ1 RNAase-Free DNase (Promega) y purificadas por columna con el kit RNA Clean & Concentrator (Zymo Research). Se cuantificaron nuevamente y se obtuvieron los rendimientos de este último paso.

Previo a la síntesis de cDNA se verificó que las muestras carecieran de DNA que pudiera interferir con los resultados de PCR (-RT). Para ello, 1 µL de cada muestra de RNA se sometió a una reacción individual de PCR con la siguiente composición:

*Reacción estándar de PCR*

	<b>Concentración</b>
<b>Buffer Taq 10x con KCl</b>	1x
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	2.5mM
<b>dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)</b>	200 µM
<b>Oligo FW</b>	100 nM
<b>Oligo RV</b>	100 nM
<b>Taq</b>	2.5 U
<b>H<sub>2</sub>O</b>	cbp 20µL

Las temperaturas y tiempos de estas reacciones de -RT se muestran en la siguiente tabla:

**Tabla 1.** Programas -RT, síntesis cDNA, y PCR.

	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Tiempo (min)</b>	<b>Ciclos</b>
<b>-RT</b>	95.0	5:00	1
	95.0	0:45	40
	60.0	0:45	
	72.0	1:00	
	72.0	7:00	1
<b>Síntesis de cDNA</b>	25.0	5:00	1
	42.0	60:00	1
	70.0	15:00	1
<b>PCR</b>	95.0	5:00	1
	95.0	0:45	30
	60.0	0:45	
	72.0	1:00	
	72.0	7:00	1

Los productos de amplificación se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 1.5% y se observaron mediante tinción con bromuro de etidio en un fotodocumentador, en el Anexo 3 se muestran dos geles representativos de este paso.

En el panel B del Anexo 3 se observó que, a excepción de la fracción 10, se logró eliminar el DNA de las muestras, pues no se observaron bandas con el peso del producto de amplificación del par de oligos empleado (243 pb). El control positivo (DNA línea silvestre de Arabidopsis) amplificó una banda que aparece entre a los 200 y 300 pb; esto confirma la ausencia de productos de tal tamaño en los demás carriles y la efectividad de la reacción. En cambio, en los carriles de las fracciones 2, 4 y 7 del gel que corresponde a las plantas no aclimatadas (Anexo 3, A), se observaron bandas entre los 200 y 300 pb. A pesar de ser indicio de contaminación con DNA, debido a la poca intensidad de las bandas de las fracciones 4 y 7, se determinó que esta no intervendría de manera significativa en los experimentos posteriores y, estas muestras fueron empleadas en ellos. Sin embargo, la banda en el carril de la fracción 2 fue más intensa que las ya mencionadas, por lo tanto, una segunda alícuota de RNA fue sometida a tratamiento con DNAsa y nuevamente se verificó la efectividad de este

en un gel. Todos los controles - RT fueron analizados de acuerdo con este criterio y en los casos donde se observaron bandas, una segunda alícuota de RNA era sometida a tratamiento con DNasa.

Una vez que se comprobó que las muestras carecían de DNA se realizó la síntesis de cDNA empleando ImProm-II Reverse Transcription System (Promega) (programa señalado en Tabla 1). Se tomó el mismo volumen de cada fracción para ser tratado con DNasa y posteriormente para la síntesis de cDNA. En nuestro caso no es posible nivelar concentraciones de RNA, ya que cada fracción contiene distinta cantidad de ribosomas cuyo RNA ribosomal es el que contribuye en mayor medida a la absorbancia a 260 nm (véase Figura 8). Finalmente se realizó PCR de punto final para cada gen de interés. Cada reacción contenía 1  $\mu$ L de cDNA y los reactivos en las concentraciones ya mencionadas. Los oligonucleótidos empleados fueron diseñados por Salazar, 2017 y se indican en la Tabla 2. Las temperaturas y ciclos del programa empleado se muestran en la tabla Tabla 1. Nuevamente, los productos de cada reacción se corrieron en geles de agarosa al 2% y se observaron los fragmentos amplificados en cada fracción mediante tinción con bromuro de etidio en un fotodocumentador. Los geles se muestran en Anexo 4.

Para llevar a cabo el análisis de resultados, se determinó la intensidad de cada banda (fracción) por densitometría empleando el software Image Lab. Primero, se sumaron todas las densidades del perfil, lo cual fue equivalente al 100%, y se determinó el porcentaje que representó la densitometría de cada fracción. De esta manera se obtiene la distribución de un mRNA a lo largo del perfil polisomal. Si el mayor porcentaje se encuentra en los polisomas pesados, entonces el mRNA se considera traducido con mayor eficiencia. Se analizaron dos réplicas biológicas independientes de fraccionamiento polisomal.

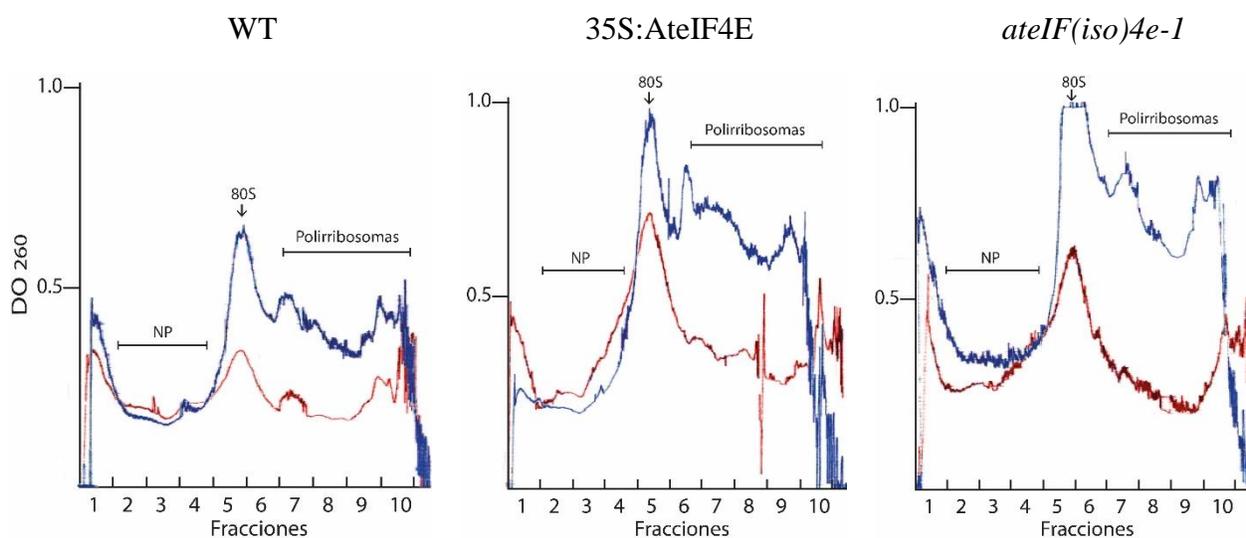
**Tabla 2.** Oligonucleótidos empleados en los experimentos de -RT y PCR. Diseñados por Salazar, 2017. Se indica el nombre del gen, el no. de acceso TAIR, y el tamaño del amplicón en cDNA o DNA.

	Gen	No. de acceso	Secuencia	Tamaño del amplicón (pb)
Regulados por eIF4E	<i>eIF4E</i>	At4g18040	FW: AAGAACGCTTACACCGCTTG RV: TCAACTAGCAAAGACAGACTG	120 (cDNA)
	<i>DREB1A</i>	At4g25480	FW: GTTGGCGTTTTAGGATGAGATG RV: TCAAACATCGCCTCATCGTG	135 (cDNA)
	<i>DREB2F</i>	At3g57600	FW: TGAATCCTTCCCTTCCATCTGG RV: ACTGCACTCTCACTACCTATGTC	146 (cDNA)
	<i>MYBHH02</i>	At1g68670	FW: ACCGTCCGATGTAGCCAAC RV: GCAACTTCTCTCCAACGAACG	85 (cDNA)
Regulados por eIF(iso)4E	<i>eIF(iso)4E</i>	At5g35620	FW: GGAGAAACAACCACACAAGCTC RV: CCCAAAATCTTCGACGGTGTC	128 (cDNA)
			FW: TGGACTTGGGTTGTTACTGC RV: TTGTCTTGCTTCGACTGTGG	247 (DNA) 149 (cDNA)
			FW: TCTAGAGATATAACATGGCGACCGATGATGTG RV: GAAGCCGGTTCCTGTCTGAGAGCTC	1395(DNA) 616 (cDNA)
	<i>TCF1</i>	At3g55580	FW: GTATGACGACCACCAGCAGCAAC RV: CAGTCTGACAACATTGACCTCTCGG	95 (cDNA)
Con-trol	<i>COR15A</i>	At2g42540	FW: GTGAAACCGCAGATACATT RV: ACTTTGTGGCATCCTTAGCC	135 (cDNA)

## 9. RESULTADOS

### 9.1. Comparación de los perfiles de polirribosomas entre plantas crecidas en condiciones de temperatura normal (22°C) y de aclimatación (4°C).

Se trabajó con el RNA obtenido de cada perfil polisomal de las líneas de plantas en estudio. El protocolo de obtención de perfiles polisomales se describe en Salazar-Díaz, 2017. Se analizaron los perfiles correspondientes a plantas aclimatadas durante una semana en comparación a plantas no aclimatadas. A continuación, se muestran los perfiles polisomales correspondientes a una de dos réplicas biológicas por cada línea.

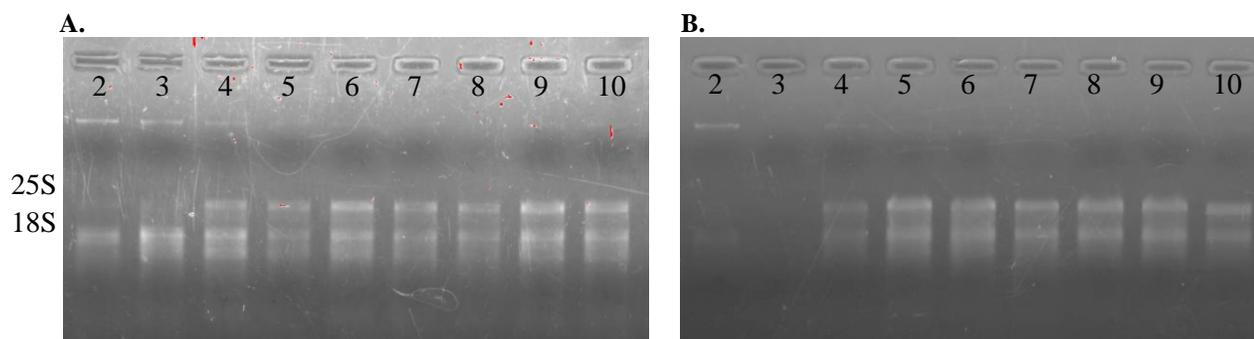


**Figura 8. Perfiles polisomales de hoja de *A. thaliana*.** Plantas línea Col-0 (WT), plantas sobreexpresoras del factor eIF4E y plantas mutantes del factor eIF(iso)4E. En rojo se muestran las plantas no aclimatadas (condiciones normales de crecimiento a 22°C), en azul plantas aclimatadas durante siete días a 4°C. Se muestran los gráficos correspondientes a una de dos réplicas biológicas independientes de cada línea.

Los mRNAs libres y aquellos con diferente número de ribosomas asociados pueden ser separados en gradientes de sacarosa. Los ribosomas unidos representan un estado fijo entre los pasos de iniciación, elongación y terminación, es decir, una iniciación más rápida da lugar a una mayor cantidad de ribosomas asociados, en cambio, una elongación y terminación rápida da lugar a una menor cantidad de ribosomas asociados. Los cambios observados en el perfil general y los perfiles de mRNAs específicos, en distintas mutantes y/o posteriores a cambios en las condiciones de crecimiento, son generalmente consistentes con modelos y predicciones basadas en otros datos metabólicos, sugiriendo que los perfiles otorgan un panorama razonable del estado traduccional de la célula (Arava et al., 2003). En este método, la separación de las subunidades ribosomales es registrada con base en sus distintas densidades ópticas. Los elementos menos densos son los primeros en aparecer en estos registros. En los perfiles polisomales de la Figura 8, los picos esperados para tRNAs y otros RNAs pequeños no se observan debido a una alta absorbancia, posiblemente proveniente de proteínas u otras sustancias usadas en la preparación (Fracción 1). Además, las fracciones 2-4 de los perfiles carecieron de una resolución de subunidades ribosomales, pues no se observan claramente los picos característicos de 40S y 60S. Sin embargo, sí se observó el pico 80S, el cual (en general) se localizó entre las fracciones 5-6. Como se observa en los perfiles de las plantas aclimatadas de las tres líneas, las cuales se indican con azul, estos contienen una mayor cantidad de polisomas en comparación a las plantas no aclimatadas. Esto indica que el frío tiene un efecto en el proceso de traducción.

Se extrajo el RNA de las fracciones 2-10 de cada perfil de las tres líneas de plantas, aclimatadas y no aclimatadas. Para verificar la integridad del RNA extraído se llevaron a cabo separaciones electroforéticas en geles de agarosa. En la figura 9 se muestra un ejemplo de los geles obtenidos para una réplica de una línea de plantas. En ambos tratamientos se logra observar la separación de los rRNAs 25S y 18S, lo cual indica que el RNA de las fracciones 2-10 se encuentra íntegro. Aunque aparentemente las fracciones 2 y 3 de las plantas aclimatadas no poseen RNA, su cuantificación espectrofotométrica indicó que estas sí poseen RNA, aunque en muy baja concentración (datos no mostrados). Este comportamiento se repitió en otras réplicas (ver Anexo 2); en los geles se observa que las fracciones no polisomales, generalmente las 2, 3 y 4 contienen una baja concentración de rRNA, y las fracciones restantes (monosomas y polisomas) poseen una mayor concentración,

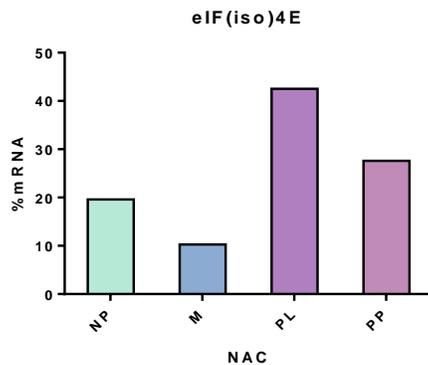
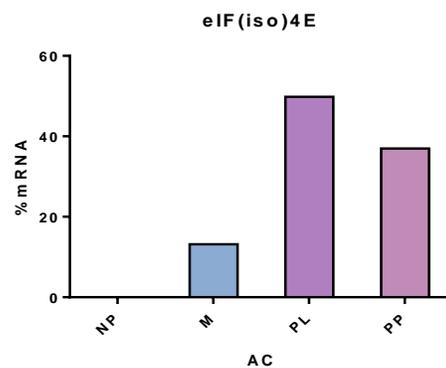
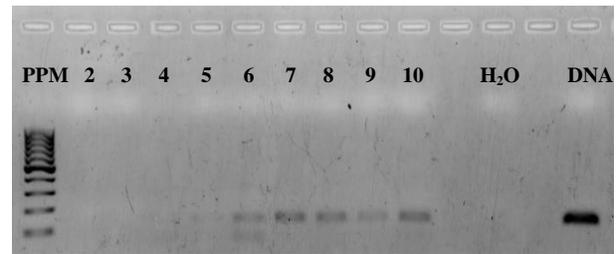
lo cual coincide con la densidad óptica obtenida en cada perfil, la cual señala un incremento en la absorbancia en estas fracciones.



**Figura 9. Muestras de RNA estudiadas.** Geles de agarosa al 1.5%. RNA de las fracciones 2-10 de los perfiles polisomales línea Silvestre. A. Plantas no aclimatadas. B. Plantas aclimatadas. Tinción con bromuro de etidio. Se cargó 1.5  $\mu$ l de RNA de cada fracción en cada pozo.

### 9.1. Cambios en la distribución de mRNAs correspondientes a los factores eIF4E en perfiles de polirribosomas.

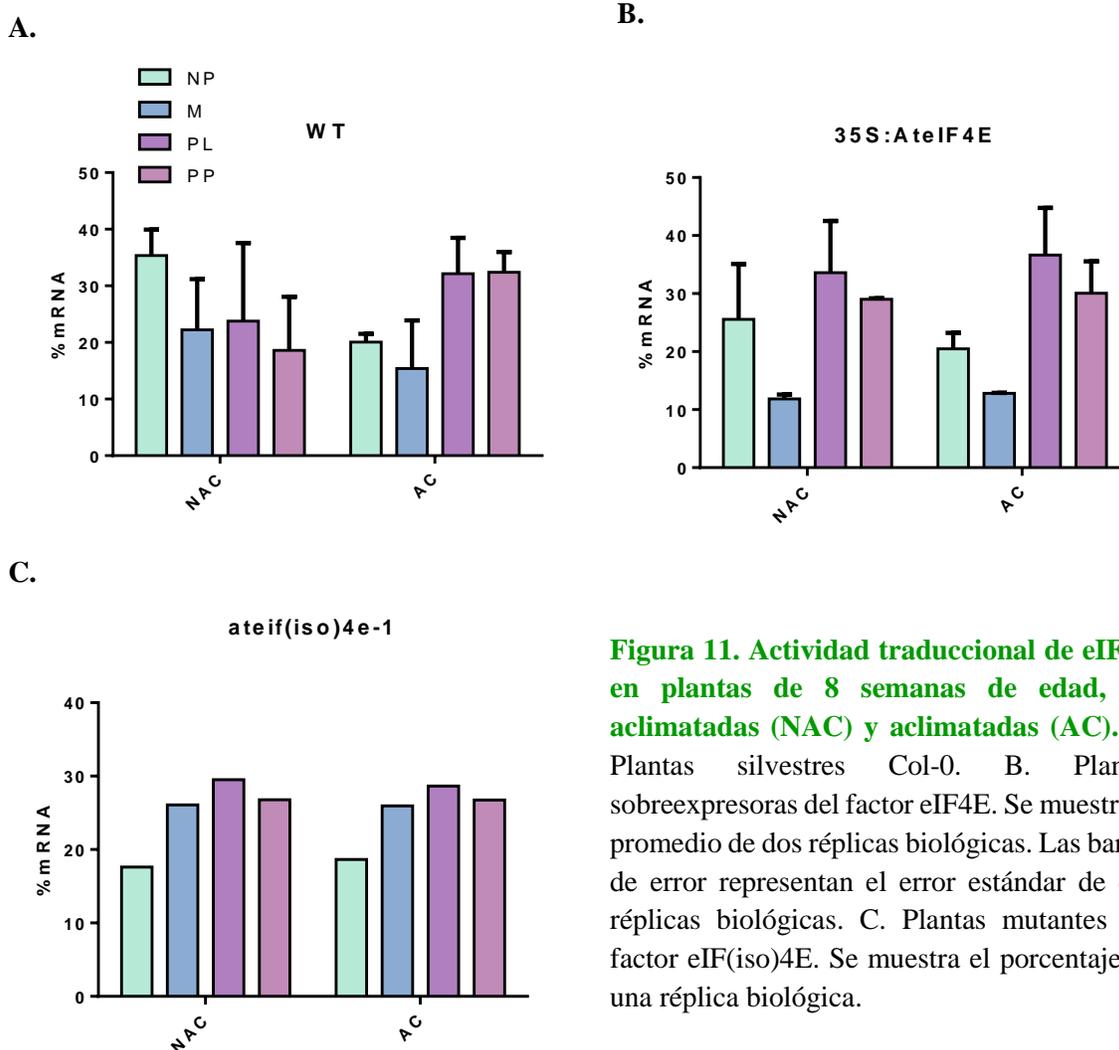
Las muestras se sometieron a reacciones de transcripción reversa, obteniendo así el cDNA de cada fracción de los perfiles analizados. El cDNA sirvió como templado para analizar el comportamiento traduccional de cada gen de interés. Los productos amplificados por PCR se corrieron en geles de agarosa como los que se muestran a continuación:

**A.****B.**

**Figura 10. Distribución del transcrito del gen eIF(iso)4E en el perfil polisomal de plantas silvestres de *A. thaliana*, primera réplica.** Arriba: geles de agarosa al 1.5%. Se muestran los productos de amplificación por PCR obtenidos a partir de 1.0  $\mu$ L de cDNA. Tinción con bromuro de etidio. Abajo: Gráficos correspondientes al porcentaje de mRNA de eIF(iso)4E distribuido en las fracciones no polisomales (NP), monosomasles (M), polisomas ligeros (PL) y polisomas pesados (PP). Izquierda: plantas no aclimatadas. Derecha: plantas aclimatadas.

Haciendo uso del perfil polisomal se clasificaron las fracciones como no polisomales (fracciones 2-4), monosomales (fracciones 5-6), y polirribosomales, que a su vez se dividió en polisomas ligeros (fracciones 7-8) y polisomas pesados (fracciones 9-10). La densidad de las bandas observadas en cada carril se sumó empleando el software Image Lab, dando lugar al 100% del mRNA del gen de interés, en este caso, eIF(iso)4E. Con este dato se obtuvo el porcentaje de mRNA existente en cada fracción. Finalmente, se sumaron los porcentajes de las fracciones de acuerdo con su clasificación. De esta manera se facilita el estudio entre las réplicas y los tratamientos. Los productos de PCR obtenidos para cada gen de interés se muestran en el Anexo 4.

Se determinó el nivel traduccional de los transcritos de los factores 4E de inicio de la traducción en plantas aclimatadas adultas respecto a plantas no aclimatadas de la misma edad. Debido a que únicamente se analizó una réplica del perfil *ateif(iso)4e-1*, los gráficos que representan los datos de estos tratamientos no poseen barras de error estándar de la media.

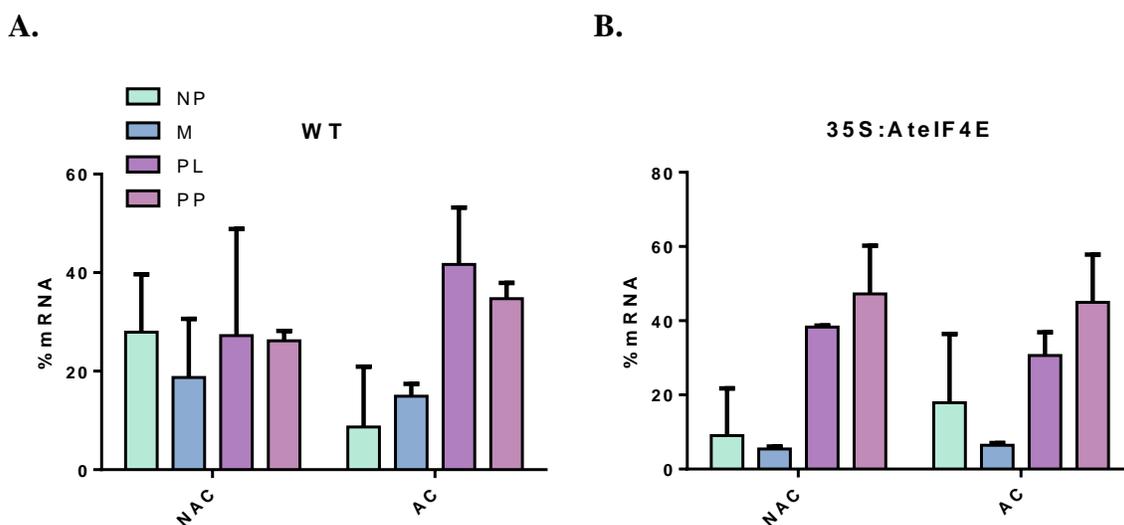


**Figura 11. Actividad traduccional de eIF4E en plantas de 8 semanas de edad, no aclimatadas (NAC) y aclimatadas (AC).** A. Plantas silvestres Col-0. B. Plantas sobreexpresoras del factor eIF4E. Se muestra el promedio de dos réplicas biológicas. Las barras de error representan el error estándar de dos réplicas biológicas. C. Plantas mutantes del factor eIF(iso)4E. Se muestra el porcentaje de una réplica biológica.

Los promedios obtenidos de los porcentajes de mRNA en las diferentes fracciones indican que el factor eIF4E tiende a cambiar su actividad traduccional en respuesta a la aclimatación en las plantas silvestres, pues en las condiciones control, aproximadamente el 60% del transcrito se localiza en las fracciones no polisomales, las cuales se consideran como traduccionalmente inactivas. Sin embargo, cuando las plantas son expuestas a bajas

temperaturas, el porcentaje en estas fracciones disminuye a un valor cercano al 40%. En las plantas de la línea 35S:AteIF4E, el transcrito de eIF4E presentó altos niveles de traducción en las condiciones control, lo cual corrobora su sobreexpresión en estas plantas. Cerca del 70% del mRNA de eIF4E se localiza en las fracciones polisomales. La exposición al frío no parece alterar los niveles en los cuales se traduce este transcrito. En cuanto a la línea mutante del factor eIF(iso)4E, en condiciones normales de crecimiento, existe una baja actividad traduccional del mRNA de eIF4E, el transcrito se reparte en porcentajes similares en las fracciones traduccionalmente bajas (NP y M) y en las traduccionalmente activas (PL y PP). La aclimatación de estas plantas no parece modificar este comportamiento (Figura 11).

La actividad traduccional del factor de inicio de la traducción eIF(iso)4E se analizó únicamente en las plantas de las líneas silvestre y sobreexpresoras de eIF4E, puesto que la línea mutante de eIF(iso)4E no expresa este gen. La mutación se comprobó mediante una reacción de PCR cuyo producto de amplificación corresponde al transcrito completo de eIF(iso)4E (ver Anexo 4). El resultado negativo de esta reacción fue de utilidad para comprobar la mutación de eIF(iso)4E en el perfil polisomal de la línea denominada como tal.



**Figura 12. Actividad traduccional de eIF(iso)4E en plantas de 8 semanas de edad, no aclimatadas (NAC) y aclimatadas (AC).** A. Plantas silvestres Col-0. B. Plantas sobreexpresoras del factor eIF4E. Se muestra el promedio de dos réplicas biológicas. Las barras de error representan el error estándar de dos réplicas biológicas.

Los promedios de los porcentajes de mRNA indicaron cambios en los niveles de traducción de eIF(iso)4E entre los tratamientos de las plantas silvestres. En las plantas no aclimatadas, cada fracción posee aproximadamente 25% del transcrito de eIF(iso)4E. La aclimatación provocó el incremento del contenido de mRNA en las fracciones polisomales, el cual se acercó al 70%. Tomando en cuenta únicamente los promedios, estos datos, junto con los de eIF4E, indican que los factores de inicio de la traducción son traduccionalmente favorecidos en respuesta al frío, en plantas silvestres de *A. thaliana*. La sobreexpresión de eIF4E recorre la mayoría del transcrito de eIF(iso)4E hacia los polisomas pesados cuando las plantas se encuentran a 22°C, lo cual dio lugar a que cerca del 80% del transcrito de este gen se localizara en las fracciones polisomales. Esto se mantuvo en la aclimatación (Figura 12, B). Por lo tanto, la sobreexpresión de eIF4E favoreció la traducción de la isoforma eIF(iso)4E y del propio eIF4E (Figura 11 B; NAC) en condiciones normales de crecimiento.

## **9.2. Regulación de la distribución polirribosomal de mRNAs correspondientes relacionados con la respuesta a estrés por frío.**

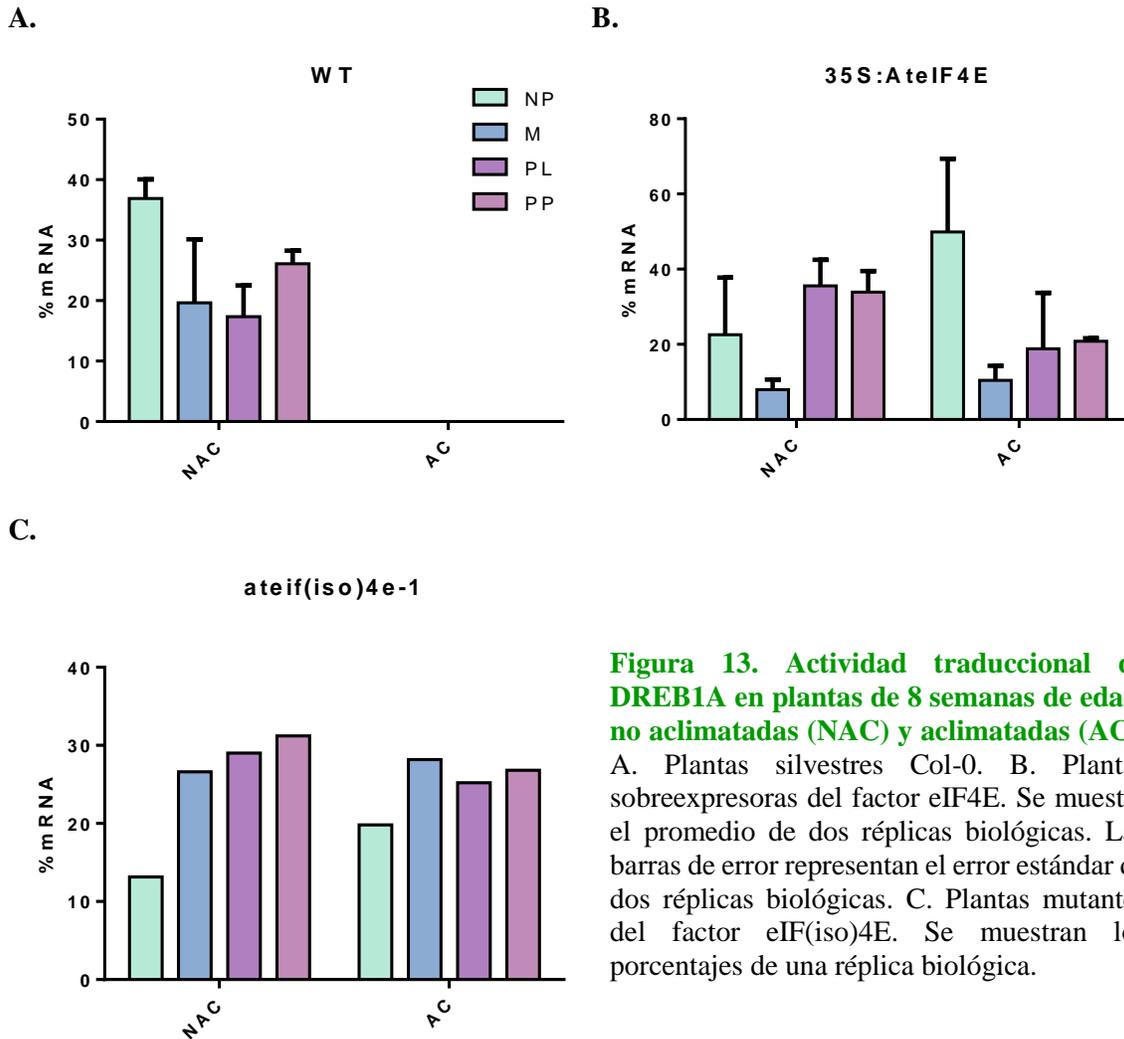
Los genes evaluados en este estudio fueron seleccionados debido a que estos mostraron ser inducidos en respuesta a las bajas temperaturas (datos obtenidos de EFP browser). Algunos además son regulados a la baja o a la alta en plantas mutantes de eIF(iso)4E, indicando que son traducidos preferencialmente por eIF(iso)4E o eIF4E, respectivamente (Martínez-Silva et al. 2012). En la siguiente tabla se muestra la función putativa de dichos genes, su regulación traduccional en la línea *ateifiso4e-1* y las veces de inducción a 4°C en plántula de *Arabidopsis*.

**Tabla 3.** Función de genes de respuesta a frío en *Arabidopsis thaliana*, su regulación traduccional en la línea *ateif(iso)4e-1* y su expresión a 4°C.

<b>Regulación traduccional</b>	<b>Función</b>	<b>Veces de inducción a 4°C</b>
<b>A la baja</b>	Regulator of chromosome condensation (RCC1) family protein (TCF1)	94 veces a 12h en hojas
<b>A la alta</b>	MYB-Related HHO2 transcription factor	3.3 veces a 1h en hojas
	AP2-ERF transcription factor drought response element binding (DREB2F)	2.3 veces a 1h en raíz
<b>Sin cambios</b>	AP2-ERF transcription factor drought response element binding (DREB1A)	326 veces a 12h en hojas
	Cold-regulated 15a (COR15A), chloroplast targeted	421 veces a 24h en hojas

DREB1A es un factor transcripcional que estimula la expresión de genes de respuesta a frío por medio del reconocimiento de la secuencia CTR/DREB presente en sus promotores. Como se observa en la Figura 13, A, la mayor cantidad del transcrito de DREB1A se localiza en las fracciones NP y M, indicando que este se traduce con poca eficiencia en ausencia de frío. En las plantas aclimatadas el transcrito estuvo ausente en polisomas a una semana de aclimatación.

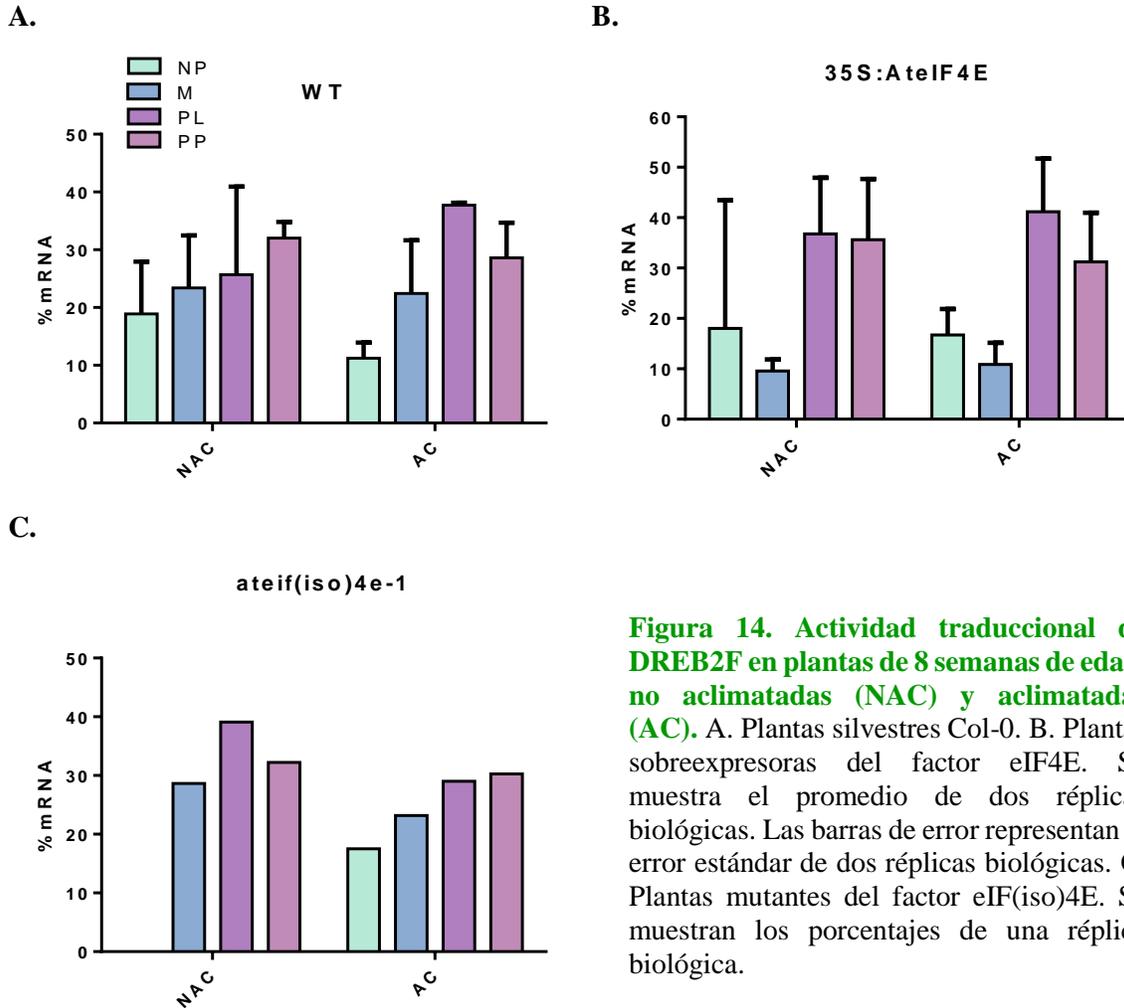
En la Figura 13 panel B, se observa que la sobreexpresión de eIF4E desplazó la mayor cantidad del transcrito a polisomas, los cuales contienen aproximadamente el 70% del transcrito en condiciones normales de crecimiento. Además, en esta línea de plantas se observó la traducción de este gen en las plantas AC, a diferencia de la línea WT, aunque de manera menos eficiente que en plantas NAC, ya que se detectó mayor proporción del transcrito en las fracciones NP. A los 7 días de exposición a frío, DREB1A se traduce con poca eficiencia. El comportamiento anterior se mantuvo en ausencia del factor eIF(iso)4E, en la condición NAC (Figura 13, C), pues aproximadamente 60% del transcrito se localizó en PL y PP, a diferencia del 40% que se observó en las plantas silvestres. Como se había reportado previamente (Duprat et. al., 2002) y acorde a lo observado en este trabajo (Figura 11C), en las plantas mutantes de eIF(iso)4E la expresión de eIF4E está aumentada, lo cual podría explicar parcialmente este comportamiento.



**Figura 13. Actividad traduccional de DREB1A en plantas de 8 semanas de edad, no aclimatadas (NAC) y aclimatadas (AC).**

A. Plantas silvestres Col-0. B. Plantas sobreexpresoras del factor eIF4E. Se muestra el promedio de dos réplicas biológicas. Las barras de error representan el error estándar de dos réplicas biológicas. C. Plantas mutantes del factor eIF(iso)4E. Se muestran los porcentajes de una réplica biológica.

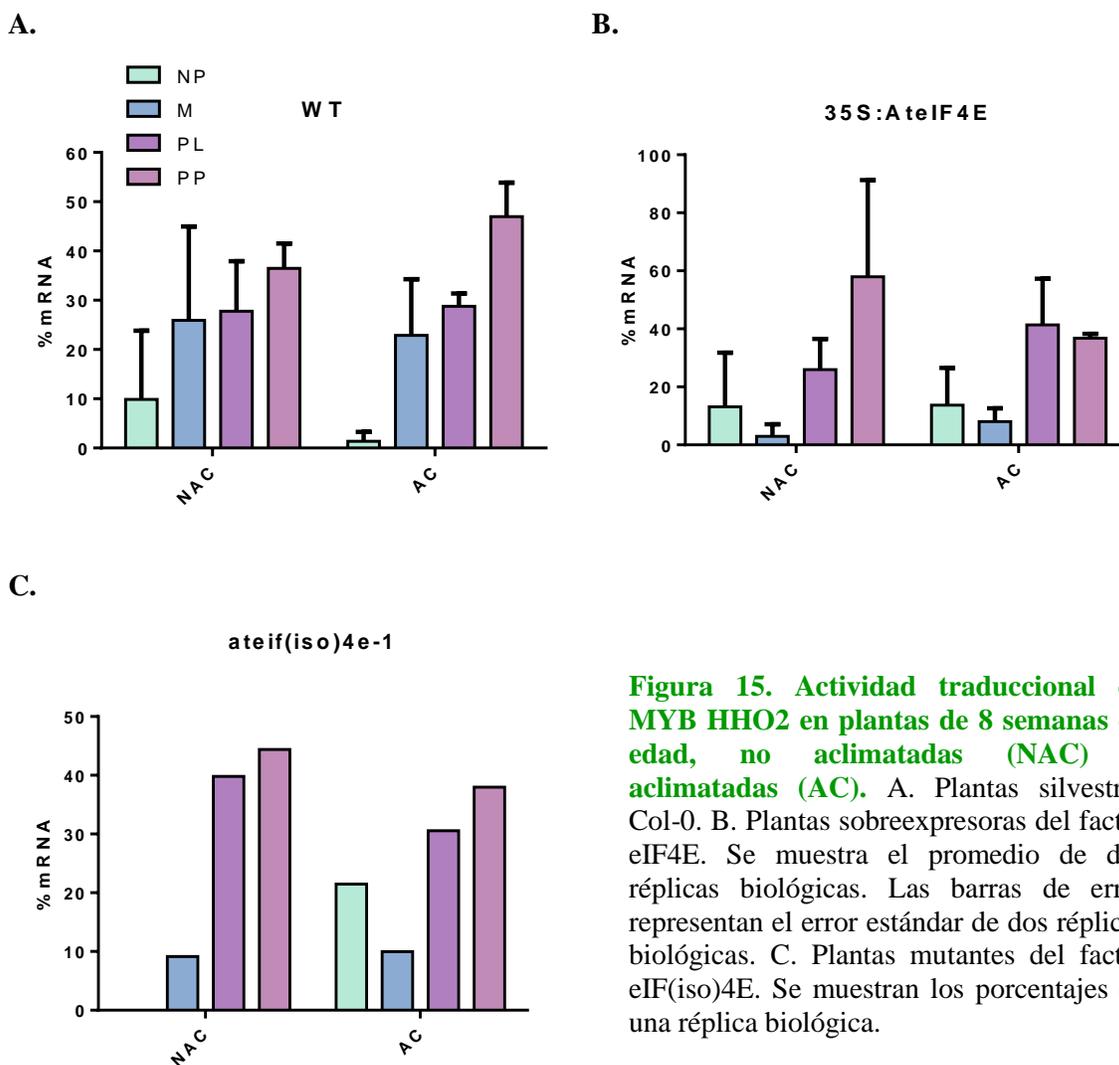
Respecto al mRNA del gen *DREB2F*, en las plantas silvestres la mayor cantidad se distribuye entre las fracciones que corresponden a PL y PP, en presencia y ausencia de estrés, sin embargo, las desviaciones estándar impiden ver claramente el comportamiento de este gen en las plantas NAC, el cual pudiera tener un nivel traduccional bajo. No obstante, los datos de las plantas aclimatadas demuestran que la exposición al frío modifica la traducción de *DREB2F*, la cual incrementó en PL en esta condición (Figura 14, A).



**Figura 14. Actividad traduccional de DREB2F en plantas de 8 semanas de edad, no aclimatadas (NAC) y aclimatadas (AC).** A. Plantas silvestres Col-0. B. Plantas sobreexpresoras del factor eIF4E. Se muestra el promedio de dos réplicas biológicas. Las barras de error representan el error estándar de dos réplicas biológicas. C. Plantas mutantes del factor eIF(iso)4E. Se muestran los porcentajes de una réplica biológica.

Como se puede observar en la Figura 14 panel B (plantas sobreexpresoras de eIF4E), en ausencia de estrés, las desviaciones estándar fueron muy grandes, indicando que el comportamiento de *DREB2F* fue diferente entre las réplicas. Los promedios de las réplicas indican que la distribución del mRNA de este factor de transcripción es mucho más localizada en fracciones polisomales. El comportamiento traduccional de este transcrito es más claro en las plantas aclimatadas, donde la mayor cantidad de mRNA se encuentra en PL y PP (Figura 14, B). Por lo tanto, la sobreexpresión de 4E favorece la traducción de *DREB2F* en presencia y ausencia de frío. En las plantas crecidas a 22°C, en ausencia del factor de inicio de la traducción eIF(iso)4E, el transcrito de *DREB2F* no afecta su traducción, la cual es eficiente (Figura 14, C). Cabe señalar que en esta réplica, el mRNA de *DREB2F* está

ausente en NP. Al aplicarse el estrés por frío, su traducción se afecta: los niveles de mRNA en M y PL disminuyen y este se recorre hacia las primeras fracciones no polisomales.

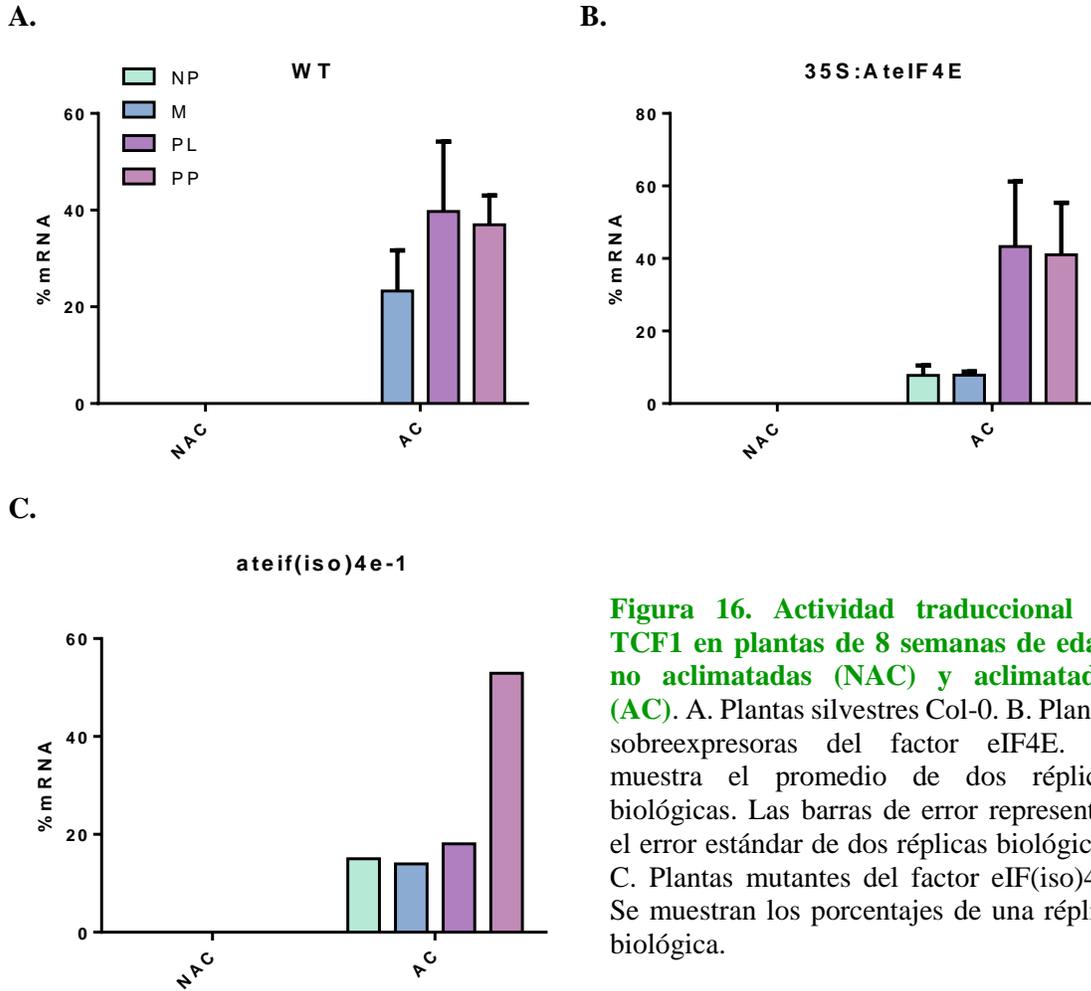


**Figura 15. Actividad traduccional de MYB HHO2 en plantas de 8 semanas de edad, no aclimatadas (NAC) y aclimatadas (AC).** A. Plantas silvestres Col-0. B. Plantas sobreexpresoras del factor eIF4E. Se muestra el promedio de dos réplicas biológicas. Las barras de error representan el error estándar de dos réplicas biológicas. C. Plantas mutantes del factor eIF(iso)4E. Se muestran los porcentajes de una réplica biológica.

El porcentaje de mRNA de *MYB HHO2* en las plantas silvestres, incrementó gradualmente hacia las fracciones PP y PL, sin embargo, la desviación estándar de la fracción M nos indica que podría existir un alto porcentaje de mRNA que no se estuviera traduciendo con alta eficiencia (Figura 15, A). La aclimatación al frío favoreció la traducción de este mRNA, puesto que cerca del 75% se encontró en polisomas. En ausencia de estrés, en las plantas

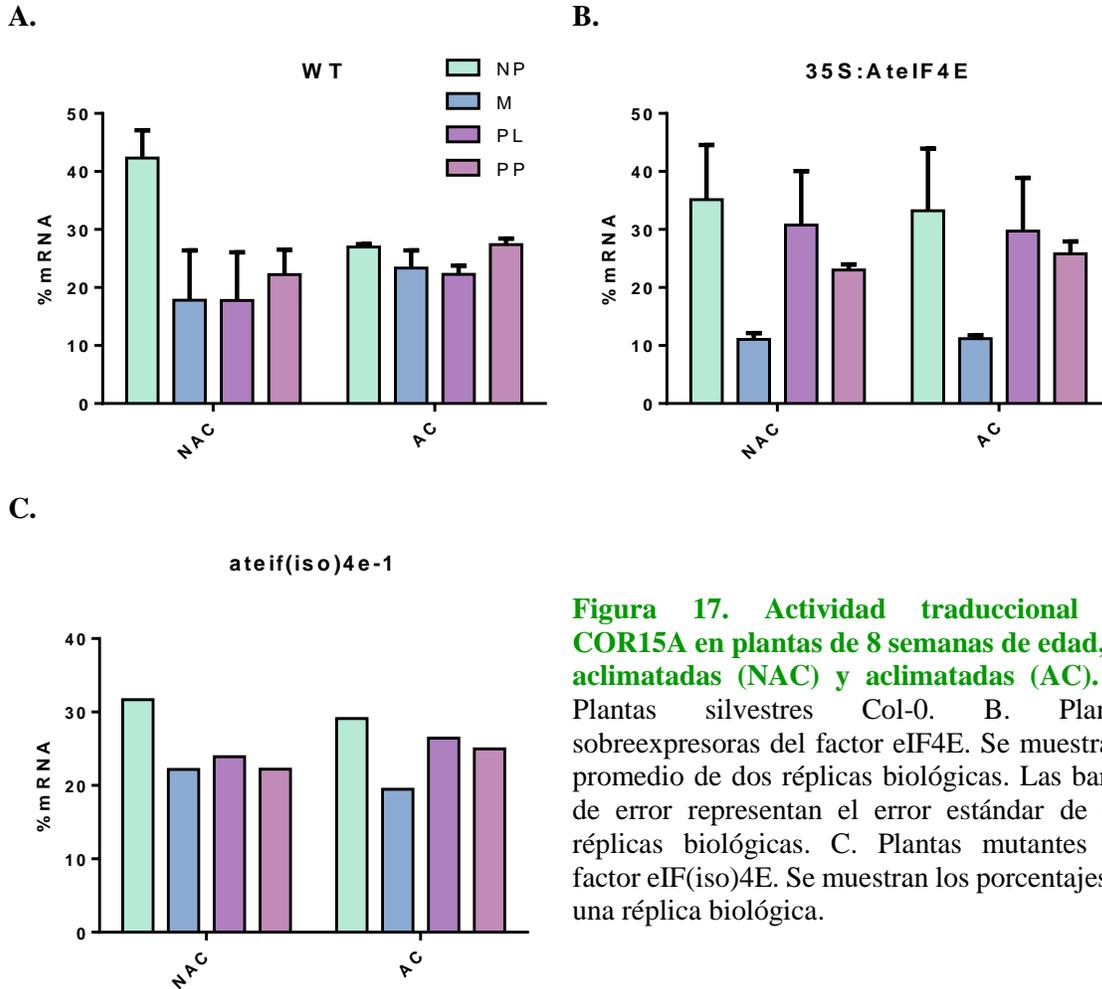
sobreexpresoras de eIF4E, la distribución del mRNA de este factor de transcripción es más localizada en las fracciones polisomales (Figura 15, B), sin embargo, las desviaciones estándar no permiten asegurar que esto suceda en ambas réplicas. El comportamiento traduccional de este transcrito es más claro en las plantas aclimatadas; la mayor cantidad de mRNA se encuentra en PL y PP (Figura 15, B). Por lo tanto, la sobreexpresión de 4E favorece la traducción de MYB HHO2 en presencia y ausencia de frío. En la Figura 15, panel C se observa que cerca del 90% del transcrito de *MYB HHO2* se encuentra en las fracciones traduccionalmente activas. En presencia de frío la traducción de *MYB HHO2* disminuyó; esto sugiere que este gen depende parcialmente para su traducción del factor eIF(iso)4E en presencia de frío. Cabe recordar que estos datos únicamente representan una repetición de este experimento, por lo cual será necesario comprobar los comportamientos anteriores de estos genes con otra réplica.

Se analizó el gen *TCF1*, el cual se sabe es traducido preferencialmente por eIF(iso)4E. En las muestras estudiadas, se encontró que el gen *TCF1* únicamente se traduce cuando las plantas son aclimatadas (Figura 16). Anteriormente se reportó que *TCF1* incrementa sus niveles de expresión en respuesta a la aclimatación en plantas silvestres de *Arabidopsis thaliana*. En estas mismas condiciones, el transcrito se encuentra mayoritariamente en polisomas ligeros y no se localiza en las fracciones NP. Por lo tanto, en las plantas silvestres la traducción de *TCF1* es altamente favorecida. En general, este comportamiento no cambia cuando el factor 4E se sobreexpresa; el porcentaje de mRNA localizado en las fracciones PL y PP fue mayor a las cantidades de transcrito encontradas en NP y M (Figura 16, B).



**Figura 16. Actividad traduccional de TCF1 en plantas de 8 semanas de edad, no aclimatadas (NAC) y aclimatadas (AC).** A. Plantas silvestres Col-0. B. Plantas sobreexpresoras del factor eIF4E. Se muestra el promedio de dos réplicas biológicas. Las barras de error representan el error estándar de dos réplicas biológicas. C. Plantas mutantes del factor eIF(iso)4E. Se muestran los porcentajes de una réplica biológica.

Aunque el mayor porcentaje del transcrito de TCF1 se encuentre en PP, se observó un incremento del mRNA en las fracciones NP. A pesar de que en un trabajo previo en plántulas de 15 días se encontró que la presencia de *TCF1* en polisomas depende de eIF(iso)4E (Martínez-Silva et al. 2012), la ausencia de este factor no parece modificar su traducción en plantas adultas aclimatadas (Figura 16, C); recordemos que el comportamiento anterior únicamente representa una réplica estudiada.



**Figura 17. Actividad traduccional de COR15A en plantas de 8 semanas de edad, no aclimatadas (NAC) y aclimatadas (AC).** A. Plantas silvestres Col-0. B. Plantas sobreexpresoras del factor eIF4E. Se muestra el promedio de dos réplicas biológicas. Las barras de error representan el error estándar de dos réplicas biológicas. C. Plantas mutantes del factor eIF(iso)4E. Se muestran los porcentajes de una réplica biológica.

Como control positivo del reclutamiento selectivo de transcritos hacia las fracciones polisomales en respuesta a las bajas temperaturas, se determinó la distribución polisomal del transcrito *COR15A*, cuyo papel durante este proceso ha sido bien descrito (Thalhammer & Hinch, 2014). El comportamiento del mRNA de *COR15A* (Figura 17) difiere del resto de los genes mencionados anteriormente, ya que la distribución de este transcrito se mantuvo constante entre las distintas líneas, y no se modificó dependiendo de las condiciones de temperatura, a pesar de que corresponde a un gen de respuesta a frío cuya transcripción incrementa durante la aclimatación (Salazar-Díaz, 2017).

## 10. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La regulación génica a través del mecanismo de la traducción de mRNAs es de suma importancia durante los eventos de adaptación de la célula a distintos ambientes. En eucariontes, este proceso ha sido ampliamente estudiado ante una gran variedad de condiciones adversas. Conocer el papel de la traducción ante el estrés por frío ha adquirido importancia en plantas debido al cambio climático que hemos vivido durante los últimos años. El paso más regulado de la síntesis de proteínas es la iniciación, donde los factores de inicio de la traducción 4E tienen un papel fundamental, pues ellos reconocen los transcritos que deben ser llevados a traducción a través de su afinidad por la estructura Cap; en *Arabidopsis thaliana* se comprobó que los factores 4E tienen un papel protector durante el estrés por congelamiento. Además, en plantas silvestres de este mismo organismo, la síntesis de proteínas incrementa de manera global tras un proceso de exposición a frío. En el presente estudio comprobamos que lo anterior también se cumple en plantas de las líneas AteIF4E y AteIF(iso)4E-1. Debido a que la traducción es un proceso energéticamente costoso, es interesante que los niveles globales de traducción incrementen ante un estímulo de estrés. No obstante, se ha comprobado que en estas condiciones la traducción es selectiva para algunos mRNAs cuya función, generalmente, tiene un papel en los mecanismos que ayudan a la célula a contender con el estrés.

En plantas silvestres de *A. thaliana*, la síntesis de la proteína eIF4E incrementó en respuesta al frío, este resultado, junto con los datos previos del incremento en su expresión, son muestra de su importancia en los mecanismos protectores de la célula ante el estrés. De acuerdo con nuestros antecedentes, estas plantas sufrieron menores daños posterior al estrés por frío; la eficiencia en la traducción de este gen podría estar directamente relacionado con este fenotipo. En nuestro estudio, pudimos corroborar el fondo genético de sobreexpresión de eIF4E en las plantas mutantes de eIF(iso)4E, pues los niveles traduccionales de eIF4E en estas plantas fueron superiores a aquellos de las plantas silvestres, demostrando el incremento en la síntesis de eIF4E que ya había sido caracterizado en esas plantas (Duprat et al., 2002).

La distribución polisomal de *eIF(iso)4E* en las plantas silvestres indica que esta isoforma se traduce más en esta condición. Sus altos niveles traduccionales cuando eIF4E se encuentra sobreexpresado podrían sugerir que la traducción de *eIF(iso)4E* es mediada por su isoforma,

y la permanencia de estos niveles ante el frío es indicio de su importancia en la protección de las plantas. Además, cabe la posibilidad de que el fenotipo resistente al congelamiento observado en la línea 35S:AteIF4E-OE pueda ser consecuencia de la protección mediada por ambos factores, y no únicamente de eIF4E. El incremento en la síntesis de eIF(iso)4E ante el estrés remarca su importancia en los mecanismos de protección celular, lo cual estaría en acuerdo con el fenotipo resistente al congelamiento observado cuando esta proteína es sobreexpresada.

Nuestros antecedentes indicaron que en las plantas silvestres no existen cambios en la expresión de *DREB1A* a los siete días de aclimatación, sugiriendo que su regulación se llevaba a cabo a nivel traduccional. En condiciones control, los niveles traduccionales de *DREB1A* son bajos, lo cual podría deberse a que el papel de esta proteína es principalmente en la respuesta a las bajas temperaturas. Dado lo anterior, su ausencia en polisomas luego de someter a las plantas a la aclimatación es interesante. Este resultado podría tener múltiples explicaciones; podría deberse al tiempo en el cual este factor de transcripción ejerce su acción, puesto que su expresión se sabe es inducida tan solo minutos posteriores al estímulo (Liu et al., 1998), y por lo tanto es posible sus máximos niveles traduccionales hubiesen sucedido previo a la toma de muestra, por lo cual nuestro estudio ya no refleja estos cambios. Otra posible explicación de este comportamiento podría ser la regulación negativa que ejercen los factores CBF2/DREB1C hacia los CBF1/DREB1B y CBF3/DREB1A, la cual propicia la expresión adecuada del regulón CBF durante la aclimatación. Recordemos que además de la regulación a nivel traduccional, existen otros mecanismos involucrados en la expresión de un gen, como elementos en *cis* y *trans* (Medina, Catalá, & Salinas, 2011). Además, se sabe que la expresión de los genes *DREB1* también está sujeta a una retroalimentación negativa por sus productos génicos y/o por los productos de sus blancos (Guo, Xiong, Ishitani, & Zhu, 2002).

La presencia en polisomas de *DREB1A* en las plantas sobreexpresoras sometidas al estrés sugiere que el incremento de eIF4E es favorable para la traducción de este gen durante tiempos más prolongados. En ausencia de eIF(iso)4E se mantuvo la presencia de *DREB1A* en polisomas, y su traducción en esta línea incrementa ligeramente; el hecho de que en ausencia de eIF(iso)4E el reclutamiento de algunos mRNAs hacia las fracciones polisomales se vea inducido indica que estos dependen mayoritariamente de eIF4E y su correspondiente

complejo eIF4F para el inicio de su traducción (Martínez-Silva et al., 2012). A pesar de la sobreexpresión de eIF4E en esta línea, existen diferencias en las distribuciones del mRNA de *DREB1A* entre AteIF(iso)4E-1 y AteIF4E, las cuales podrían ser consecuencia de la ausencia de eIF(iso)4E; es posible que el papel de DREB1A en la respuesta al frío pudiera compensar aquellos mecanismos afectados por la ausencia de eIF(iso)4E, sin embargo será necesario comprobar esta hipótesis en el futuro.

A pesar de que los factores de transcripción *DREB2F* y *MYB HHO2* fueron blancos predichos para su traducción preferencial por eIF4E, los niveles traduccionales de ambos no correlacionaron con los niveles traduccionales de eIF4E o eIF(iso)4E en las condiciones control, sin embargo, este resultado no descarta su selección para la traducción mediada preferencialmente por alguno de estos bajo otras condiciones. La ausencia de cambios a nivel transcripcional de ambos genes (Salazar-Días, 2017) podría sugerir que su regulación es principalmente traduccional, o bien, que estos genes no tienen una función en los mecanismos de respuesta al frío. Con los resultados obtenidos al estudiar su distribución en polisomas podemos inclinarnos más por la primera hipótesis, y proponer además que DREB2F y MYB HHO2 ejercen funciones importantes para la célula, dado que aún después de días de aclimatación, la traducción de ambos genes es alta. *MYB HHO2* y *DREB2F* son favorecidos para su traducción cuando 4E se sobreexpresa y, en el caso de *MYB HHO2*, esta no se ve comprometida por la ausencia de eIF(iso)4E, lo cual estaría en acuerdo con la predicción de su selección mediada por eIF4E. A pesar de que la ausencia de eIF(iso)4E ocasionó algunas modificaciones en la distribución de este transcrito, la traducción de *MYB HHO2* sigue favorecida.

La traducción de *DREB2F* tuvo los mayores cambios en ausencia de eIF(iso)4E; a pesar de que esta mutante cuenta con una gran cantidad eIF4E, la traducción de *DREB2F* no correlaciona con lo observado en el perfil AteIF4E AC. Estos cambios en ausencia de eIF(iso)4E sugieren que la traducción de este gen no es enteramente dependiente de eIF4E, a pesar de lo predicho en los antecedentes. Por lo tanto, nuestro estudio no clarifica si existe alguna preferencia de los factores 4E por este transcrito, sin embargo sí deja en claro que su expresión en estas condiciones, al igual que la de *MYB HHO2*, es regulada a nivel

traduccional (al menos en las plantas silvestres) y que ambos factores de transcripción tienen un papel en la respuesta a las bajas temperaturas.

En respuesta a la aclimatación tanto la expresión como la traducción de *TCF1* son inducidas, sugiriendo que esta proteína desarrolla un papel importante para la planta que podría ayudarla a contener contra el estrés. Debido a que la traducción de ambos factores de inicio de la traducción es inducida por las bajas temperaturas, no podemos discernir entre la preferencia de alguno de ellos por el transcrito. En las plantas *At*eIF4E el transcrito de *TCF1* parece ser aún más localizado en polisomas, sin embargo, al igual que los genes *DREB2F* y *MYB HHO2*, no podemos atribuir este comportamiento a su selección mediada por eIF4E dado que existen altos niveles traduccionales de eIF(iso)4E. A pesar de que este gen se traduce con eficiencia sin que eIF(iso)4E se encuentre en la célula, el aumento de *TCF1* en NP y M podría deberse a esta ausencia. Sin embargo, será necesario comprobar este comportamiento en el futuro con más réplicas.

Se sabe que la expresión del gen *COR15A* es altamente inducida por frío, este dato junto con lo revelado por nuestro estudio, sugieren que los niveles proteicos de *COR15A* en la célula no están directamente relacionadas a una alta eficiencia en su traducción, sino que podrían ser consecuencia de la cantidad de transcrito. Dado el comportamiento anterior, la distribución polisomal de *COR15A* nos fue de utilidad para comprobar que, los niveles de expresión de un gen no siempre son equivalentes a sus niveles traduccionales, y que el incremento en los niveles globales de traducción de la célula en respuesta a las bajas temperaturas no significa que la síntesis proteica de todos los mRNAs incremente.

En general, nuestros resultados indican que la selección de los mRNAs por los factores de inicio de la traducción es más compleja que el simple establecimiento de que cada factor recluta diferentes grupos de mRNAs al ribosoma. Además de la preferencia de cada factor por un 5'UTR en particular, existen muchos factores que pueden influir en la plasticidad de los perfiles traduccionales de un mRNA en respuesta al estrés.

## 11. CONCLUSIONES

-El frío induce la traducción de los factores eIF4E y eIF(iso)4E en plantas silvestres de *Arabidopsis thaliana*. A su vez, la expresión constitutiva de eIF4E es favorable para la traducción de ambos eIFs, niveles que se mantienen en presencia de frío. Estos datos sugieren que los altos niveles de eIF4E y eIF(iso)4E son necesarios para la célula en respuesta a las bajas temperaturas.

-Debido a que en ausencia de eIF(iso)4E la traducción de *eIF4E* en respuesta al frío no incrementa, es posible que la presencia de eIF(iso)4E sea necesaria para obtener altos niveles proteicos de su isoforma bajo esta condición.

-*DREB1A* no es un mRNA que se localice en polisomas a los siete días de exposición a las bajas temperaturas, no obstante, la sobreexpresión de eIF4E induce su traducción, y lo recluta a polisomas en presencia de frío, aún en ausencia de eIF(iso)4E. Por lo tanto, *DREB1A* depende mayoritariamente de eIF4E para su traducción.

-El frío y la expresión constitutiva de eIF4E potencian la traducción de *DREB2F* y *MYBHHO2*, y esto es afectado solo parcialmente por la ausencia de eIF(iso)4E. Por lo tanto, ambos genes son necesarios en condiciones de bajas temperaturas y dependen mayoritariamente de eIF4E para su traducción.

-*TCF1* únicamente se recluta a polisomas en plantas aclimatadas, remarcando que la función principal de este gen es en la respuesta al frío. Además, su alta traducción cuando eIF4E se encuentra sobreexpresado y los pocos cambios en ausencia de eIF(iso)4E, sugieren que puede utilizar a ambos factores para su traducción en la condición de aclimatación.

-La traducción del gen *COR15A* no varía notablemente en las dos condiciones empleadas en ninguna de las líneas estudiadas, por lo tanto, se comprueba que el efecto de la aclimatación sobre los niveles traducionales de la célula es selectivo para ciertos genes.

## 12. PERSPECTIVAS

-Realizar el análisis de una segunda réplica de las plantas *ateif(iso)-ko*, lo cual ayudaría a conocer con mayor exactitud el comportamiento de los genes en las condiciones evaluadas.

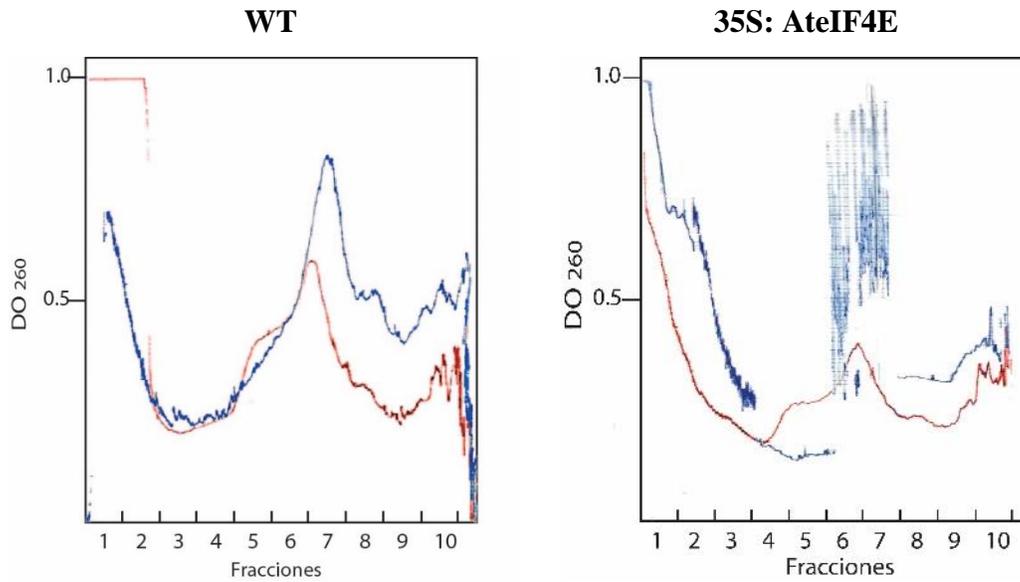
-Analizar cuantitativamente la distribución de los transcritos de los factores de inicio de la traducción eIF4E y eIF(iso)4E, en perfiles polisomales de plantas aclimatadas y no aclimatadas de *Arabidopsis thaliana* mediante qRT-PCR, así como la distribución de los genes *MYB HHO2*, *DREB1A*, *DREB2F*, *COR15A* y *TCF1*.

-Analizar la traducción de estos mismos genes en una línea sobreexpresora del factor eIF(iso)4E y una mutante del factor eIF4E.

-Analizar los niveles de expresión de los genes estudiados en las líneas 35S:AteIF4E, y *ateIF(iso)4e-1*, en presencia y ausencia del estrés.

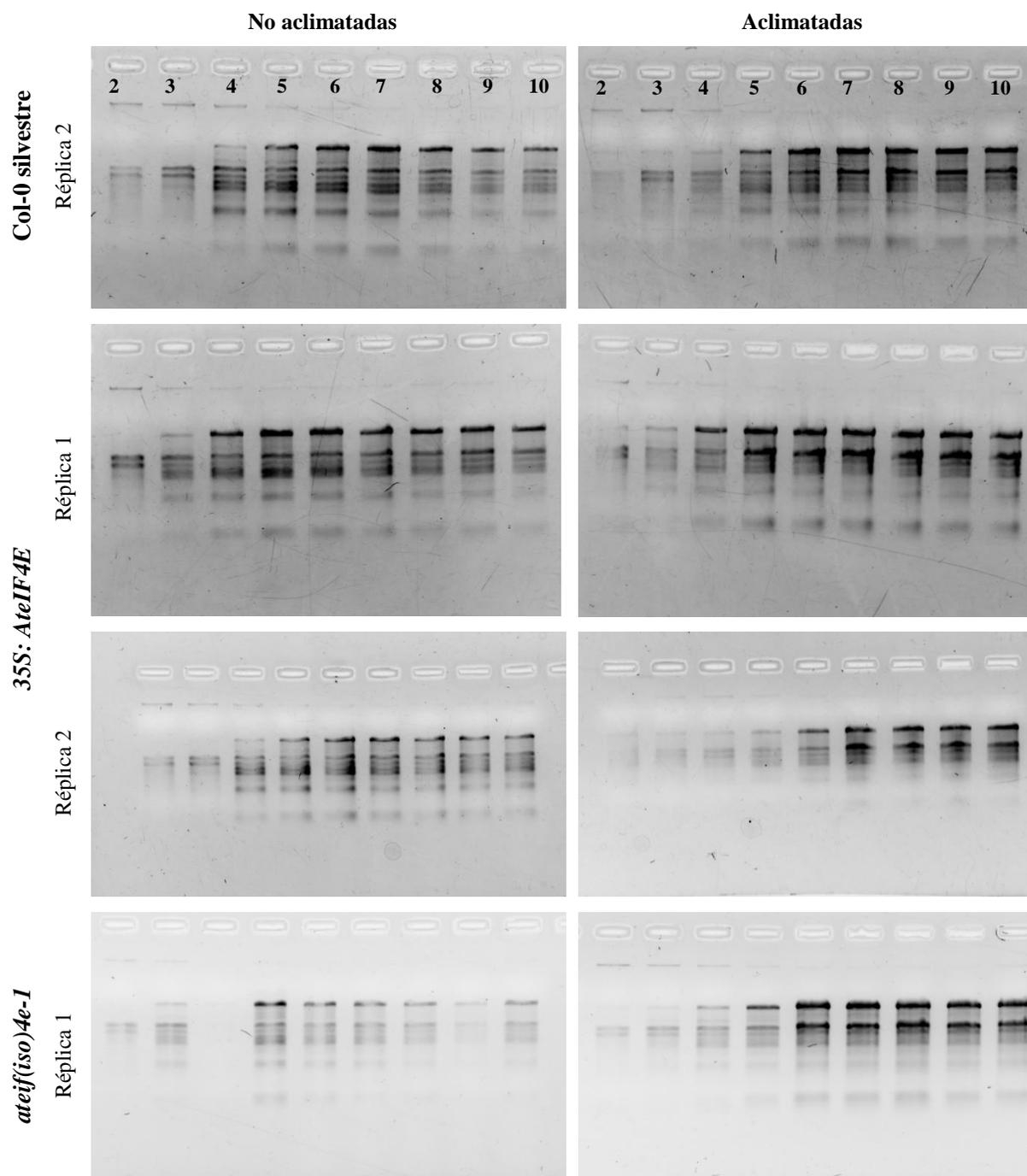
## 13. ANEXOS

### 13.1. Anexo 1. Perfiles polisomales réplica 2

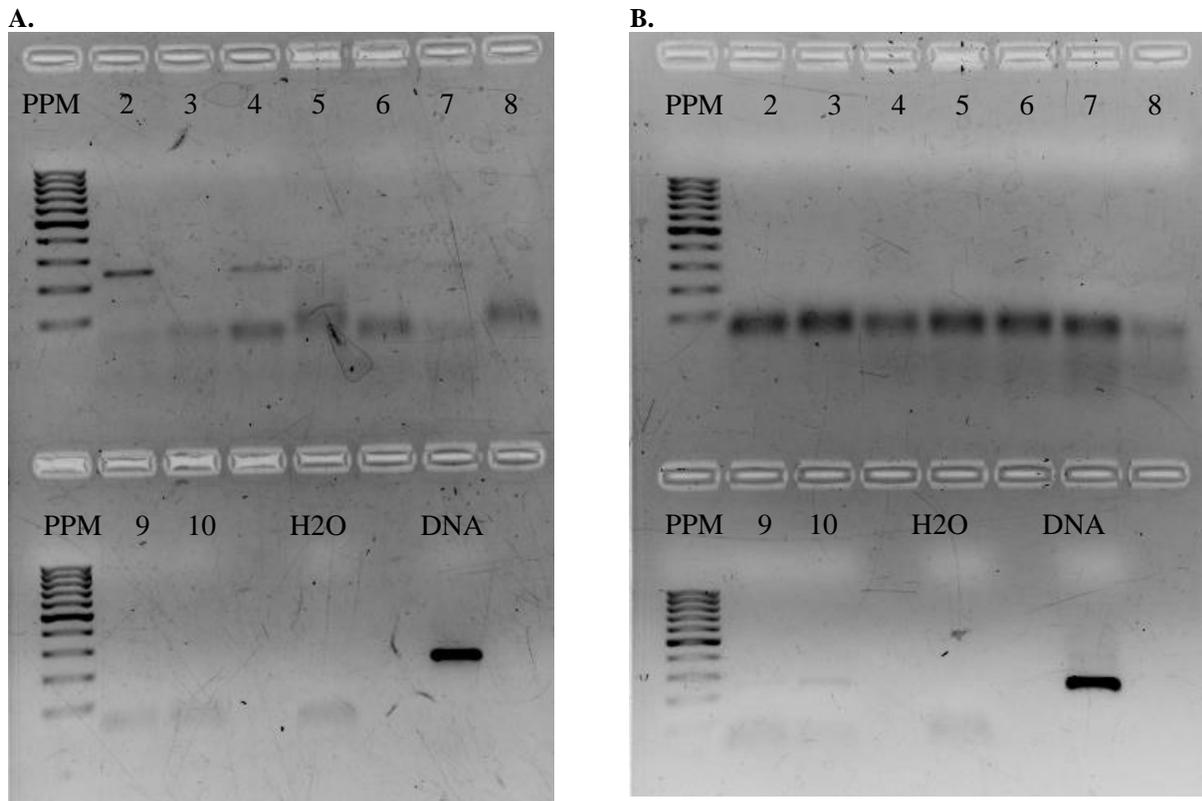


**Perfiles polisomales de hoja de *A. thaliana*.** Se muestran los gráficos correspondientes a la segunda réplica biológica de las líneas Col-0 (WT) y plantas sobreexpresoras del factor eIF4E. En rojo se muestran las plantas no aclimatadas (condiciones normales de crecimiento a 22°C), en azul plantas aclimatadas durante siete días a 4°C.

### 13.2. Anexo 2. Geles de integridad del RNA extraído de perfiles polisomales.



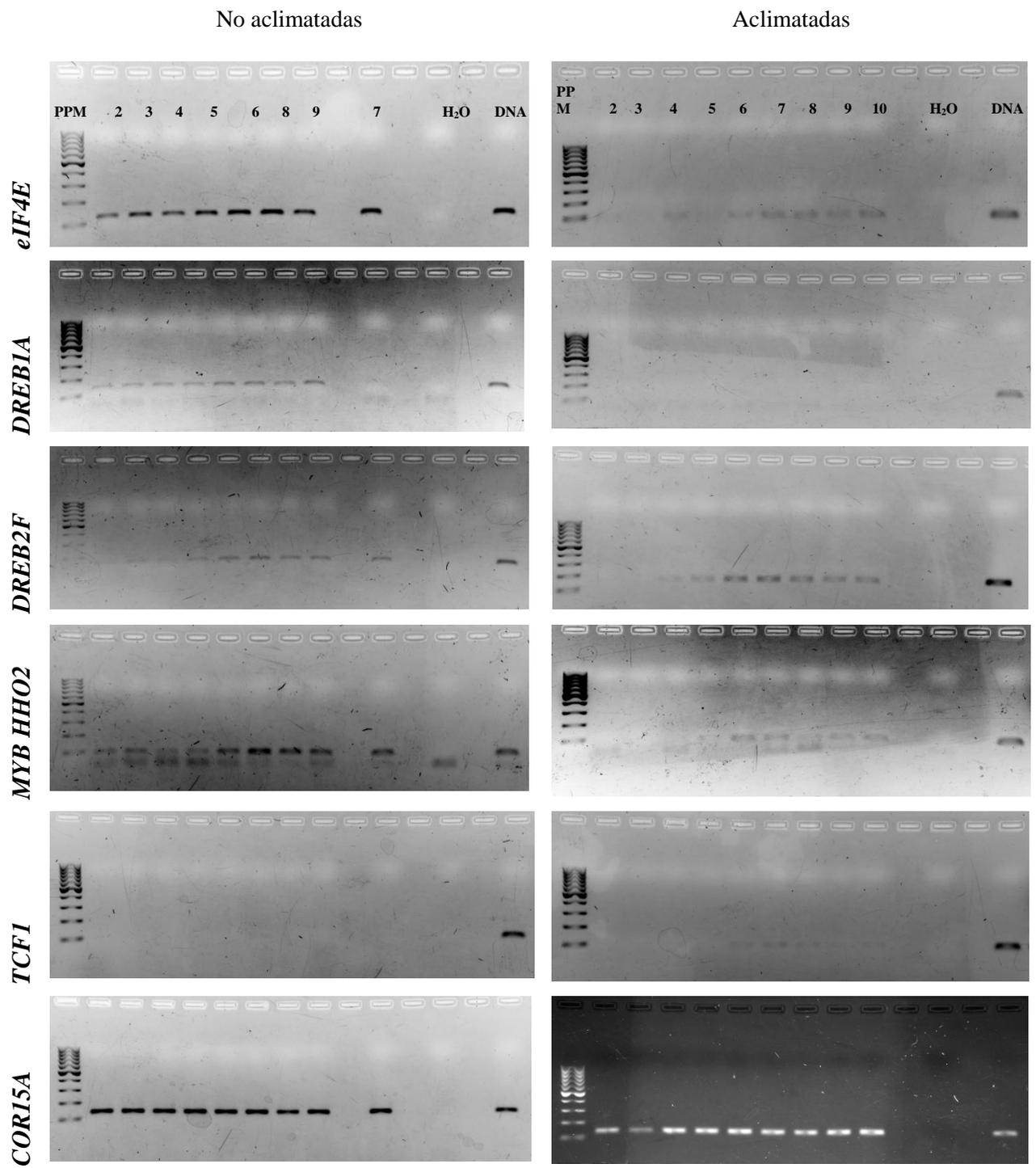
### 13.3. Anexo 3. -RT muestras perfiles polisomales



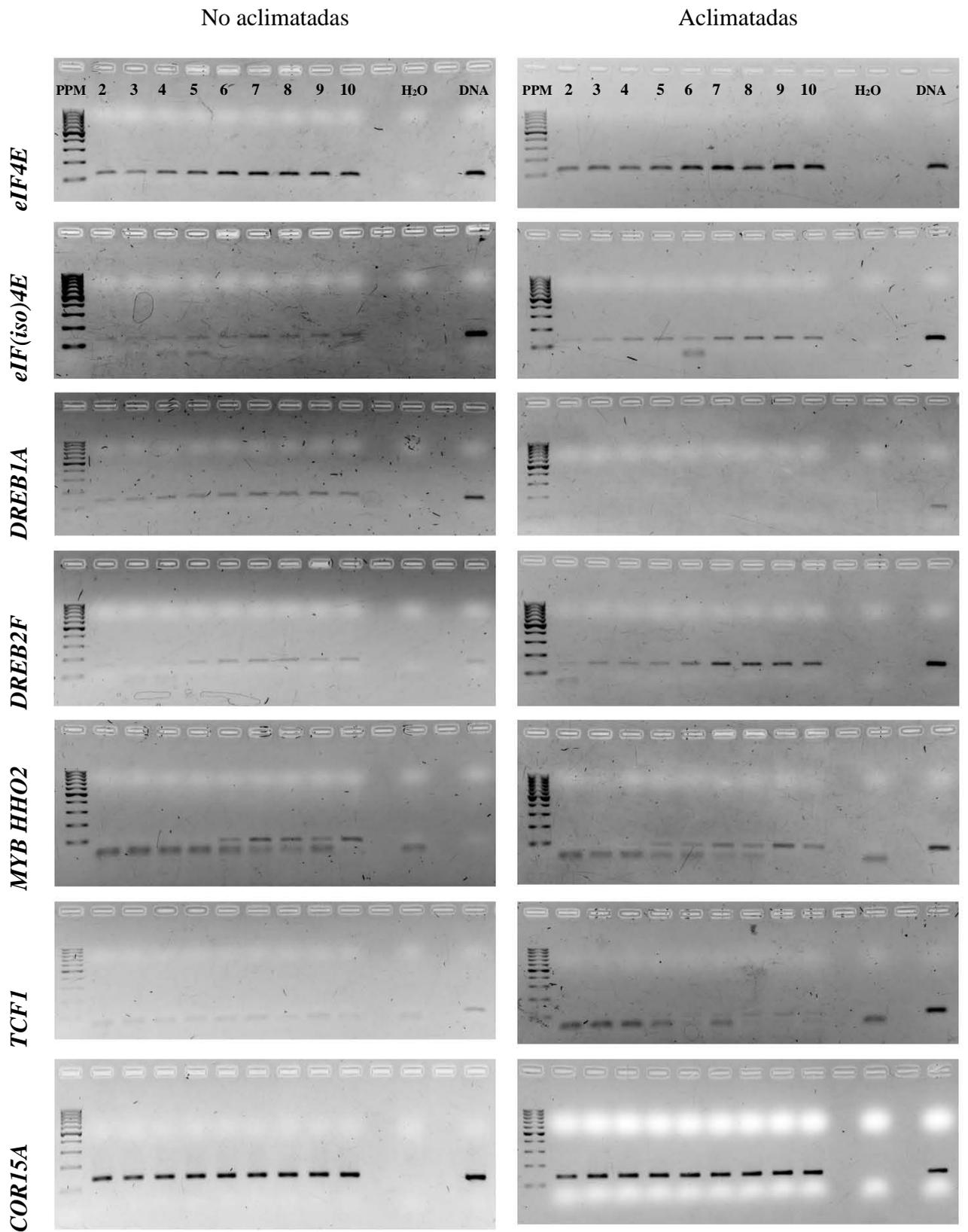
**Anexo 3. Control - RT.** Geles de agarosa al 1.5%. Se muestran los productos de la amplificación por PCR de 1.0  $\mu$ l de RNA. Las muestras corresponden a los perfiles polisomales (primera réplica) de plantas de la línea Silvestre. A. Plantas no aclimatadas. B. Plantas aclimatadas. Blanco: *eEF1 $\alpha$* . Tinción con bromuro de etidio.

### 13.4. Anexo 4. Geles de agarosa cuantificados

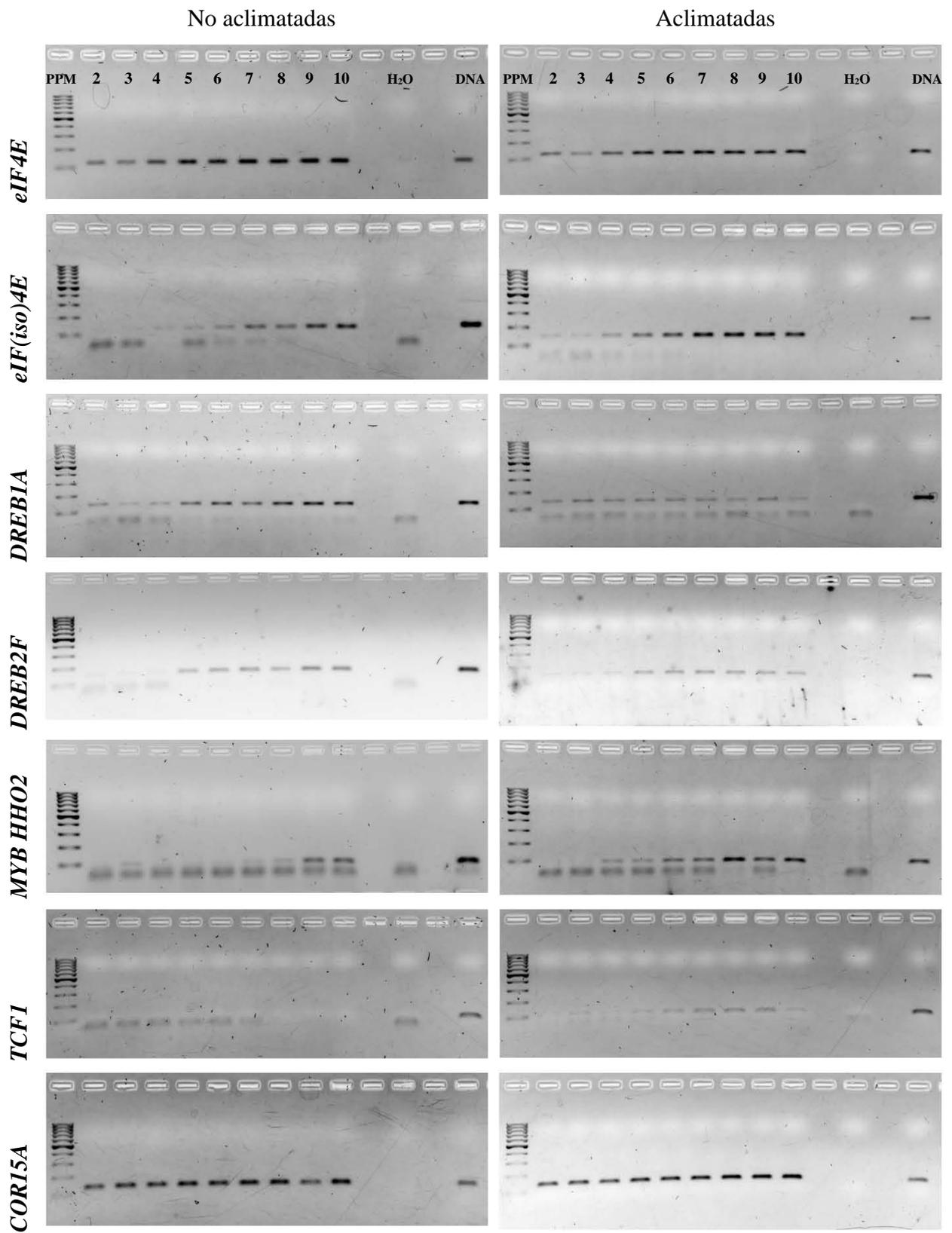
Línea Col-0 silvestre réplica 1



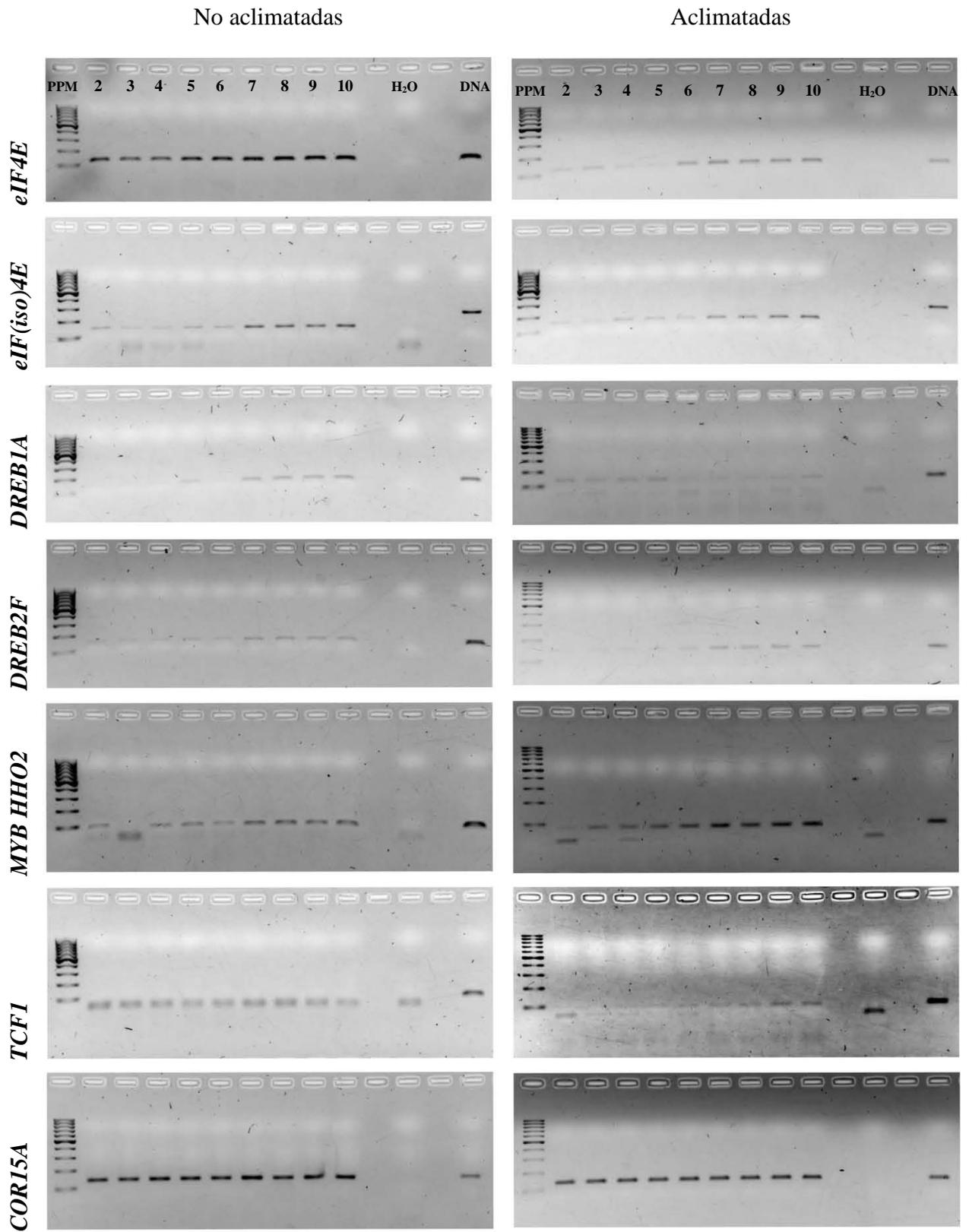
Línea Col-0 silvestre réplica 2



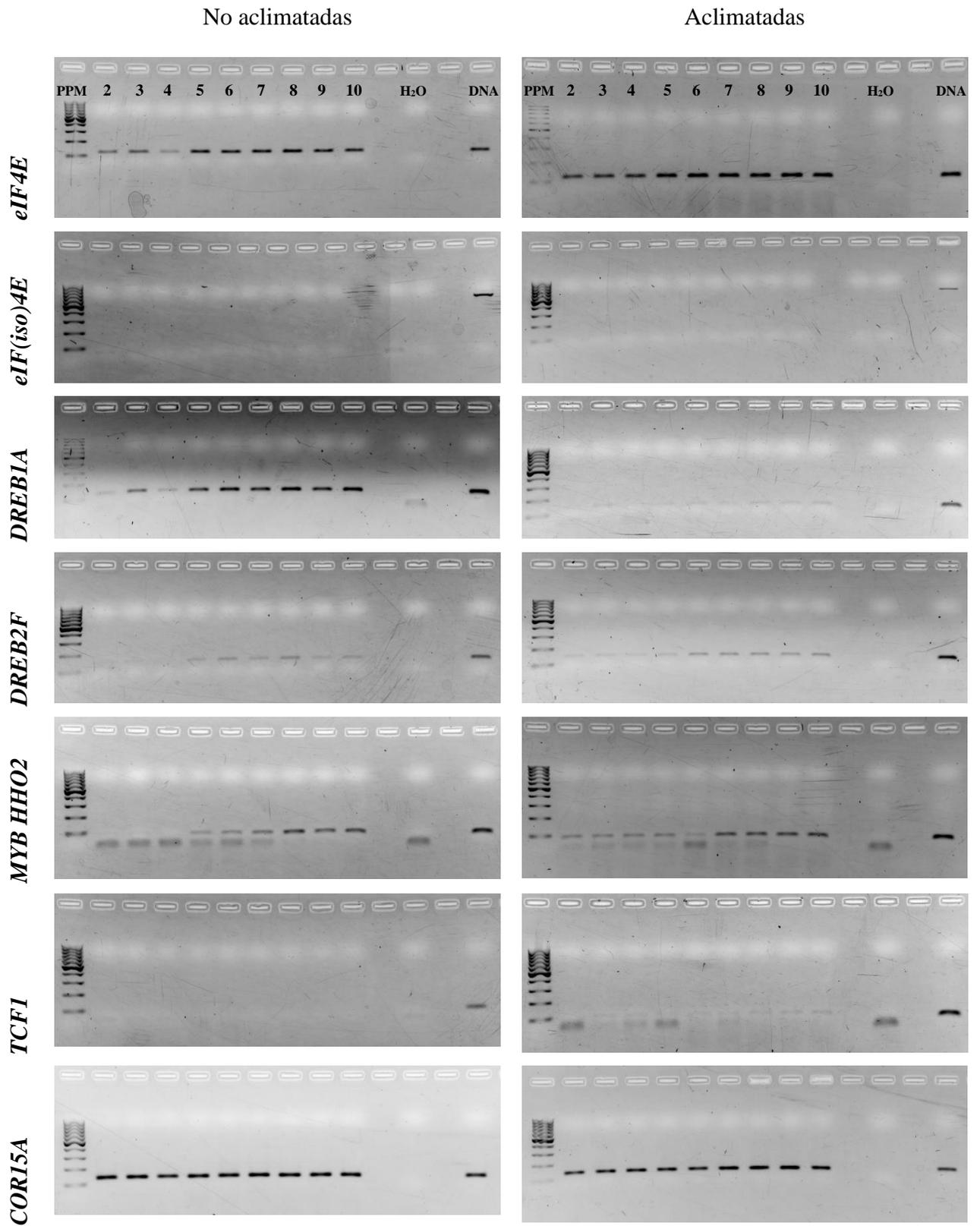
Línea 35S:*AteIF4E* réplica 1



Línea 35S:*AteIF4E* réplica 2



Línea *ateif(iso)4e-1*



## 14. REFERENCIAS

- Agarwal, P., Gupta, K., Lopato, S., & Agarwal, P. (2017). Dehydration responsive element binding transcription factors and their applications for the engineering of stress tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 68(9), 2135–2148.
- An, J., Li, R., Qu, F., You, C., Wang, X., & Hao, Y. (2018). R2R3-MYB transcription factor MdMYB23 is involved in the cold tolerance and proanthocyanidin accumulation in apple. *The Plant Journal*.
- Anchordoguy, T., Rudolph, A., Carpenter, J., & Crowe, J. (1987). Modes of interaction of cryoprotectants with membrane phospholipids during freezing. *Cryobiology*, 24, 324–31.
- Anderson, M., & Wilson, F. (2000). Growth, maintenance, and use of Arabidopsis genetic resources. In Z. Wilson (Ed.), *Arabidopsis: A Practical Approach* (pp. 1–4). Oxford: Oxford University Press.
- Arava, Y., Wang, Y., Storey, J., Liu, C., Brown, P., & Herschlag, D. (2003). Genome-wide analysis of mRNA translation profiles in *Saccharomyces cerevisiae*. TL - 100. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100 VN(7), 3889–3894.
- Aukerman, M., & Sakai, H. (2003). Regulation of Flowering Time and Floral Organ Identity by a MicroRNA and Its APETALA2 -Like Target Genes. *The Plant Cell*, 15(November), 2730–
- Balasta, M., Carberry, S., Friedland, D., Perez, R., & Goss, D. (1993). Characterization of the ATP-dependent binding of wheat germ protein synthesis initiation factors eIF-(iso)4F and eIF-4A to mRNA. *Journal of Biological Chemistry*, 268(25), 18599–18603.
- Brodersen, P., Sakvarelidze-Achard, L., Bruun-Rasmussen, M., Dunoyer, P., Yamamoto, Y., Sieburth, L., & Voinnet, O. (2008). Widespread Translational Inhibition by Plant miRNAs and siRNAs. *Science*, 320, 1185–1191.
- Bush, M., Hutchins, A., Jones, A., Naldrett, M., Jarmolowski, A., Lloyd, C., & Doonan, J. (2009). Selective recruitment of proteins to 5' cap complexes during the growth cycle in Arabidopsis. *Plant Journal*, 59(3), 400–412.
- Carberry, S., & Goss, D. (1991). Wheat germ initiation factors 4F and (iso)4F interact differently with oligoribonucleotide analogues of rabbit  $\alpha$ -globin mRNA. *Biochemistry*, 30, 4542–4545.
- Carberry, S., Goss, D., & Darzynkiewicz, E. (1991). A comparison of the binding of methylated cap analogs to wheat germ protein synthesis initiation factors 4F and (iso) 4F. *Biochemistry*, 30(6), 1624–1627.
- Clemens, M. (2001). Translational regulation in cell stress and apoptosis. Roles of the eIF4E binding proteins. *J. Cell. Mol. Med.*, 5(3), 221–239.
- Dever, T., & Green, R. (2012). Phases of Translation in Eukaryotes. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 1–16.
- Dinkova, T., & Sánchez de Jimenez, E. (1999). Differential expression and regulation of translation initiation factors -4E and -iso4E during maize germination. *Physiol Plant*, 107, 419–425.
- Dubos, C., Stracke, R., Grotewold, E., Weisshaar, B., Martin, C., & Lepiniec, L. (2010). MYB transcription factors in Arabidopsis. *Trends in Plant Science*, 15(10), 573–581.
- Duprat, A., Caranta, C., Revers, F., Menand, B., Browning, K., & Robaglia, C. (2002). The

- Arabidopsis eukaryotic initiation factor (iso)4E is dispensable for plant growth but required for susceptibility to potyviruses. *Plant Journal*, 32(6), 927–934.
- Echevarría-Zomeño, S., Yángüez, E., Fernández-Bautista, N., Castro-Sanz, A., Ferrando, A., & Castellano, M. (2013). Regulation of translation initiation under biotic and abiotic stresses. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(3), 4670–4683.
- Flores-Ceja, D. (2014). *Impacto de la sobreexpresión de eIF4E y eIF(iso)4E sobre el desarrollo y estrés abiótico en Arabidopsis thaliana*. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Frank, J., & Gonzalez, R. (2010). Structure and Dynamics of a Processive Brownian Motor: The Translating Ribosome. *Annual Review of Biochemistry*, 79(1), 381–412.
- Furuichi, Y. (2015). Discovery of m<sup>7</sup>G-cap in eukaryotic mRNAs. *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and Biological Sciences*, 91(8), 394–409.
- Furuichi, Y., & Shatkin, A. (1989). Characterization of Cap Structures. *Characterization of RNAs*, 180(1987), 164–176.
- Gallie, D., Le, H., Tanguay, R., Hoang, N., Browning, K., & Caldwell, C. (1997). The Phosphorylation State of Translation Initiation Factors Is Regulated Developmentally and following Heat Shock in Wheat The Phosphorylation State of Translation Initiation Factors Is Regulated Developmentally and following Heat Sho. *Journal of Biological Chemistry*, 272(2), 2–10.
- Gallie, D. R., & Browning, K. S. (2001). eIF4G Functionally Differs from eIFiso4G in Promoting Internal Initiation, Cap-independent Translation, and Translation of Structured mRNAs. *Journal of Biological Chemistry*, 276(40), 36951–36960.
- Gilmour, S., & Thomashow, M. (1991). Cold acclimation and cold-regulated gene expression in ABA mutants of Arabidopsis thaliana. *Plant Molecular Biology*, 17(6), 1233–1240.
- Golldack, D., Li, C., Mohan, H., & Probst, N. (2014). Tolerance to drought and salt stress in plants: Unraveling the signaling networks. *Frontiers in Plant Science*, 5(April), 1–10.
- Gross, L., Schaeffer, L., Alghoul, F., Hayek, H., Allmang, C., Eriani, G., & Martin, F. (2018). Tracking the m<sup>7</sup>G-cap during translation initiation by crosslinking methods. *Methods*, 137, 3–10.
- Guo, Y., Xiong, L., Ishitani, M., & Zhu, J. (2002). An Arabidopsis mutation in translation elongation factor 2 causes superinduction of CBF/DREB1 transcription factor genes but blocks the induction of their downstream targets under low temperatures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99, 7786–7791.
- Harding, H., Novoa, I., Zhang, Y., Zeng, H., Wek, R., Schapira, M., & Ron, D. (2000). Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Molecular Cell*, 6(5), 1099–1108.
- Hartwell, L., Hood, L., Goldberg, M., Reynolds, A., Silver, L., & Veres, R. (2000). Genetics – From genes to Genomes. In *Genetics – From genes to Genomes* (pp. 655–680). Boston: McGraw Hill.
- Hinnebusch, A. (2005). TRANSLATIONAL REGULATION OF GCN4 AND THE GENERAL AMINO ACID CONTROL OF YEAST. *Annual Review of Microbiology*, 59(1), 407–450.
- Hoyle, N., Castelli, L., Campbell, S., Holmes, L., & Ashe, M. (2007). Stress-dependent relocalization of translationally primed mRNPs to cytoplasmic granules that are kinetically and spatially

- distinct from P-bodies. *Journal of Cell Biology*, 179(1), 65–74.
- Hsu, C., & Stevens, A. (1993). Yeast Cells Lacking 5' -> 3' Exoribonuclease 1 Contain mRNA Species That Are Poly (A) Deficient and Partially Lack the 5' Cap Structure, 13(8).
- Hutvagner, G., & Zamore, P. (2002). A microRNA in a Multiple-Turnover RNAi Enzyme Complex. *Science*, 297(September), 2056–2060.
- Ji, H., Wang, Y., Cloix, C., Li, K., Jenkins, G., Wang, S., ... Li, X. (2015). The Arabidopsis RCC1 Family Protein TCF1 Regulates Freezing Tolerance and Cold Acclimation through Modulating Lignin Biosynthesis. *PLoS Genetics*, 11(9), 1–25.
- Joshi-Barve, S., Rychlik, W., & Rhoads, R. (1990). Alteration of the major phosphorylation site of eukaryotic protein synthesis initiation factor 4E prevents its association with the 48 S initiation complex. *Journal of Biological Chemistry*, 265(5), 2979–2983.
- Joshi, B., Lee, K., Maeder, D., & Jagus, R. (2005). Phylogenetic analysis of eIF4E-family members. *BMC Evolutionary Biology*, 5, 1–20.
- Karp, G. (2011). *Biología Celular y Molecular. Conceptos y Experimentos* (6th ed.). Ciudad de México: McGraw Hill.
- Koromilas, A., Lazaris-Karatzas, A., & Sonenberg, N. (1992). mRNAs containing extensive secondary structure in their 5' non-coding region translate efficiently in cells overexpressing initiation factor eIF-4E. *The EMBO Journal*, 11(11), 4153–4158.
- Kropiwnicka, A., Kuchta, K., Lukaszewicz, M., Kowalska, J., Jemielity, J., Ginalski, K., ... Zuberek, J. (2015). Five eIF4E isoforms from Arabidopsis thaliana are characterized by distinct features of cap analogs binding. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 456(1), 47–52.
- Lageix, S., Lanet, E., Pouch-Pélissier, M., Espagnol, M., Robaglia, C., Deragon, J., & Pélissier, T. (2008). Arabidopsis eIF2 $\alpha$  kinase GCN2 is essential for growth in stress conditions and is activated by wounding. *BMC Plant Biology*, 8, 1–9.
- Lanet, E., Delannoy, E., Sormani, R., Floris, M., Brodersen, P., Crete, P., ... Robaglia, C. (2009). Biochemical Evidence for Translational Repression by Arabidopsis MicroRNAs. *The Plant Cell Online*, 21(6), 1762–1768.
- Lata, C., & Prasad, M. (2011). Role of DREBs in regulation of abiotic stress responses in plants. *Journal of Experimental Botany*, 62(14), 4731–4748. <https://doi.org/10.1093/jxb/err210>
- Lellis, A., Allen, M., Aertker, A., Tran, J., Hillis, D., Harbin, C., ... Browning, K. (2010). Deletion of the eIFiso4G subunit of the Arabidopsis eIFiso4F translation initiation complex impairs health and viability. *Plant Molecular Biology*, 74(3), 249–263.
- Lewis, J., & Izaurralde, E. (1997). The role of the cap structure in RNA processing and nuclear export. *European Journal of Biochemistry*, 247(2), 461–469.
- Liu, Q., Kasuga, M., Sakuma, Y., Abe, H., Miura, S., Goda, H., ... Yamaguchi-Shinozaki, K. (1998). Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 10, 391–406.
- Marintchev, A., & Wagner, G. (2004). Translation initiation: Structures, mechanisms and evolution. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 37(3–4), 197–284.

- Martínez-Silva, A., Aguirre-Martínez, C., Flores-Tinoco, C., Alejandri-Ramírez, N., & Dinkova, T. (2012). Translation initiation factor ateiF(iso)4E is involved in selective mRNA translation in arabidopsis thaliana seedlings. *PLoS ONE*, 7(2).
- Martínez-Silva, A. V., & Dinkova, T. D. (2010). Mecanismos De Regulación Traduccional Mediados Por El Fator De Inicio 4E: Las Dos Caras De La Moneda, 29(3), 82–91.
- Medina, J., Catalá, R., & Salinas, J. (2011). The CBFs: Three arabidopsis transcription factors to cold acclimate. *Plant Science*, 180(1), 3–11.
- Meinke, D., Cherry, J., Dean, C., Rounsley, S., & Koornneef, M. (1998). Arabidopsis thaliana: A model plant for genome analysis. *Science*, 282(5389).
- Mizoi, J., Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2012). AP2/ERF family transcription factors in plant abiotic stress responses. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*, 1819(2), 86–96.
- Monzingo, A., Dhaliwal, S., Dutt-Chaudhuri, A., Lyon, A., Sadow, J., Hoffman, D., ... Browning, K. (2007). The structure of eukaryotic translation initiation factor-4E from wheat reveals a novel disulfide bond. *Plant Physiol*, 143(4), 1504–1518.
- Nagarajan, V., Satheesh, V., Poling, M., Raghothama, K., & Jain, A. (2016). Arabidopsis MYB-Related HHO2 Exerts a Regulatory Influence on a Subset of Root Traits and Genes Governing Phosphate Homeostasis. *Plant and Cell Physiology*, 57(6), 1142–1152.
- Oakenfull, R., Baxter, R., & Knight, M. (2013). A C-Repeat Binding Factor Transcriptional Activator (CBF/DREB1) from European Bilberry (*Vaccinium myrtillus*) Induces Freezing Tolerance When Expressed in Arabidopsis thaliana. *PLoS ONE*, 8(1).
- Olien, C., & Smith, M. (1977). Ice adhesions in relation to freeze stress. *Plant Physiology*, 60(4), 499–503.
- Park, W., Li, J., Song, R., Messing, J., & Chen, X. (2002). CARPEL FACTORY, a Dicer homolog, and HEN1, a novel protein, act in microRNA metabolism in Arabidopsis thaliana. *Current Biology*, 12(17), 1484–1495.
- Parker, R., & Sheth, U. (2007). P Bodies and the Control of mRNA Translation and Degradation. *Molecular Cell*, 25(5), 635–646.
- Patrick, R., & Browning, K. (2012). The eIF4F and eIFiso4F complexes of plants: An evolutionary perspective. *Comparative and Functional Genomics*, 2012.
- Patrick, R., Mayberry, L., Choy, G., Woodard, L., Liu, J., White, A., ... Browning, K. (2014). Two Arabidopsis Loci Encode Novel Eukaryotic Initiation Factor 4E Isoforms That Are Functionally Distinct from the Conserved Plant Eukaryotic Initiation Factor 4E. *Plant Physiology*, 164(4), 1820–1830.
- Perras, M., & Sarhan, F. (1990). Polysome Metabolism During Cold Acclimation in Wheat. *Plant and Cell Physiology*, 31(8), 1083–1090.
- Pisarev, A., Hellen, C., & Pestova, T. (2007). Recycling of Eukaryotic Posttermination Ribosomal Complexes. *Cell*, 131(2), 286–299.
- Proud, C. (2007). Signalling to translation: how signal transduction pathways control the protein synthetic machinery. *Biochem. J.*, 403(2), 217–234.
- Rausell, A., Kanhonou, R., Yenush, L., Serrano, R., & Ros, R. (2003). The translation initiation factor

- eIF1A is an important determinant in the tolerance to NaCl stress in yeast and plants. *The Plant Journal*, 34(3), 257–267.
- Robaglia, C., & Caranta, C. (2006). Translation initiation factors: A weak link in plant RNA virus infection. *Trends in Plant Science*, 11(1), 40–45.
- Rodriguez, C., Freire, M., Camilleri, C., & Robaglia, C. (1998). The *Arabidopsis thaliana* cDNAs coding for eIF4E and eIF(iso)4E are not functionally equivalent for yeast complementation and are differentially expressed during plant development. *Plant Journal*, 13(4), 465–473.
- Russell, P., Hertz, P., & McMillan, B. (2016). Model organisms: *Arabidopsis thaliana*. In *Biology: The Dynamic Science* (4th ed., p. 871). Boston, MA: Cengage Learning.
- Salazar-Díaz, K. (2017). *Papel de los factores de inicio de la traducción eIF4E y eIF(iso)4E durante el estrés por congelamiento en Arabidopsis thaliana*. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Sanan-Mishra, N., Pham, X., Sopory, S., & Tuteja, N. (2005). Pea DNA helicase 45 overexpression in tobacco confers high salinity tolerance without affecting yield. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(2), 509–514.
- Schwer, B., & Shuman, S. (1996). Conditional inactivation of mRNA capping enzyme affects yeast pre-mRNA splicing in vivo. *RNA*, 2, 574–583.
- Sesma, A., Castresana, C., & Castellano, M. (2017). Regulation of Translation by TOR, eIF4E and eIF2 $\alpha$  in Plants: Current Knowledge, Challenges and Future Perspectives. *Frontiers in Plant Science*, 8(April), 2–8.
- Shimotohno, K., Kodama, Y., Hashimoto, J., & Miura, K. (1977). Importance of 5'-terminal blocking structure to stabilize mRNA in eukaryotic protein synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(7), 2734–2738.
- Shirokikh, N., & Preiss, T. (2018). Translation initiation by cap-dependent ribosome recruitment: Recent insights and open questions. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, (February), 1–45.
- Soengas, P., Rodríguez, V., Velasco, P., & Cartea, M. (2018). Effect of Temperature Stress on Antioxidant Defenses in Brassica oleracea. *ACS Omega*, 3(5).
- Sonenberg, N. (1988). Cap-Binding Proteins of Eukaryotic Messenger RNA: Functions in Initiation and Control of Translation. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, 35(C), 173–207.
- Sonenberg, N., & Hinnebusch, A. (2009). Regulation of Translation Initiation in Eukaryotes: Mechanisms and Biological Targets. *Cell*, 136(4), 731–745.
- Steponkus, P. (1984). Role of the plasma membrane in freezing injury and cold acclimation. *Annu. Rev. Plant. Physiol.*, 35, 543–584.
- Strauss, G., & Hauser, H. (1986). Stabilization of lipid bilayer vesicles by sucrose during freezing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83, 2422–26.
- Thalhammer, A., & Hinch, D. (2014). A mechanistic model of COR15 protein function in plant freezing tolerance: integration of structural and functional characteristics. *Plant Signaling & Behavior*, 9(12), e977722.
- The Arabidopsis Genome Initiative. (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, 408(6814), 796–815. <https://doi.org/10.1038/35048692>

- Thomashow, M. (1999). PLANT COLD ACCLIMATION: Freezing Tolerance Genes and Regulatory Mechanisms. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 50(1), 571–599.
- Voinnet, O. (2009). Origin, Biogenesis, and Activity of Plant MicroRNAs. *Cell*, 136(4), 669–687.
- Watson, J. D., Baker, T. A., Bell, S. P., Gann, A., Levine, M., & Losick, R. (2004). *Molecular Biology of the Gene* (5th ed.). San Francisco, CA: Pearson Education.
- Weaver, R. (2008). Messenger RNA and processing II: Capping and Polyadenylation. In *Molecular Biology* (4th ed.). New York: McGraw-Hill.
- Webster, C., Gaut, R., Browning, K., Ravel, J., & Roberts, J. (1991). Hypoxia enhances phosphorylation of eukaryotic initiation factor 4A in maize root tips. *Journal of Biological Chemistry*, 266(34), 23341–23346.
- Wek, R., Jiang, H., & Anthony, T. (2006). Coping with stress: eIF2 kinases and translational control. *Biochemical Society Transactions*, 34(1), 7. <https://doi.org/10.1042/BST20060007>
- Xie, Y., Chen, P., Yan, Y., Bao, C., Li, X., Wang, L., ... Guan, Q. (2018). An atypical R2R3 MYB transcription factor increases cold hardiness by CBF-dependent and CBF-independent pathways in apple. *New Phytologist*, 218(1), 201–218.
- Zhang, Y., Wang, Y., Kanyuka, K., Parry, M., Powers, S., & Halford, N. (2008). GCN2-dependent phosphorylation of eukaryotic translation initiation factor-2 $\alpha$  in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany*, 59(11), 3131–3141.