



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Obtención y evaluación fenotípica de una mutante del factor *eIF4E* en condiciones de estrés congelante

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Brenda Nieto Rivera

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Tzvetanka Dimitrova Dinkova

Facultad de Química

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Martha Patricia Coello Coutiño

Facultad de Química

Dra. Rosa Estela Navarro González

Instituto de Fisiología Celular

Ciudad de México. Abril, 2021



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.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi tutora, la Dra. Tzvetanka Dimitrova Dinkova, por aceptarme en su laboratorio y guiarme durante el desarrollo de este proyecto.

Al comité que me asesoró durante la elaboración de esta tesis, la Dra. Martha Patricia Coello Coutiño y la Dra. Rosa Estela Navarro González.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) Proyecto de Ciencia Básica CB-2014/238439, al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) IN214118 y Programa de Apoyo a Investigación y Posgrado PAIP 5000-9118. También a CONACYT por la beca otorgada para mis estudios de posgrado y al Programa de Apoyo a Estudiante de Posgrado (PAEP) por el apoyo otorgado para asistencia a un congreso nacional.

Al Biol. Jorge Herrera-Díaz, de la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y la Industria (USAII) y a Eduardo Luján Soto por su asistencia en la técnica de HRM.

A mis compañeros del laboratorio 103, principalmente a Yullet Montaña y Lorena Villegas, por apoyarme en la mayoría de los experimentos realizados y por permitirme ser su amiga.

A Iván Almazán, por ser mi mejor amigo, mi “equipo de la vida” y permanecer conmigo en los buenos y malos momentos. Por crecer a mi lado y ayudarme a convertirme en mucho de lo que soy hoy en día.

A mis padres, Leticia Rivera y Sergio Nieto, por incentivar me a ser mejor cada día, apoyarme en cada proyecto que me he propuesto y por impulsarme a llegar tan lejos como yo desee. Los amo.

A todos los que durante el camino me han acompañado.

ÍNDICE

1. RESUMEN	8
2. INTRODUCCIÓN	9
2.1 ESTRÉS ABIÓTICO EN PLANTAS.....	9
2.2 PROCESO DE TRADUCCIÓN EUCARIONTE	12
2.3 EL FACTOR EUCARIONTE DE INICIO DE LA TRADUCCIÓN 4E (EIF4E).....	15
2.4 ISOFORMAS DEL FACTOR <i>EIF4E</i> . ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DIFERENCIAL.....	17
2.5 MUTAGÉNESIS EN PLANTAS	20
2.6 SISTEMA CRISPR-CAS9. FUNDAMENTOS E IMPLEMENTACIÓN COMO HERRAMIENTA BIOTECNOLÓGICA.....	23
2.7 PLANTAS MUTANTES PARA LOS FACTORES DE INICIO DE LA TRADUCCIÓN 4E.....	26
3. ANTECEDENTES	29
3.1 SELECCIÓN PREFERENCIAL DE TRANSCRITOS POR EIF4E Y EIF(ISO).....	29
3.2 PAPEL DE LOS FACTORES EIF4E Y EIF(ISO)4E DURANTE EL ESTRÉS POR CONGELAMIENTO	30
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	32
5. HIPÓTESIS	33
6. OBJETIVO GENERAL	33
7. OBJETIVOS PARTICULARES	33
8. METODOLOGÍA	34
8.1 ELABORACIÓN DE UNA PLANTA MUTANTE PARA <i>EIF4E</i> MEDIANTE CRISPR-CAS9	34
8.1.1 DISEÑO Y ELABORACIÓN DE VECTORES	34
8.1.2 TRANSFORMACIÓN DE <i>AGROBACTERIUM TUMEFASCIENS</i>	36
8.1.3 TRANSFORMACIÓN DE <i>A. THALIANA</i> POR FLORAL DIP	37
8.1.4 SIEMBRA DE <i>A. THALIANA</i> EN MEDIO DE CULTIVO	38
8.1.5 SELECCIÓN DE PLANTAS MUTANTES	39
8.1.6 DETECCIÓN DE MUTACIONES EN EL GEN DE <i>EIF4E</i>	40
8.1.7 CLONACIÓN DEL PRIMER EXÓN DE EIF4E EN EL pGEM®-T EASY VECTOR SYSTEM... 43	
8.2 EVALUACIÓN FENOTÍPICA DE UNA PLANTA MUTANTE PARA EIF4E (SALK 145583) EN CONDICIONES DE ESTRÉS POR CONGELAMIENTO	45
8.2.1 SIEMBRA DE <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i>	45
8.2.2 PROTOCOLO DE ESTRÉS POR CONGELAMIENTO EN PLANTAS DE 5 SEMANAS	45
8.2.3 PROTOCOLO DE ESTRÉS POR CONGELAMIENTO EN PLANTAS DE 8 SEMANAS	46
8.2.5 CORROBORACIÓN DE AUSENCIA DE TRANSCRITO (PLANTAS <i>ATEIF4E-1</i>)	49
9. RESULTADOS	53
9.1 SELECCIÓN DE LOS SGRNAs MÁS ADECUADOS PARA LA EDICIÓN DE EIF4E MEDIANTE CRISPR-CAS9	53

9.2 DESPUÉS DE 3 TRASFORMACIONES POR FLORAL-DIP SE OBTUVIERON 7 PLANTAS CANDIDATAS A MUTANTES	57
9.3 LAS PLANTAS MUTANTES DE LOS DISTINTOS FACTORES 4E PRESENTAN RESPUESTAS DISTINTAS ANTE EL ESTRÉS CONGELANTE	65
9.3.1 LAS MUTANTES Y SOBREEXPRESORAS DE LOS FACTORES 4E CONSERVAN LA INSERCIÓN DE T-DNA Y TRANSPOSONES ESENCIALES PARA SU SILENCIAMIENTO O SOBREEXPRESIÓN. 65	
9.3.2 LAS PLANTAS SALK-145583 CARECEN DEL TRASCRITO QUE GENERA A LA PROTEÍNA EIF4E.....	68
9.3.3 LA MUTACIÓN DE EIF(ISO)4E Y EIF4E RESULTA DETRIMENTAL PARA LA RESISTENCIA A ESTRÉS CONGELANTE EN PLANTAS DE 5 SEMANAS DE EDAD	69
9.3.4 EN PLANTAS DE 8 SEMANAS DE EDAD, LA MUTACIÓN DE EIF(ISO)4E RESULTA DETRIMENTAL PARA LA RESISTENCIA A ESTRÉS CONGELANTE, PERO NO ASÍ LA MUTACIÓN DE EIF4E	73
10. DISCUSIÓN	75
10.1 DIFICULTADES ENFRENTADAS DURANTE LA EDICIÓN DE <i>ATEIF4E</i> POR CRISPR-CAS9.	75
10.2 LOS FACTORES <i>EIF4E</i> Y <i>EIF(ISO)4E</i> MUESTRAN DIFERENTE RELEVANCIA PARA RESISTIR TEMPERATURAS CONGELANTES EN <i>A. THALIANA</i>	78
11. CONCLUSIONES	83
12. PERSPECTIVAS	83
13. ANEXOS	84
13.1. VECTOR PHSE401 (ADDGENE, PLÁSMIDO # 62201).....	84
13.2 OLIGONUCLEÓTIDOS	86
13.3 POSICIÓN EN EL GENOMA DE <i>A. THALIANA</i> DE OLIGONUCLEÓTIDOS PARA CORROBORACIÓN DE MUTANTES.....	88
13.4 FENOTIPOS DE ESTRÉS POR CONGELAMIENTO.....	91
13.5 MAPAS DE EXPRESIÓN DE TRASCRITOS DE LAS ISOFORMAS DE EIF4E.....	98
14. REFERENCIAS	100

FIGURAS

Figura 1. Esquema de la ruta de inicio de la traducción..	13
Figura 2. Etapa de elongación.....	14
Figura 3. Etapa de terminación.....	15
Figura 4. Estructura tridimensional del factor <i>eIF4E</i>	16
Figura 5. Estructura tridimensional de las 5 isoformas de <i>eIF4E</i>	19
Figura 6. Esquema de la función del sistema CRISPR-Cas en bacterias.....	24
Figura 7. Mecanismo de acción del sistema CRISPR-Cas9.	25
Figura 8. Esquema de la inserción del transposón en la secuencia codificante de <i>eIF(iso)4E</i>	27
Figura 9. Esquema de la mutación generada en plantas <i>cum1-1</i>	28
Figura 10. Esquema de plantas mutantes para el factor <i>eIF4E</i> (<i>At4g1804</i>)	28
Figura 11. Expresión transcripcional de <i>eIF4E</i> y <i>eIF(iso)4E</i> en plantas WT de 8 semanas de edad ...	30
Figura 12. Fenotipo de plantas no aclimatadas	31
Figura 13. Supervivencia de plantas 30 días después de ser sometidas a estrés por congelamiento. ...	31
Figura 14. Diagrama del protocolo de estrés congelante para plantas de 5 semanas.....	46
Figura 15. Escala de deterioro para plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> de 5 semanas de edad	46
Figura 16. Diagrama del protocolo de estrés congelante para plantas de 8 semanas.....	47
Figura 17. Escala de grado de daño post estrés en plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> de 8 semanas.....	47
Figura 18. Placas de medio LB con kanamicina y espectinomicina.	55
Figura 19. Alineamiento de los resultados obtenidos de la secuenciación de los 6 plásmidos que contienen un sgRNA cada uno.....	56
Figura 20. Fenotipo de selección positiva al sembrarse en medio MS con higromicina 15 µg/ml.....	57
Figura 21. Curva de diferencia de temperaturas de fusión (plantas de la tercera transformación).	59
Figura 22. Alineamiento de secuencia WT de <i>eIF4E</i> con la secuencia obtenida por secuenciación...	61
Figura 23. Curva de diferencia de temperaturas de fusión (plantas de la cuarta transformación)..	62
Figura 24. Resultados de la secuenciación de plantas 3, 6, 13, 11 y 14.....	63
Figura 25. Aminoácidos resultantes de las secuencias obtenidas	64
Figura 26. Corroboración de presencia de transposon que genera plantas mutantes	66
Figura 27. Corroboración de la presencia de cDNA en el genoma que genera sobreexpresión de <i>eIF4E</i>	67
Figura 28. Corroboración de inserción de T-DNA que genera mutantes para <i>eIF4E</i>	68
Figura 29. Productos de PCR para la amplificación de <i>ACT1</i> y <i>eIF4E</i>	69
Figura 30. Fenotipo de afectación de plantas de 5 semanas de edad (1, 2 y 3 horas de estrés).	70
Figura 31. Efecto del estrés congelante a diferentes tiempos de incubación.....	71
Figura 32. Efecto del estrés congelante (1 hora) en el exterior de las plantas.	72
Figura 33. Fenotipo representativo de plantas no aclimatadas 8 semanas de edad.....	73
Figura 34. Grado de deterioro promedio de las plantas de 8 semanas de edad.....	74

Figura 35. Mapa del plásmido pHSE401	84
Figura 36. Secuencia correspondiente al casete de expresión de sgRNA.....	85
Figura 37. Secuencia del casete de expresión del sgRNA una vez que se ha ligado el sgRNA	85
Figura 38. Posición de los cebadores en el locus de <i>eIF4E</i> (At4g18040).....	88
Figura 39. Posición de los cebadores en el locus de <i>eIF(iso)4E</i>	88
Figura 40. Posición de cebadores para DNA y cDNA de <i>eIF4E</i> (At4g18040).	89
Figura 41. Posición en el locus de <i>eIF4E</i> de los cebadores para amplificar los exones 1, 2 y 3	90
Figura 42. Réplica 2 (5 semanas).....	91
Figura 43. Réplica 3 (5 semanas).....	91
Figura 44. Réplica 4 (5 semanas).....	92
Figura 45. Réplica 5 (5 semanas).....	92
Figura 46. Réplica 6 (5 semanas).....	93
Figura 47. WT réplica 1 (8 semanas).....	94
Figura 48. <i>AteIF4E-1</i> réplica 1 (8 semanas)	94
Figura 49. <i>AteIF(iso)4E-1</i> réplica 1 (8 semanas).....	95
Figura 50. <i>35S::eIF4E</i> réplica 1 (8 semanas).....	95
Figura 51. WT réplica 2 (8 semanas).....	96
Figura 52. <i>AteIF4E-1</i> réplica 2 (8 semanas).....	96
Figura 53. <i>AteIF(iso)4E-1</i> réplica 2 (8 semanas).....	97
Figura 54. <i>35S::eIF4E</i> réplica 2 (8 semanas).....	97
Figura 55. Expresión del transcrito de <i>eIF4E</i> (At4g18040).....	98
Figura 56. Expresión del transcrito de <i>eIF(iso)4E</i> (At5g35620)	98
Figura 57. Expresión del transcrito de <i>eIF4E1b</i> (At1g29550).....	99
Figura 58. Expresión del transcrito de <i>eIF4E1c</i> (At1g29590).....	99

LISTA DE ABREVIATURAS

- **CRISPR-Cas9**- Repeticiones palindrómicas cortas, agrupadas y regularmente interespaciadas
(*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*)
- **CrRNA**- RNA CRISPR
- **cDNA**- DNA complementario
- **DNA**- Acido desoxirribonucleico
- **eIF**- Factores de inicio de la traducción eucariontes
- **HDR**- Reparación por homología directa
- **HRM**- Análisis de fusión de alta resolución
- **Kan**- Kanamicina
- **mRNA**- RNA mensajero
- **µl**- Microlitro
- **µg**- Microgramo
- **µM**- Micromolar
- **NHEJ**- Reparación por unión de extremos no homólogos
- **ORF**- Marco abierto de lectura
- **PAM**- Motivo adyacente al protoespaciador
- **PCR**- Reacción en cadena de la polimerasa
- **Rif**- Rifampicina
- **RNA**- ácido ribonucleico
- **sgRNA**- RNA guía (*single guide RNA*)
- **Spm**- Espectinomomicina
- **T-DNA** - DNA de transferencia
- **UTR**- Región no traducible del mRNA

1. RESUMEN

El estrés abiótico se define como las condiciones ambientales que reducen el crecimiento y rendimiento de las plantas por debajo de los niveles óptimos. Dichas condiciones ambientales adversas incluyen sequía, deficiencia de nutrientes, exceso de sal, metales tóxicos, calor y frío. Durante el estrés por temperaturas congelantes, las células regulan los procesos que consumen energía que, por lo regular, son vitales para el mantenimiento de la homeostasis, entre los que se encuentra la transcripción y la síntesis de proteínas. Dado que el factor *eIF4E* es un blanco importante de los mecanismos de regulación traduccional, en este estudio se evaluó su papel durante la respuesta de *Arabidopsis thaliana* a condiciones de estrés congelante.

Se utilizó el sistema CRISPR-Cas9 para la obtención de una mutante nula del factor *eIF4E* (At4g18040). Se realizaron 4 transformaciones independientes de individuos de *A. thaliana*, esperando encontrar plantas con inserciones o deleciones que generaran un corrimiento del marco de lectura del gen que codifica a *eIF4E*, sin embargo únicamente se obtuvieron plantas con mutaciones sinónimas en la región blanco, mismas que no provocaban cambios a nivel de proteína.

Por otra parte, se evaluaron plantas WT Col-0 y mutantes por inserción de T-DNA de los factores *eIF4E* (*AteIF4E-1*, *AteIF(iso)4E-1*) y una mutante sobreexpresora de *eIF4E* obtenida sobre el fondo genético de Col-0 (*35S::AteIF4E*) de 5 y 8 semanas de edad en condiciones de estrés congelante.

Tomando como base el porcentaje de hojas cloróticas y/o muertas presentes en las plantas después del estrés, se obtuvo que plantas *AteIF4E-1* mostraron un daño mayor que las plantas WT (*), mientras que las plantas *AteIF(iso)4E-1* presentaron un daño aún más significativo con respecto las plantas WT (**) a las 5 semanas de edad, mientras que a las 8 semanas las plantas WT, *AteIF(iso)4E-1* y *35S::AteIF4E* mostraron un daño similar entre ellas y la planta *AteIF4E-1* presentó un daño menor aunque no significativo. Estos datos nos sugieren que las isoformas del factor *eIF4E* no son redundantes y apoyan el papel de *eIF4E* y *eIF(iso)4E* en la traducción selectiva de mRNAs durante condiciones de estrés.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 ESTRÉS ABIÓTICO EN PLANTAS

Las plantas viven en entornos con condiciones ambientales que cambian constantemente, las cuales en muchas ocasiones resultan poco favorables para su desarrollo y crecimiento; estas condiciones adversas son divididas en estrés biótico y estrés abiótico. El estrés biótico engloba a las infecciones por patógenos y la herbivoría, mientras que el estrés abiótico se refiere a las condiciones ambientales adversas que afectan el desarrollo de las plantas (Cramer *et al.*, 2011). Dichas condiciones adversas incluyen sequía, deficiencia de nutrientes, exceso de sal, presencia de metales nocivos, calor y frío, siendo la sequía, salinidad y la temperatura los factores ambientales los que más afectan la distribución de las plantas y, por lo tanto, el rendimiento de los cultivos (Zhu, 2016).

Las plantas responden de diversas formas a las condiciones estresantes, por ejemplo, mediante el cierre de estomas, reducción de la fotosíntesis, incremento de especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés *Reactive Oxygen Species*), reducción del tamaño foliar e incremento de la longitud de la raíz (Maiti y Satya, 2014). En el caso específico de las temperaturas congelantes, se produce daño en la membrana celular de las plantas debido a la formación de hielo que afecta el movimiento de agua, además de que hay una disminución en el potencial hídrico en el entorno, lo que aumenta la osmolaridad al interior de las células (Thomashow, 1999). Así mismo, el frío induce la producción de ROS que contribuyen al daño membranal (McKersie y Bowley, 1997) y existe evidencia de que se genera la desnaturalización de proteínas, lo que podría desencadenar en daño celular (Guy *et al.*, 1998). Es por esto que las plantas que se distribuyen en zonas templadas han desarrollado mecanismos para minimizar los efectos de las temperaturas bajas mediante un proceso denominado aclimatación, mismo que se establece durante el otoño cuando las temperaturas descienden por debajo de los 10°C (Ruelland *et al.*, 2009; Gusta, 2005). De esta manera se induce la síntesis de compuestos crioprotectores que se acumulan para prevenir la ruptura y desnaturalización de las membranas ante condiciones congelantes (Takahashi *et al.*, 2018). Se piensa que el aumento de mecanismos antioxidantes, aumento en niveles de sacarosa y de azúcares simples en el espacio apoplástico, así

como la inducción de genes que codifican para chaperonas, podrían poseer efectos protectores (McKersie y Bowley, 1997).

Una de las respuestas más importantes de las células ante el estrés involucra el cese de procesos que consumen energía, por lo regular vitales para el mantenimiento de la homeostasis, entre los que se encuentra la transcripción y la síntesis de proteínas (Holcik y Sonenberg, 2005), por lo que en condiciones desfavorables la expresión de genes se encuentra sumamente regulada a nivel transcripcional y postranscripcional.

Las plantas tolerantes a las temperaturas frías reprograman su transcriptoma en respuesta a la temperatura, es así que los genes regulados por frío constituyen del 8 al 20% del genoma de *Arabidopsis thaliana*. Debido al requerimiento de moléculas protectoras, en el proceso de aclimatación se inducen cambios importantes en el transcriptoma de las plantas, encontrándose la expresión de factores transcripcionales que a su vez regulan a genes que confieren protección ante las temperaturas congelantes, tal es el caso de los factores DREB (*Dehydration Responsive Element Binding Factor*), mismos que activan la expresión de genes de respuesta a estrés abiótico mediante su unión específica a elementos en *cis*, localizados en las regiones promotoras de los genes blanco, denominados DRE/CRT (*Dehydration-responsive element*) (Mizoi *et al.*, 2012). Un grupo de genes importantes para la contención de las temperaturas congelantes son los genes COR (*Cold Response*), que se inducen con la expresión del activador transcripcional CBF1 (*CTR/DRE Binding Factor 1*) en el promotor de los mismos, logrando así su activación. Existen 4 familias, cada una con dos genes en tandem, de los que al menos uno se induce por temperaturas bajas y condiciones de déficit hídrico (deseccación, alta salinidad y ABA). Un gen de gran importancia para la contención al frío es *COR15a*, que posee expresión constitutiva y se encuentra involucrado en la estabilización de las membranas. En condiciones fisiológicas las proteínas COR15 no se encuentran estructuradas, pero frente a la deshidratación, cambian su conformación a α -hélices, con lo que son capaces de interactuar con la membrana interna del cloroplasto. Esta asociación mejora el plegamiento de 15, exponiendo una fase hidrófoba capaz de interactuar con lípidos de membrana promoviendo su estabilización (Thalhammer *et al.*, 2014; Tomashow, 1998).

Por otra parte, la traducción es un proceso que consume una cantidad importante de energía celular y es uno de los blancos principales a ser inhibidos en respuesta a muchos tipos de estrés celular (Holcik y Sonenberg, 2005). La regulación de la traducción permite la modulación delicada de la síntesis de proteínas sintetizadas a partir de mRNAs; la eficiencia traduccional de un mRNA puede ser estimada mediante la cantidad de ribosomas asociados a él: los que reclutan a gran cantidad de ribosomas son aquellos que se encuentran activamente traducidos y forman complejos denominados poli-ribosomas. Los patrones de traducción diferencial de mRNAs cambian en respuesta al tipo de tejido, estadio del desarrollo o estímulos ambientales, mismos que incluyen a las condiciones de estrés abiótico (Kawaguchi y Bailey-Serres, 2002). Durante el estrés, la síntesis global de proteínas se encuentra comprometida pero existen proteínas que continúan siendo sintetizadas para mantener a las células vivas, ya que son capaces de mitigar el daño causado por el estrés o bien de permitir a las células tolerar las condiciones adversas de manera efectiva (Holcik y Sonenberg, 2005). Se tiene conocimiento de que en condiciones de estrés por calor, la traducción de la mayoría de los mensajeros disminuye al menos en un 50%, pero no así los transcritos relevantes para el mantenimiento de la homeostasis celular, mismos que aparentemente son seleccionados por el contenido de G+C y la longitud del transcrito (Yanguéz *et al.*, 2013).

Existen características en los mRNAs que contribuyen a su regulación traduccional bajo condiciones de estrés, mismo que se ha estudiado usando perfiles polisomales. Se ha encontrado que la traducción de un mRNA se encuentra afectada por elementos reguladores localizados en la región 5'UTR y 3'UTR, además de que nucleótidos cerca del codón de inicio también contribuyen a la eficiencia traduccional (Floris *et al.*, 2009).

2.2 PROCESO DE TRADUCCIÓN EUCARIONTE

El proceso de traducción involucra 4 pasos sucesivos: iniciación, elongación, terminación y reciclamiento, los cuales se encuentran controlados por una gran cantidad de factores reguladores (Van der Kelen, 2009). De las 4 fases mencionadas, la iniciación es la más compleja y regulada (Dutt *et al.*, 2015); en este paso los factores eucarióticos de inicio de la traducción como *eIF4E*, quien reconoce la estructura 5' Cap de los mRNA, y *eIF4A*, una helicasa, se asocian a la proteína de anclaje *eIF4G* para formar el complejo *eIF4F*, que posteriormente se une al *eIF4B* para estabilizar la unión del ATP con *eIF4A*. Además, *eIF4G* recluta a la proteína de unión a poli(A) (PABP), promoviendo así la circularización del mensajero y estimulando la actividad de la helicasa *eIF4A*. Por otra parte, *eIF4G* recluta al factor *eIF3* que se encuentra unido al complejo de pre-inicio (GTP, Met-tRNA y *eIF2 $\alpha\beta\gamma$*), al complejo multifactorial (*eIF5*, *EIF1* y *eIF1A*) y a la subunidad ribosomal 40S, lo cual permite la formación del complejo de inicio 48S que recorre al mRNA de 5' a 3' en busca del codón de inicio AUG. Una vez reconocido, se hidroliza el GTP unido a *eIF2 α* por medio de la actividad GTPasa de la subunidad γ y la asistencia de *eIF5*, ocurriendo la disociación de la mayoría de los factores de inicio y la unión de la subunidad ribosomal 60S para formar el complejo de inicio 80S y comenzar la etapa de elongación (Figura 1). Cabe destacar que el complejo *eIF4F* se mantiene unido para permitir el reciclamiento de la maquinaria de inicio (Martínez-Silva y Dinkova, 2010).

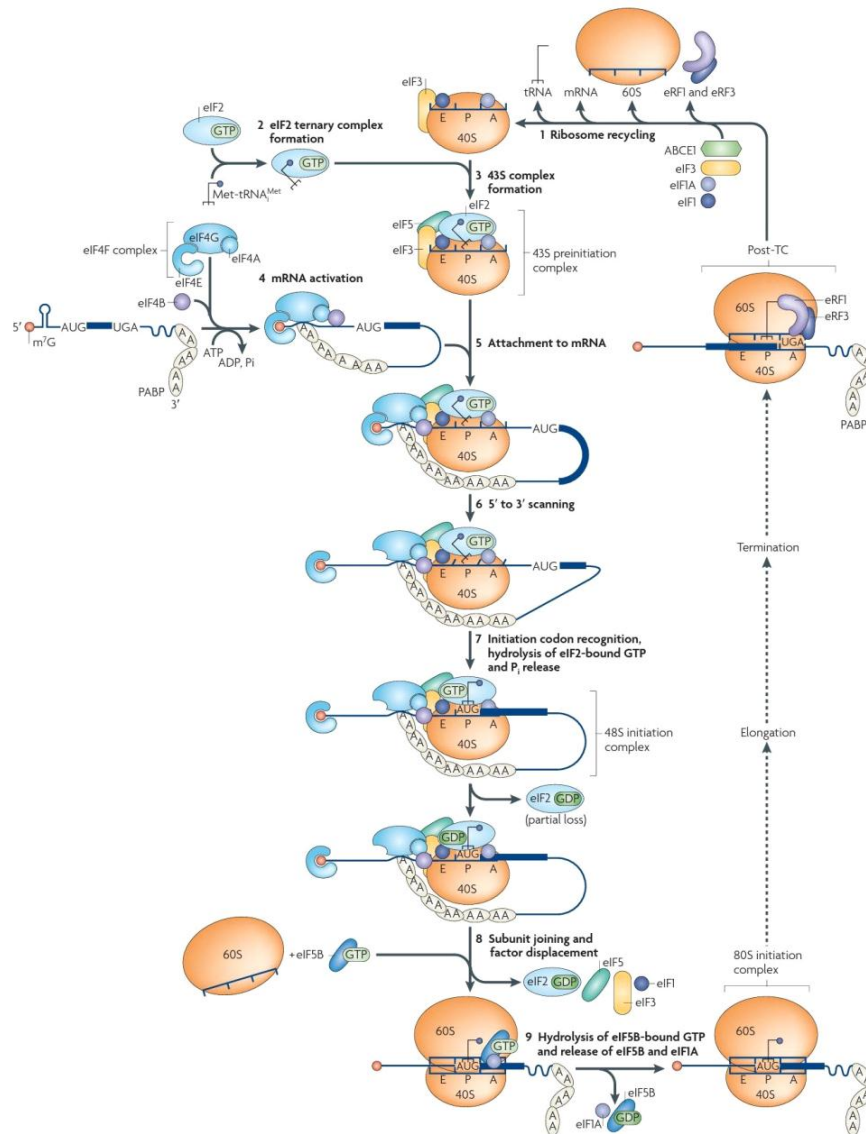


Figura 1. Esquema de la ruta de inicio de la traducción. El complejo eIF4F se une al mRNA a través de la estructura cap en el extremo 5'. Posteriormente, se ancla el complejo de pre-inicio 43S, que contiene la subunidad ribosomal 40S, eIF3 y el complejo ternario eIF2. Todo el conjunto recorre al mensajero en dirección 5'a 3'en busca del codón de inicio (AUG) y, una vez reconocido, se provoca la hidrólisis de GTP unido a eIF2, llevando a la formación del complejo de inicio 48S. Posteriormente, se une la subunidad ribosomal 60S y se desplazan a todos los factores, se hidroliza eIF5B y se libera junto con eIF1A, con lo que queda conformado el complejo de iniciación 80S. El ciclo traduccional continúa hacia la elongación y terminación, la cual lleva a la separación de las subunidades ribosomales y el posterior reciclamiento de la maquinaria traduccional (Tomado de Jackson *et al.*, 2010).

En la etapa de elongación es requerido el mantenimiento del marco de lectura, la entrega de los tRNAs al ribosoma y la formación de los enlaces peptídicos, siendo necesarios únicamente 3 factores: eEF1A, eEF1B y eEF2 (Martínez-Silva y Dinkova, 2010). Cuando el ribosoma se sitúa en el mensajero con el anticodón del tRNA iniciador (Met) en el sitio P, el segundo codón del ORF se encuentra en el sitio A (aceptor) en espera del aminoacil-tRNA. El factor eEF1A se une al aminoacil-tRNA de manera dependiente de GTP y dirige al tRNA hacia el sitio A del ribosoma (Figura 2). El reconocimiento del codón promueve la hidrólisis de GTP por eE1A, liberándose y permitiendo que el tRNA se acomode en el sitio A. Posteriormente se forma el enlace peptídico con el peptidil- tRNA del sitio P. La translocación del tRNA a los sitios E y P requiere al factor eEF2 unido a GTP y la hidrólisis de dicha molécula energética. En el estado de post translocación, un tRNA desacetilado ocupa el sitio E y el peptidil-tRNA el sitio P. El sitio A queda vacío y disponible para la unión del siguiente aminoacil-tRNA en complejo con eEF1A (Dever y Green, 2012).

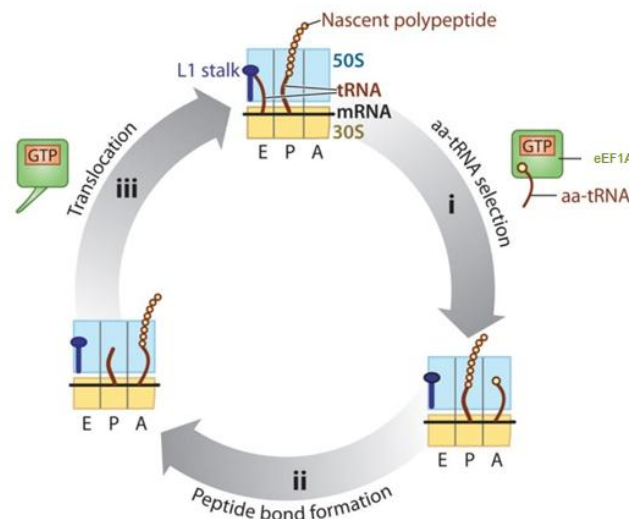


Figura 2. Etapa de elongación. Se presentan los pasos de la fase de elongación. Selección del aminoacil-tRNA mediada por el factor eEF1A, la formación del enlace peptídico y la translocación del mensajero mediada por EF2 (Tomado de Frank y González, 2010)

Por su parte, la fase de terminación se lleva a cabo cuando un codón de paro entra al sitio A del ribosoma mediado por los factores de liberación eRF1 y eRF3 (Dever y Green, 2012). eRF1 es responsable de reconocer los codones de paro e inducir la liberación del polipéptido nacido del sitio P, mientras que eRF3 es una GTPasa que media el proceso de liberación del polipéptido (Figura 3). El complejo (post-TC) se recicla después de la liberación de tRNA desactivado y del mensajero de la subunidad 40S. Finalmente, el reciclamiento de la maquinaria permite que los ribosomas y los mRNAs participen en múltiples ciclos de traducción (Hellen, 2018)

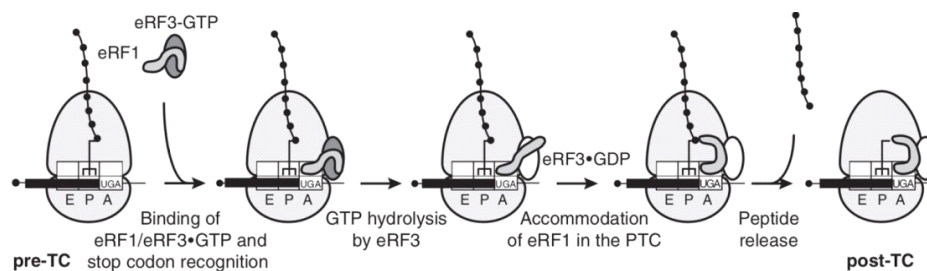


Figura 3. Etapa de terminación. Reconocimiento del codón de paro por eRF1, hidrólisis de GTP por eRF3 y liberación del péptido (Tomado de Hellen, 2018).

2.3 EL FACTOR EUCARIONTE DE INICIO DE LA TRADUCCIÓN 4E (EIF4E).

Durante la fase inicial de la traducción, el factor eucarionte de inicio de la traducción 4E (*eIF4E*) reconoce y se une a la estructura *cap* (7mGpppN) presente en la mayoría de los mRNAs eucariontes, resultando fundamental para el reclutamiento de mRNAs hacia el ribosoma (Martínez-Silva y Dinkova, 2010; Fischer, 2009).

El factor *eIF4E* es una proteína conservada a lo largo de todos los grupos de eucariontes (Poulin y Sonenberg, 2013). Su estructura consiste en ocho hojas β que se apoyan sobre tres hélices α , con lo que se forma una estructura de “mano ahuecada” (Joshi *et al.*, 2005), a través de cuya cara convexa se une al resto de los factores de inicio con los que interactúa, mientras que con la cara cóncava reconoce a *cap*, que ocupa una ranura estrecha cuya unión está dada por interacciones de tipo π - π entre las bases y grupos indol de Trp56 y Trp102, mismas que se estabilizan por enlaces de hidrógeno entre guanina-Trp 102 y Glu 103 (Figura 4). Las interacciones directas se producen entre el residuo Trp 56

y el grupo ribosa, entre los residuos Arg 157 y Leu 162 y los átomos de oxígeno α y β -fosfato. Finalmente, el Trp 166 interactúa con el N⁷-metilo de la estructura *cap* (Rhoads *et al.*, 2007). Una forma similar de unión se presenta en la proteína viral VP39, una metiltransferasa que metila el hidroxilo 2' de la ribosa del *cap* y actúa como factor de procesividad de la polimerasa viral (Gingras *et al.*, 1999).

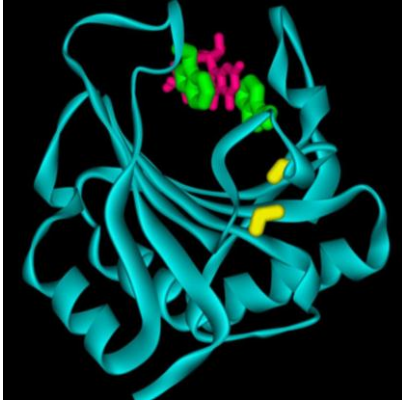


Figura 4. Estructura tridimensional del factor eIF4E de *Triticum aestivum*. En verde se visualizan los triptófanos esenciales para la unión a *cap*, mientras que la estructura m7GDP (análogo a m7GpppN) se muestra en color rosa (Tomado de Monzingo *et al.*, 2007).

El inicio de la traducción de mamíferos ha sido ampliamente estudiado. Su regulación involucra la interacción de *eIF4E* con proteínas de unión a 4E (4E-BPs), mismas que poseen el dominio conservado de unión a *eIF4E* presente también en eIF4G, por lo que el mecanismo de acción se basa en su capacidad por competir con la interacción eIF4E-eIF4G impidiendo el reclutamiento del ribosoma hacia la estructura *cap*. Este mecanismo se regula por el estado de fosforilación de las 4E-BPs: bajo condiciones fisiológicas, la cinasa TOR (*Target of rapamycin*) fosforila a las 4E-BPs, lo que impide su interacción con *eIF4E*. En respuesta a estrés, TOR es inhibido y las 4E-BPs se desfosforilan, por lo que su afinidad por *eIF4E* aumenta inhibiendo así la traducción (Clemens, 2001). Sin embargo, hasta ahora no se han encontrado proteínas homólogas a las 4E-BP de animales en el genoma de las plantas, capaces de regular la actividad del factor *eIF4E* y, por lo tanto, del inicio de la traducción.

2.4 ISOFORMAS DEL FACTOR *eIF4E*. ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DIFERENCIAL.

Existen gran variedad de isoformas del factor *eIF4E* en animales y plantas (Pirat *et al.*, 2002). En el caso de *A. thaliana*, se tiene conocimiento de cinco: *eIF4E* (At4g18040), *eIF(iso)4E* (At5g35620), *eIF4E2/eIF4E1c* (At1g29590), *eIF4E3/eIF4E1b* (At1g29550) y la proteína novedosa de unión a cap nCBP (At5g18110), recientemente renombrada como 4E-HP (*4E-homologous protein*), acorde a la nomenclatura designada para esta clase de isoformas en otros organismos (Kropiwnicka *et al.*, 2015). Los miembros de esta familia se clasifican en 3 clases: *eIF4E-I*, *eIF4E-II* y *eIF4E-III*. Los miembros de la clase I cuentan con los residuos Trp43 y Trp56 conservados (relativo a la proteína de *Homo sapiens*), la clase II tiene ambos residuos sustituidos por Tyr o Phe y la clase III solo tiene sustituido Trp56 por Tyr, Phe o Cys (Martinez-Silva *et al.*, 2012). En plantas únicamente existen miembros de la clase I y II.

En organismos que cuentan con varios miembros de la familia *eIF4E* se sabe que generalmente uno es ubicuo, mientras que el resto se activa en tejidos o etapas del desarrollo específicas. Además, se ha demostrado que presentan selectividad traduccional, por lo que se sugiere que no poseen una función redundante (Martínez-Silva y Dinkova, 2010). Las dos isoformas canónicas presentes en plantas (*eIF4E* y *eIF(iso)4E*) han sido las más estudiadas con la finalidad de dilucidar sus funciones y expresión específicas; *eIF4E* se expresa en todos los tejidos, exceptuando una zona de especialización de la raíz (Rodríguez *et al.*, 1998). Por otra parte, tanto la expresión del mensajero como la acumulación de la proteína de *eIF(iso)4E* es alta en raíces, órganos florales y tejidos en desarrollo (Bush *et al.*, 2009). Estas formas canónicas tienen interacciones específicas con otros factores, formando así dos complejos principales: *eIF4F* y *eIF(iso)4F*. Mientras que *eIF4E* y *eIF(iso)4E* poseen un 50% de similitud a nivel de secuencia de aminoácidos y masa molecular aproximada de 24kDa, las proteínas *eIF4G* y *eIF(iso)4G* son sustancialmente distintas (180 kDa y 86 kDa) (Browning, 1996). Por otro lado, *eIF(iso)4G* carece de una parte importante de la secuencia en el dominio N terminal, características que sugieren que el rol y la regulación de estos complejos podría ser distinta (Browning, 2004).

Se ha identificado que la unión al mRNA del complejo eIF4F es más fuerte a un pH de 8.0, mientras que el pH óptimo para eIF(iso)4F es de 7.6. Además, eIF4E y eiF(iso)4E, en sus respectivos complejos, son capaces de discriminar la longitud y estructura secundaria de la 5' UTR; mientras eIF4E reconoce secuencias largas y estructuradas, eIF(iso)4E se une a secuencias cortas y sin estructura secundaria (Carberry y Goss, 1991).

La proteína novedosa de unión a *cap* (nCBP) también se encuentra entre los miembros más estudiados en plantas. Se ha observado que tiene implicaciones en el proceso de transición a la floración y se conoce que puede unirse tanto a eIF4G como a eIF(iso)4G. Por su parte, eIF4E1c no se ha detectado a en análisis de expresión globales, mientras que eIF4E1b se expresa en bajos niveles en gran parte de los tejidos, siendo más abundante en aquellos involucrados en la reproducción. A pesar de que poseen actividad traduccional en levaduras *in vitro*, su baja afinidad por eIF4G y sus bajos niveles de expresión, hacen que sea poco probable que contribuyan a la traducción en tejidos vegetales *in vivo* (Patrick *et al.*, 2014).

Cada una de las isoformas de eIF4E presenta una estructura ligeramente distinta aunque se conserva, en todos los casos, la estructura canónica tipo de eIF4E (Figura 5). A pesar de ello, cuentan con afinidades diferentes por el *cap*, presentándose un valor mayor en eIF4E y eIF4E1c. Aun cuando eIF4E1b y eIF4E1c poseen 95% de identidad en secuencia de aminoácidos, la mayoría de los residuos que difieren se localizan en regiones cercanas al sitio de unión a *cap*, y se cree que la principal diferencia en su eficiencia de unión se debe al reemplazo de los residuos Phe147 y Thr145 en eIF4E1c por Met147 y Ser145 en eIF4E1b (Kropinwnicka *et al.*, 2014).

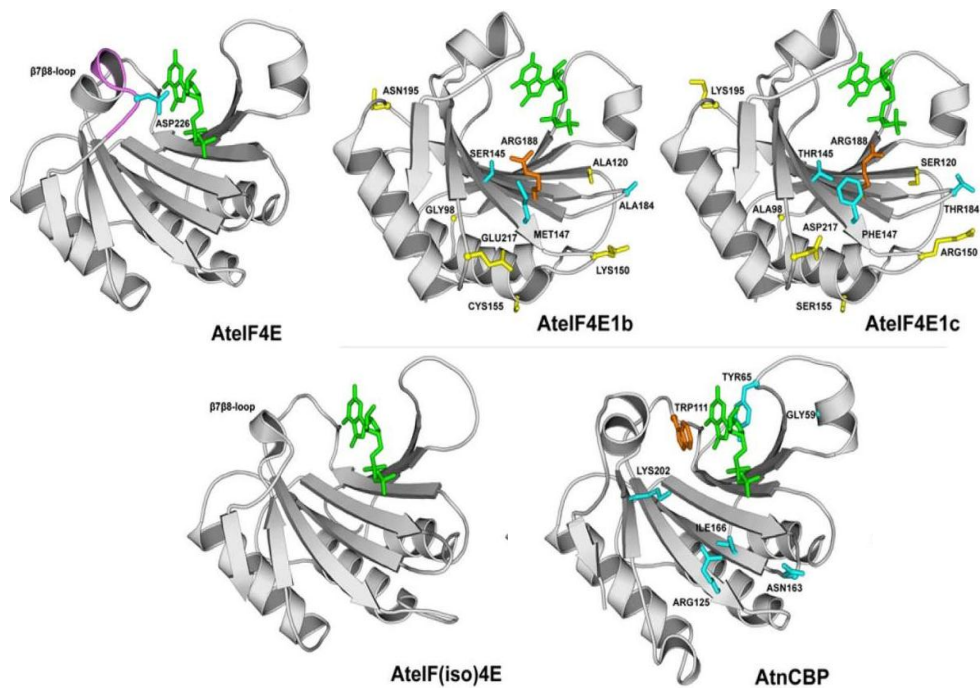


Figura 5. Estructura tridimensional de las 5 isoformas de eIF4E en *Arabidopsis thaliana*. Se resaltan con colores las principales diferencias de aminoácidos que determinan la afinidad a la estructura cap m7GpppN de cada uno de los miembros de la familia 4E (Tomado de Kropiwnicka *et al.*, 2015).

El segundo factor canónico, eIF(iso)4E, posee una eficiencia que es de 4 a 10 veces más débil que la de eIF4E, situación que puede deberse al acortamiento del asa entre las hojas beta 7 y 8, mismo que posee una longitud mayor a 6 aminoácidos en eIF4E, eIF4E1b y eIF4E1c y forma el borde de la cavidad que se une a *cap*. Además, eIF(iso)4E no posee el residuo Asp226 que si está conservado en eIF4E, mismo que interactúa con la ribosa del N(7)-metilguanosa. Por su parte, nCBP interactúa débilmente con la estructura *cap* y posee afinidades comparables a las de eIF(iso)4E para los análogos a *cap* metilados. Finalmente, eIF(iso)4E carece del residuo Arg183 de eIF4E que es el que interactúa con el motivo fosfato de *cap* y que se encuentra sustituido por Ile166. Esto puede compensarse parcialmente por los residuos Arg125 y Lys202, que se encuentran sustituidos por aminoácidos sin carga en los otros tres miembros eIF4E, eIF4E1b y eIF4E1c (Kropiwnicka *et al.*, 2014).

Entre las señales de control traduccional se encuentran los marcos abiertos de lectura río arriba (uORFs) que se localizan en la 5'UTR. La presencia de estas secuencias modula la eficiencia traduccional del ORF principal debido al reclutamiento preferencial de ribosomas. La longitud del ORF, en el contexto nucleotídico del codón de inicio y las secuencias del ORF y uORF afectan la eficiencia traduccional (Meijer y Thomas, 2002). Así mismo, otras características que también son importantes para la elección de los transcritos que serán traducidos son la estructura secundaria adoptada por el mRNA, la presencia de poliadenilación y la estructura *cap* (Merchante *et al.*, 2017). En plantas ha sido poco estudiado el papel del factor eIF4E en condiciones de estrés abiótico, sin embargo se conoce que es uno de los blancos más importantes para mecanismos de regulación traduccional por lo que es posible que posea un papel relevante durante el proceso de respuesta a las temperaturas congelantes.

2.5 MUTAGÉNESIS EN PLANTAS

Existen diversos métodos para generar mutantes de plantas de *A. thaliana* que sean de utilidad para el estudio de proteínas y genes en ciencia básica. Entre las estrategias más utilizadas se encuentran los RNAs interferentes (RNAi), la mutagénesis química y las basadas en la inserción de DNA exógeno como lo son elementos transponibles y el DNA transferible (T-DNA).

El RNA de interferencia (RNAi) es un mecanismo de regulación génica que limita el nivel de transcrito mediante la unión de un RNA pequeño con una secuencia complementaria al transcrito de interés, que puede inhibir la traducción o llevar el mRNA a una vía de degradación (Agrawal *et al.*, 2013). Este mecanismo de interferencia fue observado por primera vez en 1998 cuando se visualizó la generación de dobles cadenas de RNA en *Caenorhabditis elegans* que funcionaban como un mecanismo potente de interferencia génica. Posteriormente, se demostró que este sistema podría ser útil para generar mecanismos de regulación de transcritos de manera artificial y que podía emplearse tanto en mamíferos como en plantas. Sin embargo, entre sus desventajas se encuentra el hecho de que el silenciamiento de genes no es completo y, por lo tanto, se podrían generar proteínas funcionales. Se

han realizado estudios donde se demuestra que incluso un 5% o 10% de proteína puede ser suficiente para el mantenimiento de las funciones de las plantas silvestres (Sachse *et al.*, 2005).

Otra manera de inducir mutaciones es a través de mutágenos químicos, siendo el metanosulfonato de etilo (EMS) uno de los más utilizados. Este mutágeno es empleado sobre las semillas debido a que su aplicación resulta eficiente y los efectos pueden detectarse de manera sencilla. Usualmente causa mutaciones puntuales aunque también se han observado pérdidas de segmentos de cromosomas o deleciones (Okagaki *et al.*, 1991); además, el 99% de las veces induce cambios de C a T resultando en sustituciones de C/G a T/A. Los parámetros más importantes a tomar en cuenta para su utilización son la concentración, el tiempo de tratamiento y la temperatura (Alcántara *et al.*, 1996). La desventaja más importante de utilizar este método es que las mutaciones inducidas son completamente azarosas dentro del genoma de las plantas.

Por otra parte, los elementos transponibles son secuencias capaces de moverse de una localización a otra en el genoma. Se han identificado en todos los organismos y pueden tener una representación alta en el genoma de las diferentes especies. De manera natural, la movilización de estos elementos transponibles se denomina transposición y puede generar inactivación de genes, modular la expresión génica o inducir recombinaciones (Muñoz-López y García-Pérez, 2010) por lo que estos elementos han sido ampliamente utilizados como herramientas para inducir la interrupción de genes de manera artificial. Los transposones se dividen en dos grupos: elementos que se mueven vía escisión de DNA y los tipo II, donde se codifica para la enzima transposasa que genera rupturas de doble cadena, que ayudan a que el elemento sea escindido y reinsertado en una nueva localización (May y Martiensen, 2010). Los transposones son muy utilizados en genética reversa, un ejemplo de ello es la poblaciones Uniform Mu, descrita en 2007 por Settles *et al.*, mediante la cual se generan inserciones germinales de transposones que son estables a través de las generaciones; en este caso se encontró la desactivación de la 6-fosfogluconato deshidrogenasa que se evidenció a través del fenotipo de la semilla.

Por su parte, las mutaciones por inserción de T-DNA son utilizadas generalmente en genética reversa en *A. thaliana*. El DNA exógeno (5 a 25 kb de longitud) no solamente causa la interrupción del gen

en el cual se inserta, sino que además tienen secuencias que actúan como marcadores que sirven para la identificación de la mutación que ha causado (Patrick *et al.*, 1999). Para la generación de estas mutantes se ha insertado el T-DNA, en la mayoría de las veces, mediante transformaciones mediadas por *Agrobacterium tumefaciens*, una bacteria capaz de generar infecciones en gran cantidad de plantas. El T-DNA es acarreado en un plásmido Ti (Inductor de tumores) y se encuentra delimitado por repeticiones de 25pb que son elementos en *cis* necesarios para su procesamiento. Cualquier DNA entre esos bordes será transferido a las células (Zupan y Zambryzki, 1995) y se integrarán de manera aleatoria en el genoma; posteriormente se realiza un mapeo para determinar la región genómica en la que se insertó el T-DNA (Qu y Qin, 2014). La inserción no sólo interrumpirá la expresión de genes, sino que también puede funcionar como marcador ya que puede incluir elementos como el promotor 35S (*Cauliflower Mosaic Virus*) o genes reporteros (proteínas fluorescentes o reportero GUS) para identificar la mutación (Krysan *et al.*, 1999).

Desafortunadamente, al implementar estos sistemas las mutaciones obtenidas dependen en gran medida de condiciones azarosas, además de que el hecho de insertar regiones relativamente grandes que no corresponden al DNA del organismo podría generar una dinámica muy distinta de los componentes moleculares de los organismos. Una nueva técnica que no posee dichas desventajas es el sistema CRISPR-Cas9, que es altamente específico y no requiere la inserción de DNA exógeno en el genoma para el mantenimiento de las mutaciones generadas.

2.6 SISTEMA CRISPR-CAS9. FUNDAMENTOS E IMPLEMENTACIÓN COMO HERRAMIENTA BIOTECNOLÓGICA

El sistema CRISPR-Cas fue descrito inicialmente en 1987 como una serie de secuencias pequeñas repetidas y espaciadas en el genoma de *Escherichia coli* (Ishino *et al.*, 1987). Posteriormente, en el año 1993 se reconocieron secuencias similares en el genoma de arqueas (Mojica *et al.*, 1993). Hoy en día se sabe que el locus CRISPR (repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente espaciadas) se ha identificado en cerca del 84% de las arqueas y el 45% de las bacterias, además de que puede encontrarse tanto en arreglo dentro del cromosoma como en un plásmido de DNA (Rath *et al.*, 2015).

Fue en el año 2005 cuando se detectó que las secuencias dentro del *locus* poseían un origen viral (Mojica *et al.*, 2005), lo cual, aunado al descubrimiento de que el locus CRISPR se transcribe y a que la proteína Cas posee dominios de endonucleasa y helicasa, contribuyó a conocer que se trataba del único sistema inmune adaptativo bacteriano desconocido hasta el momento (Doudna y Charpentier, 2014; Hille y Charpentier, 2016).

Hoy en día se conoce que las bacterias que poseen el *locus* CRISPR pueden degradar genes exógenos provenientes de bacteriófagos, transposones y plásmidos (Liu *et al.*, 2017; Hille y Charpentier, 2016) mismos que son reconocidos y degradados dentro de las bacterias. Este sistema de defensa basado en CRISPR-Cas se divide en 3 fases: la primera es la adquisición, en la que el hospedero lleva a cabo la inserción de nuevos espaciadores (protoespaciadores) en el locus CRISPR provenientes de secuencias de DNA perteneciente a fagos o plásmido. La segunda fase es la expresión, que involucra que el sistema se encuentra listo para expresar los genes *cas* y transcribir a CRISPR en un pre-RNA que es procesado y madura a crRNA (CRISPR RNA) por acción de algunas proteínas Cas y factores accesorios. Finalmente, en la última etapa, denominada de interferencia, el ácido nucleico blanco es reconocido y destruido por la acción combinada del crRNA y las proteínas Cas (Figura 6) (Jore *et al.*, 2011; Rath *et al.*, 2015).

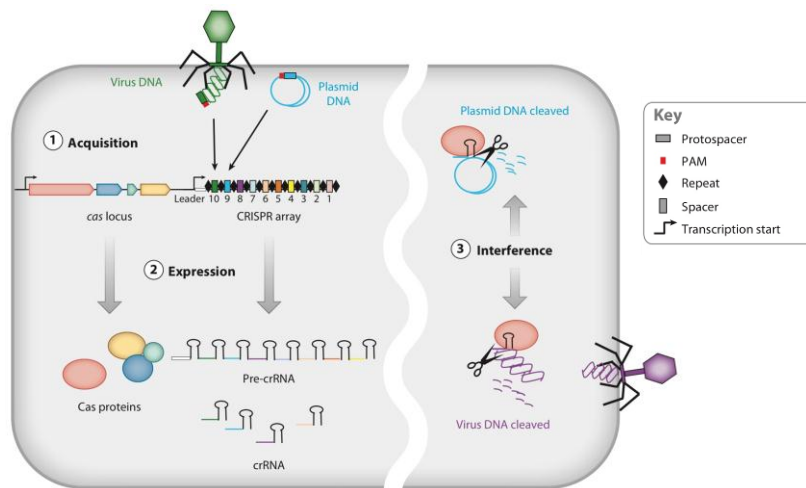


Figura 6. Esquema de la función del sistema CRISPR-Cas en bacterias. Se ejemplifican sus 4 fases: adquisición (1) donde ingresa el genoma viral o plasmídico a la bacteria y se integra al locus CRISPR, donde los ahora denominados “protoespaciadores” son separados mediante secuencias repetidas; la expresión (2) donde se generan las proteínas Cas y los pre-crRNAs con secuencias complementarias a las virales o plasmídicas; y la interferencia (3), donde en el sistema se asocia al genoma viral o plasmídico que vuelve a introducirse a la bacteria, realizando un corte de doble cadena 3 nucleótidos arriba de la secuencia PAM, misma que se encuentra adyacente a la región complementaria al protoespaciador (Tomado de Bhaya *et al.*, 2011)

En el año 2012 se descubrió que la proteína Cas9 es una endonucleasa guiada por RNA (Jinek *et al.*, 2012), por lo que puede ser programada para ser llevada hacia alguna región blanco deseada, donde inducirá DSBs (*Double-Strand Breaks*) en las células, actividad que es mediada por un RNA guía (sgRNA). El único requisito del sgRNA es que la región de 20 nucleótidos complementaria con el DNA blanco debe estar inmediatamente río arriba de una secuencia NGG (donde N es cualquier base), que se conoce como secuencia PAM (motivo adyacente al protoespaciador; por sus siglas en inglés *Protospacer Adjacent Motif*). Sin embargo, existe la posibilidad de la presencia de regiones que cuenten con un alto grado de similitud con la secuencia blanco (sitios *off-target*), lo que podría provocar apareamientos y en consecuencia mutaciones no deseadas, razón por la que la elección de un RNA guía con el menor número de sitios *off-target* es un paso fundamental para asegurar el éxito de la técnica.

Una vez que el sgRNA se aparea con la región blanco, la endonucleasa Cas9 realiza un corte de doble cadena 3 nucleótidos hacia el 5' de la secuencia PAM. El corte podrá ser reparado por las células afectadas por medio de dos vías: recombinación por homología directa (HDR), o bien, por unión de extremos no homólogos (NHEJ) (Figura 7). En la reparación HDR se utiliza como molde de reparación del cromosoma homólogo o un molde artificial para insertar una secuencia de interés, mientras que la reparación NHEJ carece de moldes por lo que es propensa a errores con los que pueden generarse sustituciones de bases, inserciones o deleciones que modifiquen el marco de lectura del gen y con ello desactivarlo.

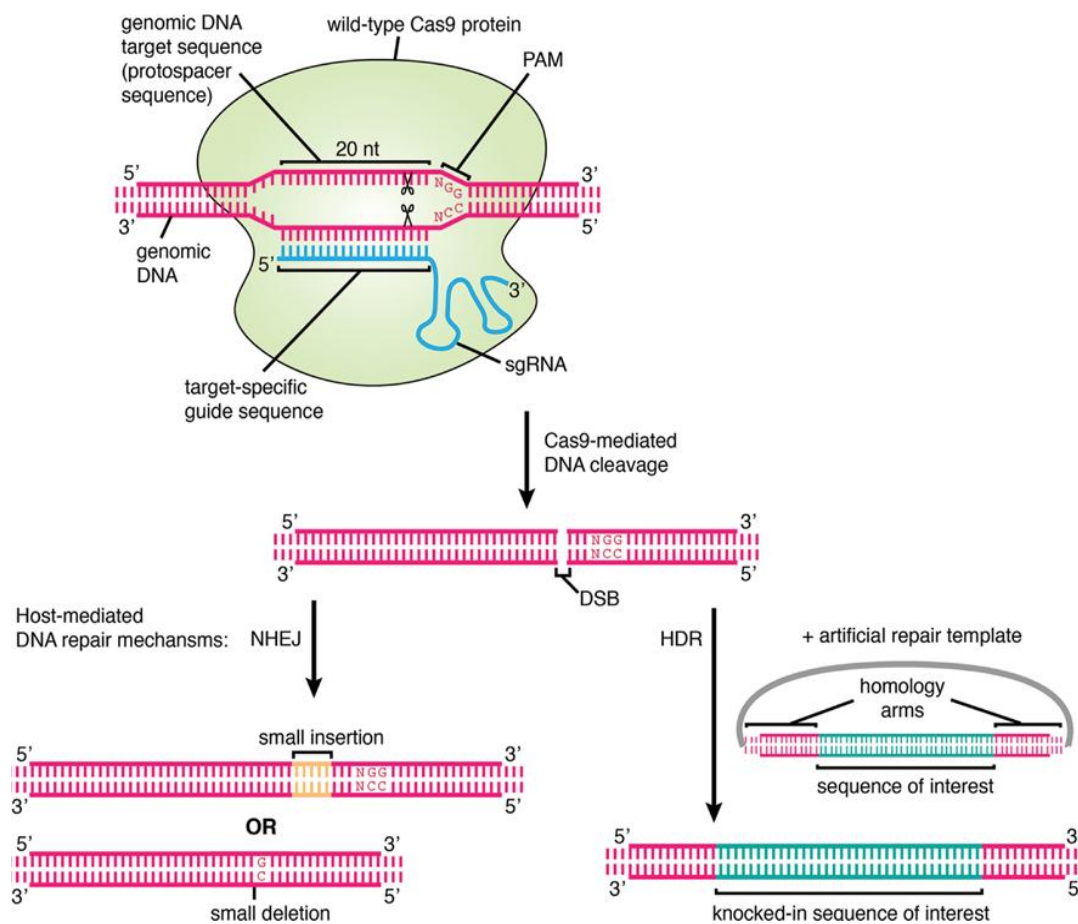


Figura 7. Mecanismo de acción del sistema CRISPR-Cas9. El sgRNA se aparea con la región blanco, provocando que Cas9 genere un corte que puede repararse por NHEJ o HDR de acuerdo a necesidades específicas de la edición genética (Tomado de Agrottis y Kettler, 2015)

2.7 PLANTAS MUTANTES PARA LOS FACTORES DE INICIO DE LA TRADUCCIÓN 4E

Se han desarrollado mutantes de los factores de inicio de la traducción 4E con la finalidad de dilucidar principalmente su función en condiciones de estrés biótico. Numerosos estudios han demostrado que la familia de factores de inicio de la traducción se encuentra involucrada en la adquisición de inmunidad a *potyvirus* específicos (dependiendo de la especie hospedera). Esto se debe a que gran variedad de virus se han adaptado a utilizar a alguno de los complejos eIF4F o eIF(iso)4F para la traducción de proteínas virales, por lo que la mutación de ellos puede conferir una resistencia natural al ataque de virus que afectan a las plantas (Sanfaçon, 2016). Existen virus que poseen una proteína denominada VPg (proteína viral unida al genoma) que, en su extremo 5', se une el factor 4E o alguna de sus isoformas. La proteína VPg promueve la inhibición de la traducción del hospedero al competir con la actividad de unión a *cap* tanto de eIF4E como de eIF(iso)4E, con lo que aumenta la afinidad de estos factores por el RNA viral en condiciones *in vitro*, facilitando así su traducción (Leonard *et al.*, 2000).

Se han elaborado plantas mutantes nulas para eIF(iso)4E, en las cuales se inhibe la infección por TuMV (Virus del mosaico del nabo) y LMV (Virus del mosaico de la lechuga) (Duprat *et al.*, 2002). En este sentido, se conoce que el factor de inicio de la traducción eIF(iso)4E interactúa con la VPg de TuMV, razón por lo cual es posible que este factor tuviese un rol fundamental en la traducción o replicación del genoma viral (Schaad *et al.*, 2000). Las plantas de *A. thaliana* mutantes nulas de eIF(iso)4E se desarrollaron mediante la inserción aleatoria de un transposón Spm de maíz en el segundo exón del gen que codifica para eIF(iso)4E (figura 8), con lo que se inhibe la síntesis de los transcritos del gen.

De manera interesante, se determinó que las plantas mutantes nulas para eIF(iso)4E (*AteIF(iso)4E-1*) no se altera el desarrollo normal de las plantas de *A. thaliana*. Sin embargo, la acumulación de la proteína codificada por el factor eIF4E, se encuentra aumentada aun cuando no se encontró mayor cantidad de mensajero, por lo que se sugirió que modificaciones post transcripcionales causaban un incremento en la síntesis de eIF4E o la estabilidad de dicha proteína. Para evaluar el efecto de la inserción del transposón se realizaron pruebas mediante la inoculación de las plantas mutantes con

TuMV y LMV; como resultado, se observó que dichos virus eran incapaces de replicarse en ausencia de eIF(iso)4E, a pesar de la presencia de eIF4E.

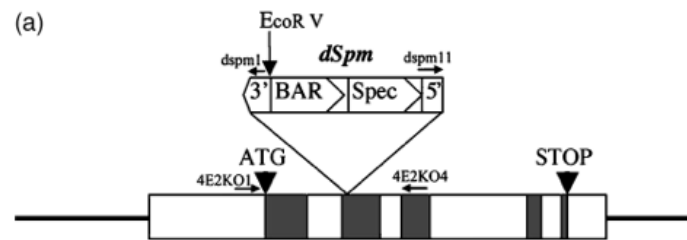


Figura 8. Esquema de la inserción del transposón en la secuencia codificante de eIF(iso)4E. Se muestra la inserción de un transposón en la región inicial del segundo exón, con lo que el gen queda interrumpido y se inhibe su correcta transcripción (Tomado de Duprat *et al.*, 2002).

También se cuenta con plantas mutantes que poseen alteraciones en eIF4E. Se conoce que una mutación puntual del gen codificante para eIF4E provoca que la planta sea resistente a CIYVV (Virus de las venas amarillas del trébol) (Sato *et al.*, 2005) y a CMV (Virus del mosaico del pepino) (Yoshii *et al.*, 2004), que es conocido por infectar sistémicamente a *A. thaliana*. Entre los síntomas de la acumulación de CMV en plantas *A. thaliana* de la accesión Col-0, se encuentran afecciones como el curvamiento de los escapos, retraso en el crecimiento, manchas, clorosis de la roseta y hojas caulinares, lo que resulta en una baja fertilidad.

Para generar mutantes que fuesen resistentes a la acumulación de CMV, se realizó mutagénesis mediante metanosulfonato de etilo (EMS), para posteriormente seleccionar aquellas plantas en las que la acumulación de CMV se redujo a niveles muy bajos. Al mapear la mutación se identificó la sustitución de una base, observándose un cambio de G a A dentro de la región de codificante del gen *AteIF4E1* (At4g18040), sustitución que cambia el residuo Trp99 a un codón sin sentido. A dichas plantas se les denominó “cum1-1” (Figura 9) (Yoshii *et al.*, 1998). Para corroborar el sitio de mutación, se realizó una transformación de plantas con un fragmento de cDNA correspondiente a eIF4E, observándose un restablecimiento en la acumulación de CMV (Yoshii *et al.*, 2004).

Es importante señalar que esta mutante, a pesar de poseer una actividad que inhibe el movimiento de virus de una célula a otra, no es una mutante nula para eIF4E ya que en experimentos realizados en nuestro laboratorio ha sido posible visualizar completa a la proteína eIF4E derivada de estas plantas, en lugar de una proteína con un peso menor como se esperaría debido a la presencia de un codón de paro prematuro.

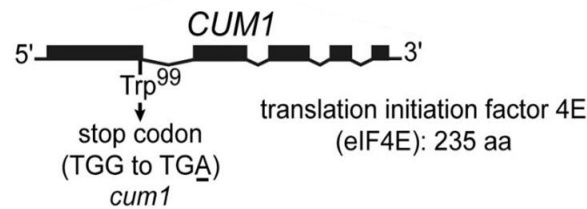


Figura 9. Esquema de la mutación generada en plantas cum1-1. Al final del primer exón se observa la sustitución de una base G por una A, lo que genera un codón de paro prematuro (Tomado de Yoshii *et al.*, 2004).

Las plantas mutantes cum1-1 fueron utilizadas por Sato *et al.* (2005) para el desarrollo de mutantes por inserción de T-DNA denominada SALK 145583 (Figura 10). Dichas plantas cuentan con una inserción de T-DNA en el primer intrón del gen que codifica para eIF4E (At4g18040), además de la mutación generada anteriormente por EMS que generó un codón de paro prematuro en Trp99.

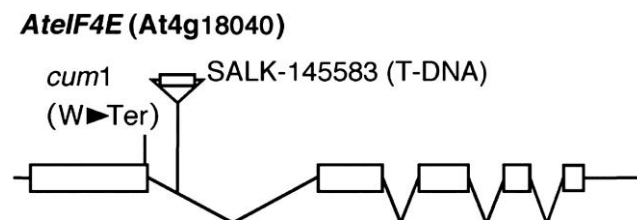


Figura 10. Esquema de plantas mutantes para el factor eIF4E (At4g1804), misma que se generó por inserción de T-DNA en el primer intrón utilizando como fondo mutante las plantas cum1-1 (Tomado de Sato *et al.*, 2005).

3. ANTECEDENTES

3.1 SELECCIÓN PREFERENCIAL DE TRANSCRITOS POR eIF4E Y eIF(ISO)4E

Estudios de microarreglos realizados con anterioridad en nuestro laboratorio sugieren que existe una selección preferencial de transcritos por parte de las isoformas eIF4E y eIF(ISO)4E (Martínez-Silva *et al.*, 2012). Dentro de los transcritos se encontraron muchos involucrados en respuesta a estrés, sin embargo existen algunos cuya transcripción se encuentra estimulada específicamente en condiciones de estrés congelante según un análisis *in silico* (Tabla 1), lo que nos sugiere que puede existir una regulación traduccional en respuesta al estrés congelante en plantas de *A. thaliana*.

Tabla 1. Genes seleccionados preferencialmente por eIF4E y eIF(ISO)4E. Se resaltan los transcritos implicados en respuestas a estrés congelante preferencialmente por eIF4E (rojo) y los seleccionados por eIF(ISO)4E (azul) (Martínez Silva *et al.*, 2010 modificado por Salazar, 2017)

Accession	Function/Gene Name
At3g23430	Phosphate transport (<i>PHO1</i>)
At4g02950	Ubiquitin family protein
At4g20340	Transcription initiation factor (<i>TFIIIE</i>)
At3g55580	Regulator of chromosome condensation, (<i>RCC1</i>)
At2g02860	Sucrose transporter 3 (<i>SUC3</i>)
At2g30260	Component of the U2 snRNP complex (<i>U2B''</i>)
At1g21630	Calcium ion binding, EF hand protein
At2g17630	Pyridoxal phosphate (PLP)-dependent transferase
At1g78240	Tumorous shoot development 2 (<i>TSD2</i>)
At2g27940	RING/U-box protein
At2g28600	P-loop containing nucleoside tri-phosphate hydrolase
At1g68670	MYB-like transcription factor family
At4g06746	Transcription factor ERF/AP2 DREB subfamily A-5 (<i>RAP2.9</i>)
At3g57600	Transcription factor ERF/AP2 DREB subfamily A-2 (<i>ERF/AP2</i>)
At2g05710	Aconitase (<i>ACO3</i>)
At5g61430	NAC domain containing protein (<i>NAC5</i>)
At1g6880	Transcription factor (<i>BRC2</i>)
At4g18720	Transcription factor IIS protein
At5g15850	Transcription factor, constans-like 1 (<i>COL1</i>)
At4g33250	Eukaryotic translation initiation factor 3 K (<i>EIF3K</i>)
At5g15630	Cobra-like4 (<i>COBL4</i>)
At5g01840	Ovate family protein 1 (<i>OPF1</i>)
At1g64580	Pentatricopeptide repeat-containing protein (<i>PPR</i>)

3.2 PAPEL DE LOS FACTORES eIF4E Y eIF(ISO)4E DURANTE EL ESTRÉS POR CONGELAMIENTO

Tomando como base los estudios anteriores, Salazar (2017) observó que, al someter a las plantas WT de 8 semanas de edad a un proceso de aclimatación durante una semana a 4°C, la expresión de los factores 4E se veía inducida (Figura 11). Esto sugería que, en estas condiciones, había un aumento en la actividad traduccional de las plantas adultas, que podría deberse a la necesidad de incrementar la síntesis de proteínas que están involucradas en la crioprotección.

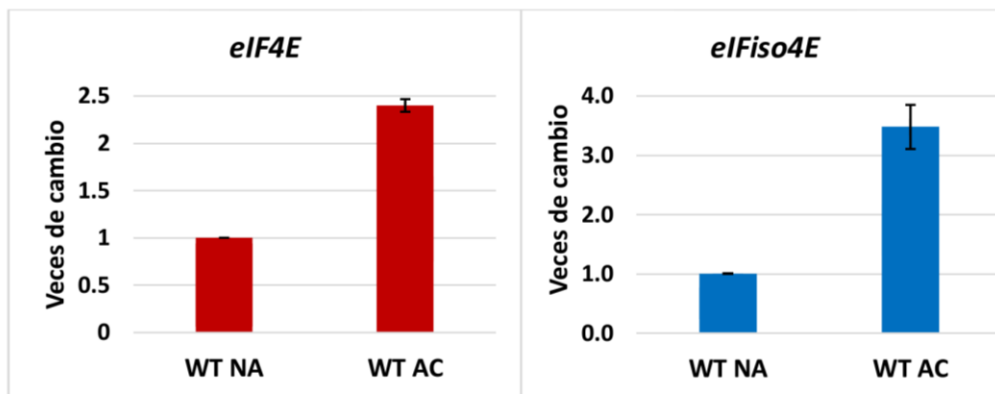


Figura 11. Expresión transcripcional de eIF4E y eIF(ISO)4E en plantas WT de 8 semanas de edad, aclimatadas (WT AC) y no aclimatadas (WT NA). Promedio de dos réplicas biológicas (Tomado de Salazar, 2017).

Así mismo se evaluó el fenotipo y la supervivencia de plantas silvestres (WT), plantas nulas del factor eIF(ISO)4E (*AteIF(ISO)4E-1*) (Duprat *et al.*, 2002) y las dos sobreexpresoras de los factores 4E elaboradas en nuestro laboratorio (*35S::AteIF4E* y *35S::AteIF(ISO)4E*) sometidas a temperaturas congelantes sin haber sido expuestas a procesos de aclimatación. Se encontró que las plantas *AteIF(ISO)4E-1* tienen mayor susceptibilidad ante el estrés por congelamiento (-20° C por una hora), mientras que las plantas sobreexpresoras de los factores 4E (especialmente *35S::AteIF4E*) mostraron un fenotipo de mayor resistencia a las 2 semanas post-estrés en comparación con las plantas silvestres (Figura 12), lo cual pudiera relacionarse con que esas líneas de sobreexpresión favorecen la expresión de genes de protección ante este tipo de estrés. Estos resultados sugieren que, en estas condiciones, el factor eIF(ISO)4E tiene una función que no puede suplirse por eIF4E, como lo es la traducción de los transcritos reconocidos de manera preferencial.

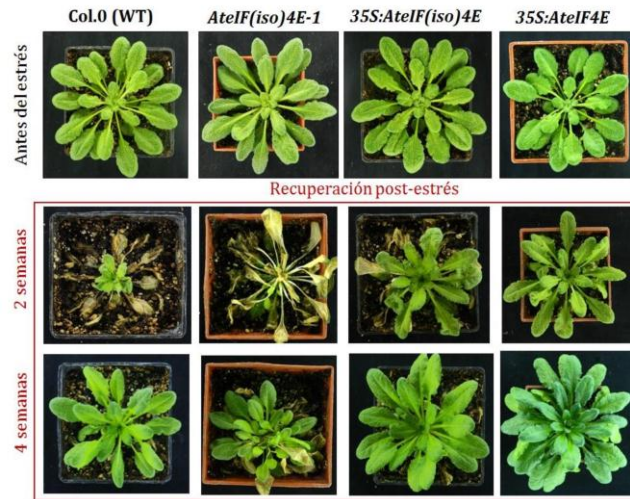


Figura 12. Fenotipo de plantas no aclimatadas antes del estrés (-20° C por una hora) y después de 2 y 4 semanas de recuperación. Plantas silvestres (Col-0 WT), plantas sobreexpresoras del factor *eIF(iso)4E* (*35S:AtelF(iso)4E*), plantas sobreexpresoras del factor *eIF4E* (*35S:AtelF4E*) y plantas nulas del factor *eIF(iso)4E* (*AtelF(iso)4E-1*) ((Tomado de Salazar, 2017).

Además, las plantas sobreexpresoras del factor *eIF4E* y *eIF(iso)4E* presentaron el mayor porcentaje de supervivencia con respecto a las plantas WT, mientras que plantas *AtelFiso4E-1* tienen una supervivencia menor respecto a plantas silvestres (Figura 13). Sin embargo, los efectos del estrés por congelamiento en plantas mutantes nulas para *eIF4E* no se ha estudiado, por lo que la evaluación de alguna planta con dicho genotipo elaborada mediante CRISPR/Cas9, o bien alguna mutante con inserción de T-DNA, podría ayudarnos a dilucidar las implicaciones de la ausencia del factor *eIF4E* durante condiciones de estrés congelante.

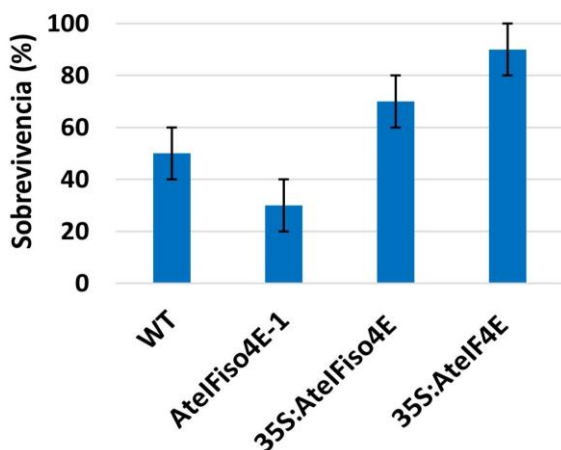


Figura 13. Supervivencia de plantas 30 días después de ser sometidas a estrés por congelamiento (Promedio de 5 réplicas en cada caso). Plantas silvestres (Col-0 WT), plantas sobreexpresoras del factor *eIF(iso)4E* (*35S:AtelF(iso)4E*), plantas sobreexpresoras del factor *eIF4E* (*35S:AtelF4E*) y plantas knock-out para el factor *eIF(iso)4E* (*AtelF(iso)4E-1*) (Tomado de Salazar, 2017).

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Debido a la manera en la que actúan las isoformas del factor de inicio de la traducción 4E (eIF4E), se ha sugerido que poseen distintos mecanismos para reconocer los mRNAs, lo que a su vez les confiere cierta selectividad o preferencia por algunos transcritos dependiendo de características específicas (Carberry y Goss, 1991). Se ha demostrado que plantas mutantes nulas para eIF(iso)4E presentan mayor resistencia a algunos tipos de potyvirus en comparación con las que poseen un genotipo silvestre (Duprat *et al.*, 2002; Pyott *et al.*, 2016); así mismo, dichas plantas mutantes cuentan con mayor sensibilidad ante el estrés por congelamiento que las plantas silvestres o sobreexpresoras de eIF4E o eIF(iso)4E, lo que indicaría que eIF(iso)4E tiene funciones que no puede llevar a cabo eIF4E (Salazar, 2017). Sin embargo, no se sabe si eIF(iso)4E puede ser suficiente para contender con el estrés por congelamiento o la aclimatación de plantas de *A. thaliana* en ausencia de eIF4E, es así que si *eIF(iso)4E* es incapaz de suplir las funciones de *eIF4E*, entonces una planta mutante *AteIF4E-1* tendrá un fenotipo de mayor afectación que una planta WT después de ser sometida a temperaturas congelantes.

Es por ello que, en este caso particular el sistema CRISPR-Cas9 fue utilizado con la finalidad de editar el gen codificante de eIF4E (At4g18040) en el genoma de *A. thaliana*, con el objetivo de desarrollar una planta mutante nula para dicho factor, lo que nos permitiría el estudio de los genes propios de la planta sin la necesidad de la integración de DNA exógeno.

Durante el desarrollo de este trabajo nos fue proporcionada la mutante *AteIF4E-1* (SALK 145583), que, como se mencionó anteriormente, fue generada por inserción de T-DNA en el fondo cum1-1 y no expresa a eIF4E. Es gracias a esto que también se evaluaron fenotípicamente plantas de *A. thaliana* mutantes para los factores 4E en dos edades distintas (5 y 8 semanas) después de ser sometidas a condiciones de estrés congelante con la finalidad de determinar las diferencias presentadas en su recuperación, lo que nos provee de una evidencia sobre la regulación traduccional de genes implicados en la resistencia al estrés abiótico.

5. HIPÓTESIS

Dado que las plantas sobreexpresoras de eIF4E (At4g18040) presentan alta tolerancia al estrés por congelamiento, entonces una planta mutante nula presentará una tolerancia menor comparada con plantas silvestres debido a que eIF(iso)4E no puede suplir sus funciones.

6. OBJETIVO GENERAL

Obtener mutantes nulas para el factor eucariote de inicio de la traducción eIF4E (At4g18040) de *A. thaliana*, elaboradas mediante CRISPR-Cas9 y evaluar fenotípicamente el efecto de la ausencia de eIF4E en la respuesta a estrés congelante.

7. OBJETIVOS PARTICULARES

- Diseñar *in silico* sgRNAs específicos para la edición del gen de *eIF4E* (At4g18040).
- Obtener los vectores apropiados que expresen a los sgRNAs para la edición de *eIF4E* y transformar con estos a *E.coli* DH5a.
- Transformar individuos de *A. thaliana* mediante *A. tumefaciens*.
- Seleccionar y caracterizar a los organismos mutantes resultantes de la transformación.
- Evaluar a las plantas mutantes nulas SALK 145583 de *eIF4E*, en condiciones de estrés por congelamiento.

8. METODOLOGÍA

8.1 ELABORACIÓN DE UNA PLANTA MUTANTE PARA *EIF4E* MEDIANTE CRISPR-CAS9

8.1.1 DISEÑO Y ELABORACIÓN DE VECTORES

Se alinearon las secuencias codificantes para eIF4E, eIF(iso)4E, eIF4E1b, eIF4E1c y nCBP para determinar los sitios de mayor disimilitud entre sus secuencias. Posteriormente se realizó una búsqueda en las plataformas *Benchling* y *ChopChop* (Labun *et al.*, 2016) para identificar sitios que pudieran ser posibles sgRNAs, eligiendo 6 con base en su posición, disimilitud respecto al resto de las isoformas, presencia de sitios para enzimas de restricción y *scores off-target* (medida que indica la probabilidad inversa de un corte fuera del objetivo).

Cada sgRNA se mandó a sintetizar como 2 cadenas sencillas de DNA complementarias entre sí, a las cuales se les añadió en los extremos las bases necesarias para su introducción en el vector pHSE401 (Xing *et al.*, 2014): ATTG al inicio de la secuencia Fw y CAAA al final de la secuencia Rv (Anexos, Tabla 19 y Figura 37).

Se tomaron volúmenes iguales de oligonucleótidos Fw y Rv con una concentración de 100µmol y se incubaron a 65°C por 5 min, posteriormente se dejaron enfriar lentamente a temperatura ambiente obteniendo así dobles cadenas con extremos cohesivos (sgRNAs). Posteriormente, se realizó una electroforesis de las cadenas resultantes para corroborar la alineación. Se utilizó un gel de agarosa al 2% y una concentración final de oligonucleótidos y sgRNAs de 200ng/µl. Se corrió por 25 minutos a 80 Volts.

Una vez obtenido el plásmido pHSE401 (Addgene, plásmido #62201) (Anexos, Figura 35), purificado y los sgRNAs hibridados, se llevó a cabo una ligación y digestión simultáneas por medio de una reacción *GoldenGate*. Se utilizó el método desarrollado por Xing *et al.* (2014) cuyos componentes y condiciones se especifican en la tabla 2.

Tabla 2. Reacción Golden Gate para la integración de sgRNAs en plásmidos

Componente	Volumen (μ l)	Condiciones de la reacción
Oligonucleótidos hibridados (100ng/ μ l)	2	5 horas a 37°C
Vector pHSE401 (100 ng/ μ l)	2	
Buffer 10X T4 ligasa (Promega)	1.5	5 minutos a 50°C
10X BSA	1.5	
BsaI HF V ₂	1	10 minutos 80°C
T4 DNA ligasa HC (Promega)	1	
H ₂ O	6	
Volumen total: 15		

Con la reacción de ligación obtenida se transformaron por choque térmico células competentes de *E.coli* Dh5alpha que posteriormente fueron plaqueadas en cajas Petri con medio LB adicionado con kanamicina (50 mg/ml) y se colocaron a 37°C durante toda la noche. Para corroborar la inserción del sgRNA en el vector, se realizó una réplica de las cajas con kanamicina en cajas con espectinomicina: en zona estéril se abrió la caja original y se colocó sobre ella papel filtro estéril cuya circunferencia coincidiera en su totalidad con la de la caja, se presionó levemente, se retiró y se colocó por unos segundos sobre una caja nueva con medio LB adicionado con espectinomicina (50 mg/ml).

Se dejaron crecer ambas cajas toda la noche a 37°C y al día siguiente se comparó el crecimiento en cada una de ellas. Las colonias que crecieron en kanamicina pero no en espectinomicina fueron las colonias con el sgRNA correctamente ligado.

Para corroborar la integración del sgRNA en el vector, se realizó un PCR de colonia. Una vez que se contó con las colonias positivas, se tomó una de ellas y se resuspendió en la reacción de PCR (Tabla 3), misma que se llevó a cabo mediante las condiciones de la tabla 4. Para las colonias candidatas se utilizaron los cebadores U6-26p F y U6-26t-R; para el control se colocaron 0.2 μ l de plásmido pHSE401 sin ligar en lugar de una colonia.

Tabla 3. PCR de colonia para células transformadas de *E. coli*

Componente	Volumen (µl)
Oligonucleótido Fw (10 µM)	0.3
Oligonucleótido Rv (10 µM)	0.3
Kapa Taq ReadyMix	5
H ₂ O	3.6
Plásmido pHSE401 (solo control)	0.2

Tabla 4. Condiciones para la elaboración de PCR utilizando Kapa Taq ReadyMix de Kapa Biosystems

Condiciones	Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	95°C	1 min	1
Desnaturalización	95°C	30 seg.	35
Alineamiento	63.8°C	30 seg.	
Extensión	72°C	1 min	
Extensión final	72°C	7 min.	1
Preservación	4°C	∞	1

La totalidad de la reacción se corrió en un gel de agarosa al 1% durante 40 minutos a 80 Volts. Una vez que la integración fue corroborada, se extrajo el plásmido a partir de las colonias positivas mediante el *GenElute™ Plasmid Miniprep Kit* de Sigma-Aldrich.

Para corroborar la correcta inserción de los sgRNA en el vector, los plásmidos resultantes fueron enviados a secuenciar. Las muestras a partir de plásmido purificado fueron preparadas de acuerdo a los requerimientos de la unidad de secuenciación de la Unidad de Síntesis y Secuenciación de ADN del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

8.1.2 TRANSFORMACIÓN DE *AGROBACTERIUM TUMEFASCIENS*

Las células competentes de *A. tumefaciens* fueron descongeladas en hielo durante 15 minutos y se les añadió 1µg de DNA plasmídico (pHSE401 con sgRNA insertado); la mezcla se congeló en nitrógeno líquido por 5 minutos. Inmediatamente después se colocaron a 37°C por 25 min, y posteriormente se

les agregó 1ml de medio LB sin antibióticos y se incubaron nuevamente a 28°C por 3 horas en agitación (250 rpm).

Finalmente, las bacterias se plaquearon en cajas Petri con medio LB adicionado con rifampicina (50 mg/ml) y kanamicina (50mg/ml). Se colocaron en incubación a 28°C durante 48 horas.

Se elaboró un PCR de colonia a partir de las colonias obtenidas de la transformación de *A. tumefaciens*. Para ello se eligieron dos colonias de cada placa para realizar cultivos. Cada colonia se transfirió a 5 ml de medio LB con kanamicina (50mg/ml) y rifampicina (50mg/ml); se incubaron toda la noche a 28°C en agitación.

Al día siguiente se tomaron 150µl de cada cultivo y se centrifugaron a 14,800 rpm durante 1 min. Se desechó el sobrenadante, las células se resuspendieron en 20µl de agua libre de nucleasas y se transfirió la mezcla a tubos de PCR. Las muestras fueron calentadas a 95°C por 10 minutos y después centrifugadas durante 5 minutos. El sobrenadante de las muestras fue utilizado para la reacción de PCR con *Kapa Taq ReadyMix* de *Kapa Biosystems*, cuyas especificaciones se muestran en las tablas 3 y 4. Los cebadores utilizados fueron U6-26p-Fw y el sgRNA Rv correspondiente. Los productos de la reacción se corrieron en un gel de agarosa al 1% durante 40 min a 80 Volts.

8.1.3 TRANSFORMACIÓN DE *A. THALIANA* POR FLORAL DIP

Se utilizaron plantas de *A. thaliana* sembradas de dos maneras distintas: 1) Un individuo por maceta, y 2) De 20 a 30 individuos por maceta (Zhang *et al.*, 2006). Se permitió el crecimiento de las plantas por al menos 4 semanas en fotoperiodo de días largos. Una vez que emergió el primer escapo floral se cortó y se permitió la formación de un mayor número de escapos y botones florales; aproximadamente una semana después las plantas estaban listas para ser transformadas.

Se tomaron 2.5 ml de los cultivos utilizados para la elaboración del PCR de colonia y se colocaron en 250ml de medio LB con kanamicina (50µg/ml) y rifampicina (50 µg/ml), mismo que se incubó a 28°C por 48 horas a 200 rpm.

Los cultivos se centrifugaron a 5,000 x g durante 20 minutos y se resuspendió el botón celular obtenido en 50 ml de disolución de sacarosa 5%. Se agregó el volumen necesario hasta alcanzar un

valor de densidad óptica (600 nm) de 0.8 y finalmente se agregó el surfactante Silwet 77 a la suspensión bacteriana a una concentración final de 0.01%.

Los escapes de las plantas a transformar se sumergieron en la suspensión de *A. tumefaciens* durante un minuto. Después, las macetas se colocaron de manera lateral sobre papel absorbente y se cubrieron con un domo de plástico para dejarse en oscuridad toda la noche. El día siguiente se colocaron verticales en fotoperiodo de día largo. Se permitió la maduración de las semillas por al menos tres semanas y fueron colectadas para su selección.

En las primeras tres transformaciones se prepararon cultivos de cada plásmido generado. Los que contenían un sgRNA cuyo blanco se encontraba en el primer exón se utilizaron de manera individual, mientras que los que contenían un sgRNA cuyo blanco se encontraba en el segundo o tercer exón se utilizaron en conjunto con alguno que contenía al sgRNA1, sgRNA2, sgRNA *Clal* o sgRNA *XmnI* (Tabla 16; Anexos Fig. 41), según las diluciones establecidas en Davis *et al.*, (2009). Se utilizaron 10 plantas para cada plásmido o cotransformación realizada.

Para la última transformación se utilizaron cultivos de plásmidos que contenían al sgRNA1, sgRNA2, sgRNA *Clal* o sgRNA *XmnI* empleados de manera individual. Se utilizaron 10 plantas para las transformaciones con cada uno de los 4 cultivos, además de una maceta de 30 individuos que fue transformada con el plásmido que contenía al sgRNA *Clal*.

8.1.4 SIEMBRA DE *A. THALIANA* EN MEDIO DE CULTIVO

Las semillas obtenidas de las plantas transformadas se colocaron en un tubo *Eppendorf* y se les agregó 1ml de hipoclorito de sodio comercial diluido al 20% y 1µl de Tween 20 (Cf. 0.1%). Se agitó vigorosamente por 20 minutos.

El tubo de semillas se centrifugó por 10 segundos en una minifuga y se eliminó el sobrenadante con una micropipeta. Después, las semillas se enjuagaron aproximadamente 5 veces con 1 ml de agua estéril durante 30 segundos hasta eliminar el hipoclorito y el Tween 20. En cada ocasión se centrifugaron durante 10 segundos y se eliminó el sobrenadante. Después del último lavado se les agregó 1ml de agua estéril.

8.1.5 SELECCIÓN DE PLANTAS MUTANTES

Se utilizó el protocolo para selección de semillas transformadas con resistencia a higromicina descrito por Harrison *et al.*, (2006). Las semillas desinfectadas se sembraron en medio MS con higromicina a una concentración final de 15µg/ml. Se estratificaron por 2 días a 4°C en oscuridad y posteriormente se expusieron a luz durante 4-6 horas en una cámara de crecimiento a 22°C. Se cubrieron durante las siguientes 48 horas y se expusieron nuevamente a luz por 24 horas. Al finalizar los intervalos de luz-oscuridad, se seleccionaron las plantas con hipocótilos más largos (0.8-1cm) ya que son las que integraron adecuadamente el plásmido. Dichas plantas se trasplantaron a sustrato esteril para crecer *Arabidopsis* (*sunshine*, vermiculita y agolita 3:1:1) y permitir que continuaran su desarrollo por tres semanas.

A cada una de las plantas que presentaron el fenotipo de selección positivo (elongación de hipocótilo), se les extrajo DNA por medio del *DNeasy*® *Plant Mini Kit* de *Qiagen*. Se maceraron las muestras (menor o igual que 100 mg de tejido fresco), se añadieron 400 µl de Buffer AP1 y 4µl de RNasa. Se vortexeó e incubó por 10 minutos a 65°C (invirtiendo el tubo 2-3 veces durante la inoculación). Se añadieron 130 µl de buffer P3, se mezcló e incubó 5 min en hielo. Se centrifugó el lisado en una *QIAshredder* colocada sobre un tubo de colecta de 2ml y se centrifugó a 20,000 x g.

Se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo sin tocar el pellet y se añadieron 1.5 volúmenes de buffer AW1 mezclando por pipeteo. Se transfirieron 650µl de mezcla en una columna *DNeasy Mini spin* colocado sobre un tubo de colecta de 2 ml. Se centrifugó por 1 minuto a 6000 x g y se descartó el sobrenadante (se repitió este paso con la muestra restante).

Se colocó una columna en un nuevo tubo de colecta de 2 ml, se añadieron 500 µl de Buffer AW2 y se centrifugó por 2 minutos a 20,000 x g.

Se transfirió la columna a un microtubo de 1.5 ml estéril, se añadieron 20 µl de H₂O y se incubó por 5min a temperatura ambiente. Finalmente se centrifugó por 1 minuto a 6000 x g (se repitió el último paso en un tubo estéril distinto).

8.1.6 DETECCIÓN DE MUTACIONES EN EL GEN DE *EIF4E*

Para la detección de posibles mutaciones en el gen que codifica para eIF4E se probaron 2 protocolos distintos, el primero utilizando la endonucleasa T7 y el segundo mediante análisis de fusión de alta resolución (HRM).

➤ Ensayo con endonucleasa T7

La endonucleasa T7 posee la propiedad de detectar y cortar DNA que se encuentra desapareado. El ensayo se basa en la separación de las cadenas de DNA, para después aparearlas al azar. De este modo, para una planta heterocigota, se generarán heteroduplex que serán cortados por la endonucleasa y podrán ser detectados mediante su electroforesis en gel de agarosa.

A partir del DNA genómico obtenido mediante el *DNeasy*® *Plant Mini Kit* de *Qiagen*, se realizó PCR con *Platinum*TM *Taq DNA Polymerase* de *Invitrogen*TM para amplificar del primer al tercer exón de eIF4E, para lo cual se utilizaron los cebadores “4E exón1 Fw” y “4E exón3 Rv” utilizando DNA genómico de las plantas candidatas y DNA de plantas WT como control negativo. Las reacciones se prepararon según las concentraciones de la Tabla 5 y el programa utilizado se describe en la Tabla 6.

Tabla 5. Volumen para una reacción de 10 µl de PCR con *Platinum*TM *Taq DNA Polymerase* de *Invitrogen*TM.

Componente	Volumen
10X PCR Buffer -Mg	1 µl
2mM dNTP mix	1 µl
Oligonucleótido Fw (10µM)	0.2 µl
Oligonucleótido Rv (10µM)	0.2 µl
DNA	1 µl
PlatinumTaq	0.04 µl
50mM MgCl ₂	0.3 µl
H ₂ O	5.56 µl

Tabla 6. Programa para PCR con Platinum™ Taq DNA Polymerase de Invitrogen™.

Condiciones	Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	94°C	1 min	1
Desnaturalización	94°C	30 seg.	35
Alineamiento	55°C	30 seg.	
Extensión	72°C	1.5 min	
Preservación	4°C	∞	1

El producto de PCR se corrió en un gel de agarosa al 2%, se observó en un transiluminador y se cortaron las bandas para ser purificadas mediante el *kit* de extracción “*Illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification* de *GE Healthcare*”.

Se cortó el fragmento de la banda y se colocó en un microtubo. Se agregaron 10µl de *Capture Buffer type 3* por cada 10 mg de gel. Se mezcló por inversión y se incubó a 50°C a 250 rpm por 30 minutos, mezclando por inversión cada 3 minutos. Una vez disuelta la agarosa, el *buffer* se tornó amarillo o naranja. Para cada purificación, se colocó una *GFX MicroSpin Column* en un tubo de colecta.

Se centrifugó la muestra para bajarla al fondo del tubo y se transfirieron 600 l de la mezcla a la *GFX MicroSpin Column*. Se incubó a temperatura ambiente por 1 minuto y se centrifugó a 16,000 x g durante 30 segundos. Se eliminó el sobrenadante y se colocó la columna de nuevo en el tubo de colecta para los pasos anteriores de ser necesario.

Se añadieron 500µl de *Wash Buffer type 1* a la columna y se centrifugó a 16,000 x g durante 30 segundos. Se desechó el tubo de colecta y se colocó la columna sobre un tubo estéril.

Se agregaron 20 µl de H₂O (previamente incubada a 50°C) sobre la membrana de la columna, se incubó por 5 minutos y se centrifugó a 16,000 x g durante 1 minuto. Finalmente, la muestra se cuantificó y se guardó a -20°C.

Para someter los fragmentos obtenidos al ensayo de endonucleasa T7, se prepararon reacciones de alineamiento como indica la Tabla 7 y se colocaron en un termociclador utilizando el programa descrito en la Tabla 8.

Tabla 7. Componentes para elaboración de una reacción de alineamiento con volumen total de 19µl.

Componente	Volumen (µl)
Fragmento de DNA purificado	200 ng
10X NEB Buffer 2	2 µl
H ₂ O	Llevar a 19 µl

Tabla 8. Condiciones de hibridación para las reacciones de alineamiento

Paso	Temperatura	Ramp/Rate	Tiempo
Desnaturalización inicial	95°C		5 min
Alineamiento	95-85°C	-2°C/segundo	
	85-25°C	-0.1°C/segundo	
Preservación	4°C		∞

Al finalizar la reacción de alineamiento, se agregó 1µl de endonucleasa T7 y se incubó por 40 minutos a 37°C. Para detener la reacción se agregaron 1.5 µl de EDTA 0.25M. La totalidad de las reacciones se corrió en un gel de agarosa al 1.5% por 50 minutos a 80V. Las muestras que presenten dos bandas son las que poseen mutaciones respecto a la secuencia WT, mientras que en las que únicamente se observe una banda son las que no cuentan con mutaciones.

Mediante este protocolo **no fue posible** evaluar mutaciones en el primer exón del gen que codifica a eIF4E, por lo que se implementó un método alternativo: el análisis de fusión de alta resolución (HRM).

➤ **Análisis de fusión de alta resolución (High Resolution Melting, HRM)**

Se realizó *High Resolution Melting* (HRM) para verificar la presencia de inserciones o deleciones en las plantas candidatas a ser mutantes de eIF4E (At4g18040) elaboradas mediante CRISPR-Cas9 y basándonos en las temperaturas de fusión de los fragmentos derivados de las distintas muestras.

Se utilizó DNA de plantas WT como control y de plantas candidatas a ser mutantes. Se emplearon los cebadores “4E exón 1 Fw” y “4E exón 1 Rv”; las reacciones fueron elaboradas con base en la Tabla 9.

Tabla 9. Componentes para una reacción de HRM.

Reactivo	Cantidad
SYBR® Green	5 µl
Oligonucleótido Fw (10µM)	0.3 µl
Oligonucleótido Rv (10µM)	0.3 µl
H ₂ O	4.4 µl

La mezcla con el número total de reacciones se dividió en tubos de PCR a los que se le agregaron 2µl de DNA genómico. Posteriormente, el contenido de los tubos se colocó en una placa de HRM que fue introducida en el equipo de PCR en tiempo real de Bio-Rad. Se obtuvieron curvas de diferencia de fusión (Figuras 21 y 23); las agrupadas en el mismo *cluster* que la curva WT son las que no poseen cambios en la secuencia, mientras que las que se agruparon en *clusters* distintos son las que pueden contener cambios de bases en la secuencia evaluada. Se realizó PCR de las plantas cuya curva de fusión se obtuvo sustancialmente distinta a la de las plantas WT para amplificar la región de 322pb correspondientes al primer exón de eIF4E. Los cebadores utilizados fueron “4E exón 1 Fw” y “4E exón 1 Rv”, las reacciones se prepararon según las concentraciones de la Tabla 5 y el programa utilizado se describe en la Tabla 6. Los productos se corrieron en un gel de agarosa al 1.5% por 50 minutos a 80V. Posteriormente las bandas obtenidas fueron purificadas mediante el protocolo para el *kit illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification* de GE Healthcare.

Algunas muestras fueron enviadas a secuenciar directamente de los fragmentos obtenidos en este paso, sin embargo otras se clonaron en en pGEM®-T Easy Vector previo a su secuenciación.

8.1.7 CLONACIÓN DEL PRIMER EXÓN DE EIF4E EN EL PGEM®-T EASY VECTOR SYSTEM

El amplicón obtenido a partir del PCR del primer exón de eIF4E se insertó en el plásmido pGEM para su secuenciación. Primeramente se optimizó el radio molar inserto:vector (10:1) y se prepararon reacciones de ligación con los reactivos y volúmenes de la Tabla 10.

Tabla 10. Condiciones para la reacción de ligación del primer exón de eIF4E en pGEM®-T Easy Vector System

Reactivo	Volumen (µl)
2X Buffer Fast Ligation T4	5 µl
pGEM®- T Easy Vector (50 ng)	1 µl
T4 ligasa	1 µl
Inserto (amplicón 322 pb)	53.39 ng

Se prepararon las reacciones y se incubaron a 4°C durante 72 horas. Posteriormente, se tomaron 5µl de la reacción de ligación y se transformó con ella células competentes de *E. coli* que fueron posteriormente plaqueadas en cajas de medio LB adicionadas con ampicilina (100µg/ml), IPTG (100mM) y Xgal (50mg/ml). Se incubaron a 37°C durante toda la noche y al día siguiente se seleccionaron las colonias blancas, mismas que se inocularon en medio líquido adicionado con ampicilina (100µg/ml) para la extracción del plásmido.

Para corroborar la inserción del fragmento se realizó PCR del plásmido utilizando los cebadores “4E exón 1 Fw” y “4E exón 1 Rv” con el protocolo descrito para *Platinum™ Taq DNA Polymerase* de *Invitrogen™* explicado en las Ttablas 5 y 6; se esperaba la amplificación de los 322 pb del inserto, mismo que fue corrido en un gel de agarosa al 1.5%.

Las muestras para secuenciación se prepararon con base en los requerimientos de la Unidad de Secuenciación del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México. Se utilizó el primer universal para secuenciación M13.

8.2 EVALUACIÓN FENOTÍPICA DE UNA PLANTA MUTANTE PARA eIF4E (SALK 145583) EN CONDICIONES DE ESTRÉS POR CONGELAMIENTO

8.2.1 SIEMBRA DE *ARABIDOPSIS THALIANA*

Se realizó la siembra de semillas (previamente se realizó la desinfección mediante el protocolo de la sección 8.1.4) de Col-0 WT, *AteIF(iso)4E-1*, *35S::eIF4E* y *AteIF4E-1* (SALK 145583) en medio Gamborg con sacarosa al 1% y agar al 0.8%. Se colocaron en una cámara de crecimiento a 22°C en un fotoperiodo de día corto y se dejaron crecer. Una vez que las plantas desarrollaron hojas verdaderas fueron trasplantadas a sustrato para *Arabidopsis* (*Sunshine*, agrolita y vermiculita 3:1:1).

8.2.2 PROTOCOLO DE ESTRÉS POR CONGELAMIENTO EN PLANTAS DE 5 SEMANAS

Un total de 10 semillas de cada genotipo (WT, *AteIF(iso)4E-1*, *AteIF4E-1* y *35S::eIF4E*) se sembraron en un mismo contenedor, se estratificaron durante dos días a 4°C y posteriormente se colocaron en una cámara de crecimiento con fotoperiodo de día corto (8h luz y 16h oscuridad) a 22°C durante 5 semanas, registrándose el fenotipo de las plantas al final. En primera instancia se realizó una prueba piloto donde se sometió a distintos grupos de plantas a estrés congelante a -20°C durante 1hr, 2 hrs y 3 hrs, posteriormente se regresaron los individuos a cámara de crecimiento a 22°C durante una semana (Gutiérrez-Angoa, 2016). Con base en los resultados se seleccionó 1 hora de estrés a -20°C para realizar las 6 réplicas subsecuentes.

Se registró fotográficamente el fenotipo de recuperación después de una semana, así como el grado de daño de cada planta, mismo que es evaluado con base en el número de hojas cloróticas y/o muertas presentes en las plantas (Figura 15).

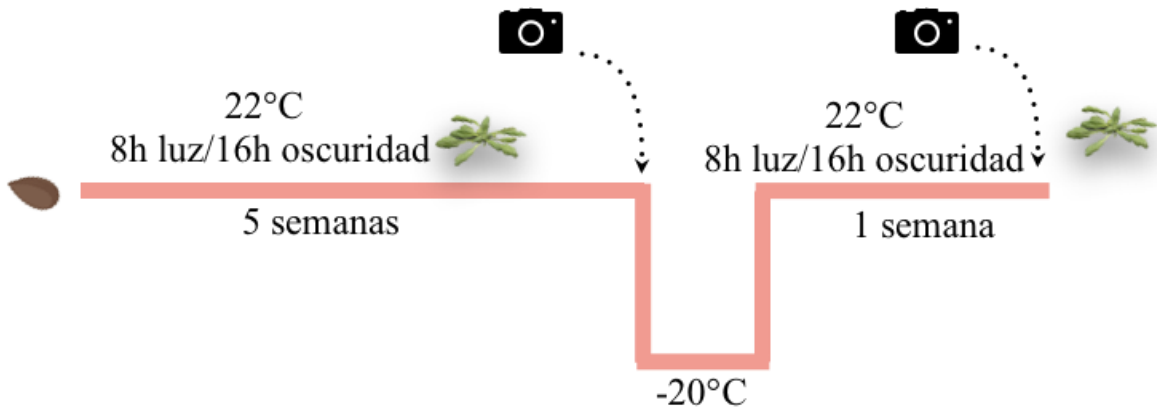


Figura 14. Diagrama del protocolo de estrés congelante para plantas de 5 semanas.



Figura 15. Escala de deterioro para plantas de *A. thaliana* de 5 semanas de edad sometidas a estrés por congelamiento. Los números del 0 al 4 representan la severidad del daño; plantas sin daño después del estrés (0), plantas con daño en 25% de las hojas (1), la mitad de las hojas se encuentran vivas y la mitad muertas (2), daño en 75% de las hojas (3) y plantas muertas (4).

8.2.3 PROTOCOLO DE ESTRÉS POR CONGELAMIENTO EN PLANTAS DE 8 SEMANAS

Plantas de cada genotipo (WT, *AteIF(iso)4E-1*, *AteIF4E-1* y *35S::eIF4E*) fueron sometidas al protocolo de estrés por congelamiento establecido anteriormente en nuestro laboratorio (Salazar, 2017). Un total de 10 plantas de cada genotipo fueron sembradas individualmente en macetas con sustrato para *Arabidopsis* (*Sunshine*, agrolita y vermiculita 3:1:1). Se estratificaron durante dos días a 4°C y posteriormente se colocaron en una cámara de crecimiento con fotoperíodo de día corto (8h luz y 16h oscuridad) a 22°C durante 8 semanas. Se realizó un registro fotográfico del fenotipo de todas las plantas, para posteriormente someterlas a estrés por congelamiento durante 1 hora a -20°C y a una recuperación corta durante 40 minutos a 4°C.

Finalmente, las plantas se colocaron en la cámara de crecimiento a 22°C durante 2 semanas, y se realizó el registro fotográfico del fenotipo de recuperación 2 semanas después del estrés y el grado de

daño de cada planta basado en la clorosis y muerte de las hojas, ejemplificado en la escala de la Figura 17.

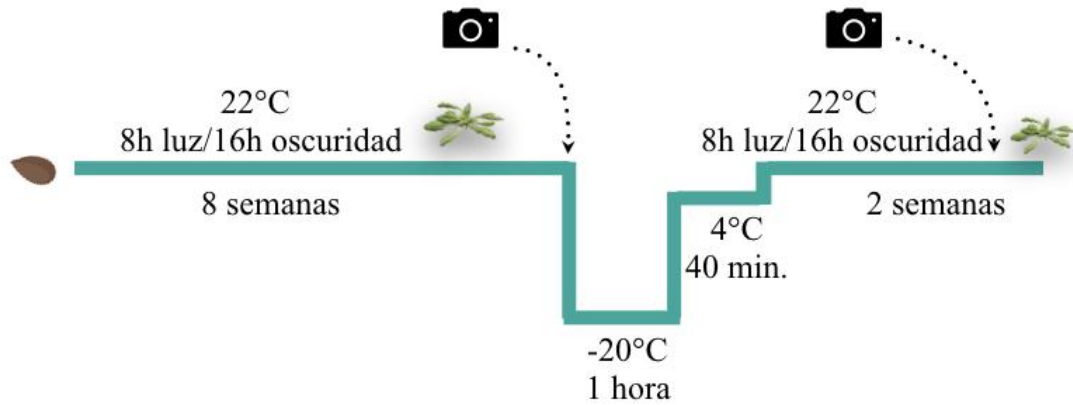


Figura 16. Diagrama del protocolo de estrés congelante para plantas de 8 semanas de edad.

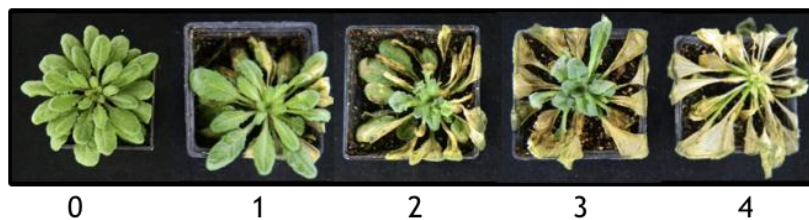


Figura 17. Escala de grado de daño post estrés en plantas de *A. thaliana* de 8 semanas de edad. Los números del 0 al 4 representan la severidad del daño; plantas sin daño después del estrés (0), plantas con daño en el 25% de las hojas más grandes (1), daño en el 50% de las hojas (2), daño en 75% de las hojas, permaneciendo sin daño las hojas jóvenes del meristemo (3), y plantas con el 100% de las hojas dañadas (4).

8.2.4 CORROBORACIÓN DE MUTANTES

Para la corroboración de las mutantes se utilizaron hojas de plantas crecidas durante un mes, a las cuales se les realizó la extracción de DNA genómico por medio del protocolo descrito con anterioridad para el *DNeasy® Plant Mini Kit* de *Qiagen* a partir de hojas de 5 plantas candidatas a ser mutantes para eIF4E, una planta candidata a ser mutante *35S::AteIF4E*, una planta candidata a ser mutante nula *AteIF(iso)4E-1* y una planta WT.

El DNA obtenido se utilizó para corroborar las inserciones de T-DNA que genera plantas mutantes de cada línea. Para las plantas *AteIF(iso)4E-1* se utilizó una mezcla de 3 cebadores (10µM c/u): “4E2KO1”, “4E2KO4” y “sdpm1”, esperando que plantas WT amplifiquen con los cebadores 4E2KO1 y 4E2KO4, mientras que las plantas mutantes lo hagan con los cebadores 4E2KO1 y sdpm1 (dentro del transposón) (Anexos, Tabla 22 y Figura 39).

En el caso de las plantas *35S::AteIF4E*, se utilizó una mezcla de 2 cebadores (10µM c/u): 4ETIC y 4E Rv (Anexos, Tabla 22 y Figura 40) que son útiles tanto para amplificar DNA genómico como para amplificar cDNA, esperando la amplificación de DNA genómico únicamente en las plantas WT, mientras que en plantas sobreexpresoras se amplificaría la región correspondiente al cDNA (presente en el cassette utilizado para la sobreexpresión).

Para las plantas *AteIF4E-1* se utilizó una mezcla de 3 cebadores (10 µM c/u): Z2015, Z2014 y LBb1 previamente diseñados por Gallot y Gallois en 2014 (Anexos, Tabla 22 y Figura 38), esperando que las plantas WT amplificaran con los cebadores Z2014 y Z2015, mientras que la planta mutante amplificara con Z2015 y LBb1 (dentro del T-DNA).

Las reacciones se elaboraron con los volúmenes y componentes especificados en la Tabla 11 y con las condiciones de la Tabla 12. Los productos se corrieron en gel de agarosa al 1.5% a 80 V por 50 minutos

Tabla 11. Componentes de la reacción de PCR con Kapa Taq ReadyMix de Kapa Biosystems, para corroborar inserción de transposones

Componente	Volumen (μ l)
Kapa Taq ReadyMix	5 μ l
H ₂ O	3.7 μ l
DNA	1 μ l
Mix de cebadores (10 μ M c/u)	0.3 μ l
Total	10 μ l

Tabla 12. Condiciones para la elaboración de PCR utilizando Kapa Taq ReadyMix de Kapa Biosystems

Condiciones	Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	95°C	1 min	1
Desnaturalización	95°C	30 seg.	35
Alineamiento	60°C	30 seg.	
Extensión	72°C	1 min	
Extensión final	72°C	7 min.	1
Preservación	4°C	∞	1

8.2.5 CORROBORACIÓN DE AUSENCIA DE TRANSCRITO (PLANTAS *ATEIF4E-1*)

Se realizó la extracción de RNA a partir de hojas de 5 plantas candidatas a ser mutantes para eIF4E (E1-E5) y una planta WT. Aproximadamente 0.5 g de hojas se maceraron en nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino que se colocó en un tubo *Eppendorf* de 1.5 ml estéril, se añadió 1 ml de Trizol® (*Invitrogen*) y se agitó vigorosamente por 15 segundos. Se incubó por 5 minutos a 25°C y se centrifugó a 12,00 x g durante 15 minutos a 4°C. En un tubo nuevo se recuperó el sobrenadante sin tocar la interfase y se añadieron 200 μ l de cloroformo, se agitó vigorosamente por 15 segundos, se incubó a 25°C por 3 minutos y se centrifugó a 12,000 x g durante 15 minutos a 4°C.

Se pasó el sobrenadante a un tubo nuevo y se agregaron 500 ml de isopropanol (mezclar por inversión únicamente). Se incubó la mezcla a -20°C por una hora.

Se centrifugó a 12,000 x g durante 10 minutos a 4°C, se descartó el sobrenadante y se lavó el *pellet* con 1 ml de etanol al 75% (mezcla por pipeteo suave). Se centrifugó a 7,500 x g durante 5 minutos a 4°C. Se secó el *pellet* durante 7 minutos y se resuspendió en 50 µl de H₂O DEPC. Se cuantificó el RNA obtenido y 3µg se trataron con *RQ1 RNase-Free DNase* (la reacción se especifica en la Tabla 13).

Tabla 13. Componentes y volumen de la reacción para tratamiento de RNA con DNasa.

Componente	Volumen (µl)
RNA	8 µl
RQ1 RNase-Free DNase 10X Reaction Buffer	1 µl
RQ1 RNase-Free DNase	1µl
H ₂ O	10 µl
Total	20 µl

Se incubó la mezcla por 30 minutos a 37°C. Después se añadió 1µl de *RQ1 DNase Stop Solution* para terminar la reacción y se incubó a 64°C por 10 minutos para inactivar la DNasa.

Posteriormente se purificó lo obtenido por medio de *RNA Clean and Concentrator*™ de *Zymo Research*. Se ajustaron las reacciones anteriores a 30µl y posteriormente se añadieron 100µl de *RNA Binding buffer* mezclando suavemente. Se añadió un volumen de etanol al 95-100%, se mezcló suavemente y se transfirió a una *Zymo-Spin*™ *IC Column* colocada sobre un tubo de colecta. Se centrifugó a 10,000 x g durante 30 segundos.

Se añadieron 400 µl de *RNA Prep Buffer* a la columna y se centrifugaron a 10,000 x g durante 30 segundos. Se agregaron 700 µl de *RNA Wash Buffer* a la columna y se centrifugó por 2 minutos.

Se transfirió la columna a un tubo nuevo, se añadieron 15µl de H₂O DEPC directo en la matriz y se centrifugaron las muestras a 10,000 x g durante 30 segundos. Posteriormente se cuantificó el RNA y se corrió en un gel de agarosa al 1.5% por 50 minutos para corroborar integridad.

A partir del RNA obtenido se generó cDNA utilizando el *ImProm-II*™ *Reverse Transcription System* de *Promega*. Se prepararon dos reacciones (A y B), que se especifican en la Tabla 14.

Tabla 14. Reacciones A y B para la obtención de cDNA a partir de RNA.

Reacción A (una por cada muestra)	Volumen (µl)
Oligonucleótido dT (10mM)	2 µl
RNA (1µg)	3µl
Total	5µl

Reacción B (1 muestra)	Volumen (µl)
ImProm-IITM 5X Reaction Buffer	4µl
MgCl ₂ 25 mM	2.4 µl
dNTP mix 10mM	1 µl
RNasin®	0.5 µl
H ₂ O	6.1 µl
ImProm-IITM Reverse Transcriptase	1µl

Se incubó la reacción A a 70°C por 5 minutos, después se colocó en hielo (4°C) por 2 minutos y se agregó la reacción B (20 µl totales). Se incubó la mezcla a 42°C por 60 minutos y posteriormente a 94°C por 2 minutos.

A partir de las muestras de cDNA obtenidas se realizó PCR. Se utilizaron los cebadores Actina1 Fw y Actina1 Rv (Anexos, Tabla 22) para la prueba control y los cebadores 4ETIC y 4E Rv (Anexos, Tabla 22 y Figura 40) para la amplificación de todo el transcrito de 4E. La reacción de PCR se realizó con base en la Tabla 15 y con las condiciones de la Tabla 16.

Tabla 15. Componentes y volumen de la reacción de PCR para corroborar ausencia de transcrito de eIF4E (At4g18040).

Componente	Volumen (
10X Taq Buffer con (NH ₄) ₂ SO ₄	1 µl
dNTP mix (2mM)	1 µl (0.2 mM c/u)
Oligonucleotido Fw (10mM)	0.2 µl (20nM)
Oligonucleotido Rv(10mM)	0.2 µl (20nM)
25 mM MgCl ₂	0.8 µl (Cf. 2mM)
DNA	2 µl (300 ng)
Taq DNA Polymerase	0.25 u
H ₂ O	4.75 µl
	Total 10 µl

Tabla 16. Condiciones para la elaboración de PCR por utilizando Taq DNA polimerasa recombinante de Thermo Scientific.

Condiciones	Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	95°C	5 minutos	1
Desnaturalización	95°C	60 segundos	35
Alineamiento	63.8°C	30 segundos	
Extensión	72°C	30 segundos	
Extensión final	72°C	10 minutos	1
Preservación	4°C	∞	1

9. RESULTADOS

9.1 SELECCIÓN DE LOS SGRNAS MÁS ADECUADOS PARA LA EDICIÓN DE EIF4E MEDIANTE CRISPR-CAS9

Con base en los datos obtenidos de las plataformas *Benchling* y *ChopChop* se eligieron 6 sgRNAs: 4 situados en el primer exón, 1 en el segundo y 1 en el tercero (Tabla 15 y Figura 41). Cuatro de éstos poseen secuencias reconocidas por enzimas de restricción, mismas que llegarían a eliminarse si se genera una mutación exitosa, lo cual podría servir como un indicativo del éxito del sistema. Los cuatro sgRNAs con dicha característica fueron nombrados con base en la enzima que actúa sobre parte de su secuencia, mientras que los dos restantes se denominaron sgRNA1 y sgRNA2.

Los probables sitios *off-target* para estos sgRNAs se muestran en la Tabla 18; se presentan los *off-targets* con hasta 3 desapareos y su localización en el genoma de *A. thaliana*, las secuencias subrayadas corresponden a las secuencias *off-target* donde existe una mayor probabilidad de realizarse un corte debido a la lejanía de los *mismatches* respecto a la secuencia PAM, mientras que los sgRNAs no subrayados poseen una probabilidad menor ya que los desapareos se encuentran cerca de la secuencia PAM y de Cas9. Los sgRNAs que no se presentan en la tabla no poseen sitios *off-target*. Es así que el sgRNA *ClaI* y sgRNA1 son, al menos teóricamente, los mejores guías debido al bajo número de *off-targets* y a la presencia de los mismos en sitios no codificantes.

Tabla 17. Secuencias elegidas como sgRNAs, incluyendo localización y presencia de sitios para enzimas de restricción.

Nombre	Secuencia	Posición	Enzima de restricción	<i>Off-target</i> score
sgRNA <i>XmnI</i>	AGAGAGAAAGAGAAGCAGTT	Exón 1	<i>XmnI</i>	46.7
sgRNA 1	TCCGATTGATCGATACCATG	Exón 1	-	68.3
sgRNA 2	ATCGCCGGAGGAGAAGGAGA	Exón 1	-	60.13
sgRNA <i>ClaI</i>	ATTGATCGATACCATGAGGA	Exón 1	<i>ClaI</i>	62.85
sgRNA <i>Bsu36I</i>	ATGGACTATGACTTTCCCTA	Exón 2	<i>Bsu36I</i>	60.24
sgRNA <i>Bpu10I</i>	TGCTTCAAACGAAGCTGCTC	Exón 3	<i>Bpu10I</i>	40.0

Tabla 18. Secuencias elegidas como sgRNAs, incluyendo localización y presencia de sitios para enzimas de restricción

	SITIO OFF TARGET	MISMATCHES	CHR	CORTE	PAM	GEN
sgRNA1	<u>TCCGATTGATTGACACCATG</u>	2	3	13,385,926	AGG	5´de Proteína FH2(similar a formina) que se une a actina (AT3G32420)
	<u>ATCGCCGGAGGAGCAGGAGC</u>	2	1	4,216,812	TGG	Proteína hipotética (AT1G12380)
sgRNA2	<u>GCCGCCGGAGGAGGAGGAGA</u>	3	4	82,803	AGG	Exón 1 de AHL7 (AT4G00200)
	<u>TTCGCCGGAGGAGGAGGAGG</u>	3	4	6,845,464	AGG	Exón 4 de RBOHI (AT4G11230.1)
	<u>ATCACCGGAGGAGGAGGAGG</u>	3	4	12,696,841	AGG	Proteína PRA1 (AT4G00005)
	<u>TTCGCGGAGGAGGAGGAGA</u>	3	5	6,310,140	AGG	Proteína de la familia CHCH similar a Cox-9 (AT5G18920)
	<u>GTCGCCGGCGGAGAAGGAGG</u>	3	1	6,971,839	AGG	Exón 1 de FREE1 (AT1G20110)
	<u>ATCGCCGGTGGTGTAGGAGA</u>	3	2	8,774,192	TGG	Transducin/WD40 repeat like superfamily protein (AT2G20330)
XmnI	<u>AGAGAGAAA CAGAAGTAGAT</u>	3	4	17,404,809	TGG	5´ de proteína transmembranal (AT4G36925)
	<u>AGAGAGAAAGAGAAAGGTT</u>	3	5	8,096,388	TGG	Proteína de la familia acil-transferasa tipo HXXXD (AT5G23970)
	<u>AGAGGGAAAGAGAATCTGTT</u>	3	5	8,354,989	CGG	ZF RH2-RING (AT5G24460)
	<u>AGAGAGAGAGAGAAGCCATT</u>	3	2	785,136	AGG	5´de proteína de la familia de cinasas ricas en leucina (AT2G02780)
	<u>AGAGAAGAAGAGAAGAAGTT</u>	3	2	7,440,353	GGG	5´de cinasa con dominio de repeticiones de tetratricopéptido (AT2G17090)
	<u>AGAGAGAGAGAGAAAGAGTT</u>	3	4	11,102,562	GGG	5´ de proteína de la superfamilia similar a pectina liasa (AT4G24780)
ClalI	<u>ATTGATTGACACCATGAGGA</u>	2	3	13,385,930	TGG	5´de Proteína FH2(similar a formina) que se une a actina(AT3G32410)

De resultar exitosa alguna inserción o deleción con el sgRNA 1, sgRNA 2, sgRNA *ClaI* o sgRNA *XmnI*, se esperaría la generación de un codón de paro en el primer exón del gen que codifica para eIF4E o bien la inserción de bases que generen el corrimiento del marco de lectura, con lo que no sea posible la generación de una proteína eIF4E funcional. En el caso la introducción de dos sgRNAs a la vez, uno en el primer exón junto con sgRNA *Bsu36I* (en el tercer exón) o *Bpu10I* (en el cuarto exón), se esperaría la escisión de un fragmento grande del gen, con lo que la probabilidad de generar la proteína sería prácticamente nula.

Una vez realizada la ligación por *GoldenGate*, se obtuvo que la mayoría de las colonias obtenidas durante la transformación contenían plásmidos pHSE401 con el sgRNA correctamente ligado, debido a que, al realizar la réplica en cajas de medio con espectinomicina (50 mg/ml), éstas fueron incapaces de crecer, evidenciando de este modo la pérdida del fragmento de resistencia a dicho antibiótico y la incorporación del sgRNA correspondiente (Figura 18).

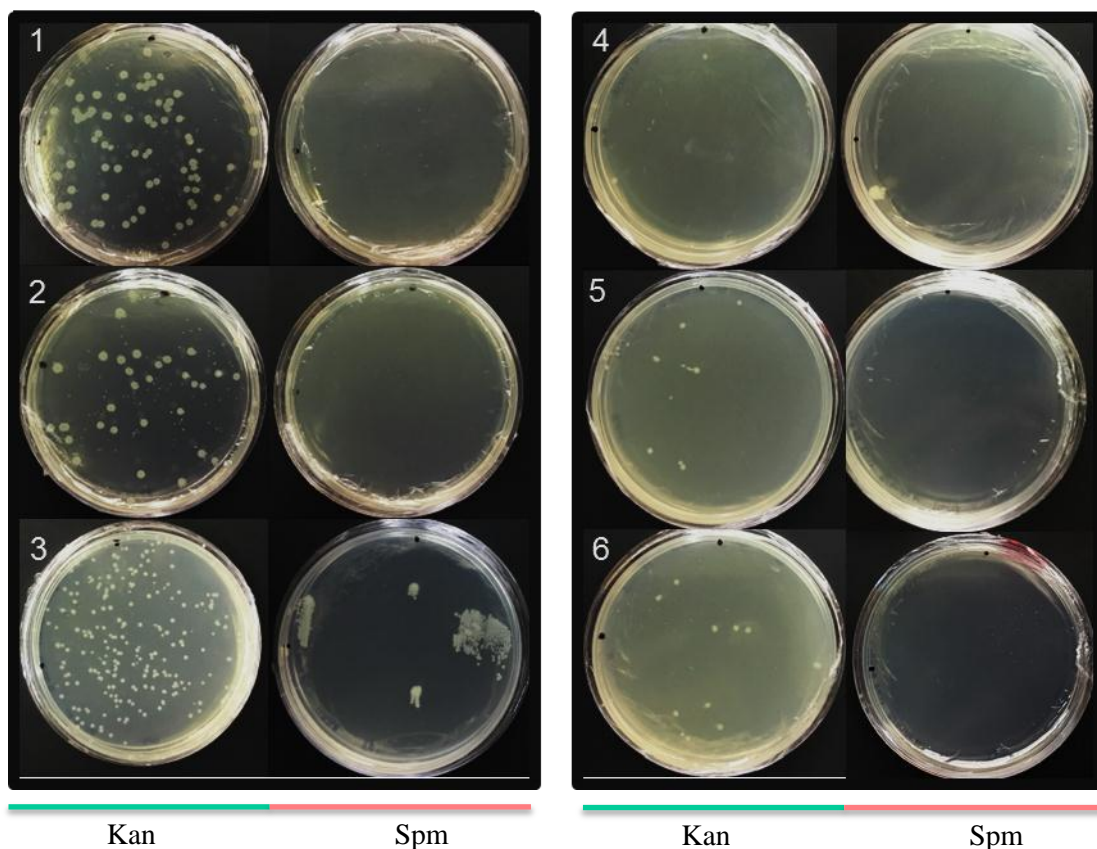


Figura 18. Placas de medio LB con kanamicina y espectinomicina. Se realizó la réplica de las placas de LB con kanamicina en placas con LB en espectinomicina. Las colonias bacterianas que

crecen en kanamicina pero no así en espectinomycinina son las que poseen el sgRNA correctamente insertado. sgRNA1 (1), sgRNA2 (2), *XmnI* (3), *ClaI* (4), *Bsu36I* (5) y *Bpu10I* (6).

Para corroborar que los sgRNAs se encontraban correctamente insertados en el vector pHSE401, se realizó un PCR de colonias elegidas al azar, esperando un fragmento de 423 pb. Una vez corroborada la inserción, los plásmidos obtenidos fueron enviados a secuenciar. Los resultados de la secuenciación de los plásmidos generados, indicaron el sgRNA se encontraba correctamente integrado, y su secuencia coincidía en su totalidad con el DNA blanco. El resto de las regiones cercanas no cuentan con cambios, lo que confirma la integridad del vector (Figura 19).

```

351                                     400
pHSE401 CTTCAAAAGTCCCACATCGCTTAGATAAGAAAACGAAGCTGAGTTTATAT
XmnI    CTTCAAAAGTCCCACATCGCTTAGATAAGAAAACGAAGCTGAGTTTATAT
sgRNA1  CTTCAAAAGTCCCACATCGCTTAGATAAGAAAACGAAGCTGAGTTTATAT
sgRNA2  CTTCAAAAGTCCCACATCGCTTAGATAAGAAAACGAAGCTGAGTTTATAT
CIaI    CTTCAAAAGTCCCACATCGCTTAGATAAGAAAACGAAGCTGAGTTTATAT
Bsu36I  CTTCAAAAGTCCCACATCGCTTAGATAAGAAAACGAAGCTGAGTTTATAT
Bpu10I  CTTCAAAAGTCCCACATCGCTTAGATAAGAAAACGAAGCTGAGTTTATAT

.....

401                                     450
pHSE401 ACAGCTAGAGTCGAAGTAGTGATTG-----GTTTT
XmnI    ACAGCTAGAGTCGAAGTAGTGATTGAGAGAGAAAGAGAAGCAGTTGTTTT
sgRNA1  ACAGCTAGAGTCGAAGTAGTGATTGICCGATTGATCGATACCATGTTTT
sgRNA2  ACAGCTAGAGTCGAAGTAGTGATTGATCGCCGGAGGAGAAGGAGA GTTTT
CIaI    ACAGCTAGAGTCGAAGTAGTGATTGATTGATCGATACCATGAGGA GTTTT
Bsu36I  ACAGCTAGAGTCGAAGTAGTGATTGATGGACTATGACTTTCCCTA GTTTT
Bpu10I  ACAGCTAGAGTCGAAGTAGTGATTGTGCTTCAAACGAAGCTGCTC GTTTT

.....

451                                     500
pHSE401 AGAGCTAGAAATAGCAAGTAAAATAAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAA
XmnI    AGAGCTAGAAATAGCAAGTAAAATAAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAA
sgRNA1  AGAGCTAGAAATAGCAAGTAAAATAAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAA
sgRNA2  AGAGCTAGAAATAGCAAGTAAAATAAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAA
CIaI    AGAGCTAGAAATAGCAAGTAAAATAAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAA
Bsu36I  AGAGCTAGAAATAGCAAGTAAAATAAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAA
Bpu10I  AGAGCTAGAAATAGCAAGTAAAATAAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAA

```

Figura 19. Alineamiento de los resultados obtenidos de la secuenciación de los 6 plásmidos que contienen un sgRNA cada uno. En rojo se muestran las regiones no coincidentes, mismas que corresponden a la secuencia de sgRNA integrada. Las regiones cercanas no poseen cambios, con lo que se comprueba la identidad del plásmido.

9.2 DESPUÉS DE 3 TRASFORMACIONES POR FLORAL-DIP SE OBTUVIERON 7 PLANTAS CANDIDATAS A MUTANTES

Después de transformar de *A. thaliana* mediante *floral dip* y seleccionar en higromicina por el método de Harrison *et al.*, (2014), se obtuvieron distintas respuestas: semillas sin germinar, plántulas con poca elongación de hipocótilo (0.1-0.3 cm) y plántulas con un elongamiento mayor, similar al reportado por Harrison *et al.*, (2014) (0.7-1.0 cm) (Figura 20). Con estos fenotipos se hace evidente que dichas plantas poseen el plásmido integrado en el genoma debido a que son capaces de generar proteínas necesarias para la escotomorfogénesis. Las plantas con fenotipo de selección positiva fueron transferidas a sustrato para *Arabidopsis* con la finalidad de que continuaran con su desarrollo.



Figura 20. Fenotipo de selección positiva al sembrarse en medio MS con higromicina 15 µg/ml. A la izquierda se observa una planta con fenotipo de selección positiva (hipocótilo elongado), sugiriendo la inserción del plásmido pHSE401 en el genoma. A la izquierda se muestra planta sin inserción de plásmido (hipocótilo sin elongación)

Como se mencionó anteriormente, para la transformación con *A. tumefaciens*, las plantas fueron sembradas de dos maneras distintas: un individuo por maceta (aproximadamente 20 contenedores) o de 20 a 30 individuos por maceta (Zhang *et al.*, 2006), obteniéndose mejores resultados al utilizar este último protocolo, donde se obtuvieron aproximadamente 14 plantas con fenotipo positivo, contrario a lo obtenido en la siembra de manera individual, donde se obtuvieron solo 2 individuos por cada 40 plantas transformadas.

Como resultado de la primera y segunda transformación se obtuvo únicamente una planta con fenotipo positivo derivada de la transformación con el sgRNA 2.

De la tercera transformación se generaron 8 plantas con fenotipo positivo obtenidas mediante la transformación con sgRNA *XmnI*, 3 con sgRNA *Clal* y 3 con el sgRNA 2. Cabe destacar que no se obtuvieron plantas con fenotipo positivo de selección derivada de cotransformaciones de plásmidos.

En la última transformación se obtuvieron 14 plantas con fenotipo de selección positiva: 2 plantas derivadas del sgRNA1, una del sgRNA 2 y 11 del sgRNA *Clal*. Sin embargo, 7 de estas plantas murieron después a su traspaso a sustrato, por lo que únicamente se obtuvieron 7 plantas.

Para las plantas de la primera y segunda transformación, debido a que el protocolo con endonucleasa T7 no fue exitoso, se envió a secuenciar el fragmento correspondiente al primer exón de eIF4E. Al realizar el alineamiento de la secuencia WT con la secuencia de las plantas candidatas se obtuvo que no existían diferencias entre ellas, por lo que a pesar de presentar fenotipo de selección positivo y probable inserción del plásmido, en dicha planta no se generaron inserciones, deleciones o cambios de bases.

A partir de la tercera transformación, se realizó HRM para corroborar la presencia de inserciones o deleciones en las plantas candidatas. Los resultados de la tercera ronda de transformación arrojaron el agrupamiento de secuencias en 3 clusters distintos, lo que sugiere que existen 3 diferentes variantes del gen en las muestras analizadas.

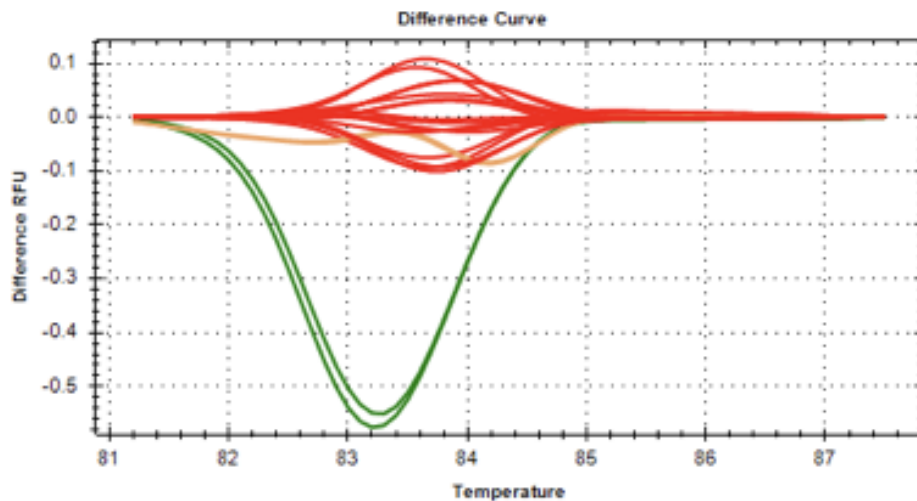


Figura 21. Curva de diferencia de temperaturas de fusión (plantas de la tercera transformación). En rojo se observan las curvas con menores diferencias respecto a la muestra WT, mientras que en naranja y verde se muestran las curvas que difieren respecto a la planta WT y por lo tanto se agruparon de manera distinta, sugiriendo así la presencia de mutaciones.

Al comparar la curva de diferencia de temperatura de fusión de las 8 plantas con la curva de diferencia de la muestra control (WT), se obtuvo que seis de las plantas candidatas a ser mutantes se agruparon junto con la muestra WT, indicando que no existe diferencia entre las temperaturas de fusión de dichas muestras. Por otra parte hubo 2 muestras correspondientes a las plantas #6 y #8 (transformadas con sgRNA 2) que formaron dos grupos distintos cada una, una temperatura de fusión que nos indica la presencia de mutaciones (Figura 21).

Posteriormente, se secuenció el fragmento purificado de eIF4E correspondiente al primer exón de las plantas que se agruparon en clusters distintos (#6 y # 8) al que contenía a la secuencia WT con la finalidad de conocer las mutaciones presentes en dicha secuencia (Figura 22).

Los resultados de la secuenciación mostraron que la planta #8 posee una secuencia WT, lo que indica que a pesar de las diferencias en las curvas de fusión, no se generaron cambios de bases. En el caso de la muestra #6, se observa una sustitución de una C por una S, la cual es una base degenerada que puede ser tanto G como C, indicando heterocigocidad en esa posición.

Los resultados de la secuenciación en conjunto con los de HRM sugieren que es posible la presencia de mutaciones, sin embargo, es probable que las plantas obtenidas a partir de transformaciones sean heterocigotas, por lo que al secuenciar múltiples fragmentos de PCR, cada uno con secuencias diferentes provenientes de cromosomas distintos, podría provocar la obtención de resultados poco confiables. Es por ello que se decidió implementar otro protocolo para la secuenciación de fragmentos, insertándolos en un vector de clonación que permita la secuenciación individual de fragmentos.

```

41                                     80
eIF4E AGAGAGATAGAGAGAAAGAGAAGCAGTTCGGAGAAACAAT
Mut A3 AGAGAGATAGAGAGAAAGAGAAGCAGTTCGGAGAAACAAT
Mut F2 AGAGAGATAGAGAGAAAGAGAAGCAGTTCGGAGAAACAAT
Mut6   AGAGAGATAGAGAGAAAGAGAAGCAGTTCGGAGAAACAAT
Mut8   AGAGAGATAGAGAGAAAGAGAAGCAGTTCGGAGAAACAAT
.....

81                                     120
eIF4E GCGCGGTAGAAGACACTCCCAAATCTGTTGTAACGGAAGAA
Mut A3 GCGCGGTAGAAGACACTCCCAAATCTGTTGTAACGGAAGAA
Mut F2 GCGCGGTAGAAGACACTCCCAAATCTGTTGTAACGGAAGAA
Mut6   GCGCGGTAGAAGACACTCCCAAATCTGTTGTAACGGAAGAA
Mut8   GCGCGGTAGAAGACACTCCCAAATCTGTTGTAACGGAAGAA
.....

121                                    160
eIF4E GCTAAGCCTAATTCAATAGAGAATCCGATTGATCGATAACC
Mut A3 GCTAAGCCTAATTCAATAGAGAATCCGATTGATCGATAACC
Mut F2 GCTAAGCCTAATTCAATAGAGAATCCGATTGATCGATAACC
Mut6   GCTAAGCCTAATTCAATAGAGAATCCGATTGATCGATAACC
Mut8   GCTAAGCCTAATTCAATAGAGAATCCGATTGATCGATAACC
.....

161                                    200
eIF4E ATGAGGAAGGTGATGATGCCGAAGAAGGAGAGATCGCCGG
Mut A3 ATGAGGAAGGTGATGATGCCGAAGAAGGAGAGATCGCCGG
Mut F2 ATGAGGAAGGTGATGATGCCGAAGAAGGAGAGATCGCCGG
Mut6   ATGAGGAAGGTGATGATGCCGAAGAAGGAGAGATCGCCGG
Mut8   ATGAGGAAGGTGATGATGCCGAAGAAGGAGAGATCGCCGG
.....

201                                    240
eIF4E AGGAGAAGGAGACGGAAACGTTGACGAATCGAGCAAATCC
Mut A3 AGGAGAAGGAGACGGAAACGTTGACGAATCGAGCAAATCC
Mut F2 AGGAGAAGGAGACGGAAACGTTGACGAATCGAGCAAATCC
Mut6   AGGAGAAGGAGACGGAAACGTTGAGGAATCGAGCAAATCC
Mut8   AGGAGAAGGAGACGGAAACGTTGACGAATCGAGCAAATCC
.....

241                                    280
eIF4E GGTGTTCTGAATCGCATCCTCTGGAACATTCATGGACTT
Mut A3 GGTGTTCTGAATCGCATCCTCTGGAACATTCATGGACTT
Mut F2 GGTGTTCTGAATCGCATCCTCTGGAACATTCATGGACTT
Mut6   GGTGTTCTGAATCGCATCCTCTGGAACATTCATGGACTT
Mut8   GGTGTTCTGAATCGCATCCTCTGGAACATTCATGGACTT

```

Figura 22. Alineamiento de secuencia WT de eIF4E con la secuencia obtenida por secuenciación para las plantas A3, F2, 6 y 8 derivadas de la segunda y tercera transformación. En verde se marca el codón de inicio y en azul la correspondiente al sgRNA 2.

A las plantas de la cuarta transformación también se les sometió al protocolo de HRM, donde las plantas WT, #1, #2, #12 derivadas de sgRNA *ClaI*, sgRNA1 y sgRNA 2, se agruparon en un mismo *cluster* (curvas rojas), mientras que las plantas #3, #11 y 13, derivadas de sgRNA *ClaI*, se agruparon en un *cluster* distinto (curvas verdes) y la planta #14, derivada de sgRNA *ClaI*, en otro grupo (curva azul) (Figura 23), indicando así que 4 plantas podrían poseer secuencias distintas a la secuencia de la planta WT.

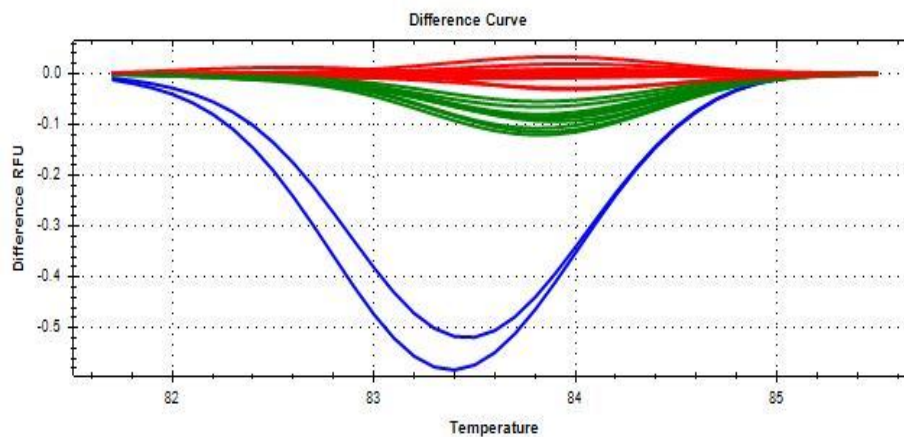


Figura 23. Curva de diferencia de temperaturas de fusión (plantas de la cuarta transformación). En rojo se observan las curvas con menores diferencias respecto a la muestra WT, mientras que en verde y azul se muestran las curvas que difieren respecto a la planta WT y por lo tanto se agruparon de manera distinta, sugiriendo así la presencia de mutaciones.

En el caso de estas plantas, se amplificó la región correspondiente al primer exón de eIF4E y se ligó en el vector *pGEM®-T Easy Vector System* para enviar a secuenciar únicamente una de las clonas y evitar los problemas que involucra la secuenciación de múltiples fragmentos de PCR que pudieran poseer secuencias distintas. Además de las plantas de la cuarta transformación, se ligó también el fragmento de eIF4E correspondiente a la planta #6 de la tercera transformación para corroborar los resultados obtenidos con anterioridad. Todas las muestras se enviaron a secuenciar obteniéndose cambios de base en las plantas #6, #13 y #14 (Figura 24). Los cambios de base se detectaron aproximadamente 35 bases río arriba y 100 bases río abajo del sitio blanco de los sgRNAs 1 (blanco de planta #6) y *ClaI* (blanco de plantas #13 y #14).

```

161                                     200
eIF4E GGAGAAACAATGGCGGTAGAAGACACTCCCAAATCTGTTG
Mut3  GGAGAAACAATGGCGGTAGAAGACACTCCCAAATCTGTTG
Mut6  GGAGAAACAATGGCGGTAGAAGACACTCCCAAATCTGTTG
Mut13 GGAGAAACAATGGCGGTAGAAGACACTCCCAAATCTGTTG
Mut11 GGAGAAACAATGGCGGTAGAAGACACTCCCAAATCTGTTG
Mut14 GGAGAAACAATGGCGGTAGAAGACACTCCCAAATCTGTTG
.....

201                                     240
eIF4E TAACGGAAGAAGCTAAGCCTAATTCAATAGAGAATCCGAT
Mut3  TAACGGAAGAAGCTAAGCCTAATTCAATAGAGAATCCGAT
Mut6  TAACGGAAGAAGCTAAGCCTAATTCAATAGAGAATCCGAT
Mut13 TAACGGAAGAAGCTAAGCCTAATTCAATAGAGAATCCGAT
Mut11 TAACGGAAGAAGCTAAGCCTAATTCAATAGAGAATCCGAT
Mut14 TGACGGAAGAAGCTAAGCCTAATTCAATAGAGAATCCGAT
.....

241                                     280
eIF4E TGATCGATACCATGAGGAAGGTGATGATGCCGAAGAAGGA
Mut3  TGATCGATACCATGAGGAAGGTGATGATGCCGAAGAAGGA
Mut6  TGATCGATACCATGAGGAAGGTGATGATGCCGAAGAAGGA
Mut13 TGATCGATACCATGAGGAAGGTGATGATGCCGAAGAAGGA
Mut11 TGATCGATACCATGAGGAAGGTGATGATGCCGAAGAAGGA
Mut14 TGATCGATACCATGAGGAAGGTGATGATGCCGAAGAAGGA
.....

281                                     320
eIF4E GAGATCGCCGGAGGAGAAGGAGACGGAACGTTGACGAAT
Mut3  GAGATCGCCGGAGGAGAAGGAGACGGAACGTTGACGAAT
Mut6  GAGATCGCCGGAGGAGAAGGAGACGGAACGTTGACGAAT
Mut13 GAGATCGCCGGAGGAGAAGGAGACGGAACGTTGACGAAT
Mut11 GAGATCGCCGGAGGAGAAGGAGACGGAACGTTGACGAAT
Mut14 GAGATCGCCGGAGGAGAAGGAGACGGAACGTTGACGAAT
.....

321                                     360
eIF4E CGAGCAAATCCGGTGTTCCTGAATCGCATCCTCTGGAACA
Mut3  CGAGCAAATCCGGTGTTCCTGAATCGCATCCTCTGGAACA
Mut6  CGAGCAAATCCGGTGTTCCTGAATCGCATCCTCTGGAACA
Mut13 CGAGCAAATCCGGTGTTCCTGAATCGCATCCTCTGGAACA
Mut11 CGAGCAAATCCGGTGTTCCTGAATCGCATCCTCTGGAACA
Mut14 CGAGCAAATCCGGTGTTCCTGAATCGCATCCTCTGGAACA
.....

361                                     400
eIF4E TTCATGGACTTTCTGGTTCGATAATCCTGCTGTGAAATCG
Mut3  TTCATGGACTTTCTGGTTCGATAATCCTGCTGTGAAATCG
Mut6  TTCATGGACTTTCTGGTTCGATAATCCTGCTGTGAAATCG
Mut13 TTCATGGACTTTCTGGTTCGATAATCCTGCTGTGAAATCG
Mut11 TTCATGGACTTTCTGGTTCGATAATCCTGCTGTGAAATCG
Mut14 TTCATGGACTTTCTGGTTCGATAATCCTGCTGTGAAATCG
.....

```

Figura 24. Resultados de la secuenciación de plantas 3, 6, 13, 11 y 14. En verde se marca el codón de inicio, en naranja la secuencia correspondiente al sgRNA ClaI y en morado la correspondiente al sgRNA 1.

No se obtuvieron inserciones o deleciones de fragmentos, aunque sí se detectaron 3 cambios de base: en la planta # 6 se detectó una S (base degenerada que puede ser tanto C como G), para la planta #13 hubo un cambio de A por C y en la planta #14 un cambio de A por G.

Finalmente se realizó la traducción de las secuencias obtenidas con base en el marco abierto de lectura del gen codificante para eIF4E (Figura 25). Se obtuvo que tanto el cambio de base de la planta 14 (A por G) como el de la planta #13 (A por C), generaban mutaciones silenciosas, por lo que el aminoácido generado a partir de ellas es el mismo que el generado a partir de la secuencia WT de eIF4E (Figura 25). Para la base degenerada de la planta #6 se determinó que solo se presentaría un cambio de aminoácido en caso de que existiera un cambio de base a C, lo que generaría un cambio de ácido glutámico (E) a glutamina (Q).

eIF4EWT	MAVEDTPKSVVTEEAKPNSIENPIDRYHEEGDDAEEGEIAGGEGDGNVDESSKSGVPESH	60
Mut3	MAVEDTPKSVVTEEAKPNSIENPIDRYHEEGDDAEEGEIAGGEGDGNVDESSKSGVPESH	60
Mut11	MAVEDTPKSVVTEEAKPNSIENPIDRYHEEGDDAEEGEIAGGEGDGNVDESSKSGVPESH	60
Mut13	MAVEDTPKSVVTEEAKPNSIENPIDRYHEEGDDAEEGEIAGGEGDGNVDESSKSGVPESH	60
Mut14	MAVEDTPKSVVTEEAKPNSIENPIDRYHEEGDDAEEGEIAGGEGDGNVDESSKSGVPESH	60
Mut6	MAVEDTPKSVVTEXAKPNSIENPIDRYHEEGDDAEEGEIAGGEGDGNVDESSKSGVPESH	60

eIF4EWT	PLEHSWTFWFDNPAVKSQTSW	82
Mut3	PLEHSWTFWFDNPAVKSQTSW	82
Mut11	PLEHSWTFWFDNPAVKSQTSW	82
Mut13	PLEHSWTFWFDNPAVKSQTSW	82
Mut14	PLEHSWTFWFDNPAVKSQTSW	82
Mut6	PLEHSWTFWFDNPAVKSQTSW	82

Figura 25. Aminoácidos resultantes de las secuencias obtenidas para las plantas #3, #6, #11, #13 y #14.

9.3 LAS PLANTAS MUTANTES DE LOS DISTINTOS FACTORES 4E PRESENTAN RESPUESTAS DISTINTAS ANTE EL ESTRÉS CONGELANTE

9.3.1 LAS MUTANTES Y SOBREENPRESORAS DE LOS FACTORES 4E CONSERVAN LA INSERCIÓN DE T-DNA Y TRANSPOSONES ESENCIALES PARA SU SILENCIAMIENTO O SOBREENPRESIÓN.

Para realizar los protocolos de estrés por congelamiento primeramente se corroboró la inserción de T-DNA correspondiente para la generación de cada una de las líneas mutantes (*AteIF4E-1*, *AteIF(iso)4E* y *35::AteIF4E*).

Para la corroboración de la mutante nula para *eIF(iso)4E* (*AteIF4E-1*), se utilizaron 3 cebadores: los primeros dos “4E2KO2” y “4E2KO4” se encuentran en el primer y tercer exón respectivamente, mientras que el cebador “dspm” se encuentra entre 4E2KO1 y 4E2KO4, específicamente sobre el transposón con el que se interrumpe el gen que codifica para *eIF(iso)4E* (At5g35620) (Anexos, Tabla 22 y Figura 39).

Se esperaba que las plantas mutantes amplificaran la región correspondiente a la región entre el cebador 4E2KO1 y el cebador situado dentro del transposón insertado (aproximadamente 400pb) y que las plantas WT, al no poseer el transposón amplificarán una banda de aproximadamente 700 pb con los cebadores 4E2KO1 y 4E2KO4 (Figura 26). Los tamaños obtenidos coinciden con los esperados, por lo que se confirmó que la planta en cuestión es nula para *eIF(iso)4E*.

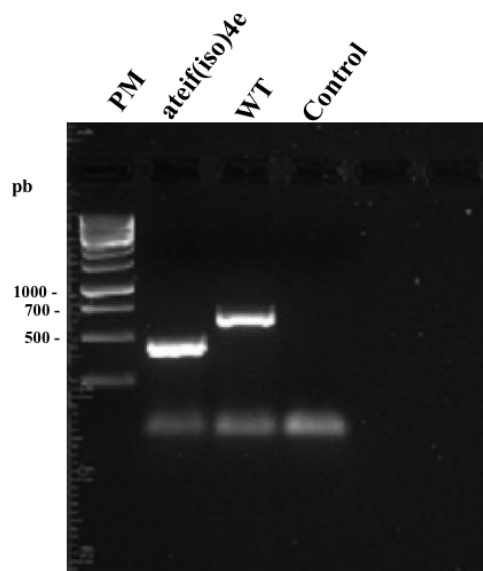


Figura 26. Corroboración de presencia de transposon que genera plantas mutantes nulas de eIF(iso)4E. Las plantas mutantes (*AteIF(iso)4E-1*) amplifican un fragmento de menor tamaño con respecto a las plantas silvestres (WT) que no poseen inserción.

En el caso de las plantas sobreexpresoras de eIF4E (*35S::AteIF4E*), se utilizaron los cebadores “4ETIC” y “4Erv”, localizados en el primer y último exón respectivamente (Anexos, Tabla 22 y Figura 40). Cabe señalar que estos cebadores son útiles para amplificar DNA genómico y cDNA; el DNA genómico amplificará un tamaño aproximado de 1413 pb, mientras que el cDNA amplifica 729 pb. En este caso se espera que en las plantas WT se obtenga un fragmento de 1413 pb, mientras que en las plantas *35S::eIF4E* se obtenga tanto la secuencia de DNA genómico como la de cDNA, ya que la construcción para la sobreexpresión se generó mediante la secuencia de cDNA asociada a un promotor 35S (Figura 27), por lo que cuenta con ambas formas en el genoma. En la planta *35S::AteIF4E* únicamente amplificó la secuencia correspondiente al cDNA debido a que ésta se encuentra insertada en múltiples ocasiones en el genoma y al ser más pequeño el fragmento se sintetiza con mayor facilidad durante la reacción de PCR.

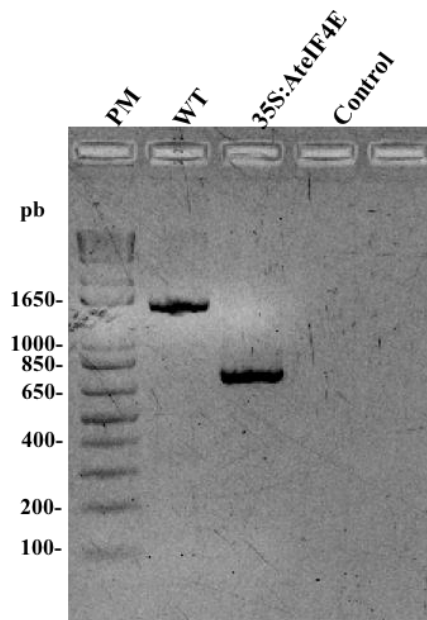


Figura 27. Corroboración de la presencia de cDNA en el genoma que genera sobreexpresión de eIF4E. Las plantas silvestres (WT) amplificaron la región correspondiente a DNA genómico, mientras que las plantas *35S::AteIF4E* amplifican el tamaño correspondiente al cDNA.

Las plantas mutantes para eIF4E (*AteIF4E-1*), fueron donadas por el Dr. Jean Luc Gallois del *Institute National De La Recherche Agronomique*, Francia. Para su corroboración se utilizaron los cebadores “Z2015”, “Z2014” y “LBb1”, situados en el primer exón, cuarto exón y en la inserción de T-DNA respectivamente. Tal como se esperaba, las plantas WT amplificaron los 1000 pb entre Z2015 y Z2014, mientras que las plantas mutantes amplificaron una región más pequeña de aproximadamente 500pb correspondiente a la longitud entre el Z2015 y LBb1, situado dentro de la inserción (Figura 28).

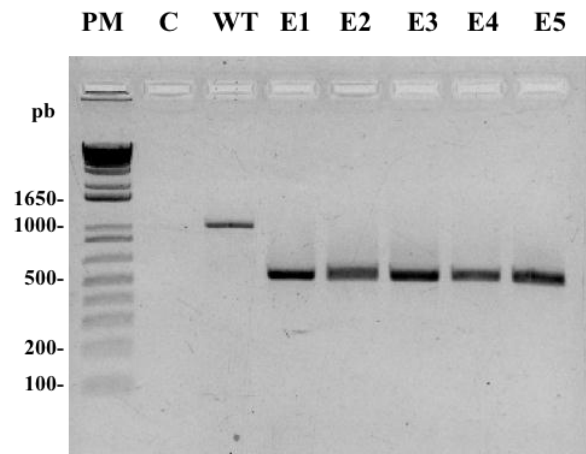


Figura 28. Corroboración de inserción de T-DNA que genera mutantes para eIF4E. Plantas silvestres (WT) amplifican una banda de aproximadamente 1000 pb que es la distancia entre el exón 1 y 4, mientras que las plantas mutantes nulas para *eIF4E* (E1- E5), amplifican la región correspondiente a la distancia entre el exón 1 y la inserción de T-DNA.

9.3.2 LAS PLANTAS SALK-145583 CARECEN DEL TRASCRITO QUE GENERA A LA PROTEÍNA eIF4E

Para corroborar la ausencia de *eIF4E* se realizó la extracción de RNA total a partir del cual se generó cDNA con el que se realizó un RT-PCR para evaluar la ausencia del transcrito de eIF4E. Se empleó como control la amplificación del transcrito de actina para probar la presencia de cDNA en las muestras, así mismo se utilizó DNA genómico de plantas WT y de una planta mutante nula de eIF4E (E1) para asegurar que la amplificación fuera producto del cDNA y no de una contaminación por DNA genómico (Figura 29). Para evaluar la ausencia de *eIF4E* se utilizaron los cebadores 4ETIC y 4ERv, que como se mencionó anteriormente, amplifican tanto DNA genómico como cDNA.

Para el caso de actina, todas las muestras amplificaron el fragmento correspondiente a 150 pb, por lo que todas las muestras contienen cDNA. En el caso de la amplificación de *eIF4E*, el DNA genómico de plantas WT amplificó los 1413 pb esperados, mientras que el cDNA de plantas WT amplificó un fragmento menor de 729 pb, probando que no existe contaminación por DNA genómico. Tanto el DNA genómico como el cDNA de plantas mutantes, no amplificaron ningún fragmento (Figura 29), por lo que se asegura que se trata de mutantes nulas para eIF4E.

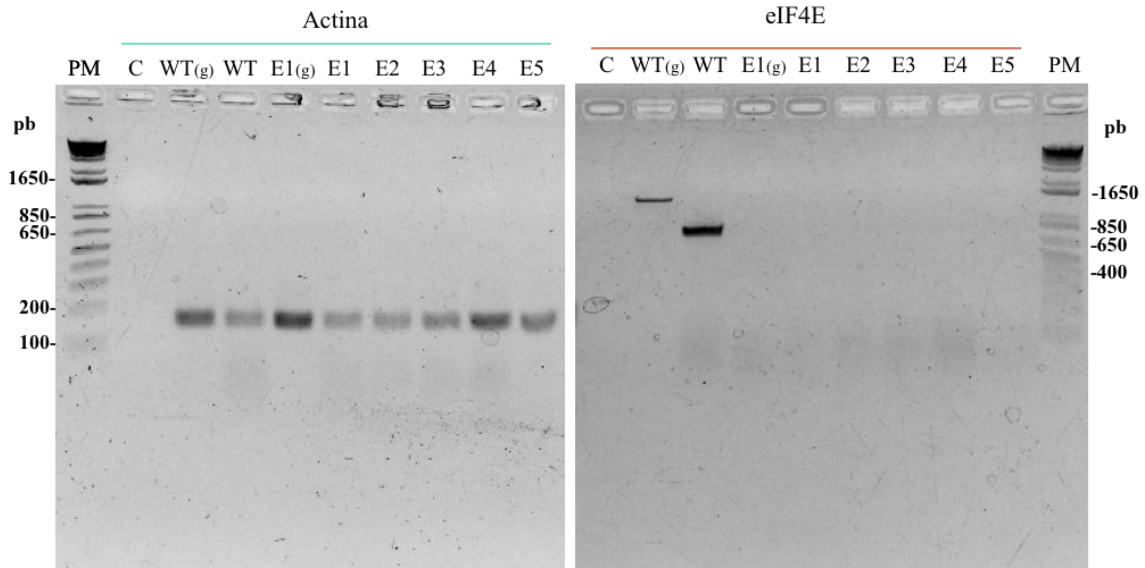


Figura 29. Productos de PCR para la amplificación de *ACT1* y *eIF4E*. Las muestras WT (g) y E1(g) son DNA genómico de plantas WT y mutantes para *eIF4E* respectivamente. El resto de las muestras corresponden a cDNA obtenido a partir de la extracción total de RNA. El panel de la izquierda presenta la amplificación del transcrito de actina (aproximadamente 150pb para DNA genómico y para cDNA); el panel de la derecha presenta la amplificación de *eIF4E* con un tamaño de 1413 pb en DNA genómico y 729 en cDNA. Marcador de 1000 pb. Mix de PCR sin DNA/cDNA como control.

9.3.3 LA MUTACIÓN DE EIF(ISO)4E Y EIF4E RESULTA DETRIMENTAL PARA LA RESISTENCIA A ESTRÉS CONGELANTE EN PLANTAS DE 5 SEMANAS DE EDAD

Plantas de las líneas WT, *AteIF(iso)4E-1*, *AteIF4E-1* y *35S::eIF4E* de 5 semanas de edad fueron sometidas al protocolo de estrés por congelamiento descrito con anterioridad. Primero se realizó una prueba piloto para determinar el tiempo de exposición necesario para encontrar fenotipos de daño diferenciales entre las líneas evaluadas. En la Figura 3 pueden observarse los fenotipos representativos de cada línea antes y una semana después del estrés a -20°C durante 1, 2 y 3 horas respectivamente (Figura 30). A cada una de las plantas evaluadas se les asignó un número del 0 al 4 dependiendo el grado de deterioro (proporción de hojas cloróticas y/o muertas) que presentaron después de una semana de recuperación (Figura 30) y posteriormente los datos se promediaron y graficaron (Figura 31).

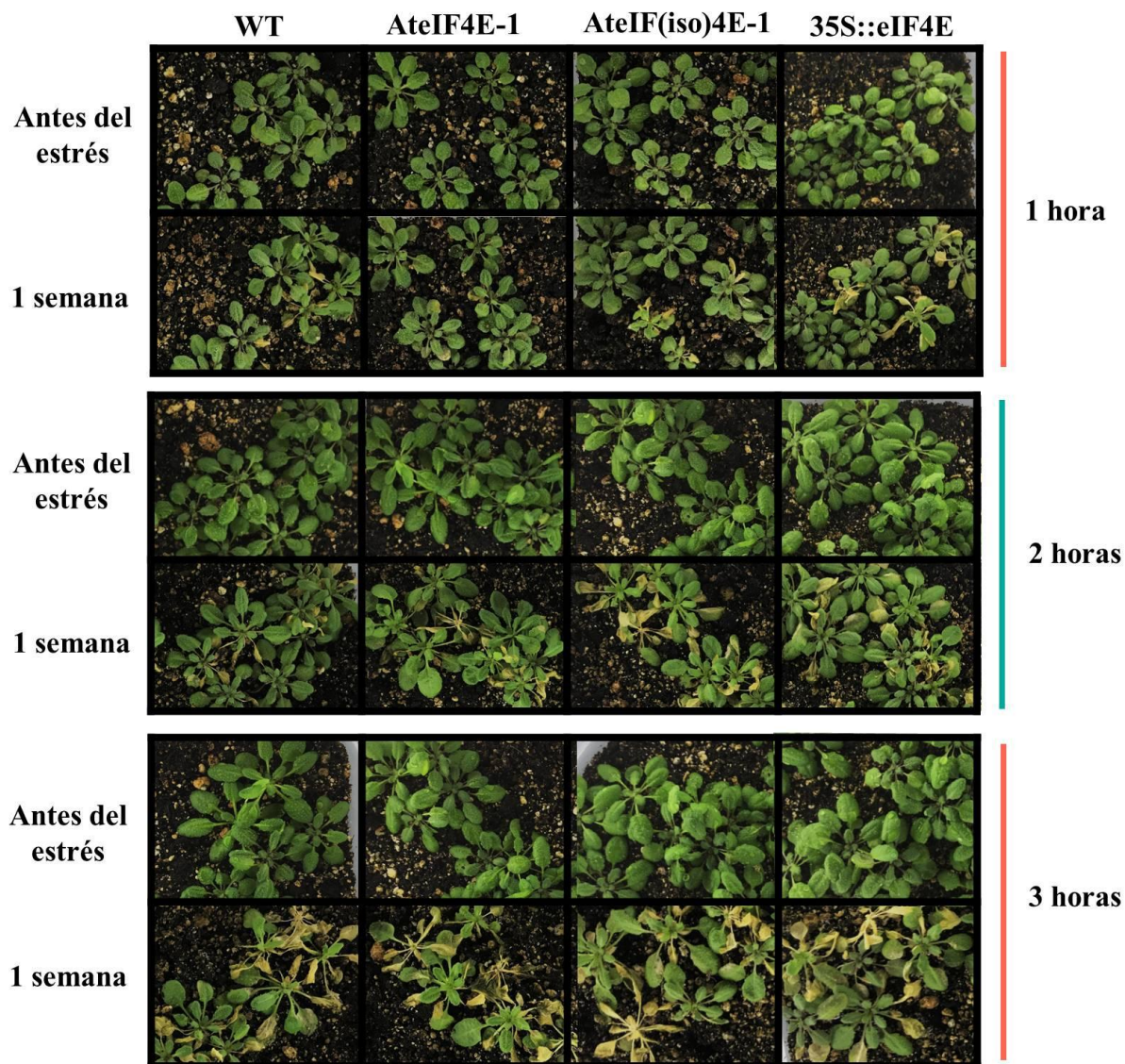


Figura 30. Fenotipo representativo de plantas antes y después de ser sometidas a -20°C durante una, dos y tres horas respectivamente. Plantas silvestres (Col-0 WT), plantas sobreexpresoras de *eIF4E* (*35S::eIF4E*), plantas mutantes nulas de *eIF4E* (*AteIF4E-1*) y plantas mutantes nulas del factor *eIF(iso)4E* (*AteIF(iso)4E-1*).

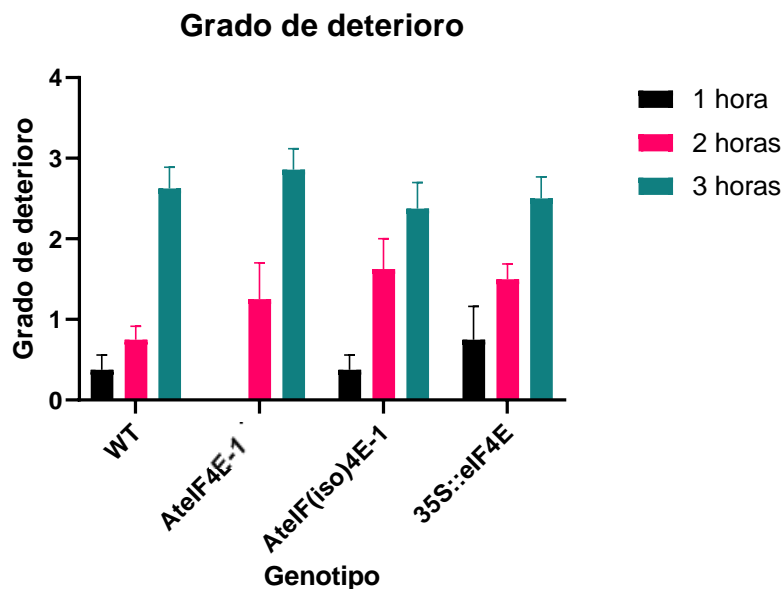


Figura 31. Grado de deterioro promedio presentado por cada una de las líneas al ser sometidas a -20°C durante una, dos y tres horas respectivamente (n=8). Las barras de error corresponden a error estándar de la media. Plantas silvestres (Col-0 WT), plantas sobreexpresoras de *eIF4E* (35S::*AteIF4E*), plantas mutantes nulas de *eIF4E* (*AteIF4E-1*) y plantas mutantes nulas del factor *eIF(iso)4E* (*AteIF(iso)4E-1*).

Se observó que a mayor tiempo de exposición a -20°C , la mayoría de las plantas presentaba daño independientemente de la línea, por lo que resultaba difícil apreciar diferencias en la respuesta al estrés. Es por ello que se decidió realizar una segunda réplica sometiendo un grupo de plantas a -20°C durante 1hr y otro grupo durante 2 horas; como resultado se obtuvo que la mayoría de las plantas de todas las líneas estresadas durante dos horas presentaban daño severo, mientras que a 1 hora de exposición las diferencias continuaban siendo evidentes, es por ello que se decidió realizar el resto de las réplicas del experimento exponiendo a las plantas únicamente a una hora de estrés a -20°C (Anexos, Figuras 42-46).

Con los grados de daño obtenidos de 6 réplicas se calcularon los promedios de deterioro por línea (n=60) y se graficaron (Figura 32). Las plantas silvestres presentaron el menor grado de daño, similar al obtenido para las plantas 35S::*AteIF4E*; el daño de las plantas *AteIF4E-1* fue significativamente mayor con respecto a las plantas WT, y a su vez las plantas *AteIF(iso)4E-1* presentaron un daño con una significancia mayor con respecto a las plantas WT que la presentada para

AteIF4E-1. Estos datos apoyan la idea de que la carencia del factor *eIF(iso)4E* podría afectar la resistencia de las plantas al estrés congelante, probablemente debido a que transcritos cuya traducción ocurre preferentemente a través de su reclutamiento por *eIF(iso)4E* son relevantes para contender con el estrés.

Sin embargo, es importante mencionar que este análisis se realizó una semana después del estrés, por lo que existe la posibilidad de que tanto *eIF4E* como *eIF(iso)4E* puedan requerirse durante el proceso de contención al congelamiento o bien durante la recuperación al mismo. Para dilucidar esto, resultaría importante el estudio de estos factores y del proceso de traducción antes, durante y después del estrés.

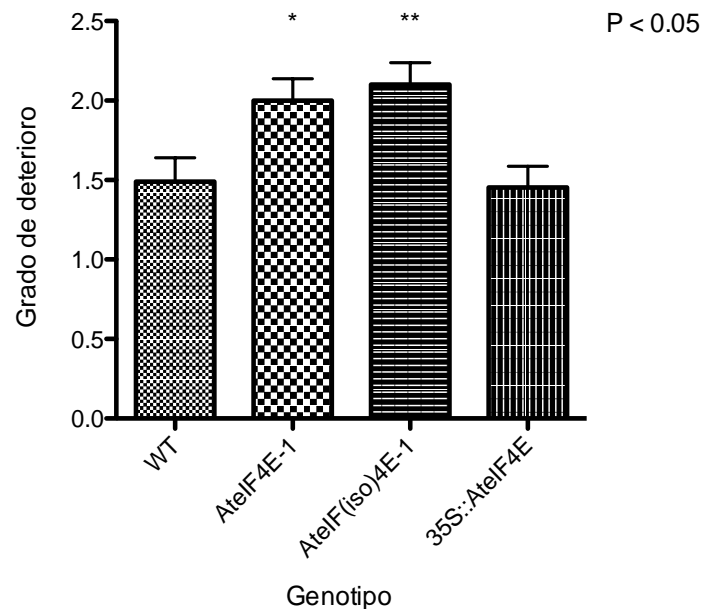


Figura 32. Gráfico de grado de deterioro promedio en plantas de cada línea una semana después del estrés a -20°C por una hora. Se muestran los valores promediados de 60 plantas evaluadas en réplicas de 10 plantas cada una. Plantas silvestres (WT), mutantes del factor *eIF4E* (*AteIF4E-1*), mutante de *eIF(iso)4E* (*AteIF(iso)4E-1*) y sobreexpresoras del factor *eIF4E* (*35S::AteIF4E*). Las barras corresponden al error estándar de la media. Análisis de varianza (ANOVA) y prueba de Dunnet; *AteIF4E-1*, *AteIF(iso)4E-1* y *35S::AteIF4E* contra WT. $P < 0.05$

9.3.4 EN PLANTAS DE 8 SEMANAS DE EDAD, LA MUTACIÓN DE *EIF(ISO)4E* RESULTA DETRIMENTAL PARA LA RESISTENCIA A ESTRÉS CONGELANTE, PERO NO ASÍ LA MUTACIÓN DE *EIF4E*

Por otra parte, también se evaluaron fenotípicamente plantas de 8 semanas de edad crecidas en fotoperiodo de día corto que fueron sometidas a estrés congelante a -20°C (Salazar, 2017). En la Figura 33 puede observarse el fenotipo representativo de cada una de las líneas evaluadas; las plantas menos afectadas fueron las *AteIF4E-1* mientras que las plantas *AteIF(iso)4E-1* presentaron un comportamiento similar a las plantas WT y *35S::AteIF4E*. Estos resultados nos muestran que aparentemente, a la edad de 8 semanas, la ausencia de *eIF4E* ayuda a las plantas a resistir dicho agente ambiental. Por otra parte, las plantas WT, *AteIF(iso)4E-1* y *35S::AteIF4E* presentan una respuesta similar, lo que nos indicaría que la presencia de *eIF4E*, e incluso su sobreexpresión, no resultan benéfica para la respuesta de la planta ante las temperaturas congelantes, lo que nos sugiere que el gen podría ser un inhibidor de la respuesta al frío.

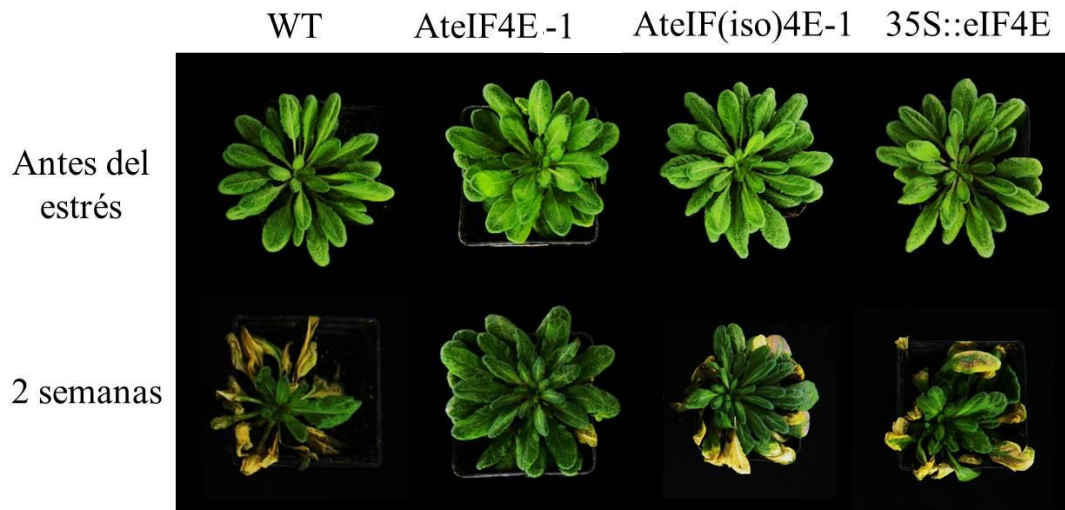


Figura 33. Fenotipo representativo de plantas sometidas a estrés congelante sin haber sido aclimatadas a 4°C previamente. Plantas silvestres (WT), mutantes del factor *eIF4E* (*AteIF4E-1*), mutante de *eIF(iso)4E* (*AteIF(iso)4E-1*) y sobreexpresoras del factor *eIF4E* (*35S::eIF4E*).

De manera similar a las plantas de 5 semanas, a cada uno de los individuos evaluados se le asignó un número del 0 al 4 dependiendo del grado de deterioro (evaluado con base en el número de hojas cloróticas y/o muertas) que presentaron después de dos semanas de recuperación, según la escala de la Figura 17. Se calcularon los promedios del grado de deterioro usando 20 plantas de cada línea

(evaluadas en dos rondas de 10 plantas) y se generaron los gráficos con base en los promedios. A la serie de datos se les realizó un análisis de varianza (ANOVA) con prueba de Tuckey, sin embargo, como se puede ver en la Figura 33, no existen diferencias significativas entre las respuestas obtenidas por las diferentes líneas de plantas, a pesar de que la tendencia de los datos concuerda con los fenotipos observados en donde, las plantas mutantes nulas de *eIF4E*, poseen un daño menor que las plantas nulas de *eIF(iso)4E*, WT y *35S::eIF4E*.

A las 8 semanas de edad no hubo un efecto diferencial en la respuesta de ninguna de las mutantes. No obstante, la isoforma *eIF4E* podría ser menos fundamental a esta edad que a las 5 semanas para la contención al estrés congelante, e incluso parece actuar como un regulador negativo de la respuesta al frío. Sin embargo, es importante señalar que debido a que los resultados no presentaron diferencias significativas sería necesario realizar más réplicas del experimento para corroborar las observaciones realizadas.

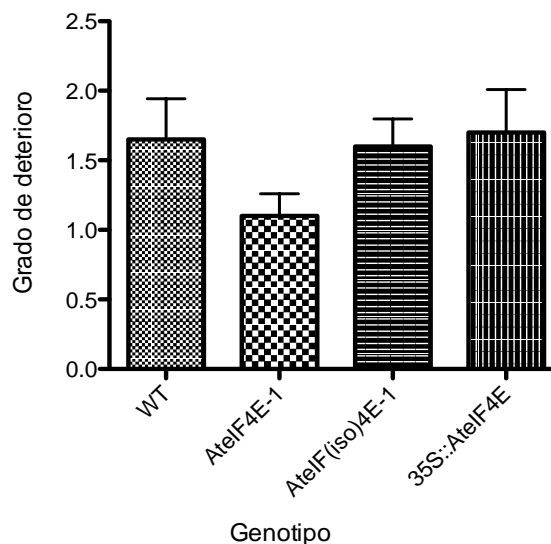


Figura 34. Grado de deterioro de las plantas de 8 semanas sometidas a estrés congelante. Se muestran los valores promediados de 20 plantas evaluadas en dos rondas de 10 plantas cada una (Anexos, Figuras 47-54). Las barras corresponden al error estándar de la media. Plantas silvestres (WT), mutantes del factor *eIF4E* (*AteIF4E-1*), mutante de *eIF(iso)4E* (*AteIF(iso)4E-1*) y sobreexpresoras del factor *eIF4E* (*35S::AteIF4E*).

Con base en los resultados obtenidos puede decirse que el papel de los factores *eIF4E* y *eIF(iso)4E* durante la respuesta al estrés congelante podría estar relacionado con el estadio del desarrollo en el que se encuentran las plantas. Sin embargo, la evidencia sugiere que contrario a lo que se pensaba, el factor *eIF(iso)4E* tiene una implicación mayor que el factor *eIF4E* en la respuesta al estrés congelante, probablemente debido a que favorece la traducción de transcritos implicados en la resistencia al estrés, que en ausencia de *eIF(iso)4E* no son traducidos eficazmente, como por ejemplo *TCF1* (*Tolerant to Chilling and Freezing 1*) e incluso el mismo *eIF(iso)4E*.

10. DISCUSIÓN

10.1 DIFICULTADES ENFRENTADAS DURANTE LA EDICIÓN DE *ATEIF4E* POR CRISPR-CAS9.

En la primera fase de este proyecto se generaron vectores para la edición del gen que codifica para el factor *eIF4E* de *A. thaliana* mediante CRISPR-Cas9. Se utilizó el plásmido pHSE401 (Xing *et al.*, 2014), mismo que contiene la secuencia que codifica para la proteína Cas9 y la región de tracrRNA para posteriormente insertar mediante *Golden-Gate* la secuencia correspondiente a los sgRNAs (complementarios a las regiones a mutar).

Se eligieron los sgRNAs con un *score off-target* superior a 40.0, además, algunos fueron diseñados en regiones reconocidas por enzimas de restricción, para que en caso de haber mutaciones se perdiera la secuencia, lo cual podría servir como un método alternativo de selección. Así mismo, el diseño de los sgRNAs se realizó en el primer exón del gen de *eIF4E* (sgRNA 1, sgRNA 2, sgRNA *XmnI* y sgRNA *Clal*) así como en el segundo (sgRNA *Bsu36I*) y tercer exón (sgRNA *Bpu10I*) para permitir la escisión de una región grande del gen. Algunas transformaciones se realizaron con cultivos derivados de transformaciones con un solo sgRNA, pero para otras se mezclaron cultivos conteniendo dos plásmidos, cada uno con distinto sgRNA. Sin embargo, las transformaciones que se realizaron utilizando los dos vectores a la vez no fueron exitosas, probablemente debido a la poca cantidad de plantas transformadas mediante este método.

Por otra parte, el proceso de transformación por *floral dip* resultó un paso fundamental para la obtención de plantas mutantes debido a su baja eficiencia, cercana al 1% en condiciones óptimas

(Zhang *et al.*, 2006). En este caso, resultó fundamental el empleo de colonias frescas para inocular los medios de cultivo, la cantidad de plantas a transformar, así como el estadio en el que se encontraban al momento de la transformación. Las condiciones que se concluyeron como ideales para la obtención de un número adecuado de plantas correctamente transformadas fueron al utilizar un número elevado de plantas por maceta con escapos de al menos 10 cm de altura.

La selección de plantas con inserción de plásmido por medio del protocolo de Harrison *et al.*, 2006 resultó muy eficiente debido a que se basa en el hecho de que la higromicina inhibe el proceso de síntesis de proteínas; así pues el proceso de escotomorfogénesis en el cual la asignación de recursos se dirige hacia el alargamiento del hipocótilo a expensas del desarrollo de cotiledones y raíces como un mecanismo para la búsqueda de la luz (Josse y Halliday, 2008) para lo cual es necesaria la síntesis activa de proteínas. En este aspecto es importante señalar que a pesar de que se contaba con un alto número de candidatas a mutantes con base en el fenotipo (hipocótilo elongado), solo unas pocas presentaron cambios en la secuencia blanco al ser evaluadas por HRM, lo cual puede deberse a que el plásmido podría no insertarse en el genoma y únicamente permanecer en el citoplasma de algunas células, por lo que al germinar las plantas el cassette de resistencia a higromicina se expresa promoviendo la inactivación del efecto del antibiótico en las plantas, sin embargo, esta transformación transitoria no posee una alta eficiencia para generar mutaciones en el genoma. Así mismo, existe la posibilidad de que en las plantas con fenotipo positivo sí se generara un corte de doble cadena en la secuencia blanco, pero la célula fue capaz de repararlo de manera adecuada, por lo que la secuencia que se obtiene continúa siendo WT. Se ha demostrado que, contrario a lo observado en levaduras, el mecanismo de NHEJ es capaz de reparar eficazmente el genoma dañado aun durante la inserción de secuencias exógenas de DNA por *A. tumefaciens* (Bray y West, 2005).

A pesar de que el sistema CRISPR-Cas9 se ha utilizado frecuentemente en plantas, las eficiencias de edición pueden variar en gran medida (Bortsei y Fischer, 2015). Algunos estudios sugieren que la posición en la que se inserta el fragmento de plásmido, el promotor bajo el que se expresa Cas9 y la optimización de codones de Cas9 pueden influir en la eficiencia del sistema (Ma *et al.*, 2016). Por

esto, es preciso mencionar que el plásmido pHSE401 se encuentra optimizado para codones de maíz (Xing *et al.*, 2014) y aunque se demostró que es funcional para la edición del genoma de *A. thaliana*, este factor podría jugar un papel fundamental en la eficiencia mostrada por el sistema en este caso.

Así pues, algunos estudios sugieren que es posible obtener mejores resultados al utilizar vectores que contengan dos sgRNAs a la vez, incluso se ha demostrado que al utilizar en conjunto dos sgRNAs que se empalman entre sí, se obtiene una eficiencia mayor de mutaciones (Lee *et al.*, 2018).

Por otra parte, durante este estudio el método de endonucleasa T7 no resultó eficiente a pesar de ser de bajo costo y reportado como ideal para cualquier mutación (Ma *et al.*, 2016). Cabe señalar que para su implementación de manera eficaz es necesaria una gran cantidad de DNA blanco amplificado, además de que posee algunos problemas como no el detectar cuándo las plantas poseen una mutación homocigota. Por otra parte, su efectividad se ve reducida por condiciones de la reacción como la temperatura y tiempo de incubación, así como la concentración utilizada de la enzima, lo que aumenta la cantidad de tiempo para la optimización de las condiciones de una reacción específica. Por otra parte, se ha demostrado que esta enzima es más eficiente para detectar inserciones o deleciones, no así cambios de base (Vouillot *et al.*, 2015) como los que se encontraron en las plantas evaluadas.

Al evaluar plantas por HRM se encontró que, a pesar de obtenerse curvas con diferencias importantes con respecto a la obtenida para el DNA WT, al realizar la secuenciación algunas no poseían cambios en la secuencia, o bien, contaban únicamente con cambios de una sola base. Es por esto que resulta de suma importancia mencionar que en este caso únicamente se evaluó un plásmido generado a partir de la inserción de amplicones del primer exón de eIF4E de cada una de las plantas candidatas, por lo que existe la posibilidad de que únicamente nos encontremos evaluando la secuencia proveniente de una de las formas del gen que podrían encontrarse en una planta heterocigota. Sería recomendable obtener un mayor número de clonaciones, y por lo tanto, de secuenciaciones para la evaluación de las plantas, sobre todo de aquellas que mediante HRM presentaron una curva sustancialmente distinta con respecto a la curva de las plantas WT, pero cuya secuenciación no arrojó cambios importantes respecto a la secuencia WT. Es importante mencionar que en la bibliografía se encuentra reportado que la técnica de HRM posee una sensibilidad y especificidad elevadas, de entre 96.1 a 99.4% dependiendo del tamaño del producto amplificado, pudiendo ocurrir falsos negativos en cambios de

base de A a T (Reed y Winter, 2004; Peng *et al.*, 201), por lo que es muy probable que, al realizar la secuenciación de más clonaciones que contengan un fragmento distinto de PCR, sería posible detectar mutaciones distintas a las encontradas con anterioridad.

10.2 LOS FACTORES *EIF4E* Y *EIF(ISO)4E* MUESTRAN DIFERENTE RELEVANCIA PARA RESISTIR TEMPERATURAS CONGELANTES EN *A. THALIANA*.

En condiciones de estrés ocurren cambios a nivel transcripcional y postranscripcional que permiten a las plantas contener a las condiciones adversas. La síntesis de proteínas es un proceso altamente regulado debido a su costo energético (Holcik y Sonenberg, 2005), no obstante es necesaria la producción de proteínas específicas que permitan a las plantas enfrentarse a las condiciones adversas. Es por esto que el estudio de factores involucrados en el paso más controlado del proceso de síntesis de proteínas podría ayudarnos a dilucidar como es que se lleva a cabo la regulación de la actividad traduccional durante el estrés abiótico.

Durante este estudio se utilizaron distintas mutantes para los factores 4E; en primer instancia se emplearon plantas con mutaciones puntuales e inserciones de T-DNA (*AteIF4E-1*), plantas con inserciones de un transpón en el segundo exón (*AteIF(iso)4E-1*) y plantas con la construcción del cDNA de eIF4E bajo el promotor 35S (*35S::AteIF4E*). Estas líneas han sido muy útiles y sobretodo ampliamente utilizadas en estudios relacionados con la resistencia de las plantas de *A. thaliana* a virus específicos (Duprat *et al.*, 2002; Sato *et al.*, 2005). Así mismo, en nuestro laboratorio fueron empleadas en un estudio preliminar para evaluar la resistencia de plantas de *A. thaliana* al estrés congelante (Salazar, 2017). Se decidió hacer uso de estas plantas en los protocolos de estrés congelante dado que durante este estudio fueron caracterizadas, observándose la ausencia de transcritos y la presencia de las inserciones correspondientes que silenciaban o promovían a los genes codificantes para los factores 4E canónicos.

Para las plantas de 5 semanas, se observó que las *AteIF4E-1* mostraron un grado de deterioro significativamente mayor con respecto a las líneas WT y *35S::AteIF4E*. Sin embargo, resulta interesante que las plantas *AteIF(iso)4E-1* presentan un grado de deterioro aun mayor que las plantas *AteIF4E-1*, lo que nos indicaría que el factor *eIF4E* no es capaz de suplir las funciones llevadas a cabo

por el factor *eIF(iso)4E*, por lo cual las plantas que carecen de este último poseen un grado de deterioro mayor. Para las plantas de 8 semanas de edad se observó que individuos del genotipo *AteIF4E-1* presentaron un deterioro menor que las plantas del resto de las líneas, mientras que en las plantas WT, *AteIF(iso)4E-1* y *35S::AteIF4E* se presenta un grado de deterioro más elevado, aunque no significativo, con respecto a las plantas *AteIF4E-1*. El hecho de no poseer diferencias significativas hace imposible determinar un papel más o menos relevante a alguna de las isoformas en plantas de 8 semanas de edad, aun cuando las réplicas del experimento poseen la tendencia antes mencionada, y que plantas *AteIF(iso)4E-1* presentaron un severo daño en réplicas realizadas anteriormente en el laboratorio (Salazar-Díaz, 2017), lo que nos indicaría que el factor *eIF(iso)4E* podría poseer un papel más relevante para contender a las temperaturas congelantes.

A las 5 semanas de edad el factor *eIF4E* parece ser más importante que a las 8 semanas de edad, ya que en estas condiciones las plantas sobreexpresoras de este factor son capaces de contender a las temperaturas congelantes de manera similar que las plantas WT, mientras que las 8 semanas las plantas sobreexpresoras poseen un daño visiblemente más elevado. Cabe señalar que *eIF4E* y *eIF(iso)4E* poseen una afinidad distinta por la estructura *cap* de los mensajero eucariontes teniendo una afinidad hasta 10 veces mayor el factor *eIF4E* (Kropiwnicka *et al.*, 2015), así que resulta probable que grandes cantidades del factor *eIF4E* se encuentren compitiendo con cantidades normales del factor *eIF(iso)4E*, por lo que la eficiencia traduccional de los transcritos preferenciales de *eIF(iso)4E* es baja y, a pesar de poseer grandes cantidades del factor *eIF4E*, éste no es capaz de suplir las funciones de *eIF(iso)4E*. No obstante, las diferencias en la respuesta de plantas de 5 y 8 semanas a las mismas condiciones podría deberse a que las plantas de 8 semanas se encuentran cercanas a la floración, lo cual provoca profundos cambios transcripcionales en las plantas, lo que afectaría la respuesta de las mismas ante las condiciones de estrés.

Algunos estudios sugieren que los factores *eIF4E* y *eIF(iso)4E* se encuentran asociados a gránulos de estrés, que son agregados citoplasmáticos que se forman en respuesta a la inhibición traduccional mediada por condiciones de estrés, y sirven como centros que clasifican los mRNAs que serán enviados a cuerpos de procesamiento o bien para su protección contra la degradación (Chantarachot y

Bailey-Serres, 2018; Weber *et al.*, 2008). El mecanismo por el cual este sistema se rige no se encuentra bien determinado, pero es posible que la preferencia selectiva de transcritos de estas dos isoformas posea un papel determinante para contender con las condiciones de estrés.

En plantas, los cambios de temperatura provocan alteraciones en la fluidez de la membrana celular, rearrreglos del citoesqueleto y entrada de calcio a las células, esto desencadena respuestas río abajo para conferir tolerancia al frío entre las que se encuentran vías dependientes e independientes del factor de unión a repeticiones C (CBF) (Gou *et al.*, 2018) además de generar un estrés osmótico que provoca cambios en la síntesis de osmolitos compatibles y en la respuesta a ABA. Las vías de señalización dependientes de CBF son muy importantes en la señalización inducida por frío y congelamiento. Los factores CBFs/DREB se unen a elementos en *cis* para activar su expresión y conferir crio tolerancia. La expresión de genes DREB1A, DREB1B y DREB1C se induce a bajas temperaturas y a su vez regulan la expresión de genes COR, que codifican para péptidos involucrados en aumentar la estabilidad de las membranas (Gilmour *et al.*, 2004; Tomashow, 1998).

En estudios previos se había sugerido que las proteínas eIF4E y eIF(iso)4E reconocen selectivamente a cierto grupo de transcritos (Martínez-Silva *et al.*, 2012; Salazar, 2017). La isoforma eIF4E reconoce preferencialmente a transcritos de los factores DREB1A y DREB2F. DREB1A interactúa con elementos regulatorios en *cis* denominados elementos de respuesta a deshidratación (DRE), lo cual está relacionado con la respuesta a sequía y temperaturas frías. La sobreexpresión de DREB1A aumenta la tolerancia a temperaturas congelantes (Maruyama *et al.*, 2009). Por su parte DREB2F responde a concentraciones salinas y deshidratación (Rashid *et al.*, 2012). La deshidratación y la salinidad promueven que las plantas produzcan altas concentraciones de ABA, mismas que inducen la expresión de un alto número de genes involucrados en respuesta al frío. Así mismo, algunos estudios indican que la expresión del regulon CRT/DRE no solo aumenta la tolerancia al congelamiento sino que también promueve la tolerancia a la sequía, lo que provee evidencia de que el rol de los genes inducibles por frío es proteger a las plantas contra la deshidratación (Tomashow, 1999).

Por otra parte, eIF(iso)4E selecciona preferencialmente a algunos transcritos como TCF1 e incluso el mismo eIF(iso)4E. TCF1 (*Tolerant to Chilling and Freezing 1*) es un remodelador de cromatina que interactúa con las histonas H3 y H4, tiene como gen blanco a BCB (*Blue-Copper binding protein*) una proteína que regula la síntesis de lignina. Es posible que la señalización mediada por TCF1 sea importante para el mantenimiento del contenido de lignina, lo que mejora la rigidez celular y reduce la expansión de las células lo cual es necesario para detener el crecimiento de las plantas durante las bajas temperaturas (Ji *et al.*, 2015). Por otra parte, se ha reportado que el complejo eIF(iso)4E se encuentra asociado a microtúbulos y facilita su alineamiento cumpliendo un rol en la regulación de su dinámica (Sanfaçon, 2015). Así mismo, se ha demostrado que los microtúbulos tienen un papel importante en la contención al estrés por frío en plantas, ya que estas estructuras se desensamblan en respuesta a las temperaturas bajas por lo que se han sugerido como sensores del estrés congelante (Nick, 2013). Es por ello que eIF(iso)4E podría tener un papel predominante no solo en los transcritos preferencialmente seleccionados, sino también en la respuesta directa a las temperaturas frías, por lo que carecer del factor eIF(iso)4E provoca daños mayores a las plantas que los presentados en plantas *AteIF4E-1*, mientras que eIF4E podría estar más involucrado en la respuesta río debajo en la cascada de señalización. Sin embargo un estudio global de los transcritos que se están traduciendo con mayor eficiencia durante y después de las condiciones adversas nos permitiría explicar con mayor precisión el papel de ambos factores en las condiciones de estrés abiótico evaluadas.

Así mismo, es importante señalar que a pesar de que las plantas *AteIF4E-1* se ha reportado que poseen una floración retardada en condiciones de días largos (Bastet *et al.*, 2016), las plantas de este genotipo florecieron de manera más temprana que las plantas del resto de las líneas evaluadas en condiciones de días cortos después de ser sometidas a congelamiento. En este aspecto es importante señalar que la planta mutante *AteIF(iso)4E-1* sobreexpresa a la isoforma eIF4E (Duprat, 2002), sin embargo, aún desconocemos si esta situación sucede de manera similar en las plantas *AteIF4E-1*, donde podría también sobreexpresarse la proteína eIF(iso)4E. La proteína eIF(iso)4E es más abundante en raíz, tejidos en desarrollo y órganos florales (Figura 56) (Bush *et al.*, 2009; Rodríguez *et al* 1998) de manera similar que los parálogos de eIF4E (eIF4E1b y eIF4E1c) que se expresan poco en la mayoría

de los tejidos y abundantes en los tejidos involucrados en el desarrollo (Figura 57 y 58). Cabe mencionar que, si bien se expresan en muy bajas concentraciones, y a nivel protéico no se han observado, es posible que ante la falta del factor eIF4E su expresión aumente. Se conoce que tanto eIF4E1b como eIF4E1c poseen la capacidad de unirse a la estructura *cap* y a eIF4G, al menos en levadura y extractos de germen de trigo. En ensayos *in vitro* se observó que eIF4E1b y eIF4E1c se asocian al complejo eIF4F, sin embargo, los parálogos requieren concentraciones 5 a 10 veces mayores que eIF4E para llegar a un nivel de estímulo del complejo eIF4F. Así mismo, en ensayos de competencia entre eIF4E y eIF4E1b se observó que el complejo eIF4E1b/eIF4G es desplazado por eIF4E para permitir la formación de un complejo más estable. Es por todo esto que algunos estudios sugieren que eIF4E debería estar ausente *in vivo* para permitir la formación de los complejos de eIF4E1b y eIF4E1c con eIF4G (Patrick *et al.*, 2014).

En las plantas *AteIF4E-1*, sometidas a estrés congelante, es posible que los factores eIF(iso)4E, eIF4E1b y eIF4E1c se encuentren expresados en mayor cantidad a nivel de transcrito y proteína. Al ser sometidas las plantas a estrés congelante, se experimentarán cambios a nivel transcripcional con lo que se expresarán gran variedad de genes implicados en múltiples procesos. Al ser eIF4E1b, eIF4E1c y eIF(iso)4E expresados principalmente durante procesos relacionados con reproducción, su alta expresión en conjunto con su mayor afinidad por mensajeros relacionados con floración podrían inducir el inicio del proceso de manera prematura. Mientras que en el resto de las líneas evaluadas, los niveles de estas isoformas se mantienen estables debido a la presencia de eIF4E, por lo que el tiempo de floración no se ve afectado.

De manera general, estos datos arrojan evidencia de que eIF4E y eIF(iso)4E no son proteínas redundantes por lo que podría existir una traducción selectiva durante el crecimiento y distintas etapas del desarrollo de las plantas, de manera similar a lo que ocurre en otros organismos como *C. elegans*, donde únicamente IFE-3 es esencial para la supervivencia, mientras que IFE-2 es importante para la longevidad y la respuesta al daño oxidativo (Keiper *et al.*, 2000; Amiri *et al.*, 2001), mientras que, en *Drosophila melanogaster*, donde existen 7 genes que codifican 8 isoformas capaces de unirse a *cap*, cada una tiene una función especializada (Hernández *et al.*, 2005).

Es así que resultaría de gran interés estudiar más a fondo principalmente a la mutante *AteIF4E-1* en un nivel molecular para determinar si las isoformas eIF(iso)4E, eIF4Eb y eIF4c poseen niveles de transcrito o proteína distintos en estas plantas comparándolos con plantas WT o *AteIF(iso)4E-1*. Además, debido a la respuesta obtenida a lo largo del desarrollo de las mutantes, se recomienda evaluar a dichas plantas en distintas etapas del desarrollo e incluso ante diferentes condiciones de luz (días largos o cortos).

11. CONCLUSIONES

- Como resultado de la implementación del sistema CRISPR-Cas9, únicamente se obtuvieron individuos con mutaciones silenciosas sobre el gen que codifica para eIF4E, por lo que hasta el momento no ha sido posible la obtención de una planta mutante nula por este método.
- La mutación de eIF(iso)4E perjudica la resistencia a estrés congelante en plantas de 5 semanas de edad, sin embargo, a 8 semanas no se observan diferencias significativas con respecto al resto de los genotipos evaluados.
- La mutación de eIF4E resulta detrimental en plantas de 5 semanas y no afecta a plantas de 8 semanas edad; sin embargo, con base en los resultados obtenidos, aun no es posible adjudicar un rol más relevante a alguna de las isoformas eIF4E o eIF(iso)4E durante el proceso de contención a las condiciones de estrés por congelamiento.

12. PERSPECTIVAS

- Secuenciar un número mayor de clonas a partir de la ligación del fragmento amplificado a partir de cada planta candidata de mutación, ya que, por ser heterocigotas, es posible que se mezclen los fragmentos WT y mutantes.
- Realizar más réplicas del protocolo con plantas de 8 semanas para dilucidar las funciones de los factores eIF4E y eIF(iso)4E.
- Evaluar una ventana del desarrollo de la planta mayor para determinar si existen diferencias en la función de los factores de inicio de la traducción 4E en la resistencia a estrés congelante.

13. ANEXOS

13.1. Vector pHSE401 (Addgene, plásmido # 62201)

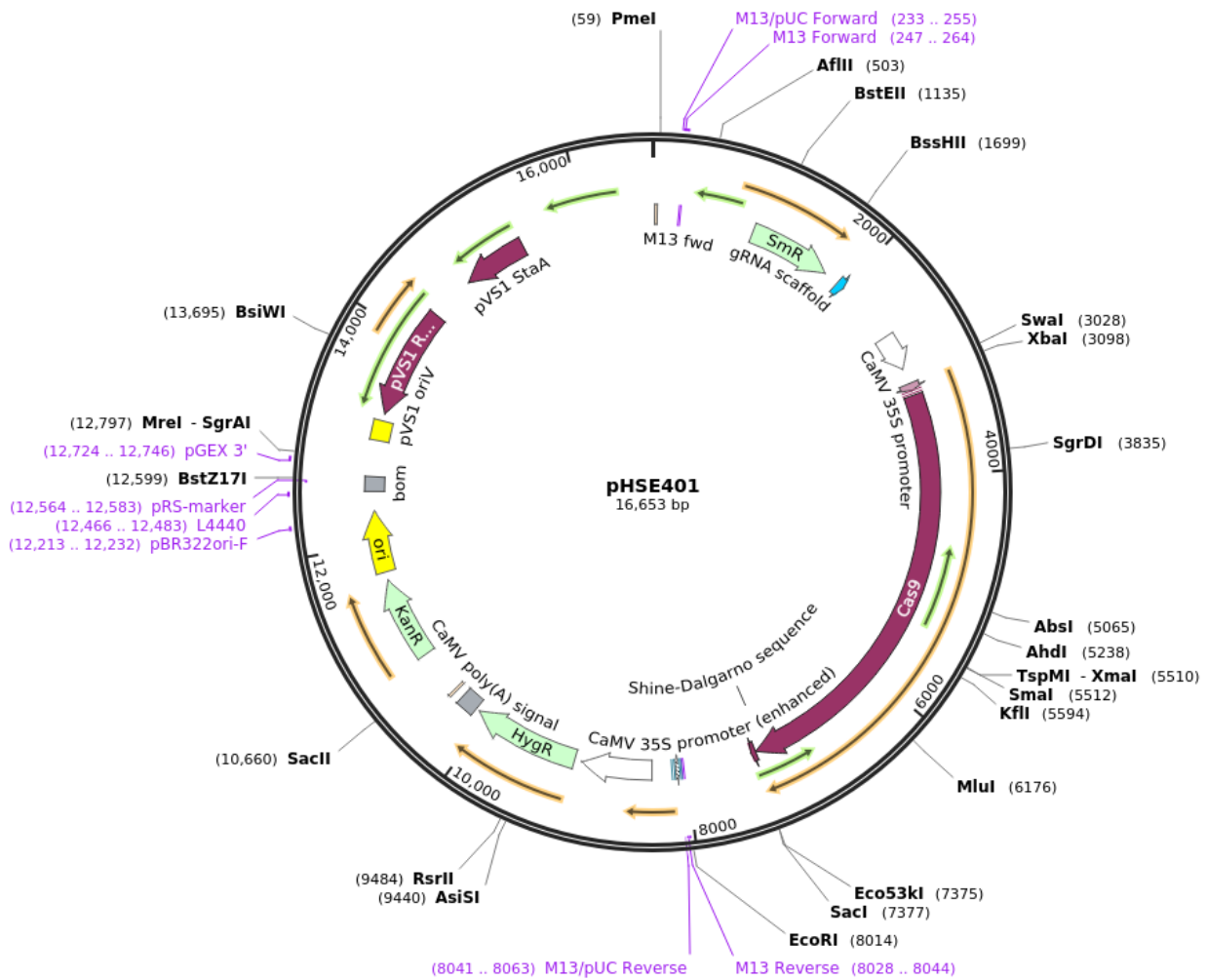


Figura 35. Mapa del plásmido pHSE401, utilizado para la mutación de eIF4E mediante CRISPR-Cas9. Posee todos los componentes necesarios para el funcionamiento del sistema dentro de la planta.

Secuencia del cassette de expresión de sgRNA antes de la ligación (Tomado de Xing *et al.*, 2014).

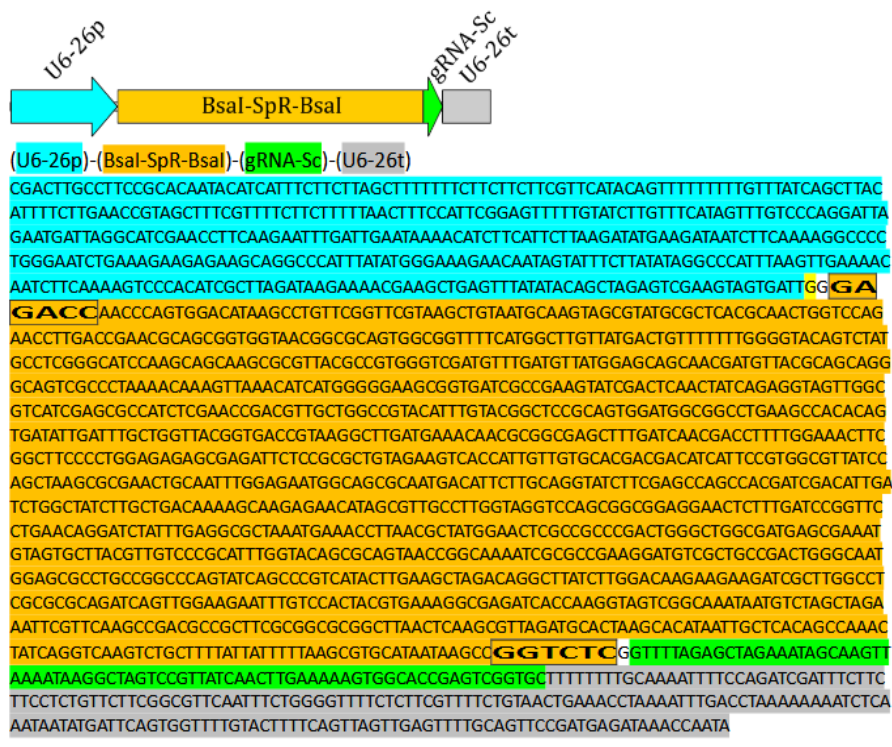


Figura 36. Secuencia correspondiente al casete de expresión de sgRNA de pHSE401 previo a la ligación. Los colores del resaltado corresponden a los componentes presentados en el esquema de la parte superior. La región color naranja escinde del plásmido una vez que se liga el sgRNA diseñado.

Secuencia del cassette de expresión de sgRNA después de la ligación (Xing *et al.*, 2014).

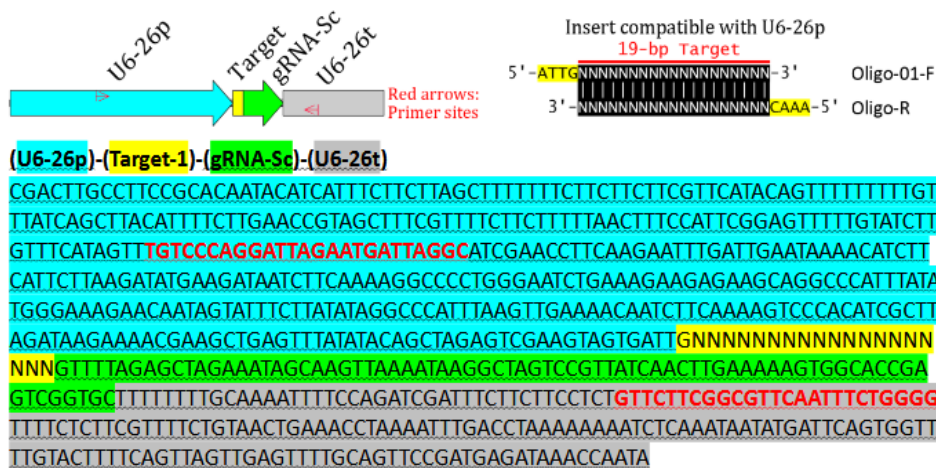


Figura 37. Secuencia del casete de expresión del sgRNA una vez que se ha ligado el sgRNA. Se pierde la resistencia a espectinomicina que se observaba en la figura 36. Se muestra en la parte superior derecha la secuencia que deben poseer los sgRNAs en los extremos para su correcta ligación dentro del vector.

13.2 Oligonucleótidos

Tabla 19. Oligonucleótidos para elaboración de sgRNAs

Elaboración de sgRNAs	
Nombre	Secuencia (5'-3')
sgRNA1	Fw: ATTGTCGGATTGATCGATACCATG Rv: AAACCATGGTATCGATCAATCGGA
sgRNA2	Fw: ATTGATCGCCGGAGGAGAAGGAGA Rv: AAACCTCCTTCTCCTCCGGCGAT
sgRNA <i>XmnI</i>	Fw: ATTGAGAGAGAAAGAGAAGCAGTT Rv: AAACAACCTGCTTCTCTTTCTCTCT
sgRNA <i>Clal</i>	Fw: ATTGATTGATCGATACCATGAGGA Rv: AAACCTCCTCATGGTATCGATCAAT
sgRNA <i>Bsu36I</i>	Fw: ATTGATGGACTATGACTTTCCCTA Rv: AAACCTAGGGAAAGTCATAGTCCAT
sgRNA <i>Bpu10I</i>	Fw: ATTGTCCTCAAACGAAGCTGCTC Rv: AAACGAGCAGCTTCGTTTGAAGCA

Tabla 20. Oligonucleótidos para PCR de colonia (*E. coli* y *A. tumefaciens*)

PCR de colonia (<i>E. coli</i> y <i>A. tumefaciens</i>)	
Nombre	Secuencia (5'-3')
U6-26p-Fw	TGTCCCAGGATTAGAATGATTAGGC
U6-26t-Rv	CCCCAGAAATTGAACGCCGAAGAAC
sgRNA1-Rv	AAACCATGGTATCGATCAATCGGA
sgRNA2-Rv	AAACCTCCTTCTCCTCCGGCGAT
sgRNA <i>XmnI</i> -Rv	AAACAACCTGCTTCTCTTTCTCTCT
sgRNA <i>Clal</i> -Rv	AAACCTCCTCATGGTATCGATCAAT
sgRNA <i>Bsu36I</i> -Rv	AAACCTAGGGAAAGTCATAGTCCAT
sgRNA <i>Bpu10I</i> -Rv	AAACGAGCAGCTTCGTTTGAAGCA

Tabla 21. Oligonucleótidos para secuenciaciones

Secuenciaciones	
Nombre	Secuencia (5'-3')
U6-26p-F	TGTCCCAGGATTAGAATGATTAGGC
M13 Fw	GTTTCCCAGTCACGTTGTA

Tabla 22. Oligonucleótidos para corroboración de mutantes *AteIF4E-1*, *AteIF(iso)4E* y *35S::AteIF4E*

Corroboración de mutantes	
Nombre	Secuencia (5'-3')
4ETIC FW	TCTAGAGATATAACAATGGCGGTAGAAGACTCCC
4E Rv	CTCGAGAGTTCGCCACATTCGCAAG
4E2KO1	TTGACCCAATAGAGTCCAGAAAT
4E2KO4	CTCTCCAATCAAAGCCATCAACTA
dspm	CTTATTTTCAGTAAGAGTGTGGGGTTTTGG
Z2014	TTCCATTGTTTTCCAATGCTC
Z2015	GAAACAAACCTCTTGGGGAAG
LBb1	ATTTTGCCGATTCGGAAC
ACTINA 1 Fw	TGTGTGTGACAACTCTCTGG
ACTINA 1 Rv	GAGGCATCAATTCGATCACTCAG

Tabla 23. Oligonucleótidos para endonucleasa T7 y HRM

Endonucleasa T7 y HRM	
Nombre	Secuencia (5'-3')
4E Exón 1 Fw	CGAGAGGAAGTACATTAGTTTGGA
4E Exón 1 Rv	CCAAGAGGTTTGTTTCGATTTC
4E Exón 2 Fw	AGCTCACGGAGCTGACTTCTAC
4E Exón 2 Rv	AAGAAAAACCGGTGAGATTCAA
4E Exón 3 Fw	TTGAATCTCACCGGTTTTTCTT
4E Exón 3 Rv	AACTCCTTCCATTGTTTTTCAA

13.3 Posición en el genoma de *A. thaliana* de oligonucleótidos para corroboración de mutantes

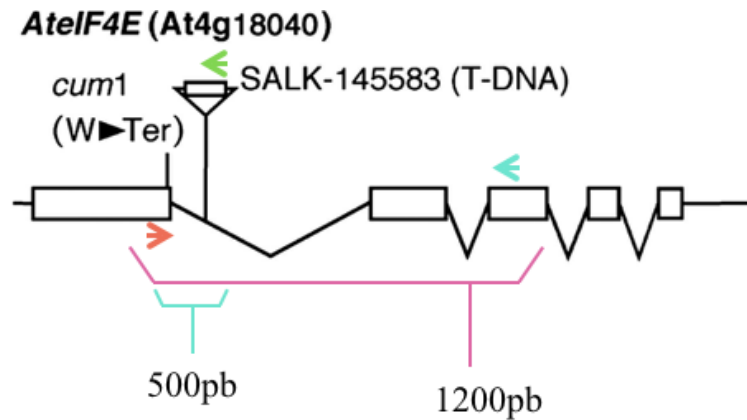


Figura 38. Posición de los cebadores para la corroboración de la inserción de T-DNA en el locus de *eIF4E* (At4g18040). El primer forward Z2015 (flecha naranja) se localiza al final del primer exón, mientras que los cebadores *reverse* LBb1 (flecha verde) y Z2014 (flecha azul) en la inserción de T-DNA y en el tercer exón respectivamente.

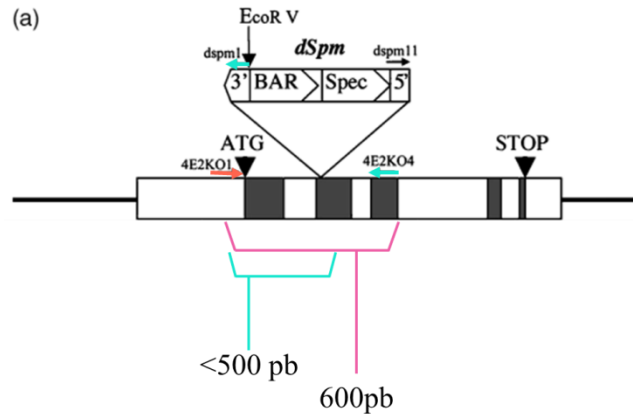


Figura 39. Posición en el locus de *eIF(iso)4E* de los cebadores utilizados para la corroboración de la inserción de un transposón en el exón 2. Como se observa, el primer Fw se encuentra sobre el primer intrón (flecha roja), mientras que los cebadores *reverse* se localizan sobre el transposón y el tercer exón respectivamente (flechas azules).

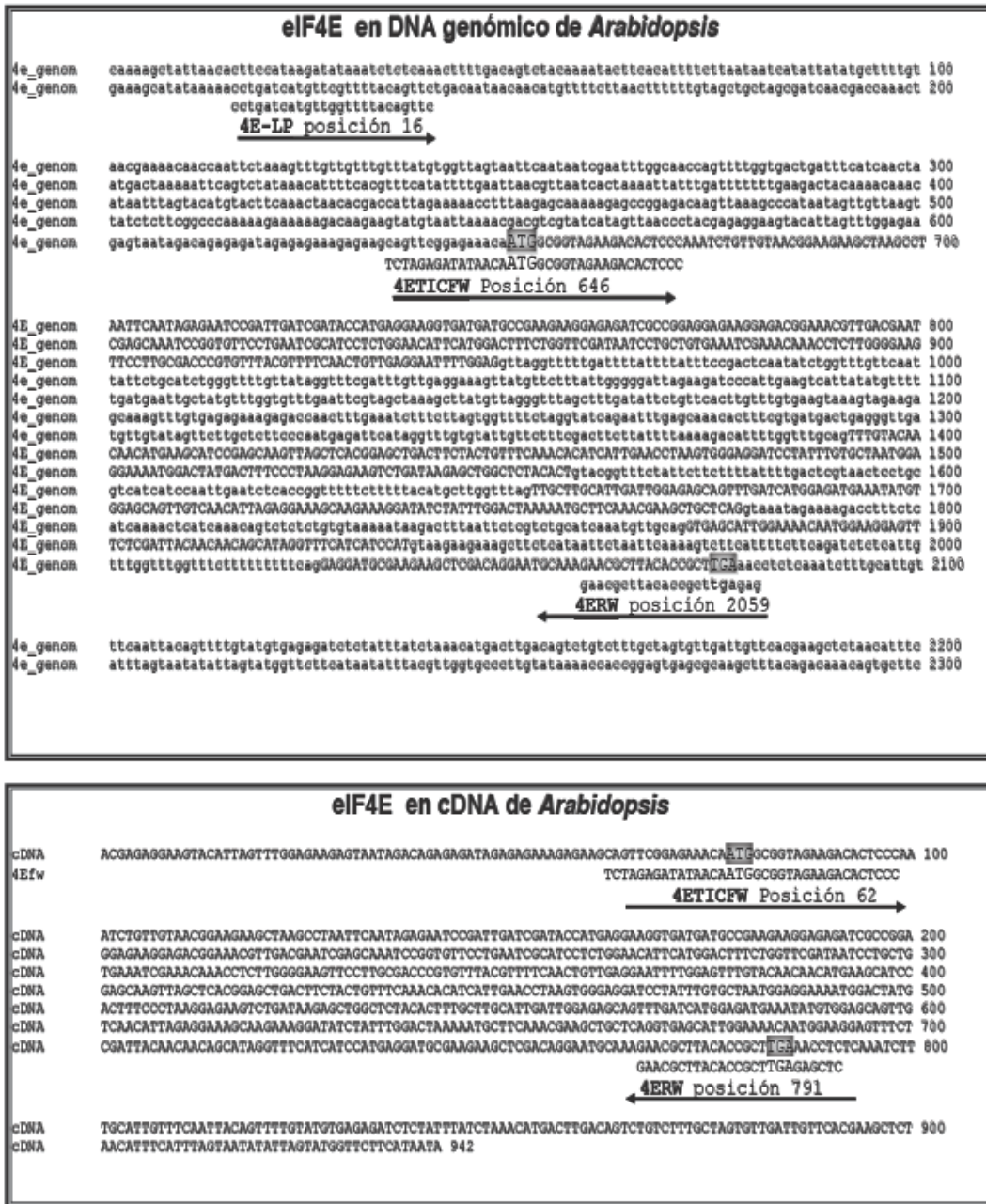


Figura 40. Posición de cebadores para DNA y cDNA de *eIF4E*(At4g18040). En la parte superior se muestra la secuencia de DNA genómico de *A. thaliana*, mientras en la parte inferior el cDNA. Pueden observarse que ambos cebadores abarcan el inicio del exón 1 y el final del exón 4, además de un fragmento de la 5' UTR y 3' UTR.

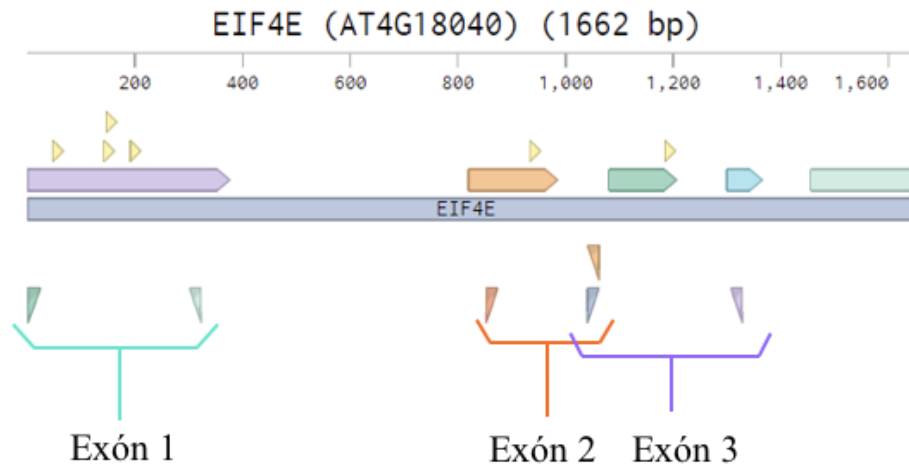


Figura 41. Posición, en el locus de *eIF4E* (At4g18040), de los cebadores para amplificar los exones 1, 2 y 3 (triángulos verdes, naranjas y morados respectivamente). Los *sgRNAs* diseñados para la mutación de *eIF4E* se muestran como triángulos amarillos sobre las cajas: *sgRNA XmnI*, *sgRNA1*, *sgRNA ClaI* y *sgRNA2* se localizan en el primer exón (flecha morada), *sgRNA Bsu36I* se localiza sobre el segundo exon (caja naranja), mientras que el *sgRNA Bpu10I* se sitúa sobre el tercer exon (caja verde).

13.4 Fenotipos de estrés por congelamiento

Estrés por congelamiento en plantas de 5 semanas

Se muestran los fenotipos de recuperación de plantas de 5 semanas antes y una semana después de ser sometidas a estrés congelante (1 hora a -20°C).

Réplica 2

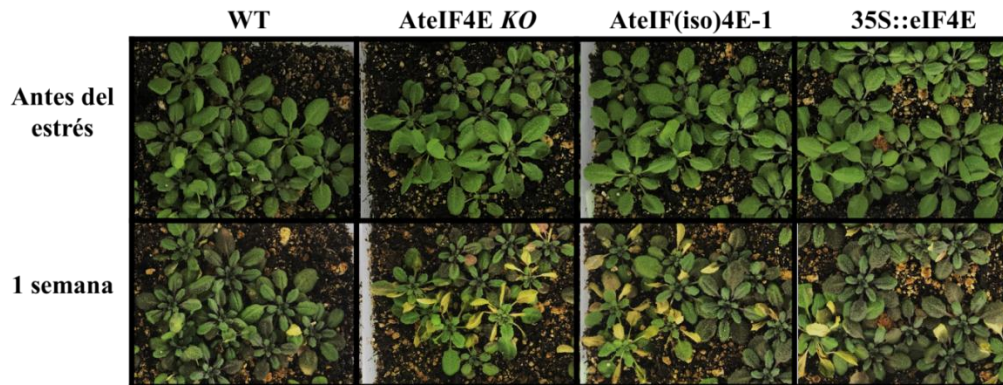


Figura 42. Réplica 2. Fenotipo de plantas WT, *AtelF4E-1*, *AtelF(iso)4E-1* y *35S:eIF4E* antes y después de ser sometidas a -20°C por 1 hora

- Réplica 3

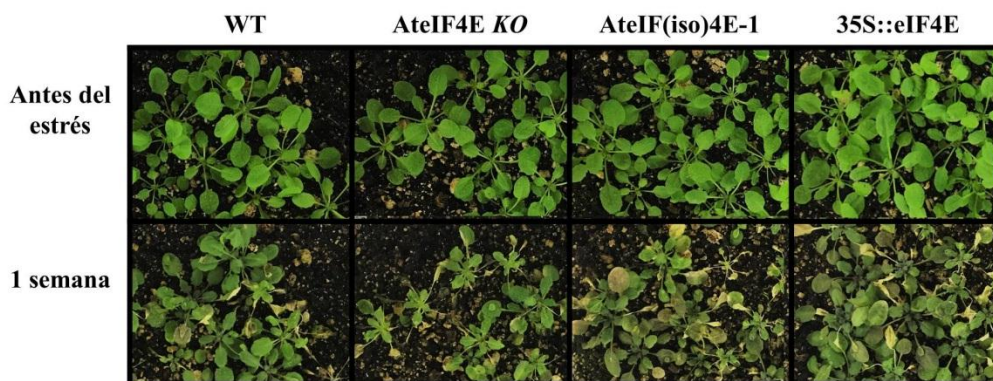


Figura 43. Replica 3. Fenotipo de plantas WT, *AtelF4E -1*, *AtelF(iso)4E-1* y *35S:eIF4E* antes y después de ser sometidas a -20°C por 1 hora

- **Réplica 4**

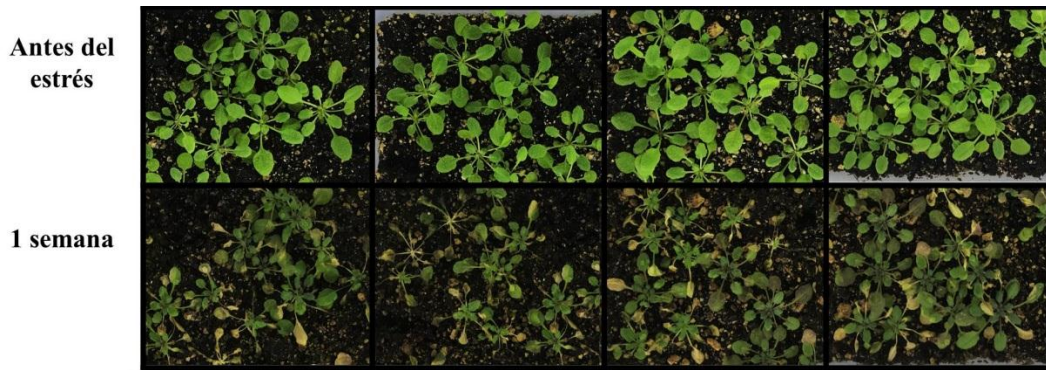


Figura 44. Réplica 4. Fenotipo de plantas WT, *AteIF4E -1*, *AteIF(iso)4E-1* y *35S:eIF4E* antes y después de ser sometidas a -20°C por 1 hora

- **Réplica 5**

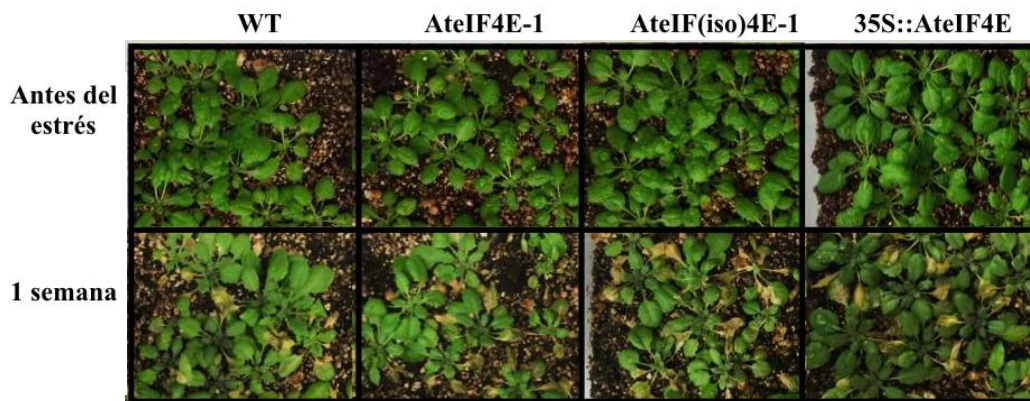


Figura 45. Réplica 5 Fenotipo de plantas WT, *AteIF4E-1*, *AteIF(iso)4E-1* y *35S:eIF4E* antes y después de ser sometidas a -20°C por 1 hora

- **Réplica 6**

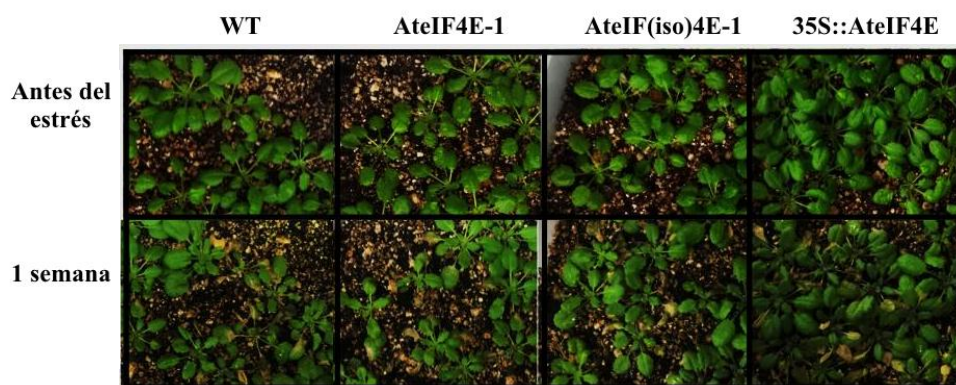


Figura 46. Réplica 6. Fenotipo de plantas WT, *AteIF4E-1*, *AteIF(iso)4E-1* y *35S::eIF4E* antes y después de ser sometidas a -20°C por 1 hora

Estrés por congelamiento en plantas de 8 semanas

Se muestran los fenotipos de recuperación de plantas de 8 semanas antes y hasta 4 semanas después de ser sometidas a estrés congelante (1 hora a -20°C).

Réplica 1

- WT

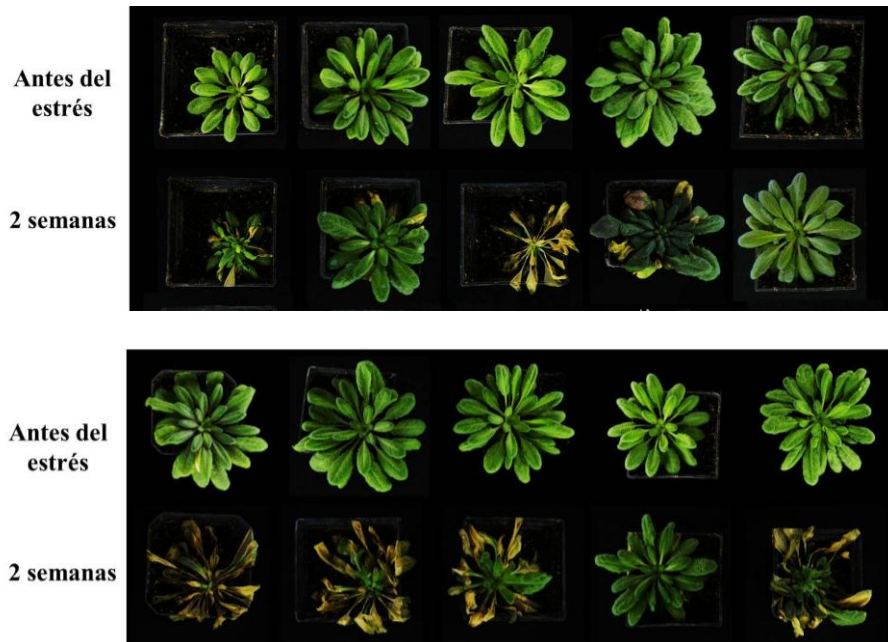


Figura 47. Fenotipo de plantas WT antes y después de ser sometidas a -20°C por 1 hora.

- *AteIF4E-1*



Figura 48. Fenotipo de plantas *AteIF4E-1* antes y después de ser sometidas a -20°C por 1 hora

- *AteIF(iso)4E-1*

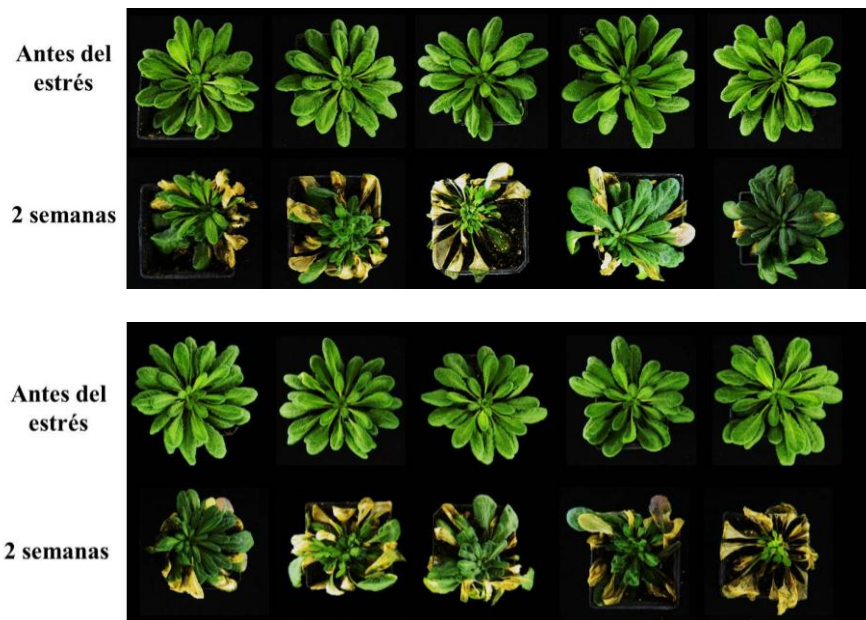


Figura 49. Fenotipo de plantas *AteIF(iso)4E -1* antes y después de ser sometidas a -20°C por 1 hora

- *35S::eIF4E*

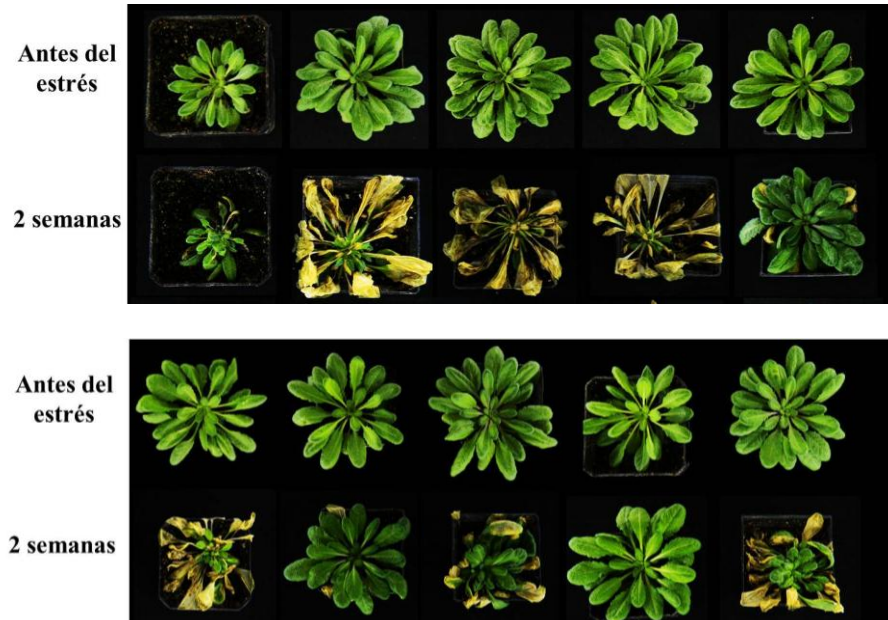


Figura 50. Fenotipo de plantas *35S::eIF4E* antes y después de ser sometidas a -20°C por 1 hora

Réplica 2

Plantas no aclimatadas

- WT

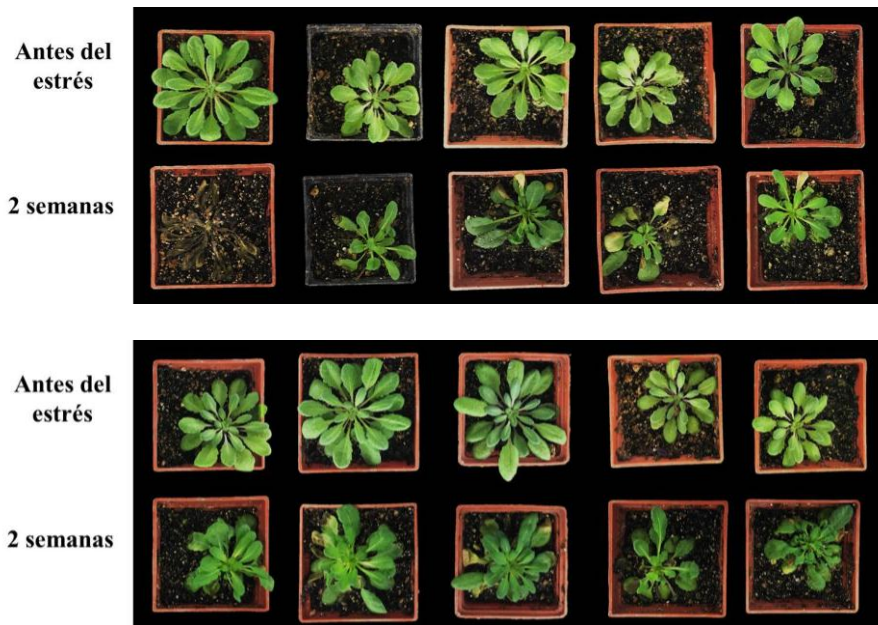


Figura 51. Fenotipo de plantas WT antes y después de ser sometidas a -20°C por 1 hora

- *AteIF4E-1*



Figura 52. Fenotipo de plantas *AteIF4E-1* antes y después de ser sometidas a -20°C por 1 hora

- *AtIF(iso)4E-1*



Figura 53. Fenotipo de plantas *35S::eIF4E* antes y después de ser sometidas a -20°C por 1 hora

- *35S::eIF4E*

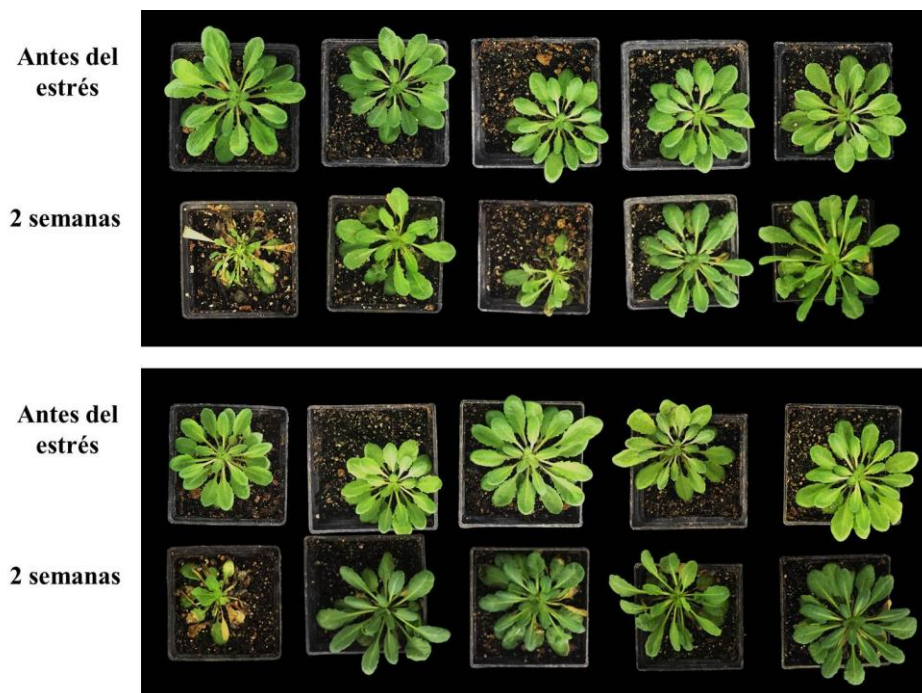


Figura 54. Fenotipo de plantas *35S::eIF4E* antes y después de ser sometidas a -20°C por 1 hora

13.5 Mapas de expresión de transcritos de las isoformas de *eIF4E*.

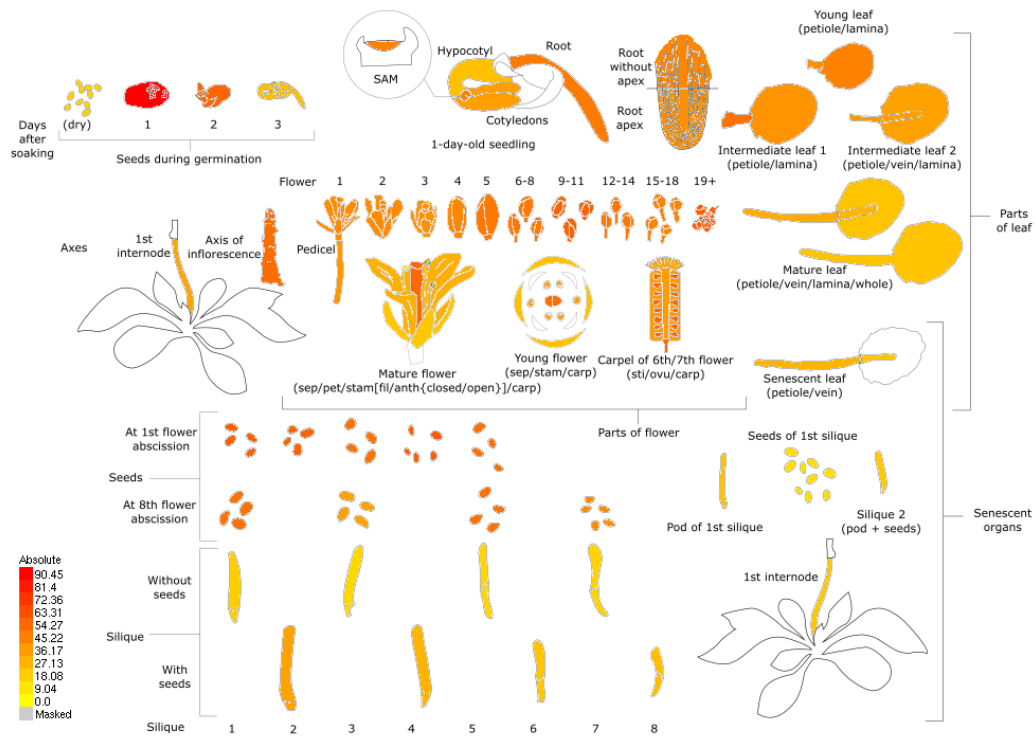


Figura 55. Expresión del transcrito de *eIF4E* (At4g18040) en los distintos tejidos de plantas de *A. thaliana* (Klepikova *et al.*, 2016).

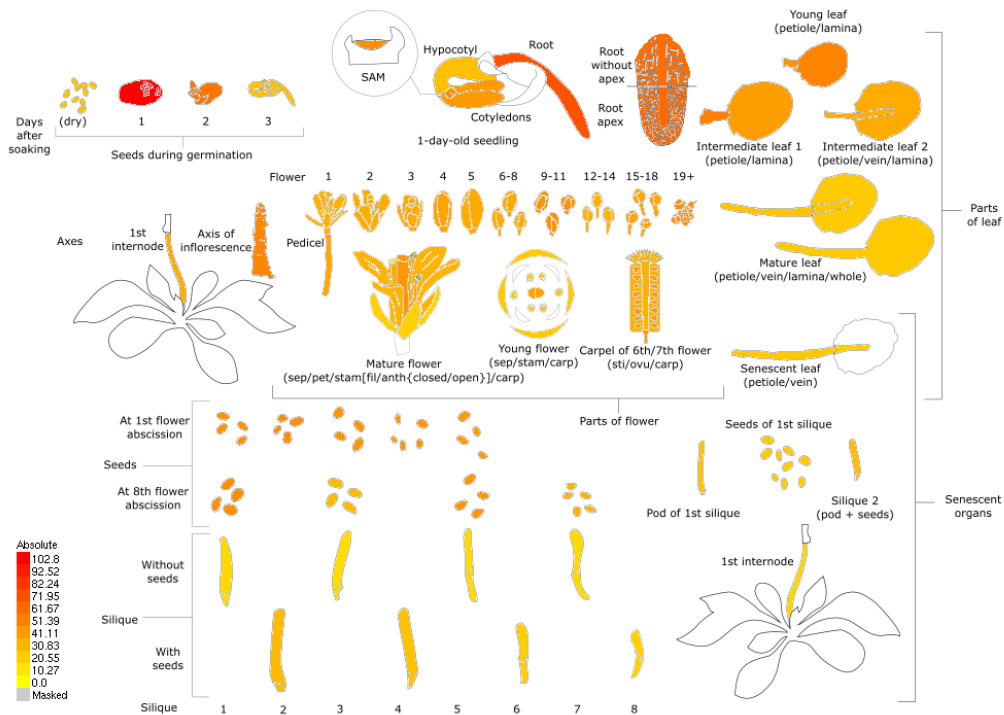


Figura 56. Expresión del transcrito de *eIF(iso)4E* (At5g35620) en los distintos tejidos de plantas de *A. thaliana* (Klepikova *et al.*, 2016).

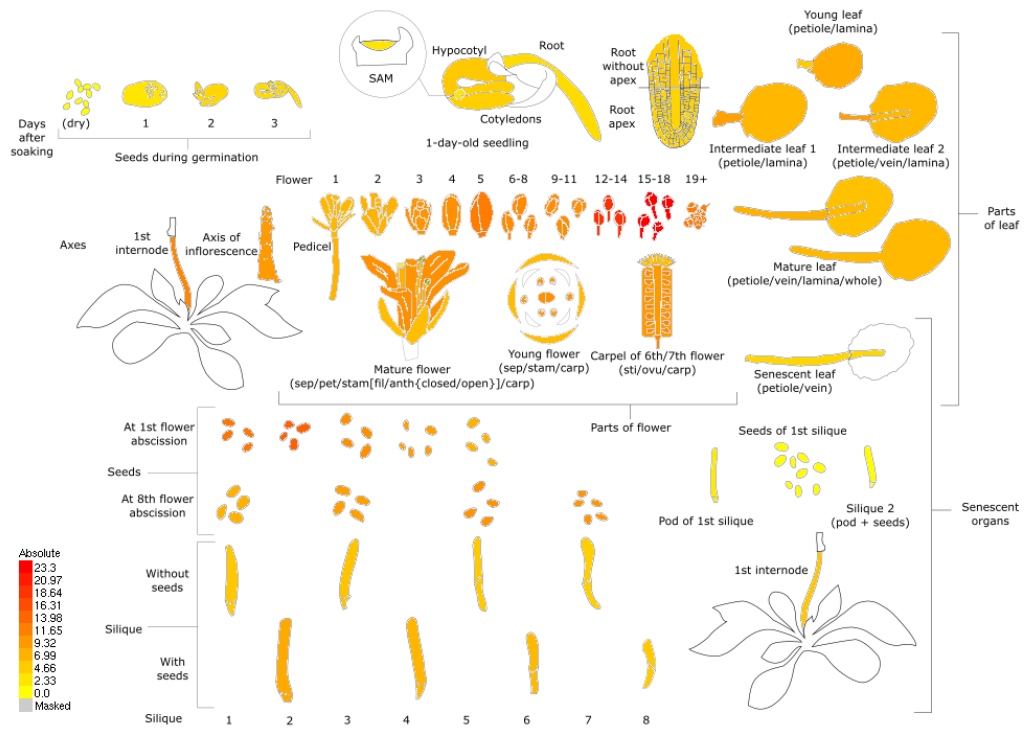


Figura 57. Expresión del transcrito de *eIF4E1b* (At1g29550) en los distintos tejidos de plantas de *A. thaliana* (Klepikova *et al.*, 2016).

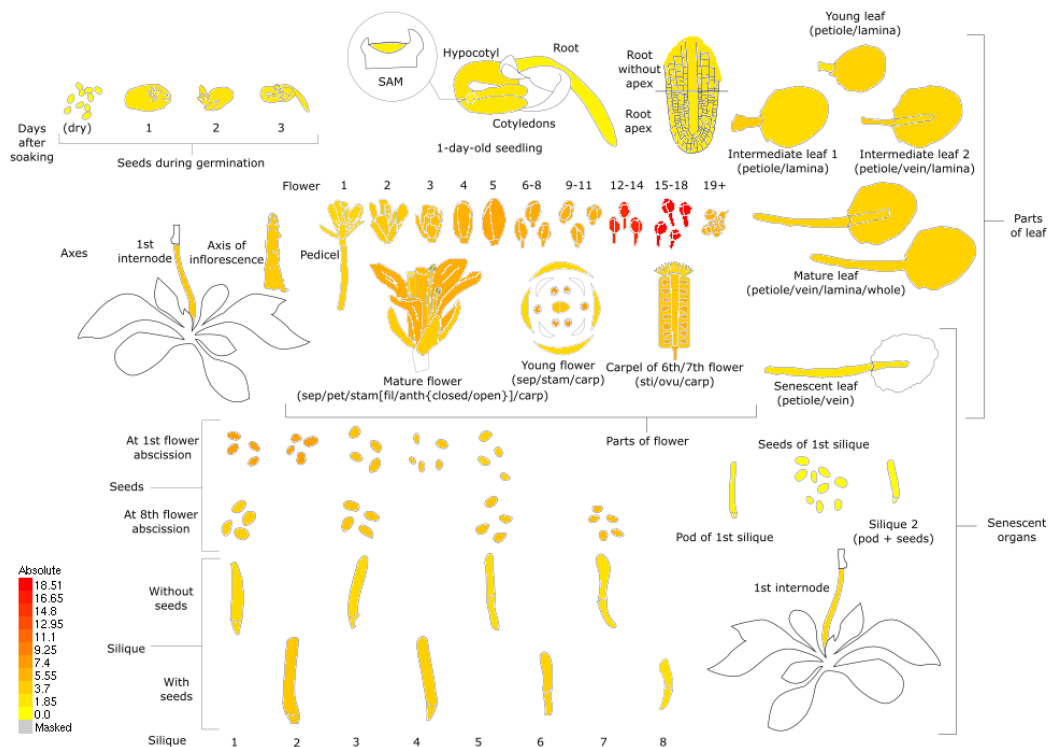


Figura 58. Expresión del transcrito de *eIF4E1c* (At1g29590) en los distintos tejidos de plantas de *A. thaliana* (Klepikova *et al.*, 2016).

14. REFERENCIAS

- Alcántara, T., Bosland, P. y Smith, D. (1996) Ethyl methanesulfonate-induced seed mutagenesis of *Capsicum annuum*. Journal of Heredity 87 (3): 239-241
- Agrawal, N., Dasaradhi, P. V. N., Mohammed, A., Malhotra, P., Bhatnagar, R. K., & Mukherjee, S. K. (2003). RNA interference: biology, mechanism, and applications. Microbiology and molecular biology reviews, 67(4), 657-685.
- Amiri A, Keiper BD, Kawasaki I, Fan Y, Kohara Y,(2001) An isoform of eIF4E is a component of germ granules and is required for spermatogenesis in *C. elegans*. Development 128: 3899–3912.
- Bastet, A., Lederer, B., Giovinazzo, N., Arnoux, X., German, Retana, S., Reinbold, C. & Lemaire, O. (2018). Trans-species synthetic gene design allows resistance pyramiding and broad-spectrum engineering of virus resistance in plants. Plant biotechnology journal, 16(9), 1569-1581. ISO 690
- Benchling [Biology Software]. (2018). Recuperado de <https://benchling.com>.
- Bush, M. S., Hutchins, A. P., Jones, A. M., Naldrett, M. J., Jarmolowski, A., Lloyd, C. W., & Doonan, J. H. (2009). Selective recruitment of proteins to 5' cap complexes during the growth cycle in *Arabidopsis*. The Plant Journal, 59(3), 400-412.
- Bray, C. M., & West, C. E. (2005). DNA repair mechanisms in plants: crucial sensors and effectors for the maintenance of genome integrity. New Phytologist, 168(3), 511-528.
- Browning, K. S. (2004). Plant translation initiation factors: it is not easy to be green. Biochemical Society Transactions, 32(4), 589-591.
- Carberry, S. y Goss, D. (1991) Wheat germ initiation factors 4Fand (iso)4F interact differently with oligoribonucleotide analogues of rabbit α -globin mRNA. Biochemistry, 30: 4542-4545
- Chantarachot, T., & Bailey-Serres, J. (2018). Polysomes, stress granules, and processing bodies: a dynamic triumvirate controlling cytoplasmic mRNA fate and function. Plant physiology, 176(1), 254-269.

- Clemens, M. J. (2001). Initiation factor eIF2 α phosphorylation in stress responses and apoptosis. Signaling Pathways for Translation, 57-89.
- Davis, A. M., Hall, A., Millar, A. J., Darrah, C., & Davis, S. J. (2009). Protocol: Streamlined sub-protocols for floral-dip transformation and selection of transformants in *Arabidopsis thaliana*. Plant methods, 5(1), 3.
- Dever, T. E., & Green, R. (2012). The elongation, termination, and recycling phases of translation in eukaryotes. Cold Spring Harbor perspectives in biology, 4(7), a013706.
- Dinkova, T. D., Martinez-Castilla, L., & Cruz-Espíndola, M. A. (2016). The diversification of eIF4E family members in plants and their role in the plant-virus interaction. Evolution of the Protein Synthesis Machinery and Its Regulation (pp. 187-205). Springer, Cham.
- Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2014). Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. Science, 346, 1258096.
- Duprat, A., Caranta C., Revers, F., Menand, B., Browning, K. y Robaglia, C. (2002) The *Arabidopsis* eukaryotic initiation factor (iso)4E is dispensable for plant growth but required for susceptibility to potyviruses. The Plant Journal (2002) 32, 927–934
- Dutt, S., Parkash, J., Mehra, R., Sharma, N., Singh, B., Raigond, P., Joshi, A., Chopra, S. y Singh, B. P. (2015) Translation initiation in plants: roles and implications beyond protein synthesis. Biologia Plantarum 59 (3), 401-412
- Fischer, P. (2009) Cap in hand: Targeting eIF4. Cell Cycle, 8(16): 2535-2541, DOI: 10.4161/cc.8.16.9301
- Gingras, A. C., Raught, B., & Sonenberg, N. (1999). eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. Annual review of biochemistry, 68(1), 913-963.
- Gutierrez, L. (2016) Efecto de la aclimatación al frío en la regulación transcripcional de la serina palmitoiltransferasa de *Arabidopsis thaliana*. Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México.

- Guy, C., Haskell, D., & Li, Q. B. (1998). Association of proteins with the stress 70 molecular chaperones at low temperature: evidence for the existence of cold labile proteins in spinach. Cryobiology, 36(4), 301-314.
- Hellen, C. U. (2018). Translation termination and ribosome recycling in eukaryotes. Cold Spring Harbor perspectives in biology, 10(10), a032656.
- Hernández, G., Altmann, M., Sierra, J. M., Urlaub, H., Del Corral, R. D., Schwartz, P., & Rivera-Pomar, R. (2005). Functional analysis of seven genes encoding eight translation initiation factor 4E (eIF4E) isoforms in *Drosophila*. Mechanisms of development, 122(4), 529-543.
- Hille, F., & Charpentier, E. (2016). CRISPR-Cas: biology, mechanisms and relevance. Philosophical transactions of the royal society B: biological sciences, 371(1707), 20150496.
- Holcik, M., & Sonenberg, N. (2005). Translational control in stress and apoptosis. Nature reviews Molecular cell biology, 6(4), 318-327.
- Ishino, Y., Shinagawa, H., Makino, K., Amemura, M., & Nakata, A. (1987). Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. Journal of bacteriology, 169(12), 5429-5433.
- Jackson, R., Hellen, C. y Pestova, T. (2010) The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. Nature Reviews, Molecular Cell Biology 10: 113-127
- Ji, H., Wang, Y., Cloix, C., Li, K., Jenkins, G. I., 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), e1005471.
- Jore, M., Lundgren, M., Van Dujin, E., Bultema, J., Westra, E., Waghmare, S., Wiedenheft, B., Pul, U., Wurm, R., Beijer, M., Barendregt, A., Zhou, K., Snijders, A., Dickman, M., Doudna, J., Boekema, E., Heck, A., Van der Oost, J. y Brouns, S. (2011) Structural basis for

CRISPR RNA-guided DNA recognition by Cascade. Nature Structural & Molecular Biology 18(5): 529-536.

- Joshi, B., Lee, K., Maeder, D. L., & Jagus, R. (2005). Phylogenetic analysis of eIF4E-family members. BMC evolutionary biology, 5(1), 1-20.
- Josse, E. M., & Halliday, K. J. (2008). Skotomorphogenesis: the dark side of light signalling. Current Biology, 18(24), R1144-R1146.
- Kawaguchi, R., & Bailey-Serres, J. (2005). mRNA sequence features that contribute to translational regulation in Arabidopsis. Nucleic Acids Research, 33(3), 955-965.
- Keima, T., Hagiwara-Komoda, Y., Hashimoto, M., Neriya, Y., Koinuma, H., Iwabuchi, N., ... & Namba, S. (2017). Deficiency of the eIF4E isoform nCBP limits the cell-to-cell movement of a plant virus encoding triple-gene-block proteins in Arabidopsis thaliana. Scientific reports, 7(1), 1-13.
- Keiper, B. D., Lamphear, B. J., Deshpande, A. M., Jankowska-Anyszka, M., Aamodt, E. J., Blumenthal, T., & Rhoads, R. E. (2000). Functional Characterization of Five eIF4E Isoforms in *Caenorhabditis elegans*. Journal of Biological Chemistry, 275(14), 10590-10596.
- Klepikova, A. V., Kasianov, A. S., Gerasimov, E. S., Logacheva, M. D., & Penin, A. A. (2016). A high resolution map of the Arabidopsis thaliana developmental transcriptome based on RNA-seq profiling. The Plant Journal, 88(6), 1058-1070.
- Krysan, P. J., Young, J. C., & Sussman, M. R. (1999). T-DNA as an insertional mutagen in Arabidopsis. The plant cell, 11(12), 2283-2290.
- 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.
- Labun, V., Montague, T.; Gagnon, J., Thyme, S. y Valen, E. (2016) CHOPCHOP v2: a web tool for the next generation of CRISPR genome engineering. Nucleic Acids Research; doi:10.1093/nar/gkw398

- Lee, J. Y., Lee, J. H., Koo, O. J., Bae, H. S., Jung, M. H., Bae, J. H., ... & Yeom, S. C. (2018). Multiple sgRNAs with overlapping sequences enhance CRISPR/Cas9-mediated knock-in efficiency. Experimental & molecular medicine, 50(4), 1-9.
- Léonard, S., Plante, D., Wittmann, S., Daigneault, N., Fortin, M. G., & Laliberté, J. F. (2000). Complex formation between potyvirus VPg and translation eukaryotic initiation factor 4E correlates with virus infectivity. Journal of virology, 74(17), 7730-7737.
- Liu, X., Wu, S., Xu, J., Sui, C. y Wei, J. (2017) Application of CRISPR/Cas9 in plant biology. Acta Pharmaceutica Sinica B. 7(3):292–302
- Ma, X., Zhu, Q., Chen, Y., & Liu, Y. G. (2016). CRISPR/Cas9 platforms for genome editing in plants: developments and applications. Molecular plant, 9(7), 961-974.
- Maiti, R. y Satya, P. (2014) Research advances in major cereal crops for adaptation to abiotic stresses. GM Crops Food 5, 259–279
- Martínez-Silva, A. V. y Dinkova, T. D. (2010) Mecanismos de regulación traduccional mediados por el factor de inicio 4E: Las dos caras de la moneda. REB 29(3): 82-91.
- Martinez-Silva, A.V., Aguirre-Martinez, C., Flores-Tinoco, C.E., Alejandri-Ramirez, N.D., Dinkova, T.D. (2012) Translation Initiation Factor AteIF(iso)4E Is Involved in Selective mRNA Translation in Arabidopsis Thaliana Seedlings. PLoS ONE 7(2): e31606. doi:10.1371/journal.pone.0031606
- Maruyama, K., Takeda, M., Kidokoro, S., Yamada, K., Sakuma, Y., Urano, K., & Sasaki, R. (2009). Metabolic pathways involved in cold acclimation identified by integrated analysis of metabolites and transcripts regulated by DREB1A and DREB2A. Plant physiology, 150(4), 1972-1980.
- May, B.P. y Martienssen, R. A. (2010) Transposon mutagenesis in the study of plant developmentt. Critical reviews in plant sciences 22 (1): 1-35
- McKersie, B. D., & Bowley, S. R. (1997). Active oxygen and freezing tolerance in transgenic plants. Plant Cold Hardiness (pp. 203-214). Springer, Boston, MA.

- Meijer, H. A., & Thomas, A. A. (2002). Control of eukaryotic protein synthesis by upstream open reading frames in the 5'-untranslated region of an mRNA. Biochemical Journal, 367(1), 1-11.
- Merchante, C., Stepanova, A. N., & Alonso, J. M. (2017). Translation regulation in plants: an interesting past, an exciting present and a promising future. The Plant Journal, 90(4), 628-653.
- Mojica, F. J. Ç; Diez-Villaseñor, C.; Garcia-Martinez, J. y Almendros, C. (2009) Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system. Microbiology, 155, 733–740.
- Mojica, F., Juez, G. y Rodríguez, F. (1993) Transcription at different salinities of *Haloferax mediterranei* sequences adjacent to partially modified PstI sites. Molecular Biology 9(3): 613-621.
- Mozingo, A., Dhaliwal, S., Dutt-Chaudhuri, A., Lyon, A., Sadow, J., Hoffman, D., Robertus, J. y Browning, K. (2007) The Structure of Eukaryotic Translation Initiation Factor-4E from Wheat Reveals a Novel Disulfide Bond. Plant Physiology, 143: 1504–1518.
- Muñoz-López, M. y García-Pérez, J. (2010) DNA transposons: Nature and applications in genomics. Current Genomics 11 (2): 115-128.
- Nick, P. (2013). Microtubules, signalling and abiotic stress. The Plant Journal, 75(2), 309-323.
- Patrick, R.M. y Browning, K.S (2012). The eIF4F and eIFiso4F complexes of plants: an evolutionary perspective. Comparative and Functional Genomics. 2012:287814.
- Patrick, R. M., Lee, J. C., Teetsel, J. R., Yang, S. H., Choy, G. S., y Browning, K. S. (2018). Discovery and characterization of conserved binding of eIF4E 1 (CBE1), a eukaryotic translation initiation factor 4E-binding plant protein. Journal of Biological Chemistry, 293(44), 17240-17247.

- Peng, C., Wang, H., Xu, X., Wang, X., Chen, X., Wei, W. & Zhang, L. (2018). High-throughput detection and screening of plants modified by gene editing using quantitative real-time polymerase chain reaction. The Plant Journal, 95(3), 557-567.
- Pestova, T. y Kolupaeva, V. (2002) The roles of individual eukaryotic translation initiation factors in ribosomal scanning and initiation codon selection. Genes & Development 16:2906–2922.
- Peterson, B. A., Haak, D. C., Nishimura, M. T., Teixeira, P. J., James, S. R., Dangl, J. L., & Nimchuk, Z. L. (2016). Genome-wide assessment of efficiency and specificity in CRISPR/Cas9 mediated multiple site targeting in Arabidopsis. PLoS one, 11(9), e0162169.
- Poulin, F., & Sonenberg, N. (2013). Mechanism of translation initiation in eukaryotes. Madame Curie Bioscience Database [Internet]. Landes Bioscience.
- Pyott, D., Sheehan, E. y Molnar A. (2016) Engineering of CRISPR/Cas9-mediated potyvirus resistance in transgene-free Arabidopsis plants. Molecular plant pathology 17(8), 1276–1288.
- Qu, L. J., & Qin, G. (2014). Generation and characterization of Arabidopsis T-DNA insertion mutants. Arabidopsis Protocols (pp. 241-258). Humana Press, Totowa, NJ.
- Rashid, M., Guangyuan, H., Guangxiao, Y., Hussain, J., & Xu, Y. (2012). AP2/ERF transcription factor in rice: genome-wide canvas and syntenic relationships between monocots and eudicots. Evolutionary Bioinformatics, 8, EBO-S9369.
- Rath, D., Amlinger, L., Rath, A. y Lundgren, M. (2015) The CRISPR-Cas immune system: Biology, mechanisms and applications. Biochimie 117: 119-128.
- Reed, G. H., & Wittwer, C. T. (2004). Sensitivity and specificity of single-nucleotide polymorphism scanning by high-resolution melting analysis. Clinical chemistry, 50(10), 1748-1754.
- Rhoads, R. E., Dinkova, T. D., & Jagus, R. (2007). Approaches for analyzing the differential activities and functions of eIF4E family members. Methods in enzymology, 429, 261-297.
- Rodriguez, C. M., Freire, M. A., 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. The Plant Journal, 13(4), 465-473.

- Sachse, C., Krausz, E., Krönke, A., Hannus, M., Walsh, A., Grabner, A. & Echeverri, C. J. (2005). High-throughput RNA interference strategies for target discovery and validation by using synthetic short interfering RNAs: functional genomics investigations of biological pathways. Methods in enzymology, 392, 242-277.
- Salazar, K. (2017) Tesis de Maestría “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. Ciudad de México.
- Sanfaçon, H. (2015) Plant Translation Factors and Virus Resistance. Viruses, 7, 3392-3419; doi:10.3390/v7072778
- Sato, M., Nakahara, K., Yoshii, M., Ishikawa, M., & Uyeda, I. (2005). Selective involvement of members of the eukaryotic initiation factor 4E family in the infection of *Arabidopsis thaliana* by potyviruses. FEBS letters, 579(5), 1167-1171.
- Schaad, M.C., Anderberg, R.J. and Carrington, J.C. (2000) Strain Specific interaction of the tobacco etch virus NIa protein with the translation initiation factor eIF4E in the yeast two-hybrid system. Virology, 273, 300–306
- Seo, E., Lee, H., Jeon, J., Park, H., Kim, J., Noh, Y. S., & Lee, I. (2009). Crosstalk between cold response and flowering in *Arabidopsis* is mediated through the flowering-time gene SOC1 and its upstream negative regulator FLC. The Plant Cell, 21(10), 3185-3197.
- Settles, A. M., Holding, D. R., Tan, B. C., Latshaw, S. P., Liu, J., Suzuki, M., ... & McCarty, D. R. (2007). Sequence-indexed mutations in maize using the UniformMu transposon-tagging population. BMC genomics, 8(1), 1-12.
- Simon, A. E., & Miller, W. A. (2013). 3' cap-independent translation enhancers of plant viruses. Annual review of microbiology, 67, 21-42.

- Sonoda, E., Hohegger, H., Saberi, A., Taniguchi, Y., & Takeda, S. (2006). Differential usage of non-homologous end-joining and homologous recombination in double strand break repair. DNA repair, 5(9-10), 1021-1029.
- Takahashi, D., Uemura, M., & Kawamura, Y. (2018). Freezing tolerance of plant cells: from the aspect of plasma membrane and microdomain. *Survival Strategies in Extreme Cold and Desiccation*, 61-79.
- Thalhammer, A., Bryant, G., Sulpice, R., & Hinch, D. K. (2014). Disordered cold regulated15 proteins protect chloroplast membranes during freezing through binding and folding, but do not stabilize chloroplast enzymes in vivo. Plant physiology, 166(1), 190-201.
- Thomashow, M. F. (1999). Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. Annual review of plant biology, 50(1), 571-599.
- Uemura, M., & Steponkus, P. L. (1997). Effect of cold acclimation on the lipid composition of the inner and outer membrane of the chloroplast envelope isolated from rye leaves. Plant Physiology, 114(4), 1493-1500.
- Van Der Kelen, K., Beyaert, R., Inzé, D. y De Veylder, L. (2009) Translational control of eukaryotic gene expression. Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology, 44(4): 143-168, DOI: 10.1080/10409230902882090
- Vouillot, L., Thélie, A., & Pollet, N. (2015). Comparison of T7E1 and surveyor mismatch cleavage assays to detect mutations triggered by engineered nucleases. G3: Genes, Genomes, Genetics, 5(3), 407-415.
- Weber, C., Nover, L., & Fauth, M. (2008). Plant stress granules and mRNA processing bodies are distinct from heat stress granules. The Plant Journal, 56(4), 517-530.
- Xing, H. L., Dong, L., Wang, Z. P., Zhang, H. Y., Han, C. Y., Liu, B., & Chen, Q. J. (2014). A CRISPR/Cas9 toolkit for multiplex genome editing in plants. *BMC plant biology*, 14(1), 1-12.
- Yoshii, M., Nishikiori, M., Tomita, K., Yoshioka, N., Kozuka, R., Naito, S. e Ishikawa, M. (2004) The Arabidopsis Cucumovirus Multiplication 1 and 2 Loci Encode Translation Initiation Factors 4E and 4G. Journal of Virology, 78(12): 6102–6111

- Yoshi, M., Yoshioka, N., Ishikawa, M. y Naito, S. (1998) Isolation of an Arabidopsis thaliana Mutant in Which the Multiplication of both Cucumber Mosaic Virus and Turnip Crinkle Virus Is Affected. Journal of Virology 72(11): 8731-8737.
- Yoshi, M., Yoshioka, N., Ishikawa, M. y Naito, S. (1998) Isolation of an Arabidopsis thaliana mutant in which accumulation of cucumber mosaic virus coat protein is delayed. The Plant Journal 13(2): 211-219
- Zhang, X., Henriques, R., Lin, S. S., Niu, Q. W., & Chua, N. H. (2006). Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana using the floral dip method. Nature protocols, 1(2), 641.
- Zhang, K., Raboanatahiry, N., Zhu, B. y Li, M. (2017) Progress in genome editing Technology and its application in plants. Frontiers in Plant Science 8:177.
- Zhang, J., Roberts, R., & Rakotondrafara, A. M. (2015). The role of the 5' untranslated regions of Potyviridae in translation. Virus research, 206, 74-81.
- Zhang, Y., Zhang, F., Li, X., Baller, J., Qi, Y., Starker, C., Bogdanove, C. y Voytas, D. (2013) Transcription Activator-Like Effector Nucleases Enable Efficient Plant Genome Engineering. Plant Physiology, 161: 20–27.
- Zhu, J. K. (2016). Abiotic stress signaling and responses in plants. Cell, 167(2), 313-324.