



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR
FACULTAD DE QUÍMICA

LICENCIATURA EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA BÁSICA

Efecto de la sobreexpresión del factor eIF4E sobre la
traducción global y específica de mRNAs en *Arabidopsis
thaliana*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADO EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA BÁSICA

PRESENTA:
CARLOS EDUARDO FLORES TINOCO



Directora de Tesis:
Dra. Tzvetanka Dimitrova Dinkova

Ciudad Universitaria, México D.F.

Julio 2012

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE	Dr. Rafael Camacho Carranza
SECRETARIO	Dra. Tzvetanka Dimitrova Dinkova
VOCAL	Dra. María Soledad Funes Argüello
SUPLENTE	Dra. Marina Gavilanes Ruíz
SUPLENTE	Dr. Luis Servín González

LUGAR DONDE SE REALIZÓ ESTA TESIS

Departamento de Bioquímica L-103, Facultad de Química Conjunto "E", Paseo de la Inv. Científica, Ciudad Universitaria, Universidad Nacional Autónoma de México, C.P. 04510, Mexico, D.F.

PRESENTACIÓN Y DEFENSA DE ESTA TESIS

Lunes 30 de julio de 2012 en el auditorio Alfonso Escobar Izquierdo del Instituto de Investigaciones Biomédicas, Circuito Mario de la Cueva s/n, Ciudad Universitaria, Universidad Nacional Autónoma de México, C.P. 04510, Mexico, D.F..



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

LICENCIATURA EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA BÁSICA
COORDINACIÓN

DR. ENRIQUE LUIS GRAUE WIECHERS
DIRECTOR
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM
PRESENTE.

Por este conducto, le informamos que la tesis titulada: “**Efecto de la sobreexpresión del factor eIF4E sobre la traducción global y específica de mRNAs en *Arabidopsis thaliana***”, que presenta el alumno **CARLOS EDUARDO FLORES TINOCO** con número de cuenta **304649091**, cumple los requisitos establecidos en el Plan de Estudios de la Licenciatura en Investigación Biomédica Básica. Por lo tanto, los suscritos Miembros del Jurado, otorgamos nuestro voto aprobatorio para que sea presentada en examen oral.

Dr. Rafael Camacho Carranza

Dra. Tzvetanka Dimitrova Dinkova

Soledad Funes

Dra. María Soledad Funes Argüello

Dra. Marina Gavilanes Ruíz

Dr. Luis Servin González

DEDICATORIAS

CON ENORME CARIÑO Y ADMIRACIÓN A MIS PADRES, DORA TINOCO Y EDUARDO FLORES, QUE A LO LARGO DE TODA MI VIDA NUNCA HAN DEJADO DE APOYARME PERO SOBRETUDO DE CREER EN MI POR MUY DIFÍCIL QUE SEA LA SITUACIÓN.

A TI ALF POR TODO TU APOYO Y CARIÑO INCONDICIONAL QUE ME HA PERMITIDO SEGUIR ADELANTE.

A MIS TÍAS ARTE, ÁNGELA, ISA, GOYA Y A TODA MI FAMILIA Y AMIGOS POR SU CONSTANTE ÁNIMO.

A LA UNAM: DEFECTOS VARIOS, VIRTUDES INFINITAS.

A LA LIBB POR ESTE CAMINO TAN ARDUO PERO TAN FRUCTÍFERO.

A CARLA POR ESA INCESANTE AYUDA Y CARIÑO, ME DA MUCHO GUSTO QUE FORMES PARTE DE MI VIDA.

A FÁTIMA Y DIEGO POR TODOS ESOS MOMENTOS JUNTOS, HA SIDO UN HONOR Y ADMIRACIÓN PERO SOBRETUDO UN GUSTO ESTAR A SU LADO.

A BARBIE BULLIE ALIAS MARIELA, ME RECORDASTE EL GUSTO POR TRABAJAR Y MAS CON CON UNA GRAN AMIGA COMO TU. GRACIAS POR TODO.

A SILVIA, MARY, DR. PEDERNERA, DRA. MÉNDEZ, FLOR, JORGE Y TODAS LAS PERSONAS QUE ME HAN AYUDADO A LO LARGO DE LA CARRERA.

A CESY POR DARME LA OPORTUNIDAD, LA CONFIANZA Y EL APOYO QUE HE REQUERIDO.

A LOS INTEGRANTES DEL LABORATORIO 103: ERIKA, CHIAPAS, PEDRO, ALEJANDRO, KEVIN, FRIDA, ELOISA, NAHOLI, OMAR, CARLOS, VALERIA, CÉSAR Y TODOS AQUELLOS QUE SE HAN INTEGRADO POR SU AYUDA, CONSEJOS PERO SOBRETUDO MOMENTOS GRATOS QUE HEMOS PASADO.

A LOS CONTRIBUYENTES.

A MÉXICO.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Tzvetanka Dimitrova Dinkova por su ayuda constante que resultó en la conclusión de esta tesis.

A la Dra. Carolina Peña Montes por su ayuda en la realización del PCR en tiempo real.

A la M.C. Karina Jiménez Durán y a la USAI de la Facultad de Química por su ayuda en la obtención de imágenes por microscopía confocal.

A la estudiante de Q.F.B. Mariela Kalinova Jelezova por su apoyo en los experimentos de esta tesis.

A los proyectos CONACyT 81708, ICyTDF PIUTE10-55 y PAPIIT IN204309 por el financiamiento otorgado.

Al proyecto PAPIIT IN204309 que otorgó una beca para la realización de esta tesis de licenciatura.

***-Entonces te juzgaras a ti mismo- le respondió el rey-
Lo cual es aún mas difícil que juzgar a los demás;
y si lo logras serás un verdadero sabio.
A. de Saint-Exupère, El principito***

***Ya se sabe que la ignorancia es la madre del miedo
Herman Melville, Moby Dick***

Resumen

La síntesis de proteínas, a través de la decodificación de RNAs mensajeros (mRNAs) durante el proceso de traducción, es uno de los eventos fundamentales para que la expresión génica se lleve a cabo, por lo tanto es altamente regulada a múltiples niveles. Dentro de las moléculas a las que se les ha descrito una regulación estricta se encuentra el factor eucariote 4E (eIF4E), el cual está encargado de unir la estructura cap situada en el extremo 5' de los mRNAs promoviendo estabilidad y eficiencia en la traducción de éstos.

El factor eIF4E pertenece a una familia de proteínas que unen al cap de manera diferencial, además no están sujetos a la misma regulación ni se expresan en los mismos estadios, generando afectaciones, tanto positivas como negativas, en la traducción específica de ciertos mRNAs.

Trabajos previos del laboratorio en la planta modelo *Arabidopsis thaliana*, identificaron a varios mRNAs susceptibles a sufrir cambios en su traducción *in vivo* bajo la presencia de distintas isoformas del eIF4E, particularmente durante la simultánea ausencia del factor eIFiso4E y la sobreexpresión de eIF4E.

La presente tesis se enfocó a evaluar los efectos de la sobreexpresión de eIF4E en la traducción selectiva de RNAs mensajeros mediante la generación de una planta transgénica estable que sobreexpresara a este factor de manera constitutiva. En esta planta se encontró que la traducción de ciertos mRNAs se favorece mientras que la de otros se inhibe, además el eIF4E a nivel de proteína no se expresa en toda la planta, aun cuando su mRNA se expresa bajo el promotor viral constitutivo 35S. Finalmente, su localización dentro de un mismo tejido es diferencial comparada con la de el eIFiso4E. Estos datos apoyan la hipótesis sobre las diversas funciones que pudieran llegar a tener ambos factores, además de estar sujetos a una regulación compleja que asegure su correcta expresión en determinados estadios del desarrollo.

Parte de este trabajo se utilizó para la publicación del artículo Martínez-Silva AV, Aguirre-

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

Abstract

Protein synthesis through the translation of mRNAs is a fundamental and highly controlled task during gene expression. Among the most regulated molecules is the eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E) which is responsible for binding the cap structure located at the 5' end of mRNAs, providing them stability and efficiency during their translation.

eIF4E belongs to a widespread protein family characterized by their cap binding ability. The eIF4E family members are not equally regulated or expressed causing selective regulation, either positive or negative, in the translation of specific mRNAs.

Previous works in the model plant *Arabidopsis thaliana* identified several mRNAs susceptible to change *in vivo* their translation according to the presence of distinct eIF4E isoforms, particularly in the absence of eIFiso4E and simultaneous overexpression of eIF4E.

The present thesis evaluated the effects of eIF4E's overexpression on the selective translation of mRNAs through the generation of a transgenic plant that overexpresses this factor in a constitutive way. In this mutant, it was found that some mRNAs' translation is favored while some others are disfavored. It was also found that eIF4E is subject to post-transcriptional regulation because its protein level varied throughout the plant, despite of the fact its mRNA was expressed under the constitutive viral promoter 35S. Finally, eIF4E localization was different from the one observed for eIFiso4E, even in the same tissues. Together these data further support the idea about the variety of functions that eIF4E and eIFiso4E have, suggesting that a tight regulation of their localization ensures their function in specific tissues and development stages.

Part of this work was used for the publication Martínez-Silva AV, Aguirre-Martínez C, **Flores-Tinoco CE**, Alejandri-Ramírez ND, Dinkova TD (2012) Translation Initiation Factor AtelF(iso)4E Is Involved in Selective mRNA Translation in *Arabidopsis Thaliana* Seedlings. PLoS ONE 7(2): e31606. doi:10.1371/journal.pone.0031606

Abreviaturas

4EBP	Proteína de unión a eIF4E
4E-SE	Elemento sensible a eIF4E
ARE	Elemento rico en adeninas y uracilos
ATP	Adenosín trifosfato
BASTA	Glufosinato de amonio
cDNA	DNA complementario
CDS	Secuencia codificante
CIYVV	Virus de la vena amarilla del trébol
Col-0	Ecotipo Columbia 0
eIFs	Factor de inicio eucarionte
GFP	Proteína verde fluorescente
GTP	Guanosín trifosfato
LMV	Virus del mosaico de la lechuga
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
OCD	Ornitin descarboxilasa
PABP	Proteína de unión a tracto de poliadeninas
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
tRNA	Ácido ribonucleico de transferencia
TuMV	Virus del mosaico del nabo
UTR	Región no traducida
VEGF	Factor de crecimiento endotelial y de vasos sanguíneos
WT	Silvestre

Unidades

Abs	absorbancia
Da	Dalton
DO	densidad óptica
h	horas

L	litro
M	molar
mg	miligramo
min	minutos
mL	mililitro
ng	nanogramo
°C	grado centígrado
p/p	Relación peso-peso
p/v	Relación peso-volumen
pH	potencial de hidrógeno
rpm	revoluciones por minuto
s	segundos
S	Svedberg (unidad de sedimentación)
U	unidades
V	Volts
v/v	Relación volumen-volumen
x g	Fuerza centrífuga
μL	microlitro

Índice

Resumen.....	vii
Abstract.....	ix
Abreviaturas.....	x
Unidades.....	x
Introducción.....	1
La traducción.....	1
El eIF4E: su regulación y su sobreexpresión.....	4
Familia de proteínas eIF4E.....	6
Diferencias entre eIF4E y eIFiso4E.....	9
Hipótesis.....	11
Objetivo.....	11
Objetivos Particulares.....	11
Materiales y Métodos.....	12
Cultivos Biológicos.....	12
Bacterias.....	12
Especies y cepas utilizadas.....	12
Obtención de células <i>Agrobacterium tumefaciens</i> competentes.....	12
Obtención de células <i>Escherichia coli</i> DH5 α competentes.....	12
Transformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> por choque térmico.....	13
Transformación de <i>E. coli</i> DH5 α competentes por choque térmico.....	13
Plantas.....	14
Material utilizado.....	14
Esterilización de semillas.....	14
Siembra de semillas en medio cultivo.....	14
Siembra de semillas en tierra.....	15
Transformación de plantas por <i>floral dip</i>	15
Selección de transformantes en tierra usando el herbicida BASTA (glufosinato de amonio).....	16
Técnicas de Biología Molecular.....	16
Generación de plásmidos.....	16
Ensayos con enzimas de restricción.....	17
Extracción de DNA.....	18
Plasmídico a partir de bacterias.....	18
Genómico de plantas.....	18
Extracción de RNA.....	19
Total para RT-PCR.....	19
A partir de fracciones polisomales.....	19
Amplificación de DNA.....	20
Transcripción Reversa.....	20
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	20
PCR en tiempo real.....	21
Extracción de Proteínas.....	21
Cuantificación de Proteínas.....	22
Western Blot.....	22
Obtención de Perfiles Polisomales.....	22

Secuenciación.....	25
Predicción de la estructura de la proteína de fusión eIF4E-GFP	25
Obtención de secuencias e información de los genes de <i>Arabidopsis</i>	25
Predicción de motivos en los transcritos traducidos.....	25
Análisis densitométrico para determinar niveles de expresión.....	26
Análisis por microscopía confocal.....	26
Resultados.....	27
Generación de una construcción que sobreexpresa al eIF4E en <i>Arabidopsis thaliana</i>	27
Obtención de una planta sobreexpresora del eIF4E.....	31
Actividad traduccional global de las líneas sobreexpresoras del eIF4E.....	35
Actividad traduccional específica para ciertos mRNAs en la línea eIF4E- ϕ	38
Características particulares de los mRNAs que cambiaron su distribución polisomal.....	40
Localización diferencial del eIF4E en la planta.....	44
Discusión.....	47
Sobreexpresión de eIF4E a nivel de proteína.....	47
Aumento de la traducción global en la línea eIF4E- ϕ	48
Desregulación en la traducción específica de mRNAs.....	48
Conclusiones.....	51
Perspectivas.....	52
Presentación y publicación de este trabajo.....	54
Apéndices.....	55
Apéndice A: Soluciones usadas.....	55
Medios de cultivo.....	55
Separación de ácidos nucleicos y proteínas.....	56
Extracción de plásmidos (Minipreps).....	57
Extracción de DNA genómico de plantas.....	57
Extracción de Proteínas.....	58
Extracción de perfiles polisomales.....	58
Apéndice B: Datos sobre las secuencias, genes y plásmidos.....	59
Apéndice B1 Oligonucleótidos usados.....	59
Apéndice B2 Condiciones de PCR.....	59
Transcripción Reversa.....	59
PCR semicuantitativo.....	60
PCR en tiempo real.....	60
Apéndice B3 Plásmidos utilizados.....	61
Apéndice B4 Secuenciación de plásmidos.....	61
Apéndice B5 Transcritos encontrados con desregulación en su actividad traduccional en la mutante carente de eIF4E.....	62
Referencias.....	66

Introducción

La traducción

La síntesis de proteínas es un proceso crucial mediante el cual los seres vivos buscan adaptarse al medio ambiente que los rodea, por lo que deben lograr este cometido no solo de una manera rápida sino altamente controlada si es que esperan sobrevivir.

La traducción eucarionte es el proceso donde el mRNA sintetizado durante la transcripción y exportado desde el núcleo hacia el citoplasma es descifrado y convertido en proteína. Este proceso consta de 3 fases: el inicio, que tiene como objetivo el ensamble del complejo ribosomal 80S en el codón de inicio; la elongación, en la cual los tRNAs correspondientes a cada codón del mRNA entran al ribosoma donde se decodifica el mRNA y se realizan los enlaces peptídicos a la vez que se va liberando la proteína naciente hasta llegar al codón de término o paro donde ocurre la última etapa, la terminación, que conlleva al disociamiento del complejo ribosomal del mRNA dejándolo listo para un nuevo ciclo traduccional (Figura 1) (Sonenberg y Hinnebusch, 2009; Jackson et al., 2010).

En eucariontes, los mRNAs tienen en su extremo 5' la estructura 7mGpppN (donde G indica una guanina y N puede ser cualquier nucleótido) denominada "cap", esta estructura es primordial para el inicio de la traducción, pues es reconocida por el factor eucarionte de inicio de la traducción (eIF) 4E que junto con eIF4G y la proteína de unión a PoliA (PABP) (situada en el extremo 3' del mRNA) circularizan al mensajero protegiéndolo y dándole estabilidad ante nucleasas. Por otra parte, la unión del complejo ternario (formado por eIF2 el tRNA iniciador y la subunidad ribosomal pequeña) promovida por la interacción entre eIF4G y eIF3 permite proceder al escaneo del mRNA en busca del codón de inicio con ayuda de la helicasa eIF4A. Una vez encontrado, la subunidad 60S se integra mediante la hidrólisis de GTP conformando un ribosoma funcional 80S listo para proceder con la elongación (Figura 1) (Sonenberg y Gingras, 1998; Gebauer y Hentze, 2004; Sonenberg y Hinnebusch, 2009).

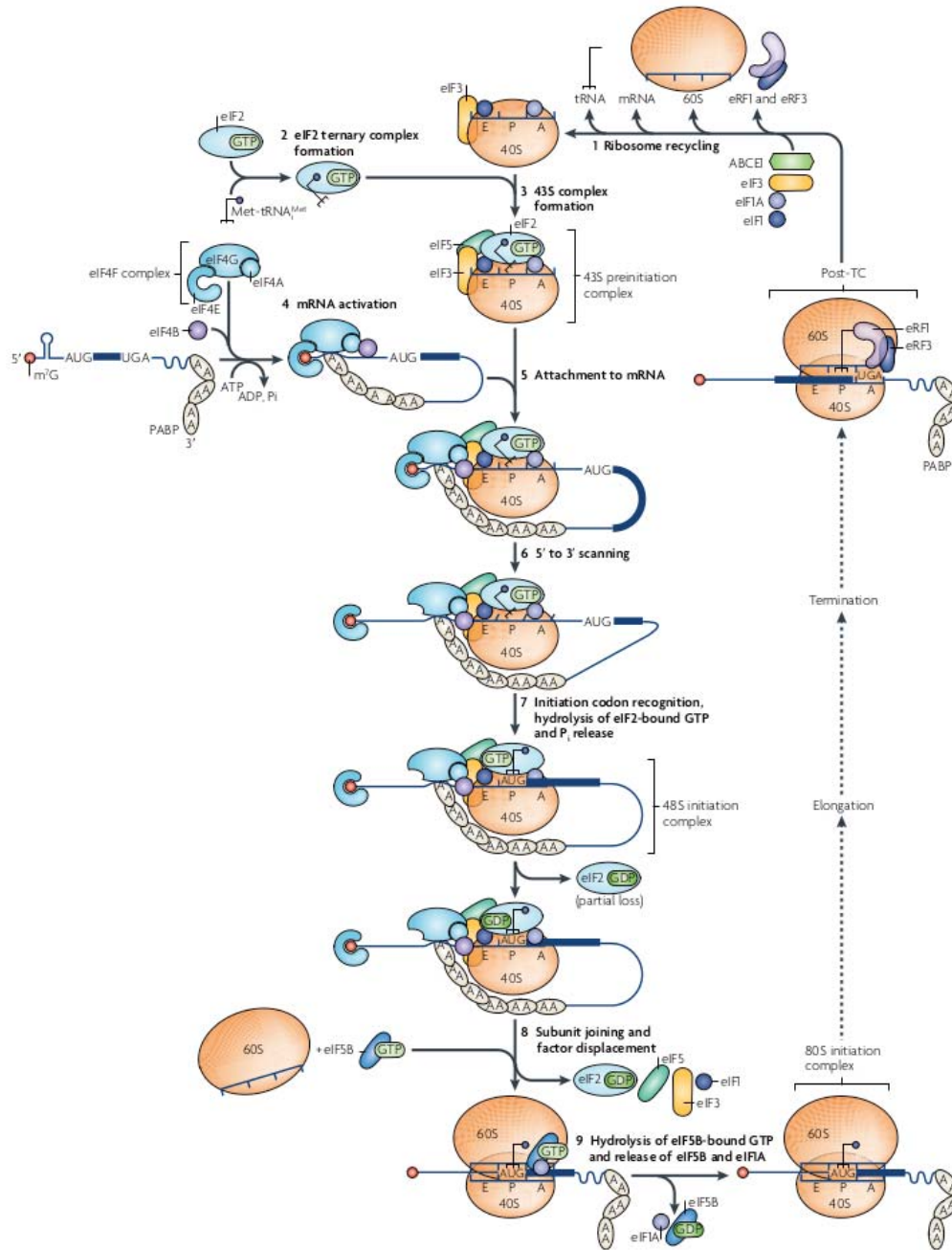


Figura 1. Traducción eucarionte. Las subunidades ribosomales se encuentran libres tras el término de la traducción (1) y se reciclan para siguientes rondas traduccionales. La subunidad 40S se une a eIF2-GTP y el tRNA iniciador para formar el complejo 43S (2 y 3), el cual se posicionará (5) en el mRNA unido y circularizado por el complejo eIF4F (eIF4E, eIF4G y eIF4A) y la PABP (4). Posteriormente, se escanea el mRNA en busca del codón de inicio (6), una vez encontrado se liberan gran parte de los factores (7 y 8) permitiendo la unión de la subunidad ribosomal mayor (8). Tras la liberación de los factores remanentes, quedan ribosomas competentes para la elongación (9). Una vez que se disocian al encontrar el codón de término serán reciclados para iniciar de nuevo todo el proceso (1). Tomado de Jackson et al. (2010).

Dada la importancia del inicio de la traducción, al eIF4E se le ha documentado una alta regulación a todos los niveles.

La modulación de la traducción ofrece cambios dinámicos e importantes en la expresión génica de un organismo, gran medida de la regulación descrita en este proceso se da al inicio de ésta (Gebauer y Hentze, 2004; Besse y Ephrussi, 2008; Sonenberg y Hinnebusch, 2009; Jackson et al., 2010), ya sea impidiendo la regeneración del complejo ternario mediante cinasas del eIF2 (Hinnebusch, 2005), estructuras secundarias en el mRNA que impidan el paso del complejo ribosomal (Gebauer y Hentze, 2004) o alterando la correcta circularización del mRNA (Figura 2), esto último puede ser a través de la deadenilación del extremo 3' del mRNA, imposibilitando la entrada del complejo traduccional e inhibiendo la actividad del eIF4E en su asociación con el resto de los factores (Gebauer y Hentze, 2004; Humphreys et al., 2005; Robaglia y Caranta, 2006; Sonenberg y Hinnebusch, 2009).

Ejemplos de la inhibición de las funciones del eIF4E se han encontrado en el impedimento de la asociación con eIF4G para poder circularizar el mRNA (Figura 2B) (Besse y Ephrussi, 2008) o la unión de otras proteínas como la Argonauta 2 a la estructura cap evitando que se lleve a cabo la traducción (Figura 2C) (Kiriakidou et al., 2007).

Otro punto de regulación específica de la traducción de mRNAs son las estructuras secundarias altamente complejas en el 5' UTR del mensajero (Koromilas et al., 1992; Grens y Scheffler, 1990), para sobrepasar esto y lograr ser traducidos se requieren de mayores concentraciones de la helicasa eIF4A y eIF4E (Koromilas et al., 1992; Ray et al., 1983).

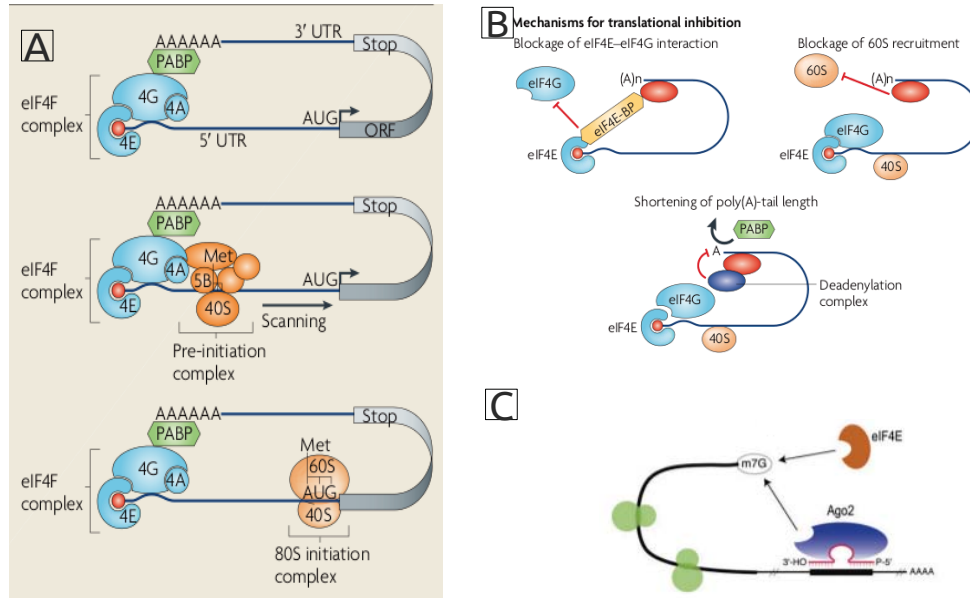


Figura 2. La traducción y su regulación. A Inicio de la traducción, (*panel superior*) el complejo eIF4F junto con la PABP se unen al mRNA permitiendo su circularización, (*panel medio*) el complejo de preinicio de la traducción se une al mRNA circularizado y comienza el escaneo en busca del codón de inicio, (*panel inferior*) una vez encontrado el codón de inicio parte de los factores de inicio de la traducción se disocian permitiendo la unión de la subunidad ribosomal mayor y proceder con el resto de la traducción. B y C Mecanismos que afectan la circularización del mRNA. B La asociación entre eIF4E y eIF4G puede ser abatida a través de las proteínas 4E-BPs que se unen al primero. El tracto de poliadeninas en el extremo 3' UTR del mRNA es necesario para que se pueda unir la PABP, el acortarlo impide que se pueda circularizar además conduce al mRNA a su degradación. El bloqueo de la subunidad ribosomal mayor implica que la traducción no se lleve a cabo. C La proteína Argonata 2 de animales posee un dominio capaz de unir al cap de los mRNAs lo cual la haría competir con eIF4E por unirsele reprimiendo así su traducción. Adaptado A y B de Besse y Ephrussi (2008) , C de (Kiriakidou et al. (2007) .

El eIF4E: su regulación y su sobreexpresión

La regulación del eIF4E, ya sea positiva o negativa, ha sido descrita como un control global y específico de la traducción en múltiples y diferentes procesos celulares como apoptosis (Morley et al., 2005), desarrollo de *Drosophila melanogaster* (Cho et al., 2006) y *C. elegans* (Dinkova et al., 2005), señalización neuronal (Banko et al., 2006), plasticidad sináptica (Klann et al., 2004), consolidación de la memoria (Hoeffler et al., 2011), cáncer (Sonenberg y Gingras, 1998; Clemens y Bommer, 1999) entre muchos otros mas.

La expresión del eIF4E está regulada a nivel de la estabilidad de su mensajero a través de una zona rica en adeninas y uracilos (ARE) que es reconocida por las proteínas HuR o AUF, ambas proteínas compiten por la unión al mRNA de eIF4E, la primera para

estabilizarlo y la segunda para desestabilizarlo (Topisirovic et al., 2009). A nivel de proteína el eIF4E puede sufrir modificaciones que alteren su función, particularmente la fosforilación que aumenta su actividad y por consiguiente la síntesis de proteínas (Frederickson et al., 1991; Mèndez et al., 1996).

Otra manera de control de eIF4E son las proteínas con las que interacciona como pueden ser las proteínas de unión al eIF4E (4EBP). Las 4EBPs en un estado hipofosforilado compiten con el factor eIF4G por unir al eIF4E secuestrándolo e impidiendo la traducción a nivel global (Figura 2B) (Sonenberg y Gingras, 1998; Gebauer y Hentze, 2004; Richter y Sonenberg, 2005; Besse y Ephrussi, 2008). Las 4EBPs no son las únicas proteínas que se unen al eIF4E para modificar su actividad, otras que lo hacen son el factor de transcripción PRH (un inhibidor tejido-específico de eIF4E) (Topisirovic et al., 2003; Culjkovic et al., 2006) y el HoxA9 (un activador de eIF4E) (Topisirovic et al., 2005) las cuales compiten entre ellas por unirse al eIF4E (Topisirovic et al., 2005). Otra proteína es PML la cual al unirse a eIF4E provoca que éste pierda afinidad por el mRNA (Cohen et al., 2001).

Si bien varios de los mecanismos antes descritos mayoritariamente hablan sobre una disminución en la cantidad o funcionalidad del eIF4E y por consiguiente de la traducción, también se han documentado sucesos donde el eIF4E se encuentra sobreexpresado teniendo consecuencias muy particulares. En estos casos aparentemente la traducción global no se afecta (Sonenberg y Gingras, 1998; Clemens y Bommer, 1999) pero se nota un aumento en la expresión de ciertas proteínas, particularmente las de ciclo celular, como Pim-1 (Hoover et al., 1997), la ciclina D1, ornitina descarboxilasa (ODC) y el factor de crecimiento endotelial y de vasos sanguíneos (VEGF) (Culjkovic et al., 2007).

Aunque bajo distintos mecanismos, los aumentos en la cantidad de las proteínas mencionadas solo ocurren cuando el eIF4E está aumentado (Koromilas et al., 1992; Sonenberg y Gingras, 1998; Clemens y Bommer, 1999). La ciclina D1 y la ODC

incrementan su exportación nuclear (Rosenwald et al., 1995; Rousseau et al., 1996; Culjkovic et al., 2005, 2006, 2007), que es mediada por el eIF4E a través de la vía alterna de exportación nuclear (Cullen, 2003), donde el eIF4E reconoce el elemento sensible a 4E (4E-SE) localizado en el extremo 3' de estos mRNA (Culjkovic et al., 2005, 2007, 2006; Topisirovic et al., 2009). En el caso de Pim-1, OCD y VEGF, su traducción aumenta (Grens y Scheffler, 1990; Rousseau et al., 1996; Hoover et al., 1997; Clemens y Bommer, 1999; Culjkovic et al., 2007) posiblemente a través de alguna estructura secundaria en su 5' UTR como la encontrada en la proteína anitapoptótica Osteopontina que le ayuda a ser traducida en situaciones donde el eIF4E está sobreexpresado (Larsson et al., 2006). Independientemente de la manera en la que se vean favorecidas, el aumento en proteínas de ciclo celular conlleva a la transformación celular (Koromilas et al., 1992; Rousseau et al., 1996; Sonenberg y Gingras, 1998; Clemens y Bommer, 1999; Cohen et al., 2001; Topisirovic et al., 2003; Culjkovic et al., 2005, 2007) y como consecuencia al desarrollo de cáncer, siendo una elevada expresión de eIF4E (incluso de solo el doble) un mal pronóstico médico (Clemens y Bommer, 1999). Esto convierte en primordial el entendimiento de los efectos que tiene una sobreexpresión de eIF4E en cualquier organismo.

Familia de proteínas eIF4E

El factor eIF4E pertenece a una numerosa familia de proteínas, codificadas por distintos genes, caracterizadas por la capacidad de unir la estructura cap de los mRNAs. A partir de la conservación de los triptófanos 43 y 56 del eIF4E humano se agruparon a todos los eIF4Es encontrados o predichos en 3 clases (Joshi et al., 2005). La Clase I conserva los triptófanos del eIF4E humano, la Clase II tienen sustituciones del triptófano por tirosina, leucina o fenilalanina y la Clase III tiene conservado el triptófano 43 pero tiene sustituido el 56 por una cisteína o tirosina. Los metazoos tienen miembros de las tres clases mientras que los hongos y plantas solo miembros de la clase I y II, los protistas conservan aminoácidos de las clases mencionadas pero no el número de aminoácidos que hay entre los triptófanos conservados.

Si bien esta clasificación es aplicable a cualquier eIF4E, sus funciones y relevancia en la traducción es mas compleja afectando directamente procesos fisiológicos y del desarrollo de un organismo (Tabla 1) (Rhoads, 2009).

Tabla 1. Diversos ejemplos de eIF4Es de una misma clase con distintas propiedades. Adaptada de Rhoads (2009).

Ejemplo	Propiedades Moleculares Inusuales	Papel fisiológico especializado
Clase I		
<i>C. elegans</i> IFE-1	Se une a cap con estructura m ⁷ G o m ₃ ^{2,2,7} G y a la proteína de gránulos de estrés PGL-1	Requerida para la espermatogénesis
<i>C. elegans</i> IFE-2	Se une a cap con estructura m ⁷ G o m ₃ ^{2,2,7} G	Estrés oxidativo y senescencia
<i>D. rerio</i> eIF4E-1B	Incapaz de unir m ⁷ G cap, eIF4G o 4E-BP	Expresión restringida a embriones tempranos y gonadas
<i>S. pombe</i> eIF4E-2	Baja afinidad por eIF4G	Estrés celular
<i>X. laevis</i> eIF4E-1B		Reprime la traducción de mRNAs maternos durante la ovogénesis
Clase II		
<i>A. thaliana</i> nCBP	Se une 5-20 veces mejor al m ⁷ GTP que eIF(iso)4E	
<i>C. elegans</i> IFE-4		Traducción de mRNAs específicos
<i>D. melanogaster</i> 4EHP	Se une a cap pero no eIF4G, interacciona con Biocoide y Brat	Reprime la traducción de los mRNAs <i>caudal</i> y <i>hunchback</i>
<i>H. sapiens</i> 4EHP	No se une a eIF4G o 4E-BPs	
<i>M. musculus</i> eIF4E-2	Se une a 4E-BPs pero no a eIF4G	
Clase III		
<i>M. musculus</i> eIF4E-3	Se une a eIF4G pero no a las 4E-BPs	

En plantas se han identificado varios miembros de la familia de eIF4E pertenecientes a la Clase I y II (Joshi et al., 2005). Por parte de la Clase I se han identificado al eIF4E y al eIFiso4E siendo este último único de plantas. De la Clase II se encontró a la nCBP cuya capacidad de unir el cap en *Arabidopsis thaliana* es mucho mayor que la

presentada por el eIFiso4E (Ruud et al., 1998). En *Arabidopsis thaliana* los factores eIF4E y eIFiso4E, ambos de la Clase I, han mostrado no ser redundantes al presentar claras diferencias como: su requerimiento por parte de los virus para poder llevar a cabo su ciclo infectivo en la planta (Tabla 2) (Duprat et al., 2002; Sato et al., 2005; Robaglia y Caranta, 2006; Miyoshi et al., 2008), la capacidad del eIF4E mas no del eIFiso4E de complementar al eIF4E de levadura (Rodriguez et al., 1998), su expresión en diferentes etapas del desarrollo de la planta (Bush et al., 2009) y su capacidad de traducir selectivamente mRNAs (Figura 3) (Martínez-Silva et al., 2012) .

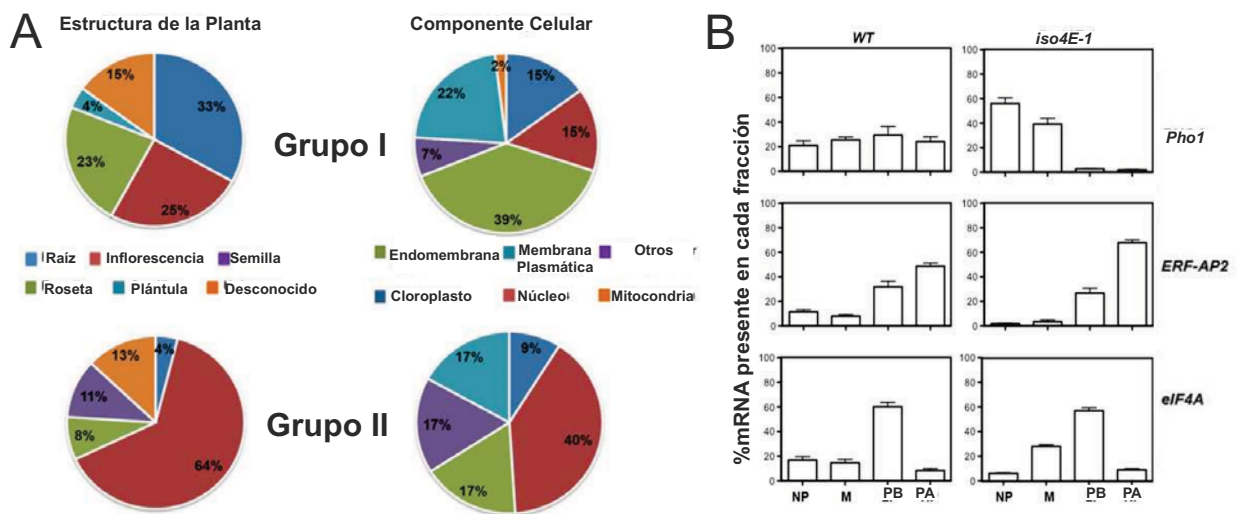
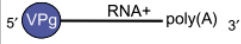
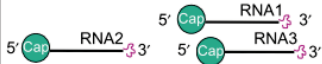
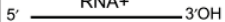
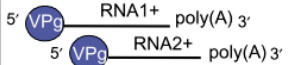


Figura 3. Traducción selectiva en *Arabidopsis thaliana*. A, En una planta carente del factor eIFiso4E y que sobreexpresa a eIF4E (iso4E-1), a los 15 días después de la germinación la traducción de ciertos mRNAs se ve afectada, en algunos casos se observa que disminuye (Grupo I) y en otros aumenta (Grupo II), posiblemente la falta de eIFiso4E sea el causante del Grupo I y la sobreexpresión de eIF4E la del Grupo II. Este efecto afecta a todo el organismo pues en ambos grupos las proteínas codificadas se expresan en distintos tejidos y compartimientos celulares. B, Efecto de esta planta (iso4E-1) en la traducción selectiva de los mRNAs de Pho-1 y AP2, en el primero la traducción se ve dirigida hacia fracciones traduccionalmente inactivas (fracciones NP y M) mientras que para el segundo es lo opuesto (fracciones LP y HP). NP, no polisomas; M, monosomas; PB, polisomas bajos; PA, polisomas altos. Adaptado de Martínez-Silva et al. (2012).

Estos mismos factores en el trigo muestran una capacidad diferencial para unir el cap a distintos pH o con distinto número de metilaciones (Carberry et al., 1991), el eIFiso4E tiene menor capacidad de unión frente a cambios de pH y preferencia por dimetilaciones en el cap mientras que el eIF4E lo hace por monometilaciones (Carberry et al., 1991).

Tabla 2. Factores de inicio de la traducción requeridos por los virus para proceder con su ciclo infeccioso en plantas. Adaptada de Robaglia y Caranta (2006).

Género	Virus	Planta	Locus	Control de la expresión génica	Factor de traducción
Potyvirus 	TuMV, TEV	<i>Arabidopsis</i>	<i>lsp1</i>	Knock-out (EMS-induced)	eIF(iso)4E
	TuMV, LMV	<i>Arabidopsis</i>	<i>lsp1</i>	Knock-out (T-DNA)	eIF(iso)4E
	CIYVV	<i>Arabidopsis</i>	<i>cum1</i>	Knock-out (EMS-induced)	eIF4E1
	PVY, TEV	<i>Capsicum</i> spp.	<i>pvr2</i>	Naturally occurring mutations	eIF4E
	PVMV	<i>Capsicum</i> spp.	<i>pvr6</i>	Naturally occurring knock-out	eIF(iso)4E
	LMV	<i>Lactuca</i> spp.	<i>mo1</i>	Naturally occurring mutations	eIF4E
	PSbMV	<i>Pisum sativum</i>	<i>sbm1</i>	Naturally occurring mutations	eIF4E
	PVY, TEV	<i>Lycopersicon</i> spp.	<i>pot1</i>	Naturally occurring mutations	eIF4E
Cucumovirus 	CMV	<i>Arabidopsis</i>	<i>cum1</i>	Knock-out (EMS-induced)	eIF4E
	CMV	<i>Arabidopsis</i>	<i>cum2</i>	EMS-induced mutations	eIF4G
Carmovirus 	TCV	<i>Arabidopsis</i>	<i>cum2</i>	EMS-induced mutations	eIF4G
	MNSV	<i>Cucumis melo</i>	<i>nsv</i>	Naturally occurring mutations	eIF4E
Bymovirus 	BaYMV, BaMMV	<i>Hordeum vulgare</i>	<i>rym4/5</i>	Naturally occurring mutations	eIF4E

En el maíz la expresión del eIF4E durante la germinación es distinta a la del eIFiso4E, siendo la del eIFiso4E mas constante durante esta etapa y su reclutamiento a complejos traduccionalmente activos es mayor sugiriendo que su síntesis *de novo* también lo sea (Dinkova y Sánchez-de-Jiménez, 1999). Además la traducción del eIFiso4E aumenta tras un estímulo de insulina (Dinkova et al., 2000).

Diferencias entre eIF4E y eIFiso4E

En *Arabidopsis thaliana* se ha estudiado una mutante que carece del factor eIFiso4E, la cual en condiciones normales no muestra ningún fenotipo mas que la sobreexpresión del eIF4E, posiblemente para aliviar la falta del otro factor, pero muestra resistencia a infección por potyvirus (Figura 9) como el virus del mosaico del nabo (TuMV) y el virus del mosaico de la lechuga (LMV) (Duprat et al., 2002). La resistencia recesiva a virus es

selectiva para los miembros de la familia eIF4E (Tabla 2) (Robaglia y Caranta, 2006), pues en la mutante nula para eIF4E se impide el desarrollo del potyvirus de la vena amarilla del trébol (CIYVV) (Sato et al., 2005). Si bien los mecanismos bajo los que opera esta resistencia no se conocen del todo, se sabe que TuMV inhibe *in vitro* la traducción (Miyoshi et al., 2008) pudiendo impedir la síntesis de proteínas requeridas para combatir la infección *in vivo*.

Trabajos previos del laboratorio han buscado ahondar entre las diferencias entre eIF4E y eIFiso4E, como resultado de esto se identificó en la mutante nula de eIFiso4E (descrita arriba) un fenotipo donde la raíz principal es mas corta y mediante microarreglos se encontraron transcritos traduccionalmente afectados, como el transportador de fosfatos Pho-1, o estimulados, como el factor transcripcional AP2, (Figura 3) (Martínez-Silva et al., 2012). Esto sugirió que la falta del eIFiso4E podría causar la inhibición traduccional de mRNAs específicos, mientras que la sobreexpresión del eIF4E podría relacionarse con el incremento en la traducción de otros mRNAs (Martínez-Silva et al., 2012).

Hipótesis

La presencia de mRNAs con una mayor actividad traduccional en la planta mutante nula del eIFiso4E es debida a la sobreexpresión endógena del eIF4E.

Objetivo

Evaluar la traducción global y específica para los mRNAs sobretraducidos en la mutante carente del eIFiso4E en una planta sobreexpresora del eIF4E de *Arabidopsis thaliana*.

Objetivos Particulares

Generar un vector que sea capaz de dirigir la expresión a niveles constitutivos del eIF4E en *Arabidopsis thaliana*.

Transformar plantas de *Arabidopsis thaliana* silvestres con dicho vector para que sobreexpresen al eIF4E.

Evaluar en la planta sobreexpresora del eIF4E la traducción global y específica de los mRNAs que se encontraron sobretraducidos en la mutante carente del eIFiso4E.

Materiales y Métodos

Las soluciones usadas se describen con mayor detalle en el Apéndice A.

Cultivos Biológicos

Bacterias

Especies y cepas utilizadas

Para el presente trabajo se utilizaron las bacterias *Escherichia coli* cepa DH5 α y *Agrobacterium tumefaciens* cepa Pvg2260/c58.

Obtención de células Agrobacterium tumefaciens competentes

A partir de una colonia de *Agrobacterium tumefaciens* se realizó un precultivo de 10mL en medio YM líquido, el cual se mantuvo a 28°C toda la noche con agitación de 200-350rpm. Se usaron 2mL del precultivo para inocular un volumen de 50mL de medio YM líquido que se incubó del mismo modo que el precultivo hasta que alcanzara una DO_{600nm} de 0.4 (aproximadamente 16 a 20h de incubación), tras lo cual se dejó en hielo por 10min y se centrifugó a 1700 x g por 5min a 4°C. Posteriormente se resuspendió en 1mL de CaCl₂ 20mM, glicerol 10% v/v y se dividió en fracciones de 100 μ L. Las células se usaron en el momento o se congelaron en nitrógeno líquido para almacenarlas a -70°C.

Obtención de células Escherichia coli DH5 α competentes

A partir de una colonia de *Escherichia coli* se realizó un precultivo de 10mL en medio LB líquido, el cual se mantuvo a 37°C toda la noche con agitación de 200-350rpm. Se usaron 4mL de precultivo en un volumen de 400mL de medio LB líquido que se incubó del mismo modo que el precultivo hasta que alcanzara una DO_{600nm} de 0.4

(aproximadamente 3 a 5h de incubación), tras lo cual se dejó en hielo por 30min y se centrifugó a 3000rpm por 7min a 4°C. Posteriormente se resuspendió en 10mL de la solución de CaCl₂ y se centrifugó 5min a 1700 x g y 4°C, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió en 2mL de la solución de CaCl₂ y se dividió en fracciones de 250µL. Las células se usaron en el momento o congelaron en nitrógeno líquido para almacenarlas a -70°C.

Transformación de Agrobacterium tumefaciens por choque térmico

Se descongelaron células competentes en hielo y se les añadieron 10ng del plásmido de interés, se congelaron en nitrógeno líquido durante 5min y posteriormente se incubaron a 37°C por 25min. Bajo condiciones de esterilidad se les agregó 1mL de medio YM y se incubaron a 28°C durante 3h en agitación a 200-300rpm. Terminado este tiempo se centrifugaron a 16200 x g por 30s, se desechó el sobrenadante y se resuspendieron en 100µL de medio YM. El total de células fueron estriadas en cajas petri con YM sólido con kanamicina (50mg/L) y rifampicina(100mg/L) e incubadas de 48 a 72h a 28°C.

Transformación de E. coli DH5α competentes por choque térmico

A células competentes previamente descongeladas en hielo se agregaron 10ng de plásmido. Se mezclaron cuidadosamente por inversión e incubaron en hielo por 30min para posteriormente aplicarles un choque térmico a 42°C durante 30s, tras lo cual fueron regresadas al hielo. Bajo condiciones de esterilidad se les agregaron 250µL de medio SOC y se incubaron durante 1h a 37°C en agitación a 200-350rpm. Se centrifugaron a 1700 x g por 1min, se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron en 100µL de medio SOC. Las células se estriaron en cajas con medio LB con kanamicina (50mg/L) y se incubaron a 37°C por 24h.

Plantas

Material utilizado

Las plantas utilizadas para esta tesis fueron *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia 0 (Col-0) silvestre (WT), mutante nula para elFiso4E (iso4E-1) (Duprat et al., 2002) y sobreexpresora de elFiso4E (iso4E-2) (Martínez-Silva et al., 2012). La mutante nula contiene la inserción de un transposón (dspm1) en el segundo exón del gen que codifica para elFiso4E, impidiendo la transcripción de un transcrito viable (Duprat et al., 2002). En este trabajo a partir de plantas silvestres se generaron plantas transgénicas que contienen inserciones de la CDS de elF4E no determinadas ni en número ni localización. Tanto su elaboración como sus características se detallan en la sección de resultados.

Esterilización de semillas

A las semillas se les removieron restos de hojas, silicuas y cualquier otro residuo que pudieran tener. Posteriormente, en condiciones de esterilidad, se colocó en un tubo tipo Eppendorf el equivalente de semillas a un volumen de 50-100 μ L, se le agregó 1mL de NaClO comercial diluido al 20% v/v y 1 μ L de Tween 20 (cf 0.1%). Se agitaron a velocidad media en vortex durante 20min, se centrifugaron rápidamente en una picofuga y se eliminó el sobrenadante. El procedimiento se repitió pero usando solo 1mL de NaClO al 20% v/v durante 10min. Finalmente se enjuagaron de 3 a 5 veces con agua destilada estéril agitando en vortex durante 3min y desechando el sobrenadante cada vez hasta que se dejara de producir espuma.

Siembra de semillas en medio cultivo

El medio de cultivo usado fue Gamborg's 3.2 g/L (Sigma-Aldrich®) pH 5.3, 1% p/v Sacarosa y 1% p/v de agar bacteriológico, cuando se utilizó medio sólido.

En una campana de flujo laminar y con semillas estériles, se sembraron de 15 a 30 semillas en frascos con 30mL de medio líquido, en caso de medio sólido se colocaron

semillas distanciadas una de otra entre 3 y 5mm hasta cubrir la caja completa.

En ambos casos al término de la siembra se colocaron a 4°C en oscuridad durante 48-72h (estratificación) y después en cámaras de crecimiento a 22°C con fotoperiodo corto (8h luz/ 16h oscuridad) durante 15 días.

Siembra de semillas en tierra

Se preparó una mezcla de sustratos con turba, agrolita y vermiculita (3:1.5:1 p/p/p/p) que equivale a Metromix 200, se humedeció con agua potable o destilada y se colocó en macetas o charolas.

Para sembrar, las semillas se mezclaron con arena en un salero y se espolvorearon sobre la tierra, se regaron, cubrieron con un domo o plástico auto adherente para conservar la humedad y se mantuvieron durante 48-72h a 4°C en oscuridad (estratificación). Finalmente se colocaron a 22°C ya sea en fotoperiodo largo (16h luz/ 8h oscuridad) o corto (8h luz/ 16h oscuridad) regándose cada tercer día o cuando fuera necesario.

Transformación de plantas por floral dip

Se realizó de acuerdo a lo descrito por (Zhang et al., 2006) que aquí se resume. Bajo condiciones de esterilidad se inoculó un precultivo de 10mL de medio LB líquido con una colonia de *Agrobacterium tumefaciens* que contenía el plásmido de interés y se incubó a 28°C por 24h con agitación (200rpm). De este precultivo se tomaron 2mL para inocular 200mL de medio LB con kanamicina (50mg/L) y rifampicina (100mg/L) durante 48h, tiempo tras el cual se centrifugaron 20min a 4500 x g desechando el sobrenadante y resuspendiendo las bacterias en una solución de sacarosa al 5% v/v hasta alcanzar una DO_{600nm} de 0.8. Por cada 10mL de suspensión de bacterias se agregó 1µL de Silwet 70. En esta disolución se introdujeron durante 1 minuto y de manera invertida plantas silvestres con inflorescencias sin abrir, teniendo mucho cuidado de sujetar la maceta con firmeza para evitar que la planta se pudiera caer. Una vez terminado esto, la maceta se colocó de manera lateral sobre papel absorbente para quitar el exceso de

solución, se cubrieron con un domo y se dejaron en oscuridad toda la noche. A partir del día siguiente se les permitió continuar con su ciclo de vida normal bajo fotoperiodo largo (16h luz/8h oscuridad) y el material utilizado fue limpiado con cloro.

Selección de transformantes en tierra usando el herbicida BASTA (glufosinato de amonio)

Las semillas obtenidas de las plantas transformadas mediante floral dip se cultivaron en tierra del modo descrito en secciones anteriores durante 5 días bajo fotoperiodo largo, al sexto día se asperjaron 3 veces con un rocío fino de una solución del herbicida BASTA 30mg/L. Este proceso se repitió de 3 a 5 veces cada tercer día, tras dos semanas de terminado el tratamiento las plantas resistentes eran verdes y sanas contrario a las no transformadas que lucen blancas y prácticamente muertas (cloróticas) (Figura 9).

Las plantas seleccionadas positivamente se transplantaron a tierra nueva bajo fotoperiodo largo, ya que altas y prolongadas dosis de BASTA pueden matar inclusive a las plantas resistentes. Finalmente se comprobó por PCR la presencia del transgen en las plantas seleccionadas (Figura 10), ya que una errática aplicación del herbicida puede resultar insuficiente generando falsos positivos sobre todo cuando hay una alta densidad de plantas.

Técnicas de Biología Molecular

Generación de plásmidos

Durante este trabajo se realizaron dos construcciones (Apéndice B3) con la finalidad de poder infectar y transformar a *Arabidopsis thaliana*. Para obtener la construcción p4E1 se utilizó la tecnología TOPO® y para p4E2 la tecnología de recombinación Gateway® y LR clonase® de Invitrogen® de acuerdo a las instrucciones del fabricante. De manera resumida, el vector pENTR-TOPO® cuenta con sitios que son reconocidos por una topoisomerasa que intercambia lo que se encuentra dentro de dichos sitios con

cualquier otro fragmento, permitiendo la introducción de secuencias en esa zona. Para asegurar la direccionalidad del fragmento a introducir, éste debe llevar en su extremo 5' la secuencia CACC, en este caso el fragmento fue la CDS de eIF4E y la secuencia de direccionalidad se dió desde el momento que se amplificó, ya que el oligonucleótido sentido (Fw) fue sintetizado con la secuencia CACC en el extremo 5' (oligonucleótidos pENTR4E en el Apéndice B1). Tras este proceso se obtuvo un plásmido (p4E1) con resistencia a kanamicina que contenía la CDS de eIF4E.

Otra ventaja de los plásmidos pENTR-TOPO® es la posibilidad de intercambiar sus fragmentos recombinados con plásmidos que al igual que el pENTR-TOPO® usen la tecnología LR clonase®, como es el caso de la serie pEarleyGate (Earley et al., 2006) que cuentan con la capacidad de expresarse tanto en *E. coli* como *A. tumefaciens*. El pEarleyGate103 cuenta con la secuencia codificante de GFP para fusionarse a la proteína de interés en su carboxilo terminal bajo el promotor constitutivo 35S. Ambas proteínas están separadas por 16 aminoácidos para permitir su correcto plegamiento. Previo a la reacción con la LR clonase® entre ambos vectores, se digirió el p4E1 con la enzima *MluI* para eliminar su sitio ori pUC y así evitar su replicación, esto se realizó debido a que tanto los plásmidos pENTR-TOPO® como los pEarleyGate tienen resistencia a kanamicina con lo que la digestión evita que haya una transformación con el plásmido p4E1. A continuación se realizó la reacción LR clonase® de acuerdo a como el fabricante lo indica.

Las características de los plásmidos usados en este trabajo se detallan en el Apéndice B3.

Ensayos con enzimas de restricción

Para comprobar la correcta inserción de la CDS de eIF4E en el vector pENTR-TOPO® se utilizaron las enzimas de restricción *AvaI*, *AscI*, *PvuII* y *EcoRV* todas de New England Biolabs® de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Para separar el sitio ori pUC de p4E1 del resto del plásmido, se le digirió con la enzima de restricción *MluI* de Invitrogen®, siguiendo las indicaciones del fabricante.

Extracción de DNA

Plasmídico a partir de bacterias

Se inocularon con una colonia de bacteria 6mL de medio LB líquido con antibióticos incubándose con agitación 16h a 37°C. Este cultivo fue centrifugado a 16200 x g durante 10min, se desechó el sobrenadante y se resuspendió e incubó a temperatura ambiente durante 5min el botón en 150µL de la Solución I de Minipreps. Se añadieron 300µL de la Solución II de Minipreps y posteriormente se mezcló cuidadosamente por inversión, se dejó reposar 10min en hielo. A continuación, se agregaron 225µL de la Solución III de Minipreps mezclando por inversión y dejando reposar en hielo 15min. Para precipitar el Debris celular y DNA cromosomal bacteriano, se centrifugó 10min a 16200 x g, se recuperó el sobrenadante y se precipitó el DNA plasmídico y RNA agregando 2 volúmenes de etanol absoluto, mezclando por inversión e incubando 1h a -20°C. Se centrifugó 15min a 16200 x g y se desechó el etanol lavando el pellet con 1mL de etanol:agua (70:30 v/v). Se centrifugó a 16200 x g durante 5min y se desechó el sobrenadante. El pellet se resuspendió en agua estéril con RNAsa A (0.1µg/mL) incubando durante 30min a 37°C. Para eliminar la RNAsa, se ajustó el volumen a 300µL con agua. Se le añadió y mezcló un volumen de fenol pH=8.0:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1 v/v/v), tras esto se centrifugó a 16200 x g durante 5min y se recuperó la fase acuosa (superior) a la cuál se le añadieron 0.1 volúmenes de Solución III de Minipreps y 2 volúmenes de etanol absoluto, tras mezclarse se incubó 2h a -20°C. El DNA se precipitó y lavó con etanol:agua del mismo modo que se mencionó arriba. El pellet final se resuspendió en agua bidestilada estéril y se almacenó a -20°C.

Genómico de plantas

En nitrógeno líquido se maceró tejido vegetal (50mg-2g) hasta obtener un polvo muy fino, al cual se le agregó 1mL de la Solución de Lisis de Extracción de DNA de plantas, se mezcló mediante vortex e incubó a temperatura ambiente por 10 min. Se agregó un volumen de fenol pH=8.0:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1 v/v/v). La reacción se mezcló e incubó 10min a temperatura ambiente, posteriormente se centrifugó 5min a 16200 x g, se recuperó el sobrenadante al cual se le agregaron 0.1 volúmenes de

acetato de sodio 3M pH=5.2 y un volumen de isopropanol frio, se mezcló por inversión y se incubó a -20°C por 2h. Trascorrido este tiempo se centrifugó 15min a 16200 x g, se desechó el sobrenadante y se lavó con etanol:agua (70:30 v/v), se mezcló y centrifugó a 16200 x g por 5 min. Se desechó el sobrenadante y se resuspendió en agua con RNAsa A (0.1µg/mL) incubando 1h a 37°C, posteriormente se ajustó el volumen total a 300µL y se repitió el procedimiento desde la adición del fenol:cloroformo:alcohol isoamílico. Finalmente el botón se resuspendió en agua y almacenó a -20°C.

Extracción de RNA

Total para RT-PCR

Se utilizaron 50-100 mg de tejido fresco o congelado a -70°C, el cual se maceró siempre en congelación con pistilos de plástico limpios y estériles. Posteriormente se realizó la extracción de RNA usando el reactivo de TRIzol® de Invitrogen® siguiendo las indicaciones del fabricante. EL RNA obtenido se resuspendió en 20µL de agua tratada con DEPC, de los cuáles se tomaron 3µL para evaluar la calidad e integridad del RNA a través de un gel 1.5%Agarosa 1X MOPS 4% formaldehído teñido con bromuro de etidio. Previó a cargarse la muestra en el gel ésta se mezcló con amortiguador de carga para RNA.

Una vez corroborada la integridad de la muestra, se procedió a cuantificarla usando 1µL de RNA diluido en 99µL de agua, a esta disolución se le midió la absorbancia (Abs) a 260nm y 280nm en un espectrofotómetro. Para calcular la concentración de RNA se aplicó a la siguiente fórmula:

$(Abs_{260nm})(40)(100)=mg/mL$ RNA, donde 40 representa el coeficiente de extinción molar a la longitud de onda señalada.

Una relación $(Abs_{260nm}/Abs_{280nm}) > 1.6$ indica que la muestra no contiene contaminantes proteicos.

A partir de fracciones polisomales

El volumen de las fracciones obtenidas se ajustó a 500µL, a las fracciones mas densas (aquellas con el porcentaje de sacarosa mas alto) se les agregaron 100µL de agua

tratada con DEPC. Por cada 500µL de fracción se agregaron 25µL de SDS 10% p/v y 1µL de Proteinasa K (10mg/mL). Posteriormente se mezcló en vortex e incubó a 37°C durante 30min. Tras esto se realizaron 2 purificaciones con 1 volumen de fenol pH 8.0:clorofomo: alcohol isoamílico (25:24:1), las cuales se mezclaron en vortex y centrifugaron a 16200 x g durante 5min, en ambas purificaciones se recuperó la fase acuosa. El RNA se precipitó agregando a 400µL de fase acuosa 70µL de LiCL 10M y 470µL de isopropanol absoluto frio, se mezcló por inversión varias veces y se incubó 1h a -70°C. Para recuperar el RNA se centrifugó a 16200 x g por 15min, desechando el isopropanol y el botón restante se lavó con etanol:agua DEPC (70:30 v/v), se mezcló y centrifugó a 16200 x g durante 5min y se desechó cuidadosamente el etanol:agua. Las fracciones correspondientes a un mismo perfil se resuspendieron en el mismo volumen para su posterior cuantificación y síntesis de cDNA.

Amplificación de DNA

Transcripción Reversa

Todo RNA usado fue tratado previamente con DNasa (RQ1 DNase de Promega® , acorde a las instrucciones del fabricante) para evitar cualquier posible contaminación por DNA.

A partir de 1µg de RNA total se sintetizó el cDNA complementario a los mRNAs usando la ImProm-II™ Reverse Transcription System de Promega® de acuerdo a las instrucciones del fabricante, y un oligonucleótido de polidesoxitimidinas (oligo dT) indicado en el Apéndice B1.

En el caso de la síntesis de cDNA a partir de RNAs de fracciones polisomales, se utilizó el mismo volumen de RNA de cada fracción de un mismo perfil y las reacciones se escalaron a 50µL.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

A partir 50-300ng de DNA o cDNA se realizaron las amplificaciones detalladas en la

sección de resultados. Éstas se realizaron usando 1U/reacción de Taq Polimerasa de Alta Enzymes® o Taq High Fidelity de Roche® para clonar la CDS de eIF4E. Los oligonucleótidos así como los ciclos y temperaturas usados en las reacciones se detallan los apéndices B1 y B2 respectivamente.

PCR en tiempo real

Con esta técnica se buscó analizar la distribución de transcritos a lo largo de las fracciones de un perfil polisomal. A partir del cDNA generado de los RNAs de cada fracción polisomal, se tomó el mismo mismo volumen de cDNA de cada fracción de un mismo perfil y se realizaron las amplificaciones usando el SYBR GreenER de Invitrogen® de acuerdo a las instrucciones del fabricante en 12.5µL de reacción total en el equipo Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR.

Los datos obtenidos se analizaron de la siguiente manera acorde a Dinkova et al. (2005): primero se calculó el ΔCt para cada fracción, este valor se obtuvo mediante la diferencia de el valor de Ct mas alto de las fracciones con el valor de Ct de cada fracción. Los valores ΔCt fueron usados para elevar el número 2 ($2^{\Delta Ct}$) y se realizó la sumatoria de todos estos nuevos valores. Finalmente se determinó el porcentaje que correspondía a cada fracción con respecto al total. Los porcentajes se promediaron para el número de réplicas realizadas.

Extracción de Proteínas

Se realizó de acuerdo a como se describe en Agrawal y Thelen (2009) que aquí brevemente se describe. El tejido congelado en nitrógeno líquido se molió usando un politrón directamente en 10mL de amortiguador de extracción de fenol, posteriormente se dejó incubando con agitación 30min a 4°C. Cumplido este tiempo se centrifugó 30min a 4500 x g y se tomó la fase fenólica (superior) a la cual se le añadieron 5 volúmenes de la solución de acetato de amonio/metanol, se mezcló bien y se dejó incubando a -70°C toda la noche. Para precipitar las proteínas se centrifugó 30min a 4500 x g y el pellet resultante se lavó 2 veces con la solución de acetato de amonio/metanol, 2 veces con acetona:agua (80:20 v/v) y una última con etanol:agua (70:30 v/v). El pellet se resuspendió en amortiguador IEF y se centrifugó 15min a 16200

x g. El sobrenadante se transfirió a un tubo limpio y se almacenó a -70°C .

Cuantificación de Proteínas

Se realizó mediante el método colorimétrico de Bradford de BioRAD®. A $800\mu\text{L}$ del Reactivo de Bradford a temperatura ambiente, se agregaron $199\mu\text{L}$ de agua desionizada y $1\mu\text{L}$ de proteína y se midió en un espectrofotómetro a $\text{DO}_{595\text{nm}}$. La reacción se llevo a cabo por triplicado y el valor promedio se comparó con una curva de calibración de albumina. La curva de calibración se realizó (por triplicado) del mismo modo agregando concentraciones conocidas de albúmina ($1,2,5,10,20\mu\text{g}$).

Western Blot

Las proteínas ($20\mu\text{g}$ adicionadas con amortiguador de carga de proteínas) se separaron mediante electroforesis en geles de acrilamida al 15% a 100V durante 2h en amortiguador de corrida de proteínas 1X. Tras esto las proteínas fueron transferidas del gel a una membrana de PVDF (previamente activada en metanol absoluto) en amortiguador de transferencia de proteínas a 100V 1 h. La membrana fue bloqueada con leche en polvo baja en grasa al 5% (p/v) en TBS durante 1h con agitación. Tras esto se incubó con agitación 1h con los anticuerpos primarios rabbit anti-eIF4E (1:10000) o rabbit anti-eEF1 β (1:5000) según fuera el caso. Se lavó la membrana con TBST 3 veces durante 10min y se incubó con el anticuerpo secundario acoplado a HRP goat-antirabbit (1:5000) y se reveló usando el substrato quimioluminiscente HRP de Millipore®, y exponiendo la membrana en una placa radiográfica por 5min para detectar a eIF4E y por 10s para detectar a eEF1 β . Para remover los anticuerpos pegados y realizar nuevas detecciones en la misma membrana ésta se incubó 1h con la Solución de Desnudado de Membranas y se lavó 3 veces con TBST por 10 min.

Obtención de Perfiles Polisomales

Se molieron en nitrógeno líquido de 300mg-3g de tejido de planta congelado hasta obtener un polvo muy fino. Se le agregaron 2mL de amortiguador de lisis y se agitó intensamente en vortex durante 1 minuto. El extracto se separó en tubos de 1.5mL y se

centrifugó 15min a $16200 \times g$ a 4°C . En hielo se separó el sobrenadante y se llevó a un volumen de 6mL con Amortiguador de Lisis. Esto se agregó cuidadosamente (con pipeta Pasteur) sobre 3mL de sacarosa 60% en amortiguador de gradiente (p/v) previamente colocada en un tubo de ultracentrifugación, se centrifugó 3h a 45000rpm a 4°C y con vacío aplicado en un rotor de ángulo fijo 75Ti Beckman-Coulter. El sobrenadante se desechó y al botón se le agregaron 400 μL de agua DEPC y 100 μg de cicloheximida, manteniéndose un mínimo de 30 min en hielo agitando ocasionalmente y de manera muy suave para ayudar a disolverlo. Mientras tanto, se formó un gradiente de sacarosa del siguiente modo, en tubos de ultracentrifugación se añadieron 2mL de sacarosa 60% en amortiguador de gradiente (p/v) y encima de estos con mucho cuidado y con pipeta Pasteur se agregaron 2mL de sacarosa al 20% en amortiguador de gradiente (p/v) con 100 μg de cicloheximida, se selló el tubo con Parafilm® y lentamente se inclinó hasta dejarlo en posición horizontal de 2 a 3h. Trascurrido este tiempo se levantó cuidadosamente y se agregó con pipeta Pasteur el botón resuspendido. Es importante en todo momento cuidar de no romper las fases de sacarosa, en caso de que se rompieran el gradiente ya no es útil. El gradiente con el botón resuspendido se centrifugó 1h a 45000rpm en un rotor de columpio SW 60Ti Beckman-Coulter.

El gradiente, cuidando de perturbarlo lo menos posible, se colectó en fracciones de 500 μL usando una bomba de flujo continuo conectada a una lámpara de luz UV a su vez conectada a un registrador para medir y graficar de manera continua la $\text{Abs}_{254\text{nm}}$ de la muestra. Las fracciones colectadas, por lo general 9, se almacenaron a -70°C .

Un perfil polisomal típico se muestra en la Figura 4, en ésta se observa la absorbancia de una muestra de RNA separada mediante un gradiente de sacarosa sometido a ultracentrifugación acorde a los ribosomas que contenga (Figura 4A). En las fracciones mas ligeras (aquellas con menor contenido de sacarosa) se encuentran las subunidades ribosomales 40S y 60S por separado así como mRNAs que no se están traduciendo y que corresponden a la fracción no polisomal. Posterior a esta zona se observa un pico muy marcado que indica la presencia de ambas subunidades

ribosomales ensambladas, las cuales se pueden asociar libremente, además de mensajeros que estén asociados a solo un ribosoma por lo que su traducción es baja, a esta fracción se le denomina monosomal. En las fracciones mas pesadas (aquellas con un contenido alto de sacarosa y que sedimentan mas) se encuentran los mensajeros que tienen una traducción elevada denominadas polisomales. Las fracciones polisomales se caracterizan por tener mRNAs con un alto número de ribosomas asociados y se pueden subdividir en dos clases, la alta y la baja siendo la primera mas densa y por lo tanto sedimenta mas que la segunda. Las fracciones polisomales bajas pueden indicar una traducción elevada pero que tiene una reinicialización reducida contrario a lo que sucede en las fracciones polisomales altas. Las fracciones polisomales altas también pueden indicar un reclutamiento continuo de ribosomas pero que por alguna razón no pueden proceder eficientemente con la elongación (Figura 4B).

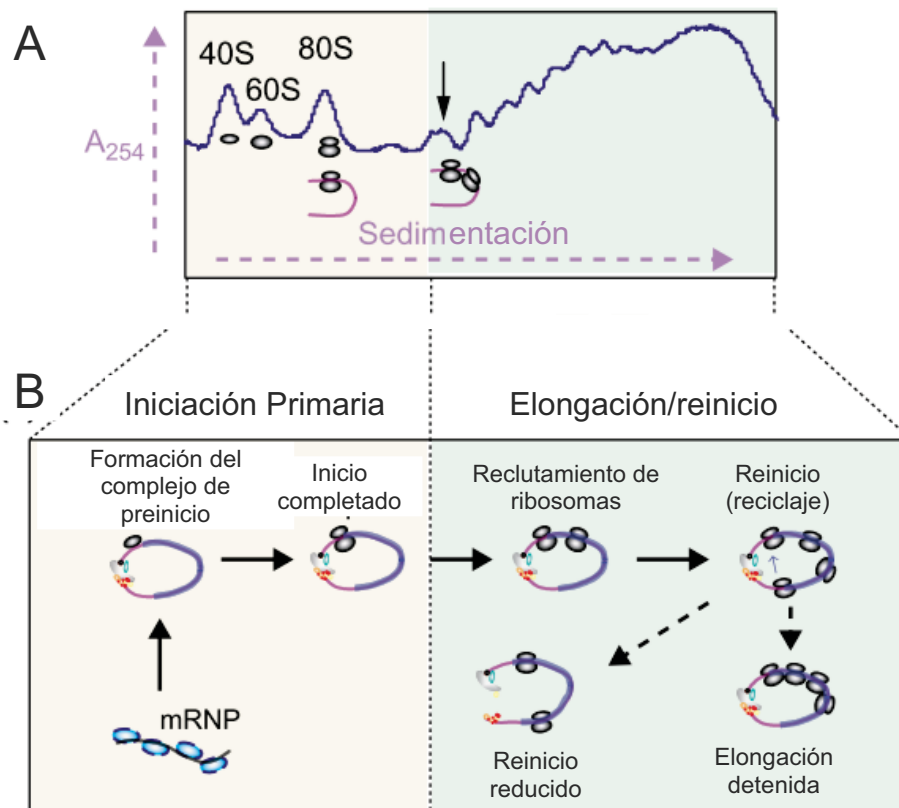


Figura 4. Análisis de la actividad traduccional global. Mediante un gradiente de sacarosa se pueden separar complejos traduccionales a partir de su composición ribonucleoproteica, y A observar su patrón de absorbancia en luz ultravioleta. B dependiendo de la composición ribosomal en un mensajero, será su actividad traduccional. Ver la sección obtención de perfiles polisomales para mas detalles Adaptado de Kawaguchi y Bailey-Serres, (2002).

Secuenciación

La secuenciación automática de la construcción p4E2 se realizó utilizando un secuenciador automático ABI PRISM 310 Genetic Analyzer® de Perkin-Elmer Applied Biosystems, en la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. Las secuencias obtenidas se identificaron como eIF4E y GFP mediante un alineamiento múltiple (BLAST *blast.ncbi.nlm.nih.gov*), además traduciendo *in silico* la secuencia usando Expasy Translation Tool (*web.expasy.org/translate/*) se encontró que no hubo corrimientos en el marco de lectura.

Predicción de la estructura de la proteína de fusión eIF4E-GFP

Utilizando la CDS de eIF4E y la de GFP se realizó traducción *in silico* de ambos utilizando el servidor Expasy Translation Tool (*web.expasy.org/translate/*) para posteriormente introducir la secuencia proteica obtenida en el servidor SAMT-08 (HMM-based Protein Structure Prediction, SAM-T08 (*http://compbio.soe.ucsc.edu/SAM_T08/T08-query.html*)) (Katzman et al., 2008; Karplus et al., 1998; Karplus et al., 2003).

Obtención de secuencias e información de los genes de *Arabidopsis*

Las secuencias y las funciones de los genes cuya traducción se evaluó (Apéndice B5 y Tabla 4) en este trabajo fueron obtenidas del Centro de Información de *Arabidopsis* “TAIR” (*www.arabidopsis.org*).

Predicción de motivos en los transcritos traducidos

Las secuencias correspondientes al cDNA de cada mRNA analizado fueron introducidas al servidor MEME (*http://meme.sdsc.edu/meme/cgi-bin/meme.cgi*) (Bailey et al., 2009). Con los parámetros: cualquier número de repeticiones del motivo en la secuencia; tamaño del motivo: mínimo 5, máximo 50 nucleótidos; número máximo de motivos: 7; búsqueda solo en la hebra sometida. De los resultados obtenidos sólo aquellos con un valor E (el cual indica la probabilidad de que el motivo sea producto del azar) $<1.0e-.01$ fueron utilizados.

Análisis densitométrico para determinar niveles de expresión

Las imágenes correspondientes a los geles a analizar se guardaron en formatos *.tiff o *.png, los cuales no pierden calidad ni información de la imagen. Utilizando el programa ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) se analizaron estas imágenes convirtiéndolas a escala de grises (8 bits) y siguiendo el protocolo indicado en <http://lukemiller.org/index.php/2010/11/analyzing-gels-and-western-blots-with-image-j/> que aquí se describe. Cada banda fue seleccionada con la herramienta de selección rectangular cuidando que la selección fuera menos del doble de ancho con respecto a su altura y que todas fueran del mismo tamaño. Tras seleccionar la primera banda se seleccionó la opción *Analyze>Gels>Select First Lane*, seguido a esto se seleccionó la siguiente banda y posteriormente *Analyze>Gels>Select Next Lane*, esto último se realizó para las bandas restantes. Una vez seleccionadas todas las bandas y una zona sin bandas que sirva para identificar el ruido de fondo se utilizó la opción *Analyze>Gels>Plot Lanes* para graficar la intensidad correspondiente de cada banda. Con la herramienta de línea se cerró cada grafica de base a base para demarcar un área completamente cerrada y con la herramienta de bastón “wand” se seleccionó dentro de la curva para obtener el valor numérico correspondiente al área de la curva. Los valores obtenidos se copiaron a una hoja de cálculo. Con el control de carga (tubulina) se normalizaron el resto de los valores para después ser promediados.

Análisis por microscopía confocal

Debido a que no es posible ver la planta completa, se tomaron secciones de planta viva, las cuales fueron disectadas en un microscopio estereoscópico e inmediatamente fueron observadas en el microscopio confocal Olympus FV1000® en la USAI de la Facultad de Química utilizando una longitud de onda de excitación de 488nm y de emisión de 515-565nm para identificar a la GFP. Para descartar falsos positivos por autofluorescencia de la planta, la fluorescencia basal en un fondo WT fue detectada se ajustó la intensidad del láser para no detectarla, además aquellas estructuras con alta autofluorescencia como tricomas o estomas fueron descartados desde un inicio. Las imágenes fueron analizadas con el programa FluoView® 1000 de Olympus® .

Resultados

Generación de una construcción que sobreexpresa al eIF4E en *Arabidopsis thaliana*

En esta sección se describe como se obtuvo un vector para expresar en plantas el factor de traducción eIF4E fusionado a la proteína verde fluorescente (GFP) bajo el promotor 35S. Para lograr este objetivo se obtuvo la secuencia codificante (CDS) del eIF4E de *Arabidopsis thaliana* mediante RT-PCR, rindiendo un solo fragmento de aproximadamente 700pb (Figura 5), el cual fue purificado para ser integrado al vector pENTR-TOPO®, resultando en el vector p4E1, (Figura 6A) con el que se transformaron células de *E. coli* DH5α.

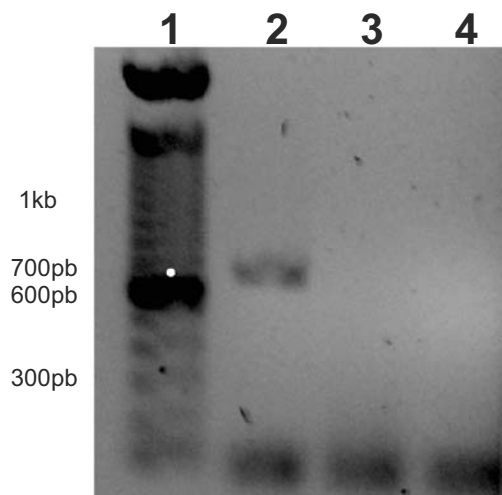


Figura 5. Amplificación de la CDS de eIF4E. Al realizar una RT-PCR dirigida hacia la CDS de eIF4E se obtuvo una banda única de aproximadamente 700pb, correspondiente al tamaño esperado. Carriles: 1, estándares de 100pb; 2, RT-PCR eIF4E; 3, PCR con RNA total para verificar que no existe contaminación con DNA genómico; 4, PCR sin cDNA.

Si bien la orientación correcta fue asegurada desde la amplificación del fragmento (ver Materiales y Métodos), se realizaron ensayos de digestión con las enzimas *Ava*I, *Asc*I, *Pvu*II y *Eco*RV (Figura 7 y Tabla 3) que corroboraron la correcta inserción del fragmento en el vector. El vector p4E1 ofrece la ventaja de recombinar la secuencia insertada con cualquier otro plásmido que use la tecnología de recombinación Gateway® y LR Clonase®.

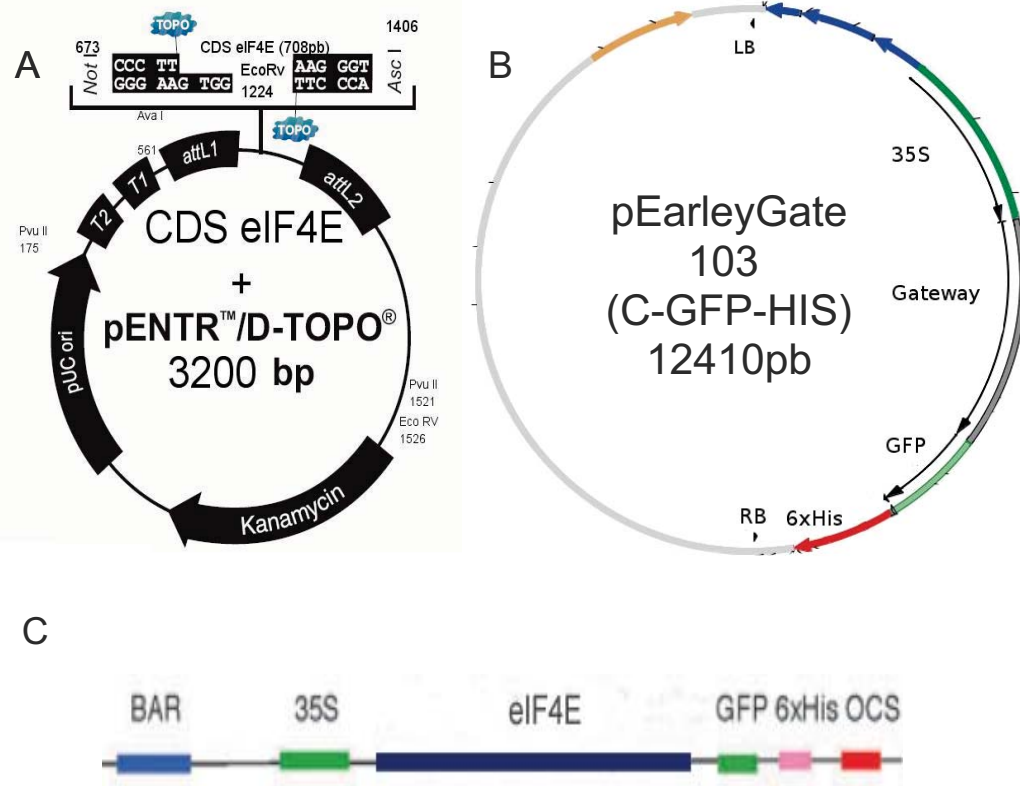


Figura 6. Vectores empleados en este trabajo. A Para la clonación de la CDS de eIF4E se utilizó el vector pENTR/D-TOPO® el cual permite la recombinación direccional de fragmentos que contengan la secuencia CACC para posteriormente recombinarlo con otros vectores mediante la tecnología Gateway®, como el pEarleyGate-103. B Vector pEarleyGate-103, el cual se replica tanto en *E. coli* como en *A. tumefaciens*. *A. tumefaciens* permite infectar y transformar plantas. El pEarleyGate-103 añade al inserto en su carboxilo terminal a la GFP y un tracto de histidinas para poder purificarlo. C, Fragmento de la construcción p4E2 que se insertará en el genoma de la *A. thaliana* tras la infección con *A. tumefaciens*, la resistencia al herbicida BASTA (BAR) así como la CDS de eIF4E fusionada a GFP y el tracto de histidinas bajo el promotor viral constitutivo 35S y el terminador transcripcional de la octopina sintasa OCS. A modificado de pENTR/D-TOPO® Invitrogen® (*invitrogen.com*), B y C adaptados de Earley et al. (2006).

Con el fin de tener un vector apropiado para la transformación de la planta se recombinó el plásmido p4E1 con el pEarleyGate-103 (Figura 6B) dando como resultado el vector p4E2 (Figura 6C). El vector p4E2 cuenta con resistencia a kanamicina y al herbicida BASTA, es capaz de mantenerse en *Agrobacterium tumefaciens* y bajo el promotor 35S expresa la CDS del eIF4E que en su extremo carboxilo terminal está unido a GFP y una etiqueta de 6 residuos de histidinas que permiten la purificación de la proteína de fusión mediante cromatografía de afinidad con Níquel.

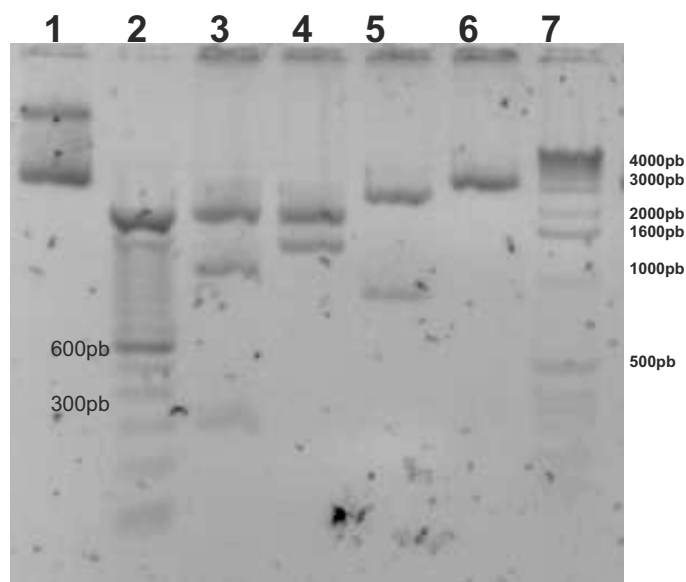


Figura 7. La CDS de eIF4E está correctamente insertada en el p4E1. Debido a que un error en la inserción generaría que este se transcribiera al revés, dando lugar a una proteína diferente, se comprobó que estuviera en la orientación correcta. Para verificar esto, el p4E1 se digirió con enzimas de restricción esperando ver patrones que indicaran la orientación del fragmento. El tamaño de cada fragmento así como los que corresponderían a un plásmido sin inserto o en orientación invertida se muestran en la Tabla 3, los lugares donde cortan las enzimas en el plásmido están indicados en la Figura 6A. Carriles: 1, p4E1 sin cortar; 2, escalera de 100pb; 3, *PvuII/EcoRV*; 4 *PvuII*; 5, *Aval/Ascl*; 6, *Aval*; 7, escalera de 1kb.

Tabla 3. Fragmentos esperados tras digestión con enzimas de restricción del plásmido p4E1.

Orientación	<i>Aval</i>	<i>Aval / Ascl</i>	<i>PvuII</i>	<i>PvuII / EcoRV</i>
Correcta	3200pb	2355, 845pb	1849,1351pb	5,1844,1049,302pb
Incorrecta	3200pb	2355, 845pb	1849,1351pb	5,1844, 656,665pb
Sin insertar	3200pb	2355, 137pb	1849,643pb1	5,1844,1351pb

Para determinar *in silico* el plegamiento de la proteína de fusión, se realizaron predicciones bioinformáticas (Figura 8), donde se apreció que tanto eIF4E como GFP muestran un correcto plegamiento y cierta libertad gracias a los 16 aminoácidos que los

separan, por lo que se consideró que GFP no interferiría con la capacidad de eIF4E de unir a cap o a eIF4G. Por otra parte, ya se ha demostrado que GFP no altera estas funciones en su fusión al C-terminal de eIF4E (Martínez-Silva et al., 2012).

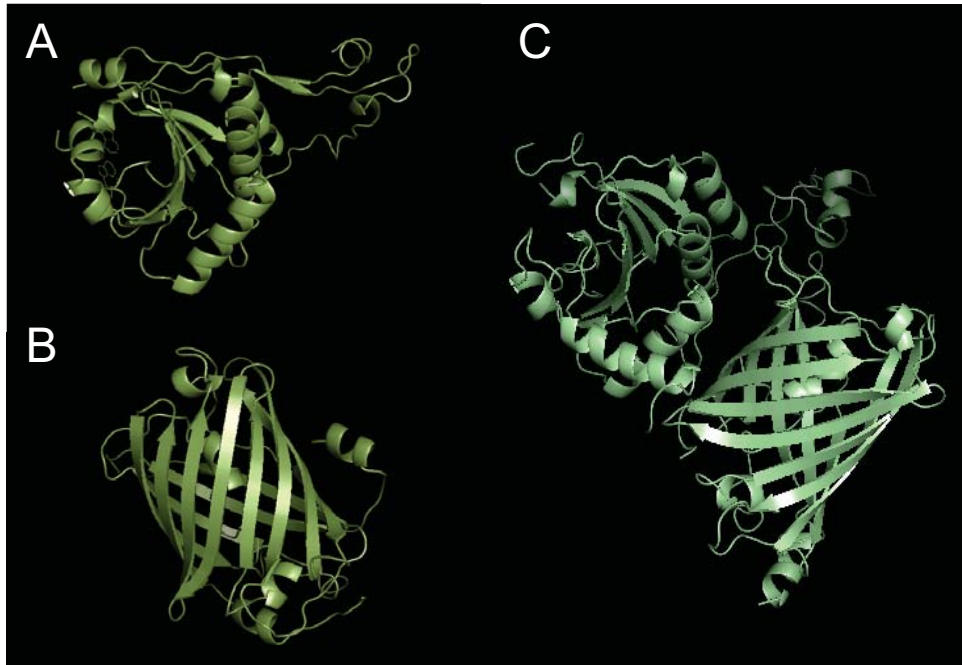


Figura 8. Representación gráfica del análisis *in silico* del plegamiento de eIF4E-GFP no muestra alteraciones estructurales para eIF4E o GFP. Se realizaron predicciones del plegamiento de A eIF4E, B GFP y C la proteína de fusión eIF4E-GFP donde se aprecia que no hay alteraciones en ninguna de las dos proteínas, las cuales están separadas por 16 aminoácidos.

Al igual que con el vector p4E1, con el vector p4E2 se transformaron células de *E. coli* DH5 α para obtener una cantidad mayor de plásmido y posteriormente transformar *Agrobacterium tumefaciens* y así infectar y transformar a la planta (ver siguiente sección). Para comprobar que durante todo el proceso de clonación no hubo corrimientos de lectura o mutaciones durante las transformaciones, el vector p4E2 fue secuenciado revelando intacta la CDS del eIF4E (Apéndice B4).

Obtención de una planta sobreexpresora del eIF4E

Utilizando *Agrobacterium tumefaciens* transformada con el p4E2 se procedió a transformar mediante *floral dip* a *Arabidopsis thaliana* Col-0 silvestre (WT), tras lo cual se obtuvieron varias plantas sobrevivientes a las cuales se les permitió continuar con su ciclo de vida hasta obtener semillas. Estas semillas se germinaron de manera normal y posteriormente fueron tratadas con el herbicida BASTA, las plántulas que estuvieran transformadas exitosamente sobrevivirían y se mostrarían sanas, mientras que las silvestres presentarían clorosis (Figura 9). De este escrutinio se obtuvieron varias líneas de plantas transgénicas, pero solo sobrevivieron 4 denominadas: eIF4E- γ , eIF4E- ζ , eIF4E- ϕ y eIF4E- Ω .

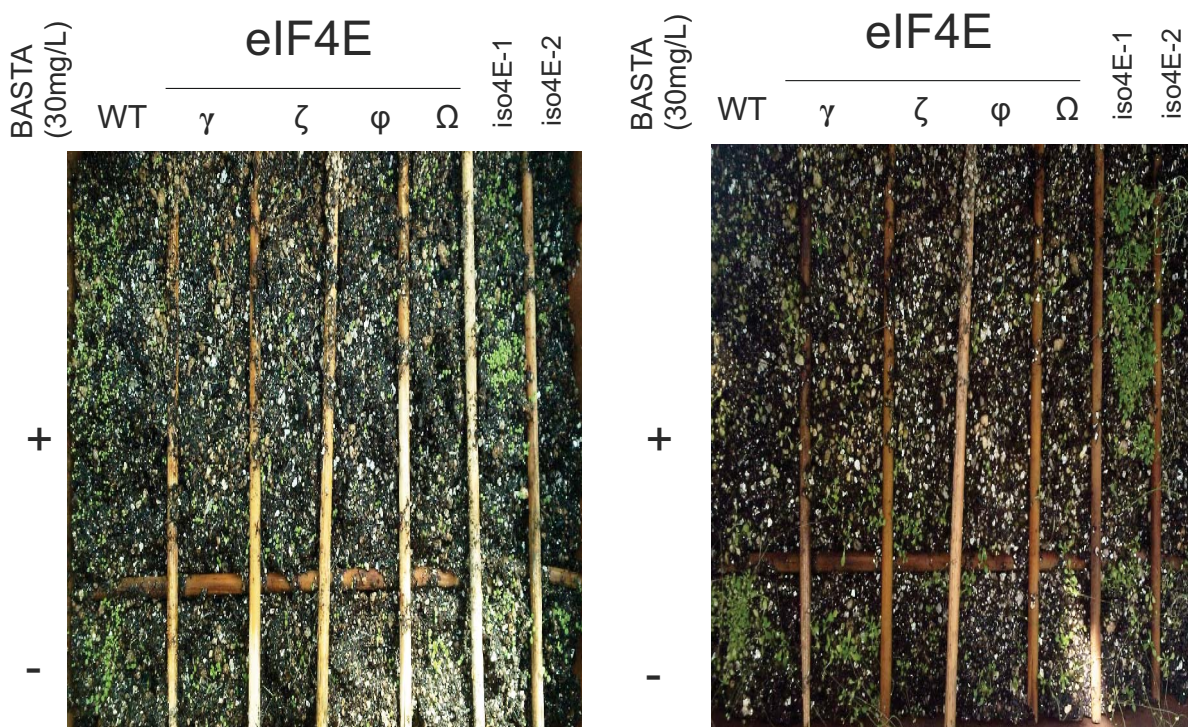


Figura 9. Selección de transformantes mediante su resistencia al herbicida BASTA. Las plantas obtenidas tras el *floral dip* fueron sometidas a un tratamiento donde se les rociaba con BASTA (30mg/L) cada tercer día durante 3 semanas. *Izquierda* al inicio del tratamiento las plantas se ven saludables. *Derecha* Al final del tratamiento aquellas que no contienen el transgen no son resistentes y se muestran cloróticas mientras que las que si lo contienen se presentan saludables al final del tratamiento. Las plantas WT no contienen el transgen y por eso se muestran susceptibles al herbicida, iso4E-1 e iso4E-2 contienen la resistencia al herbicida BASTA.

Las líneas eIF4E- γ y eIF4E- ζ se originaron de la misma planta transformada pero fueron las únicas descendientes que sobrevivieron. Debido a que la expresión del transgen así como su actividad traduccional es diferencial (ver siguientes secciones) se optó por tratarlas como líneas independientes.

Para las cuatro líneas seleccionadas se comprobó la presencia del transgen BAR que le confiere resistencia a BASTA mediante la amplificación por PCR de su DNA genómico (Figura 10).

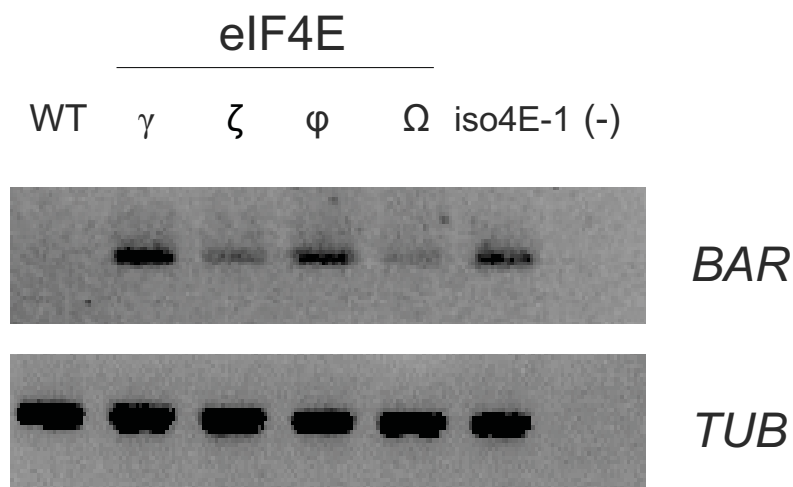


Figura 10. Genotipificación de plantas transgénicas mediante PCR. Aquellas plantas que sobrevivieron al tratamiento con el herbicida BASTA fueron analizadas en busca del gen *BAR*. iso4E-1 carece del factor eIFiso4E y que también contiene el gen que confiere la resistencia al herbicida. Como control de reacción se utilizó tubulina (*TUB*).

Debido a que la transformación por *floral dip* arroja transformantes heterocigas, ya que *Agrobacterium tumefaciens* solo infecta el tejido materno (Bechtold et al., 2000; Desfeux et al., 2000), tanto el procedimiento de selección por BASTA como el de comprobación de la presencia del transgen por PCR fueron repetidos durante las siguientes generaciones de plantas con el fin de reducir la población WT dentro de las líneas transgénicas obtenidas.

Posteriormente mediante RT-PCR semicuantitativo se evaluó el nivel de sobreexpresión del mRNA del eIF4E que tiene cada línea con respecto a la silvestre (Figura 11) siendo la línea eIF4E- ϕ la que mostró un mayor nivel de sobreexpresión. También se evaluó la

expresión de los factores eIFiso4E y nCBP, si bien en ambos se mostró un aumento en su expresión, en ninguno fue mas del doble.

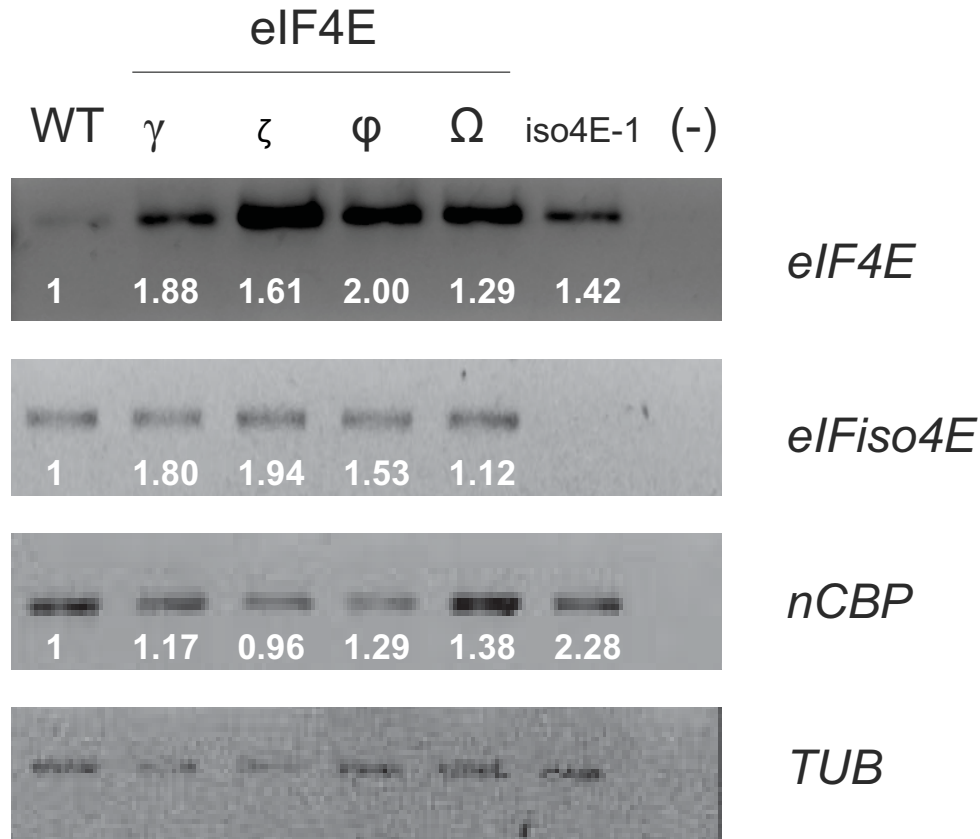


Figura 11. Sobreexpresión de eIF4E a nivel de RNA. A través de RT-PCR se determinó semicuantitativamente el nivel de sobreexpresión del transcrito correspondiente para eIF4E en las líneas transgénicas con respecto a la silvestre, además del mismo modo se evaluó el nivel de transcrito de los factores eIFiso4E y nCBP. Como control de carga se utilizó tubulina (*TUB*). El número que se muestra debajo de cada transcrito es el promedio de 3 replicas independientes del análisis densitométrico de la banda correspondiente a cada transcrito analizado normalizada con la intensidad de la banda correspondiente a tubulina. Las líneas eIF4E- γ y eIF4E- ϕ son las que mostraron mayor nivel de sobreexpresión del transcrito.

La expresión de la proteína de fusión mediante Western Blot fue muy difícil de detectar y se observó solamente en las líneas eIF4E- ζ y eIF4E- Ω (Figura 12). En trabajos con eIFiso4E fusionado a GFP también fue difícil observar a la proteína de fusión usando esta técnica aunque al purificar las proteínas mediante unión a un análogo de cap se observó que la proteína de fusión está presente y es funcional (Martínez-Silva et al.,

2012). Estos resultados sugieren que los anticuerpos α -eIF4E y α -eIFiso4E no son eficientes para la detección de las correspondientes proteínas de fusión.

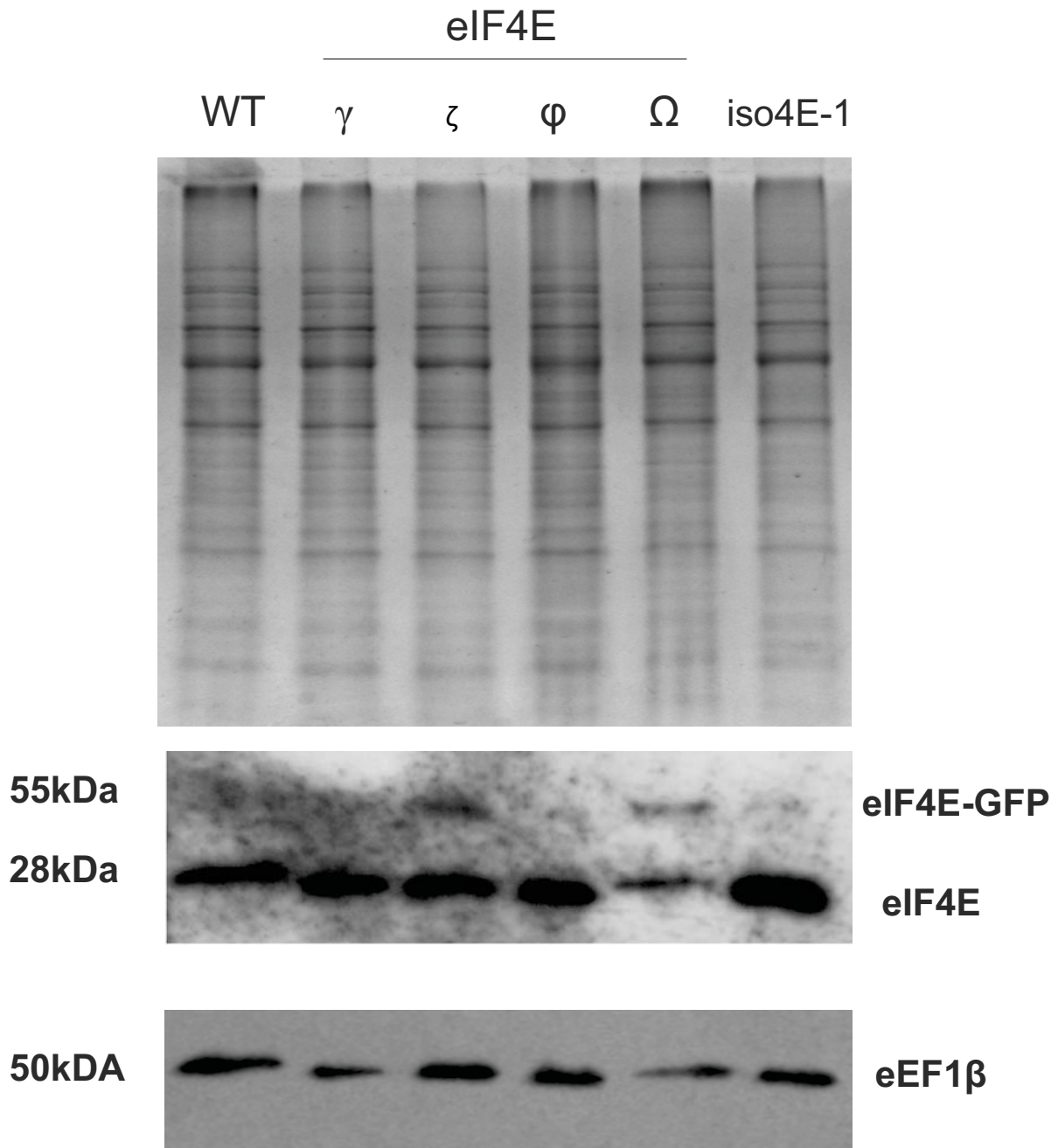


Figura 12. Detección de eIF4E y eIF4E-GFP a nivel de proteína. Mediante Western Blot se identificó la expresión del eIF4E y eIF4E-GFP en las plantas transgénicas así como eIF4E en la WT y la línea iso4E-1 que endógenamente sobreexpresa a eIF4E. Solo en algunos casos se llegó a observar la proteína recombinante eIF4E-GFP. Como control de carga se utilizó eEF1 β y el gel teñido con azul de Coomassie.

Actividad traduccional global de las líneas sobreexpresoras del eIF4E

Para evaluar la actividad traduccional global (perfiles polisomales) de las plantas sobreexpresoras del eIF4E y compararlo con la WT se separaron los complejos traduccionalmente activos de aquellos que no lo son. Para lograrlo un extracto celular fue separado mediante ultracentrifugación por densidad a través de un gradiente de sacarosa (20-60%). Como se describe en la Figura 4 y en la sección de Materiales y Métodos, las fracciones mas ligeras (aquellas con menor concentración de sacarosa) carecen de actividad traduccional pues contienen mRNAs libres o asociados a proteínas como pudieran ser complejos de inicio de la traducción y son denominadas No Polisomales (NP). Seguido a éstas se encuentran las fracciones Monosomales (M) las cuales contienen un solo ribosoma, ya sea debido a la libre asociación de las subunidades ribosomales o anclado a un mRNA que sería pobremente traducido. Las fracciones mas densas (aquellas con mayor concentración de sacarosa) contienen mRNAs asociados a varios ribosomas y por consiguiente presentan una actividad traduccional elevada, a estas fracciones se les denomina polisomales. Las fracciones polisomales son de dos tipos, las altas (PA) y las bajas (PB). Si bien los mRNAs en ambas fracciones se traducen eficientemente, en las altas tienen un mayor reclutamiento de ribosomas para reiniciar la traducción del mRNA a comparación de las bajas. Los polisomas altos también pueden indicar que la elongación no esté procediendo de manera correcta y los ribosomas se queden estancados en el transcrito (Kawaguchi y Bailey-Serres, 2002).

Se compararon los perfiles polisomales de las líneas transgénicas sobreexpresoras del eIF4E con aquellos de la línea WT y la mutante nula del eIF4E (iso4E-1). En la Figura 13 se puede observar que las líneas transgénicas eIF4E- ϕ y eIF4E- γ tienen su zona de polisomas mas enriquecida (flecha Figura 13), sugiriendo una mayor actividad traduccional que la observada en la línea WT. Además se observó un ligero corrimiento de la fracción monosomal con respecto a la WT (punta de flecha Figura 13). Las otras dos líneas transgénicas, eIF4E- ζ y eIF4E- Ω , al igual iso4E-1, no mostraron cambios en su perfil polisomal con respecto a la silvestre (Figura 14).

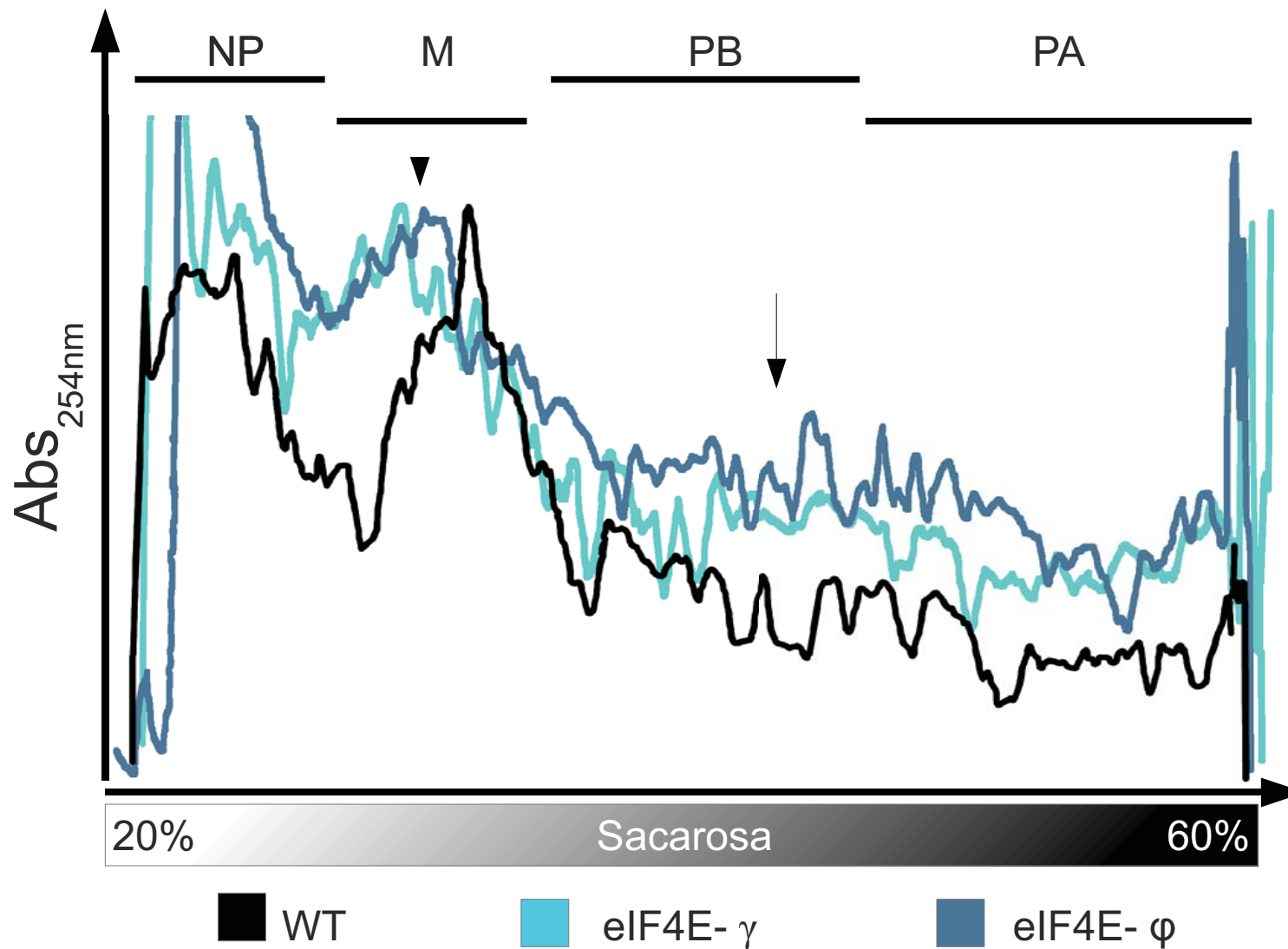


Figura 13. Las líneas eIF4E- γ y eIF4E- ϕ muestran un incremento en los niveles de fracciones polisomales respecto a la WT. Se realizaron fraccionamientos polisomales de las 3 líneas indicadas donde se puede apreciar un ligero corrimiento del pico correspondiente a los monosomas (punta de flecha) pero sobretodo un aumento de las fracciones polisomales (flecha) al medir su ABS_{254nm}, en especial las bajas. NP, no polisomas; M, monosomas; PB, polisomas bajos; PA, polisomas altos.

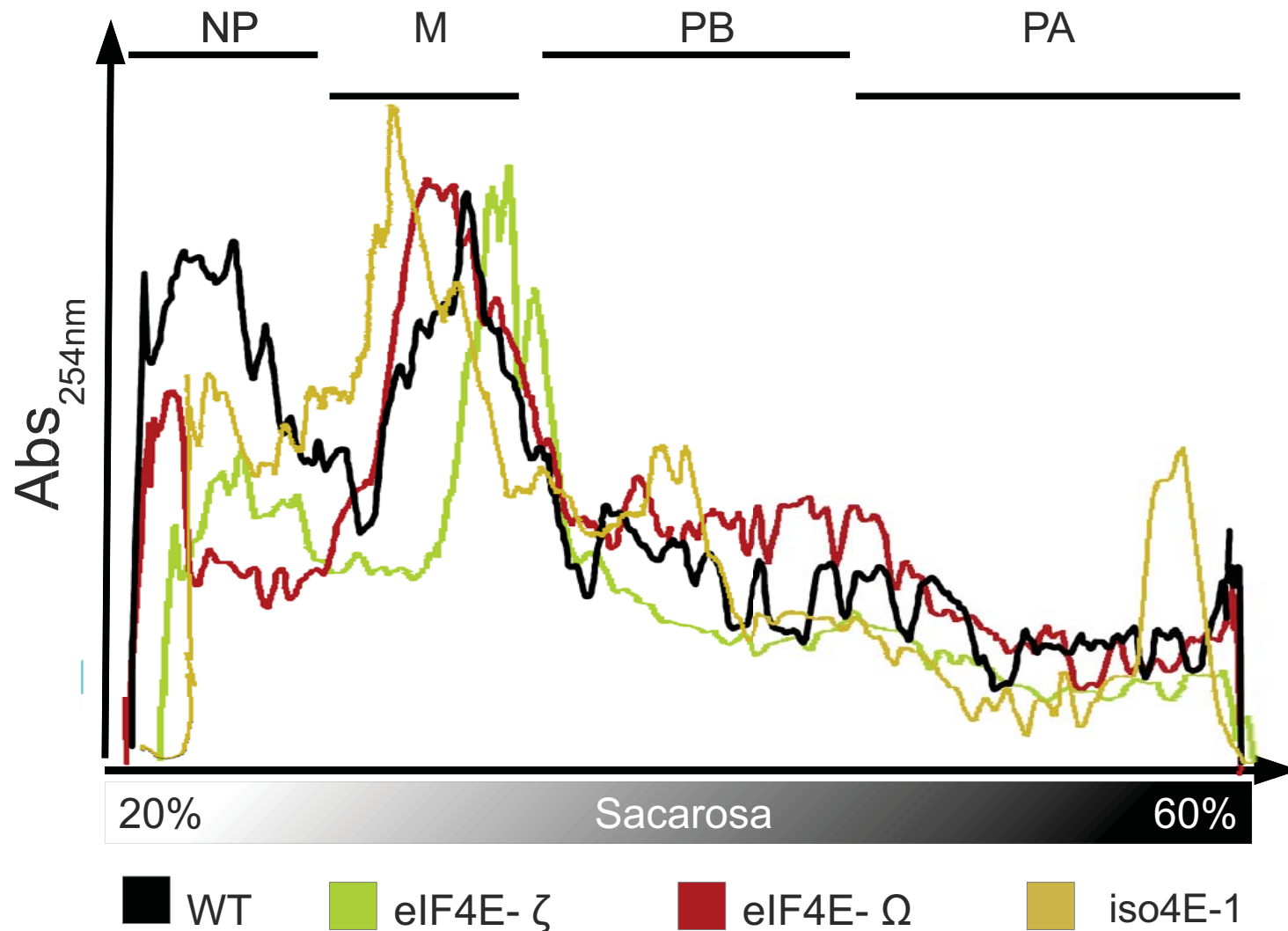


Figura 14. Las líneas eIF4E- ζ , eIF4E- Ω e iso4E-1 no muestran diferencias en su distribución polisomal con respecto a la línea WT. Se realizaron fraccionamientos polisomales de las líneas indicadas donde se puede observar que no hay cambios con respecto a la WT en la ABS_{254nm} para medir fracciones polisomales. NP, no polisomas; M, monosomas; PB, polisomas bajos; PA, polisomas altos.

Actividad traduccional específica para ciertos mRNAs en la línea eIF4E- ϕ

Algunos de los mRNAs que cambiaron su distribución polisomal en la línea iso4E-1 se muestran en la Tabla 4 (Martínez-Silva et al., 2012), en este trabajo se evaluó la distribución polisomal de estos mRNAs en la línea eIF4E- ϕ y se comparó con su distribución en la línea WT (Figura 15).

En la mutante sobreexpresora de eIF4E los mRNAs de eIF3K y Aconitasa 3 se movilizaron a fracciones polisomales altas. Por otra parte, los transcritos correspondientes a AP2, BRC2, Myb-like, eEF1 α , Col-1 y Pho-1 no cambiaron substancialmente su distribución comparado con la línea WT. También se encontraron 2 mRNAs que se distribuyeron a fracciones traduccionalmente menos activas, el caso de ANAC100 que paso de fracciones polisomales altas a bajas y el caso de TFIIE que se movilizó a fracciones monosomales.

Tabla 4. Funciones y procesos en los que se han reportado los mRNAs que se les analizó su actividad traduccional. Éstos mRNAs fueron elegidos al azar de aquellos que cambiaron su actividad traduccional en la mutante nula del factor eIF4E (Apéndice B5).

Nombre	ID	Función	Traducción en iso4E1 vs WT
Aconitasa 3	At2g05710	Isomerización de citrato a isocitrato.	aumento
AP2	At4g36920	Factor de transcripción homeótico responsable de la identidad floral	aumento
BRC2	At1g68800	Factor de transcripción de la familia TCP, arresta el desarrollo de la yema axilar	aumento
Col1	At5g15850	Factor de transcripción involucrado en el ciclo circadiano y desarrollo floral	aumento
eEF1 α	At5g60390	Elongación de la traducción	sin cambios
eIF3K	At4g33250	Factor de inicio de la traducción	aumento
MYB-like	At1g68670	Factor de transcripción de la familia Myb	aumento
NAC5/ANAC100	At5g61430	Factor de transcripción	aumento
Pho1	At3g23430	Transporte de fosfatos desde las células epidermales y corticales de la raíz hacia el xilema	disminución
TFIIE	At4g20340	Factor general de la transcripción	disminución

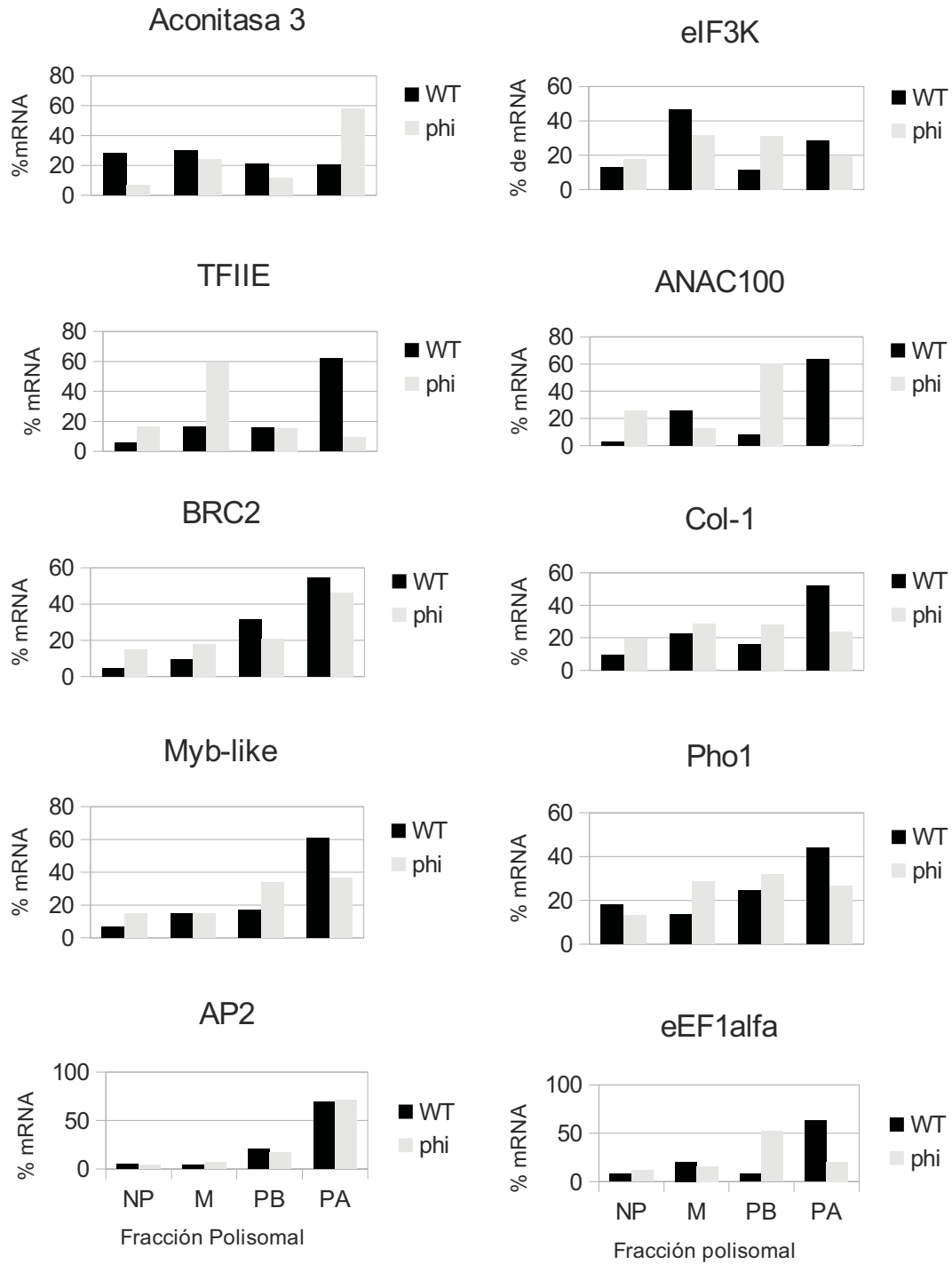


Figura 15. La distribución de ciertos mRNAs en fracciones polisomales se ve afectada por la sobreexpresión de eIF4E en la línea eIF4E- ϕ . Mediante PCR en tiempo real se evaluó la presencia a lo largo de las fracciones polisomales de los transcritos indicados en la Tabla 5. Barras negras línea WT, barras grises línea eIF4E- ϕ . Se muestra el promedio de dos replicas independientes.

Características particulares de los mRNAs que cambiaron su distribución polisomal

Para indagar si los mRNAs cuya distribución polisomal cambió en la línea eIF4E-φ comparten alguna característica común se analizó la longitud de sus UTRs (Tabla 5) e *in silico* se buscaron motivos (Figura 16 y 17) en las secuencias que se encontraron movilizadas a fracciones polisomales en la planta iso4E-1 (Apéndice B5) y se compararon con aquellas que no mostraron cambios en esta misma planta.

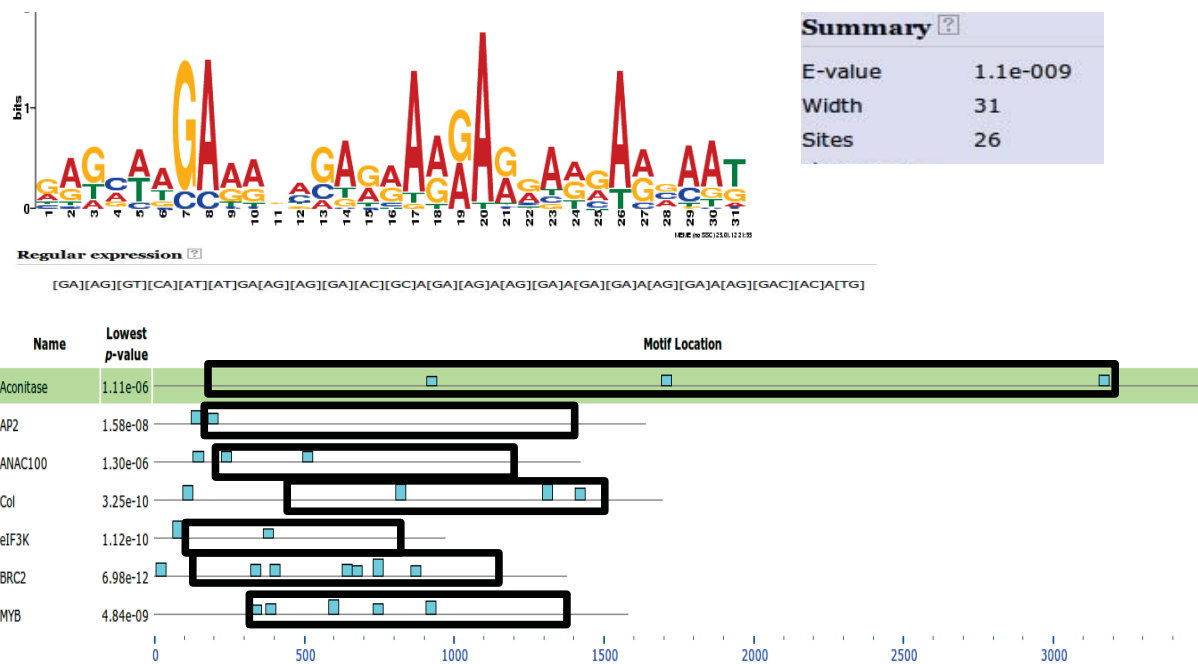
Al analizar las UTRs de los mRNAs que vieron alterada su distribución polisomal en la planta iso4E-1 (Tabla 5), se encontró que aquellos que fueron estimulados tenían una 5' UTR de rango muy variado, tanto en longitud de bases (94-424) como en porcentaje del mRNA (9-24%), este rango fue mayor que el de aquellos mRNAs que vieron desfavorecida su distribución polisomal (54 y 119 bases; 1.99 y 7.69% del mRNA) y de aquellos que no vieron alterada su distribución polisomal (59-250 bases y 3.3-14.2% del mRNA). En el caso de la 3' UTR, aquellos mRNAs que se movilaron a fracciones polisomales cuentan con un rango menor (183-229 bases y 5.5-19.1% del mRNA) que el encontrado para los transcritos que no cambiaron su distribución (183-345 bases y 13-21% del mRNA), es de notar que la secuencia reportada para el mRNA de TFIIE carece de 3' UTR. Finalmente la suma de ambos UTRs no mostró diferencias entre los grupos.

Posteriormente se buscó *in silico* si los mRNAs estimulados en su traducción contenían algún motivo en común (Figura 16) y diferente de aquellos que no se vieron afectados (Figura 17) en la planta iso4E-1. En ambos casos se encontraron dos motivos, uno conteniendo principalmente purinas y otro pirimidinas, aunque la distribución y longitud de cada motivo varió en ambos grupos. En el caso de los mRNAs que se movilaron a polisomas, el Motivo 1 (aquel donde predominan las purinas) se encontró en todos los mensajeros analizados aunque la mayoría de las repeticiones del motivo se encontraron fuera de las UTRs. El otro motivo encontrado (Motivo 2) consta

Tabla 5. Longitud de los UTRs de los mRNAs a los que se les analizó su actividad traduccional. Se identificó la longitud del 5'UTR, 3'UTR y de la suma de ambos UTRs tanto en nucleótidos (nt) como en porcentaje con respecto al mensajero completo.

Nombre	ID	5'UTR		3'UTR		3' + 5' UTR		CDS		mRNA
		nt	% mRNA	nt	% mRNA	nt	% mRNA	nt	% mRNA	nt
<u>No polisomales a polisomales</u>										
Aconitasa 3	At2g05710	370	10.59	192	5.50	562	16.09	2973	85.11	3493
AP2	At4g36920	152	9.26	191	11.63	343	20.89	1299	79.11	1642
ANAC100	At5g61430	208	14.60	204	14.32	412	28.91	1011	70.95	1425
Col 1	At5g15850	424	24.97	205	12.07	629	37.04	1068	62.90	1698
eIF3K	At4g33250	94	9.65	186	19.10	280	28.75	681	69.92	974
BRC2	At1g68800	135	9.78	229	16.59	364	26.38	1071	77.61	1380
MYB	At1g68670	315	19.90	183	11.56	498	31.46	1065	67.28	1583
<u>Polisomales a no polisomales</u>										
TFIIE	At4g20340	119	7.69	0	0.00	119	7.69	1428	92.31	1547
Pho1	At3g23430	54	1.99	309	11.39	363	13.38	2349	86.58	2713
<u>Sin cambios</u>										
eEF1 alfa	At5g60390	59	3.34	345	19.56	404	22.90	1350	76.53	1764
Subunidad 2 G3PDH A	At1g12900	117	7.79	183	12.19	300	19.99	1351	90.01	1501
ACT2	At3g18780	250	14.24	371	21.13	621	35.36	1352	76.99	1756
eIF4A-1	At3g13920	186	10.54	329	18.65	515	29.20	1353	76.70	1764
Cadena 2 TUBULIN BETA	At5g62690	145	8.40	227	13.15	372	21.55	1354	78.45	1726

Motivo 1



Motivo 2

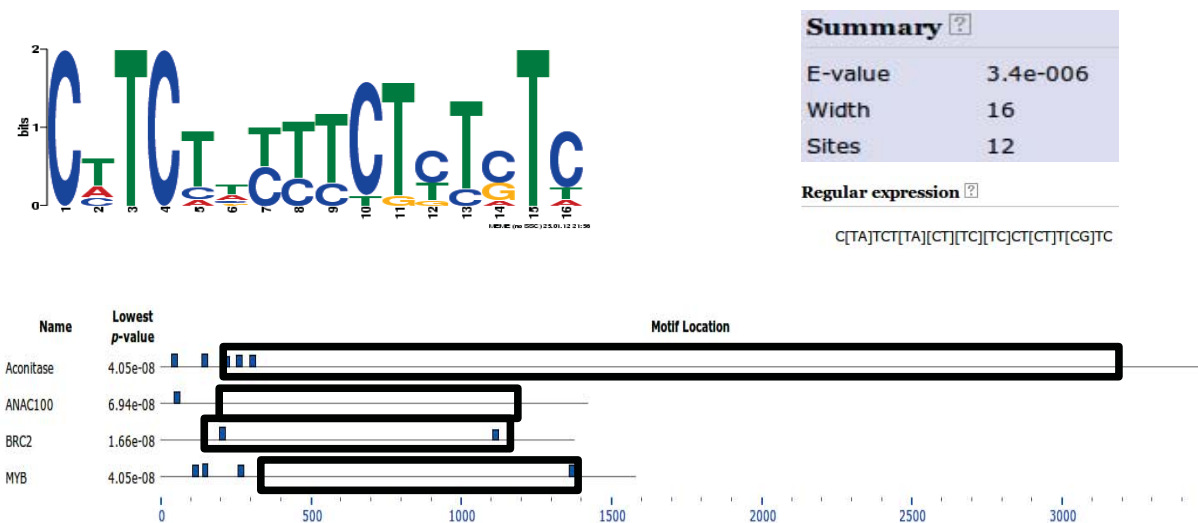


Figura 16. Motivos encontrados *in silico* en los mRNAs que cambiaron su distribución a polisomas en iso4E-1. Un análisis de las secuencias de los mRNAs que aumentaron su traducción reveló que comparten dos motivos en común. El motivo 1 es rico en purinas mientras que el motivo 2 lo es en pirimidinas. El recuadro negro indica la localización de la CDS de cada mRNA mientras que las barras azules indican la localización del motivo en el mRNA.

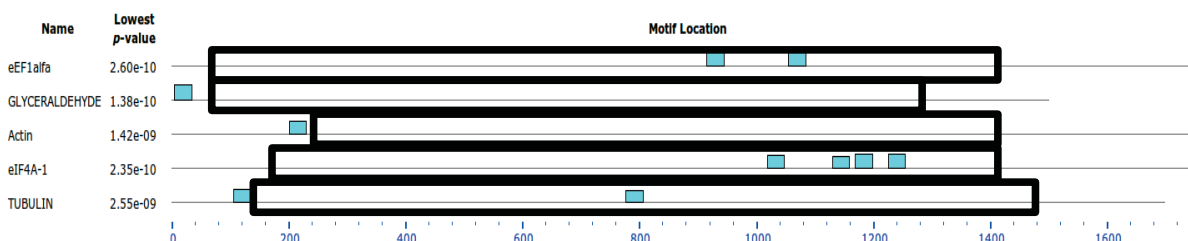
Motivo 3



Summary ?	
E-value	8.8e-005
Width	28
Sites	10

Regular expression ?

`C[AT][CT][C][CA][AGT]G[AG][ATG][TC][CA]TC[AT][TA]C[TA][TC][CG][AGT][TACGA][TCG][CGA][AC]C[TC][CT][CAT]`



Motivo 4



Summary ?	
E-value	2.3e-004
Width	12
Sites	25

Regular expression ?

`[GC]A[ATG][GC][AG][AT][CG][AC][AT]GA[TA]`

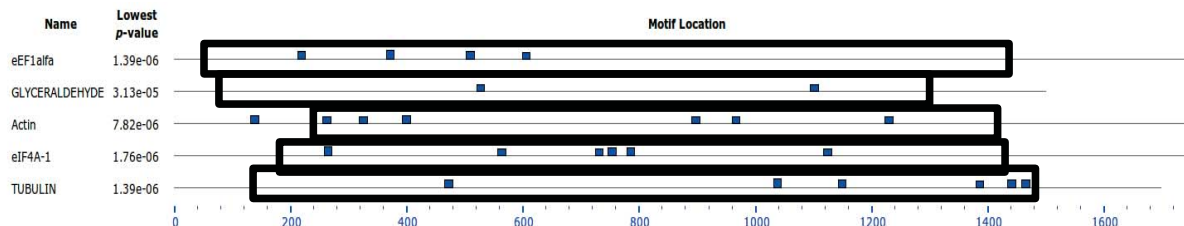


Figura 17. Motivos encontrados *in silico* en los mRNAs que no ven afectada su distribución polisomal en iso4E-1. Un análisis de las secuencias de mRNAs que no se afecto su distribución polisomal en eFiso4E-1, reveló que comparten 2 motivos en común. El motivo 3 es rico en pirimidinas mientras que el motivo 4 lo es en purinas. El recuadro negro indica la localización de la CDS de cada mRNA mientras que las barras azules indican la localización del motivo en el mRNA.

de un tracto de pirimidinas hallado en cuatro de los transcritos y su ubicación es predominantemente mayor en la 5' UTR o justo al inicio de la CDS.

En los transcritos que no alteraron su distribución polisomal en la planta iso4E-1 se encontraron 2 motivos (Motivo 3 y 4). El Motivo 3 está formado predominantemente por pirimidinas aunque en menor cantidad que el Motivo 2 encontrado para los mRNAs estimulados en su traducción, además el Motivo 3 se encuentra mas hacia el extremo 3' de la CDS de éstos transcritos. El Motivo 4 está formado esencialmente por purinas y su distribución es principalmente a lo largo de la CDS.

Localización diferencial del eIF4E en la planta

Se exploró la presencia de la proteína de fusión eIF4E-GFP usando microscopia confocal en plantas transgénicas en diversos tejidos de la planta. En la flor (Figura 18), eIF4E-GFP se encontró presente en los pétalos y pistilos, en estos últimos hay una fuerte expresión en el estigma, mientras que en las anteras no fue detectado.

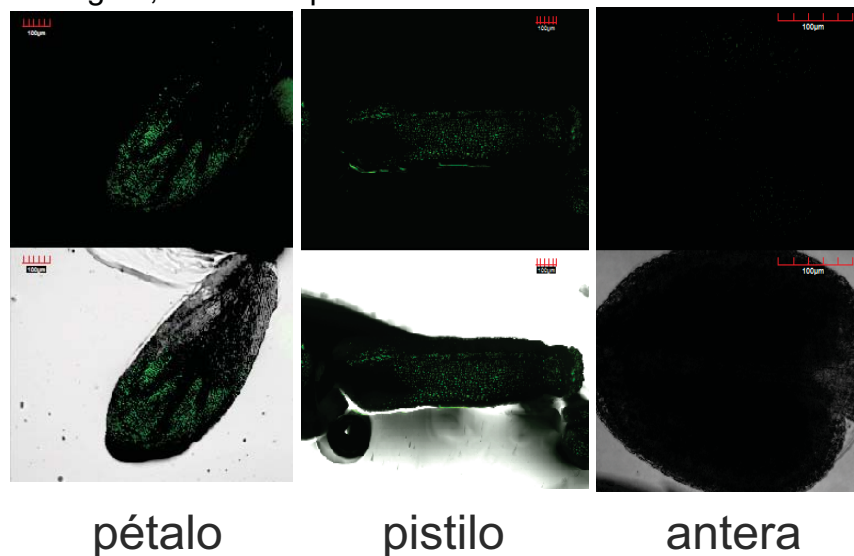


Figura 18. La expresión de eIF4E es diferencial en órganos florales. La expresión de la proteína de fusión eIF4E-GFP se detectó a través su fluorescencia emitida usando microscopia confocal. Se detectó en pétalos y pistilo, en éste ultimo fuertemente expresado en el estigma. En las anteras no se observó.

En otros tejidos como el meristemo apical y la raíz se encontró presente mientras que en la hoja no fue detectado (Figura 19). En el caso de la raíz, su expresión va en

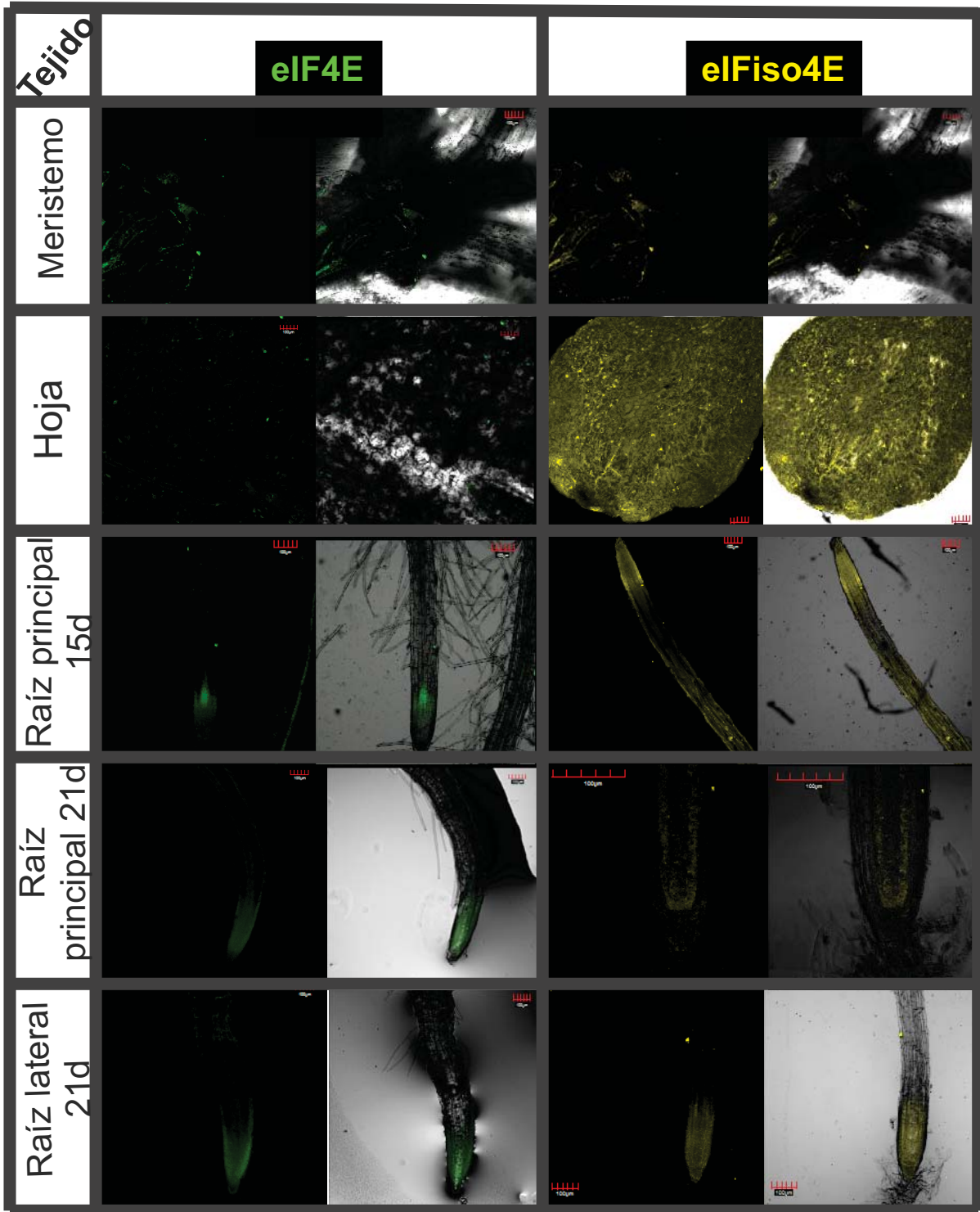


Figura 19. La expresión de eIF4E es diferencial a la de eIFiso4E en diversos tejidos de la planta. La expresión de las proteínas de fusión eIF4E-GFP y eIFiso4E-GFP se detectó a través de microscopia confocal en los tejidos indicados. En meristemo apical la expresión es similar, mientras que en hoja solo se detectó a eIFiso4E-GFP, ambos factores se expresan en raíz pero en distintas zonas.

aumento del meristemo radicular hacia las capas celulares mas externas de la raíz conforme avanza su desarrollo. Al comparar este patrón con el observado para el eIFiso4E-GFP en éstos mismos tejidos, se puede observar que si bien ambos factores están presentes de manera similar en el meristemo apical, en hoja hay una fuerte presencia del eIFiso4E-GFP, mientras que en la raíz la expresión de este factor corresponde mas a zonas de diferenciación y elongación radicular.

Discusión

Sobreexpresión de eIF4E a nivel de proteína

Se generaron cuatro líneas transgénicas capaces de sobreexpresar al factor eucariote de inicio de la traducción 4E fusionado a la proteína verde fluorescente (eIF4E-GFP). Si bien la expresión de ésta construcción a nivel de proteína fue difícil de determinar, trabajos previos del laboratorio han mostrado que este tipo de construcciones si son estables y retienen su función de unir a cap (Martínez-Silva et al., 2012) a pesar de que son difíciles de detectar por Western blot en un extracto total de proteína. Esto también ha sido reportado por otros grupos (Bush et al., 2009) observándose que en extractos proteicos totales donde gran parte de los factores traduccionales endógenos no son detectables es necesario concentrarlos mediante purificación con análogos de cap. Otra prueba que sugiere la funcionalidad de la construcción eIF4E-GFP es su visualización mediante la fluorescencia emitida por la GFP, la cual también permitió determinar una localización diferencial e inclusive restringida en ciertos tejidos de la planta de eIF4E respecto a eIFiso4E. Uno de estos tejidos fue la raíz donde eIFiso4E-GFP se detectó en la zona de elongación de la raíz así como en la punta de ésta y aquellas que rodean el haz vascular donde hay células diferenciadas, mientras que eIF4E-GFP se localizó en mayor medida en la zona meristemática.

Lo anterior sugiere la necesidad de la planta por uno de estos factores en específico, necesidad que va cambiando de acuerdo al tiempo de desarrollo y de las funciones que pueda llevar a cabo cada factor. El proceso celular donde se requieran puede ser diverso ya que éstos factores además de su rol canónico en la traducción están involucrados en otros procesos como la exportación nuclear (Iborra et al., 2004), la degradación (von der Haar et al., 2004) e inhibición (Kiriakidou et al., 2007) de mRNAs y posiblemente otros como el transporte intercelular de mRNAs.

Aumento de la traducción global en la línea eIF4E- ϕ

Si bien estudios previos en animales han determinado que la sobreexpresión de eIF4E no lleva a un aumento en la traducción global (Rousseau et al., 1996; Clemens y Bommer, 1999; Culjkovic et al., 2007), los resultados encontrados en este trabajo indican que dos de cuatro líneas transgénicas sobreexpresoras de eIF4E-GFP presentaron incrementos en la absorbancia a 254nm de las fracciones polisomales, particularmente las zonas mas enriquecidas son las correspondientes a las polisomales bajas (Figura 13) sugiriendo un incremento en la actividad traduccional. La importancia y efectos biológicos de este hecho queda aun por ser determinada, pero una posibilidad sería que los mRNAs acumulados en ésta zona se están traduciendo eficientemente mas no tienen preferencia para reiniciar su traducción.

Desregulación en la traducción específica de mRNAs

Como se esperaba, la traducción de algunos mRNAs se vió favorecida en la planta transgénica coincidiendo con aquellos casos encontrados en la planta mutante nula de eIFiso4E que sobreexpresa endógenamente a eIF4E (iso4E-1). En este trabajo se encontraron los transcritos de eIF3K y Aconitasa 3 que cambiaron su distribución polisomal hacia una mas activa traduccionalmente. Otros mRNAs como AP2, BRC2 y Myb-like se encontraron predominantemente en fracciones traduccionalmente muy activas pero sin encontrar diferencias con respecto a la distribución de la línea silvestre; debido a que éstos mRNAs están altamente expresados en los estadíos de desarrollo estudiados, sería conveniente evaluar su capacidad a ser sobretraducidos por eIF4E en las plantas transgénicas en etapas donde su expresión sea menor.

Dentro de los transcritos que disminuyeron su traducción en la planta eIF4E- ϕ se encuentran los mRNAs de Col-1 y Pho-1, los cuales se distribuyeron equitativamente a lo largo de las fracciones polisomales. A diferencia de lo observado en eIF4E- ϕ , en iso4E-1 el mRNA correspondiente a Pho-1 se halló desplazado a fracciones de poca actividad traduccional (no polisomas) (Martínez-Silva et al., 2012), (comparar Figura 3 y

15) por lo que es mas probable que en iso4E-1 su baja traducción sea debida a la falta del eIF4E mas que a una regulación negativa por la sobreexpresión del eIF4E.

Otro de los transcritos que se vió alterado en las plantas sobreexpresoras del eIF4E fue el de ANAC100, éste tuvo un comportamiento peculiar pues su perfil polisomal en ambas plantas indica que está siendo muy traducido. En la línea silvestre esta traducción es llevada a cabo en las fracciones polisomales altas, mientras que en la línea eIF4E- ϕ lo hace en las bajas sugiriendo un menor reinicio de su traducción.

Un caso particular es el de TFIIIE, pues en la planta iso4E-1 su traducción disminuye, lo cual en un inicio se atribuyó a la falta de eIF4E que lo traduciría selectivamente, pero los resultados encontrados en esta tesis indican que la sobreexpresión del eIF4E podría estar mediando un mecanismo de regulación negativa de su traducción.

En sistemas donde se ha buscado algún motivo o estructura que mediara el reconocimiento preferencial de mRNAs por el eIF4E no se ha encontrado ninguno claramente, apuntando a mecanismos mas complejos. En la exportación nuclear mediada por eIF4E se ha identificado el elemento sensible a eIF4E (4E-SE), pero éste se encuentra en el extremo 3' del mRNA, (Culjkovic et al., 2006, 2007, 2005; Topisirovic et al., 2009) dejando la posibilidad de que no sea el eIF4E el que lo reconozca sino otra proteína que posteriormente reclute al eIF4E. Además se ha encontrado un dominio de 55 nucleótidos en el mRNA de la osteopontina (Larsson et al., 2006) que media su sobretraducción, éste también se encontró en la ODC pero su relevancia en la sobretraducción de este mensajero queda por ser determinada (Larsson et al., 2006).

En el presente trabajo se identificaron dos motivos en común que compartían los mRNAs sobretraducidos. Si bien estos son muy parecidos en cuanto a su composición a los encontrados en aquellos mRNAs que se han reportado como insensibles a la sobreexpresión del eIF4E, la diferencia en longitud y localización dentro de cada mRNA entre los motivos podrían ser suficientes para mediar una preferencia por el eIF4E para

traducirlos.

Algo que queda por dilucidar es si un mecanismo global es el que permite a eIF4E regular (tanto positiva como negativamente) a ciertos mRNAs, como podría ser el 4E-SE, el dominio encontrado en la osteopontina (ver arriba) o si cada mRNA tiene su propio mecanismo como se ha descrito en el mRNA de la ferritina y su región IRE que controla específicamente su traducción (Gebauer y Hentze, 2004). Un mecanismo así es probable donde un mRNA particular reclute a un regulador específico que a su vez traiga a moduladores de la función de eIF4E tanto positivos (por ejemplo HuR (Topisirovic et al., 2009) y HOXA9 (Topisirovic et al., 2005)) como negativos (por ejemplo PML (Cohen et al., 2001) y PRH (Topisirovic et al., 2003)).

Conclusiones

La línea ϕ sobreexpresora del factor de inicio de la traducción eIF4E mostró un aumento en las fracciones polirribosomales. A nivel de mRNAs específicos los correspondientes a eIF3K y Aconitasa 3 mostraron una movilización a fracciones polisomales altas mientras que ANAC100 y TFIIE lo hicieron a fracciones traduccionalmente menos activas, siendo TFIIE el más drástico pues se movilizó hacia monosomas.

La localización de la proteína eIF4E-GFP no es ubicua a lo largo de la planta. En flores se detectó en el gineceo y los pétalos mientras que en anteras no. Comparando la expresión de eIF4E con la de eIFiso4E a lo largo de la planta se observó que tienen un patrón diferencial, en hojas solo está presente eIFiso4E y en raíz eIFiso4E se expresa en zonas de elongación y diferenciación mientras que eIF4E en zonas de proliferación.

Perspectivas

Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que la proporción de eIF4E y eIFiso4E constituye un mecanismo regulador de la traducción y el desarrollo de *Arabidopsis thaliana*, pero para poder confirmar esta propuesta se tienen que realizar más estudios.

La sobreexpresión de eIF4E en animales conlleva a la transformación celular (Clemens y Bommer, 1999) y alteración en otros procesos como la exportación nuclear de mRNAs (Rosenwald et al., 1995; Rousseau et al., 1996; Culjkovic et al., 2005, 2006), un análisis fenotípico detallado y de exportación de mRNAs con el 4E-SE en las plantas sobreexpresoras permitirá saber si estos fenómenos también ocurren en plantas.

Para poder determinar el nivel de sobreexpresión de eIF4E se sugiere la estandarización de la detección de la proteína recombinante en las líneas transgénicas aquí generadas, además de comparar los niveles de los factores de unión a cap eIFiso4E y nCBP.

Dos líneas sobreexpresoras (eIF4E- ϕ y eIF4E- γ) mostraron un aumento en la traducción global mientras que las otras dos (eIF4E- ζ y eIF4E- Ω) no lo hicieron. Si esto se debe a los niveles de expresión de eIF4E o a cuestiones particulares de la zona de inserción del transgen dentro del genoma queda por ser dilucidado.

Los datos de PCR en tiempo real proponen a eIF4E como un regulador no solo positivo sino también negativo de la traducción específica en la línea eIF4E- ϕ . Es conveniente corroborar estos datos en el resto de las líneas sobreexpresoras. Además no es claro si el motivo encontrado *in silico* en aquellos mRNAs sobretraducidos es suficiente para

mediar su traducción selectiva. La construcción de químeras de mRNAs no afectados por la sobreexpresión del eIF4E con los motivos encontrados o los mRNAs que si se vieron afectados por la sobreexpresión de eIF4E sin dichos motivos ayudarían a descubrir el mecanismo subyacente.

La localización diferencial de los factores de traducción a lo largo de la planta sugiere que son requeridos de manera específica y posiblemente sea necesario reprimirlos para asegurar el correcto desarrollo y viabilidad de la planta. Sería interesante investigar si hay mRNAs particulares a ser traducidos por un factor en específico en cada una de éstas estructuras que explique su expresión diferencial.

Presentación y publicación de este trabajo

Este trabajo se presentó como cartel en el XVIII Congreso Nacional de Bioquímica organizado por la Sociedad Mexicana de Bioquímica.

Además parte de este trabajo se utilizó para la publicación del artículo:

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

El artículo completo se encuentra al final de esta tesis.

Apéndices

Apéndice A: Soluciones usadas

Medios de cultivo

LB

1% p/v Peptona de Caseína
0.5% p/v Extracto de Levadura
0.5% p/v Cloruro de Sodio
pH= 7.0
1.5% Agar bacteriológico (si es sólido)

SOC

0.5 % p/v extracto de levadura
2.0 % p/v bactotripton
10 mM NaCl
2.5 mM KCl
10 mM MgCl₂
10 mM MgSO₄
20 mM Glucosa

YM

-Solución A
1.0% p/v Manitol
0.04% p/v Extracto de Levadura
0.01% p/v NaCl
0.02% K₂HPO₄
1.5% Agar bacteriológico (si es sólido)

-Solución B

2M MgSO₄

Esterilizar ambas soluciones y antes de usar mezclar Solución A con B (1000:1)

Solución de CaCl₂ (para *E. coli*)

60mM CaCl₂
15% v/v Glicerol
10mM PIPES
pH 7.0

Solución de CaCl₂ (para *Agrobacterium tumefaciens*)

20mM CaCl₂
10% v/v Glicerol

Tierra

3 partes de turba/sustrato/Sunshine Mix®
1.5 partes de agrolita
1 parte de vermiculita

Remojar y mezclar bien, esterilizar antes de usar

BASTA

30mg/L Glufosinato de Amonio

Preparar solo la cantidad a usar por tratamiento y mantener a 4°C

Gamborg's

3.2g/L Gamborg's B-5 Plant culture Media

1% p/v Sacarosa

pH 5.3 ajustado con KOH

1.5% p/v agar bacteriológico (si es sólido)

Separación de ácidos nucleicos y proteínas

Gel de Agarosa

-Para DNA

0.8-1.5% p/v Agarosa

1X TBE

-Para RNA

2% p/v Agarosa

1X MOPS

4% v/v Formaldehído 37%

-TBE 5X (500mL)

27g Tris Hcl pH=8

13.75g Ácido Bórico

1.86g EDTA

-MOPS 20X

4M MOPS

20mM EDTA

100mM NaAC

Los gels se corrían a 60-80V en el TBE o

MOPS 1X, a las muestras a separar se les

agregó amortiguador de carga de DNA o

RNA

Gel de Acrilamida

-Solución I (100mL)

30g Acrilamida

0.8g Bis acrilamida

-Solución II pH 8.8 (100mL)

9.075g Tris HCl

0.2g SDS

-Solución III pH 6.8 (100mL)

3.03g Tris HCl

0.2g SDS

-Gel Separador 15%

1:1 Solución I: Solución II

50µL APS 10%/10mL de gel

10µL TEMED/10mL de gel

-Gel Concentrador (2.5mL)

415µL Solución I

1.25mL Solución III

807µL Agua

25µL APS 10%

3µL TEMED

-Amortiguador de Corrida 10X (1L)

30g Tris HCl

144g Glicina

10g SDS

-Amortiguador de transferencia (1L)

80mL amortiguador de corrida 10X

200mL Metanol

Solución de Desnudado de Membranas

(100mL)

1.5g Glicina

1mL Tween 20

0.1g SDS

pH 2.2 ajustado con HCl

TBST (1L)

6.05g Trizma Base

8.75g NaCl

1mL Tween 20 (al momento)

Amortiguador de carga de DNA 6X

50% v/v Glicerol

1mM EDTA

0.25% p/v Azul de Bromofenol/Xilencianol

Amortiguador de carga de RNA

0.25% Azul de Bromofenol/Xilencianol

1.5X MOPS

9% v/v Formaldehído 37%

60% v/v Formamida desionizada

Amortiguador de carga de proteínas

(20mL)

0.6g Tris HCl pH=6.8

0.4g SDS

8mL Glicerol

80mg Azul de bromofenol

20 μ L β -mercaptoetanol/ 100 μ L de
amortiguador (agregar al momento)

Extracción de plásmidos (Minipreps)

Solución I

50mM Glucosa

25mM Tris HCl pH=8

10mM EDTA

Solución II (preparada al momento)

0.2M NaOH

1% p/v SDS

Solución III

5M KAc

19% v/v Ácido acético glacial

Extracción de DNA genómico de plantas

Amortiguador de Lisis

350mM NaCl

10mM Tris HCl pH 7.6

50mM EDTA

7M Urea

2% p/v Sarcosyl

Extracción de Proteínas

Amortiguador de extracción

100 mM Tris-HCl pH 8.8
10 mM EDTA
900 mM Sacarosa
0.4%(v/v) 2-mercaptoetanol (al momento)

Almacenar a 4°C

Amortiguador de extracción de fenol

Mezclar volúmenes iguales de amortiguador de extracción y fenol pH=8.8

Solución acetato de amonio/metanol

100 mM (p/v) Acetato de amonio en 100% metanol

Almacenar a 4°C

Solución IEF (Isoelectric focusing)

8M Urea
2M Thiourea
4% CHAPS
2% Triton X-100
50 mM DTT

Almacenar a -20°C y usar solo una vez

Extracción de perfiles polisomales

Amortiguador de Lisis

200mM Tris HCl pH=7.8
50mM KAc
25mM MgAc
2mM EGTA
100µg/mL Heparina*
2% v/v PTE*
1% v/v Nonidet P40*
50mg/mL Cicloheximida (disuelta en etanol)*

*Agregados al momento

Amortiguador de Gradiente

50mM Tris HCl pH=7.8
20mM KAc
10mM MgAc

Agua DEPC

0.1% v/v DEPC

Esterilizar antes de usar

Apéndice B: Datos sobre las secuencias, genes y plásmidos.

Apéndice B1 Oligonucleótidos usados

Oligonucleótido	Gen a amplificar	Fw (Sentido)	Rv (Antisentido)
pENTR4E	CDS de eIF4E	CACCATGGCGGTAGAAGACTCCC	AGCGGTGTAAGCGTCTTTGCATTCC
BAR	bar	ACAGCGACCACGCTCTTGAA	TGCACCATCGTCAACCACTA
pENTR iso4E	eIFiso4E	CACCATGGCGACCGATGATGTG	GACAGTGAACCGGCTCTTCTGG
nCBP RNA	nCBP	CAGGGACTCGGGAAACATGGACAGC	GCCGCTTGATTGAGTCTCTCAAACCCATCAC
tub	tubulina	CTCAAGAGGTTCTCAGCAGTA	TCACCTTCTCATCCGCAGTT
4E RNA	eIF4E	GGCGGTAGAAGACTCCCAAATCTGTTG	AGCGGTGTAAGCGTCTTTGCATTCC
Aconitase 3	Aconitase 3	CCTTCTCTACCCAGACAGCGTGG	CACCCCATCCAGCAACTCCC
BRC2	BRC2	AGGCGAGCAAGACGATTGAATG	CCTTTCCTCCTCCTTCCGATGC
AP2	ERF/AP2	TGGAAGAAGGGTCTGCTCGG	CAAGTCCTTTGCTGACTCCACG
NAC5	ANAC 100/NAC5	CCTGCTTCTCCAACCAAACGG	AATCCTGTGAAAAATGTCGGCTTG
Col-1	Col-1	ATGCTGCCAATCGTCTTGCTTC	TGCGGAATGAATCTCTGAATCACAG
eEF1	eEF1 α	CACATCAACATTGTGGTCATTG	GCAGTAGTACTTGGTGGTGGTCTC
Pho-1	Pho-1	CCAAACACAGCGTTGCGTTACC	GAGGCTCGGAGGATGAGGTGG
eIF3K	eIF3K	CCAGACTTCAGCCTTTGCCTCTTC	CCAGAACTGTTGGAACCTCCCAG
TFIIE	TFIIE	AGCCGTTTGTCAAGCTGGTGAG	TCTAACCCATTGCCGCCTCG
MYB	Myb-like	TCGGAAGGAGTTATCTGGTACGACG	AAGACAGGACCACCACAAACACTTG
Oligo dT	Tracto de poliA	TTTTTTTTTTTTTTTTTTVN	

Apéndice B2 Condiciones de PCR

Transcripción Reversa

Temperatura	Tiempo (min)	
70 °C	5	Oligo dT + RNA
4 °C	5	Oligo dT + RNA
25 °C	5	Reacción RT
42 °C	60	Reacción RT
70 °C	15	Reacción RT

PCR semicuantitativo

Paso	Temperatura	Tiempo
1	94 °C	2min
2	94 °C	15s
3	60 °C	1min
4	72 °C	1min
5	Repetir pasos 2 a 4	N* veces
6	70 °C	10min

*El número (N) de veces a repetir el programa fue de 35 para reacciones a partir de DNA genómico y cDNA usado para la clonación de la CDS. Para los experimentos de RT-PCR semicuantitativo donde se compararon los niveles de transcrito, los ciclos variaron de manera a que fueran visibles pero no saturaran la reacción; estos ciclos fueron determinados manualmente a través de curvas de concentración y gradientes de ciclos:

cDNA a amplificar	Oligonucleótido	Número de Ciclos	Fragmento Amplificado
eIF4E	4E RNA	28	700pb
eIFiso4E	pENTRiso4E	28	550pb
nCBP	nCBP RNA	28	550pb
tubulina	tub	25	485pb
bar	bar	35	300pb

PCR en tiempo real

Temperatura	Tiempo
94 °C	1min
60 °C	1min
Repetir 40 ciclos	

Apéndice B3 Plásmidos utilizados

Plásmido	Características
pENTR/D-TOPO	Recombinación de fragmentos que contengan en su extremo 5' la secuencia CACC, además el vector se puede usar como donador para recombinaciones posteriores usando la tecnología Gateway®. Presenta resistencia a kanamicina.
pEarleyGate103	Vector receptor de fragmentos recombinados mediante la tecnología Gateway®. El fragmento recombinado se expresará bajo el promotor constitutivo 35S y estará fusionado a GFP y un tracto de histidinas. Se puede mantener tanto en <i>E. coli</i> como en <i>A. tumefaciens</i> . Presenta resistencia a kanamicina y al herbicida BASTA.
p4E1	Vector pENTR/D-TOPO® recombinado con la CDS de eIF4E.
p4E2	Vector p4E1 recombinado con el vector pEarleyGate103

Apéndice B4 Secuenciación de plásmidos

>oligonucleótido pENTR4E-1

AAAATCTGGTTGNANNNNGANNAAGCTAAGCCCNNTTCATANANAATCCGATTGATCGAT
 ACCATGAGGAAGGTGATGATGCCGAAGAAGGAGAGATCGCCGGAGGAGAAGGAGACGGAA
 ACGTTGACGAATCGAGCAAATCCGGTGTTCCTGAATCGCATCCTCTGGAACATTCATGGA
 CTTTCTGGTTTCGATAATCCTGCTGTGAAATCGAAACAAACCTCTTGGGGAAGTTCCTTGC
 GACCCGTGTTTACGTTTTCACCTGTTGAGGAATTTGGAGTTTGTACAACAACATGAAGC
 ATCCGAGCAAGTTAGCTCACGGAGCTGACTTCTACTGTTTCAAACACATCATTGAACCTA
 AGTGGGAGGATCCTATTTGTGCTAATGGAGGAAAATGGACTATGACTTTCCCTAAGGAGA
 AGTCTGATAAGAGCTGGCTTACACTTTGCTTGCATTGATTGGAGAGCAGTTTGATCATG
 GAGATGAAATATGTGGAGCAGTTGTCNACATTAGAGGAAAGCAAGAAAGGATATCTATTT
 GGACTAAAAATGCTTCAAACGAAGCTGCTCNGNGAGCATTGGAAAAACAATGGAAGGATT
 TCTCGATTACNACAACAGCATAGGTTTCATCATCCATGANGATGCGAAGAAGCTCGACAG
 GAATGCAAAGAACGCTTACNCCGCTNANGNGGGCGGCCNACCCNNNTTCTGNANAAN
 GTGNNNCTCGAGATGGTANATCTGACTNNAAGGAAAAAATTTTCNCTGGNNTGNCCCN
 ATTCTNGTNNANTNNNNGGGGANGTAATGGGCNCAATTTTCNGNCNNGGNAAGNGANGG
 NATGCNNNNNGGAAATACCNAAAATNTTGNNNANNGGAAANNCTGTNNNGGCCNANC
 TTGNNNNANTTTCNNTANGGGGTNAGNNTTTNNANNNNNNTNNNTNNANNGNNNNNTNN
 NNNNNCCNCCNNGNN
 NNN
 NNN
 NNN

>oligonucleótido GFP-2

ATTNNNNNNNTTTNNNNNNNTGATCNGCNNNTTGCCGCCCGCGTCTTCATGTTGTGGCG
 GGCTTGAGTTGGCTTTGATGCCGTTCTTTTGCTTGTGCGCCATGATGTATACGTTGTGG
 GAGTTGTAGTTGTATCCAACCTTGTGGCCGAGGATGTTCCGTCCTCCTTGAATCGATT
 CCTTAAGCTCGATCCTGTTGACGAGGGTGTCTCCCTCAAACCTGACTTCAGCACGTGTC
 TTGTAGTTCCCGTCGTCCTTGAAGAAGATGGTCTCTCCTGCACGTATCCCTCAGGCATG
 GCGCTCTTGAAGAAGTCGTGCCGCTTCATATGATCTGGGTATCTTGAAGAAGCATTGAACA
 CCATAAGAGAAAAGTANGACAAGTGTGGCCACGGAACAGGTAGTTTCCAGTAGTGCAAA
 TAAATTTAAGGGTAAGTTTCCGTATGTTGCATCACCTTACCCTCTCCACTGACAGAAA
 ATTTGTGCCCATTAACATCACCATCTAATTCNNAAGAAATGGGACAACCTCCNGTGANNAG
 TTCTTCTCCTTTANNNNNATCTACCATCTCGAGCACCCTTGTACANAAGCTGGGTC
 GGCNCGCCACCTTNNNGTGTAAAGCGTCTTTGNNTTCNNNNNNCTTCTCCTCCTT
 TGGGATGNNNAACCATGNGNGNTNNCCNANAACCTCCTTCCANTGTTTCCAATGCNNNC
 TGANANCTNNTTGAANNTTTTANCCAANANNCCCTTCTGGNTTCCCTANGTGACACNGN
 NNCNAATTCNNNNCAGANNAANGCTCNNCACAANGANNAANNGANANCCNNNNN

Apéndice B5 Transcritos encontrados con desregulación en su actividad traduccional en la mutante carente de eIFiso4E

Tabla B5. mRNAs movilizados de no poliribosomas (NP) hacia poliribosomas (P) en plántulas *(iso)4E-1* de 15 días post germinación. Adaptado de Martínez-Silva et al. (2012)

Gen ID	Fracción ^a	Zscore ^b	Función/Nombre ^c	Proceso Biológico ^c	Componente Celular ^c	Estructura de la planta ^d
<i>At4g18720</i>	NP	-2.673.546	Factor de transcripción IIS	Transcripción	Núcleo	Inflorescencia, semilla
	P	3.161.070				
<i>At1g51000</i>	NP	-2.230.721	Desconocido	Desconocido	Desconocido	Semilla
	P	3.047.951				
<i>At3g30160</i>	NP	-2.142.414	Desconocido	Desconocido	Endomembrana	Inflorescencia
	P	2.982.585				
<i>At3g47830</i>	NP	-1.545.177	Superfamilia de glicosilasas de DNA	Reparación de DNA	Desconocido	Desconocido
	P	2.944.518				
<i>At2g17080</i>	NP	-2.098.657	DUF241	Desconocido	Cloroplasto	Raíz
	P	2.925.778				
<i>At5g56740</i>	NP	-2.538.741	Acetiltransferasa de la histona H4 (HAC7)	Modificación de cromatina, acetilación de histonas	Núcleo	Inflorescencia
	P	2.816.778				
<i>At2g05710</i>	NP	-3.258.442	Aconitasa (ACO3)	Procesos metabólicos, ácido abscísico, cadmio, estrés oxidativo y por salinidad	Pared celular, cloroplasto, citosol, mitocondria, membrana plasmática	Inflorescencia
	P	2.635.277				
<i>At4g33250</i>	NP	-1.787.014	Factor eucarionte de inicio de la traducción 3K (eIF3K)	Regulación del inicio de la traducción	Intracelular	Inflorescencia
	P	2.587.417				
<i>At3g62630</i>	NP	-1.902.524	DUF1645	Desconocido	Desconocido	Inflorescencia
	P	2.341.149				
<i>At5g61430</i>	P	-1.841.136	NAC5	Regulación de la transcripción	Desconocido	Inflorescencia
	NP	2.314.377				
<i>At4g09740</i>	NP	-1.588.788	Glycosil-hidrolasa 9B14 (GH9B14)	Metabolismo de carbohidratos	Endomembrana	Inflorescencia
	P	2.277.257				
<i>At5g46660</i>	NP	-1.939.306	Proteína similar a la cinasa C con dedo de zinc	Desconocido	Desconocido	Inflorescencia
	P	2.230.663				
<i>At1g66310</i>	NP	-1.571.516	Proteína con dominios similares a F-box/RNI-like/FBD	Desconocido	Desconocido	Inflorescencia
	P	2.148.245				

<i>At5g04680</i>	NP	-2.223.525	Proteínas con la repetida Ankyrin	Desconocido	Desconocido	Inflorescencia, roseta
	P	2.137.576				
<i>At3g16750</i>	NP	-1.675.123	Desconocido	Desconocido	Desconocido	Inflorescencia, roseta
	P	2.104.560				
<i>At4g06746</i>	NP	-1.785.573	RAP2.9	Regulación de la transcripción	Núcleo	Desconocido
	P	2.075.933				
<i>At5g46870</i>	NP	-1.981.270	Familia de proteínas que se unen a RNA (RRM/RBD/RNP motivos)	Óxido-reducción	Desconocido	Desconocido
	P	2.074.465				
<i>At2g24255</i>	NP	-1.876.917	DUF295	Desconocido	Desconocido	Inflorescencia
	P	2.067.121				
<i>At1g77540</i>	NP	-1.680.218	Acetiltransferasa de las histonas H3/H4	Desconocido	Peroxisoma	Inflorescencia
	P	2.035.870				
<i>At2g16587</i>	NP	-2.105.544	Obsoleto			
	P	2.001.793				
<i>At1g74320</i>	NP	-1.605.135	Cinasa de colina	Desconocido	Desconocido	Inflorescencia
	P	1.995.300				
<i>At2g40980</i>	NP	-1.934.189	Superfamilia de proteínas cinasas	Desconocido	Membrana plasmática	Inflorescencia
	P	1.985.620				
<i>At5g42990</i>	NP	-1.947.571	Enzima conjugadora de ubiquitina 18 (UBC18)	Catabolismo de proteínas dependiente de ubiquitinación	Desconocido	Semilla
	P	1.962.867				
<i>At5g46320</i>	NP	-1.636.239	Proteína de la familia MADS-box	Desconocido	Desconocido	Inflorescencia, semilla
	P	1.944.284				
<i>At5g37000</i>	NP	-1.716.726	Familia de proteínas de exostosina	Desconocido	Endomembrana	Desconocido
	P	1.923.488				
<i>At5g58950</i>	NP	-1.552.318	Superfamilia de cinasa de proteínas (Ser/Thr/Ty)	Fosforilación de proteínas	Citosol, membrana plasmática	Inflorescencia
	P	1.906.344				
<i>At2g28430</i>	NP	-1.630.853	Desconocido	Desconocido	Desconocido	Roseta
	P	1.853.080				
<i>At5g34895</i>	NP	-1.842.650	Elemento transponible	Desconocido	Desconocido	Semilla
	P	1.847.307				
<i>At2g28600</i>	NP	-2.087.557	Proteína de la superfamilia de hidrolasas de nucleósido trifosfatos que contienen P-loop	Desconocido	Desconocido	Inflorescencia
	P	1.827.262				

<i>At2g27940</i>	NP	-1.980.991	Proteína que contiene RING/U-box	Desconocido	Desconocido	Semilla
	P	1.811.982				
<i>At1g68670</i>	NP	-1.831.687	Factor de transcripción similar a los de la familia Myb	Regulación de la transcripción	Núcleo	Roseta
	P	1.798.796				
<i>At4g16850</i>	NP	-2.202.095	Desconocido	Desconocido	Desconocido	Raíz
	P	1.786.194				
<i>At1g34070</i>	NP	-1.809.017	Retrotransposon	Desconocido	Desconocido	Semilla
	P	1.781.528				
<i>At5g15850</i>	NP	-2.044.311	Factor de transcripción similar a CONSTANS (COL1)	Regulación del desarrollo floral	Núcleo	Roseta
	P	1.716.399				
<i>At4g36420</i>	NP	-1.578.407	Proteína ribosomal de la familia L12	Traducción	Intracelular	Inflorescencia, raíz
	P	1.682.111				
<i>At3g57600</i>	NP	-2.521.353	Codifica a un factor de transcripción miembro de la subfamilia DREB y de la familia ERF/AP2	Regulación de la transcripción	Núcleo	Roseta
	P	1.680.785				
<i>At1g77815</i>	NP	-1.657.187	Polinucleotil transferasa, similar a la familia de ribonucleasas H	Desconocido	Desconocido	Desconocido
	P	1.665.614				
<i>At1g28250</i>	NP	-1.675.972	Desconocido	Desconocido	Desconocido	Inflorescencia, raíz
	P	1.661.507				
<i>At5g16260</i>	NP	-2.010.447	Proteína de unión a RNA Early Flowering 9 (ELF9)	Desarrollo floral, decaimiento de mRNAs	Núcleo	Inflorescencia
	P	1.645.528				
<i>At5g16280</i>	NP	-1.924.226	Similiar a la superfamilia de proteínas con un motivo repetido de tetratricopéptido (TPR)	Desconocido	Endomembrana	Inflorescencia
	P	1.626.150				
<i>At1g68800</i>	NP	-1.735.674	Codifica a un factor similar a los TCP, cercano a BRC2	Regulación de la transcripción, formación de raíces secundarias	Núcleo	Inflorescencia
	P	1.622.053				
<i>At5g41130</i>	NP	-2.335.224	Proteína de la familia de esterasas/lipasas/ tioesterasas	Proceso metabólico	Desconocido	Desconocido
	P	1.597.087				
<i>At5g40070</i>	NP	-1.869.780	Proteína de la familia MADS-box	Desconocido	Cloroplasto	Inflorescencia
	P	1.587.226				
<i>At3g58330</i>	NP	-2.090.172	Proteína de la familia de fosfolipasas (PEARLI 4)	Desconocido	Desconocido	Inflorescencia
	P	1.562.033				

<i>At1g12460</i>	NP	-1.733.917	Proteína de la familia de cinasas con repetidas ricas de leucina	Fosforilación de proteínas	Membrana plasmática	Inflorescencia
	P	1.561.872				
<i>At3g60580</i>	NP	-1.798.217	Proteína de la familia de dedo de Zinc (tipo C2H2)	Regulación de la transcripción	Núcleo	Inflorescencia
	P	1.537.458				
<i>At5g54110</i>	NP	-1.551.241	Proteína altamente polar con mas de 60% de residuos hidrofílicos, asociada con la membrana plasmática (MAMI)	Respuesta a estrés osmótico	Membrana plasmática	Inflorescencia
	P	1.514.329				
<i>At4g04790</i>	NP	-1.954.280	Similiar a la superfamilia de proteínas con un motivo repetido del tetratricopéptido (TPR)	Desconocido	Desconocido	Inflorescencia
	P	1.506.521				

^a Poliribosomas (P) y no-poliribosomas (NP) se obtuvieron mediante fraccionamiento de gradientes de sacarosa (20-60%) como se describe en la sección de Materiales y Métodos.

^b Usando el programa GeneArise se identificaron mRNAs distribuidos diferencialmente en las fracciones de *AteIF(iso)4E-1* considerando un z-score > 1.5 desviaciones tipo.

^c Los datos se obtuvieron de The Arabidopsis Resource Center (TAIR).

^d La estructura de la planta con el mayor nivel de mRNA reportado se consideró de acuerdo al AtGenexpress Visualization Tool (Schmid, M., Davison, T.S., Henz, S.R., et al., 2005, A gene expression map of Arabidopsis thaliana development, Nature Genetics 37: 501-506).

Referencias

- Agrawal, G. K. y Thelen, J. J.** (2009). A high-resolution two dimensional Gel- and Pro-Q DPS-based proteomics workflow for phosphoprotein identification and quantitative profiling. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, **527**, 3-19, ix.
- Bailey, T. L., Boden, M., Buske, F. A., Frith, M., Grant, C. E., Clementi, L., Ren, J., Li, W. W., y Noble, W. S.** (2009). MEME SUITE: tools for motif discovery and searching. *Nucleic Acids Research*, **37**, W202-8.
- Banko, J. L., Hou, L., Poulin, F., Sonenberg, Nahum, y Klann, E.** (2006). Regulation of eukaryotic initiation factor 4E by converging signaling pathways during metabotropic glutamate receptor-dependent long-term depression. *The Journal of Neuroscience*, **26**, 2167-73.
- Bechtold, N., Jaudeau, B., Jolivet, S., Maba, B., Vezon, D., Voisin, R., y Pelletier, G.** (2000). The maternal chromosome set is the target of the T-DNA in the in planta transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Genetics*, **155**, 1875-87.
- Besse, F. y Ephrussi, A.** (2008). Translational control of localized mRNAs: restricting protein synthesis in space and time. *Nature Reviews. Molecular cell biology*, **9**, 971-80.
- Bush, M. S., Hutchins, A. P., Jones, A. M. E., Naldrett, M. J., Jarmolowski, A., Lloyd, C. W., y Doonan, J. H.** (2009). Selective recruitment of proteins to 5' cap complexes during the growth cycle in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, **59**, 400-12.
- Carberry, S. E., Darzynkiewicz, E., y Goss, D. J.** (1991). A comparison of the binding of methylated cap analogues to wheat germ protein synthesis initiation factors 4F and (iso)4F. *Biochemistry*, **30**, 1624-7.
- Cho, P. F., Gamberi, C., Cho-Park, Y. A., Cho-Park, B., Lasko, P., y Sonenberg, Nahum** (2006). Cap-dependent translational inhibition establishes two opposing morphogen gradients in *drosophila* embryos. *Current Biology*, **16**, 2035-2041.
- Clemens, M. J. y Bommer, U. a** (1999). Translational control: the cancer connection. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, **31**, 1-23.
- Cohen, N, Sharma, M., Kentsis, a, Perez, J M, Strudwick, S., y Borden, K. L.** (2001). PML RING suppresses oncogenic transformation by reducing the affinity of eIF4E for mRNA. *The EMBO Journal*, **20**, 4547-59.
- Culjkovic, B., Topisirovic, I., y Borden, K. L. B.** (2007). Controlling gene expression through RNA regulons the role of the eukaryotic translation initiation factor eIF4E. *Cell Cycle*, **6**, 65-69.
- Culjkovic, B., Topisirovic, I., Skrabanek, L., Ruiz-Gutierrez, M., y Borden, K. L. B.** (2006). eIF4E is a central node of an RNA regulon that governs cellular proliferation. *The Journal of Cell Biology*, **175**, 415-26.
- Culjkovic, B., Topisirovic, I., Skrabanek, L., Ruiz-Gutierrez, M., y Borden, K. L. B.**

- (2005). eIF4E promotes nuclear export of cyclin D1 mRNAs via an element in the 3'UTR. *The Journal of Cell Biology*, **169**, 245-56.
- Cullen, B. R.** (2003). Nuclear RNA export. *Journal of Cell Science*, **116**, 587-597.
- Desfeux, C., Clough, S. J., y Bent, a F.** (2000). Female reproductive tissues are the primary target of Agrobacterium-mediated transformation by the Arabidopsis floral-dip method. *Plant Physiology*, **123**, 895-904.
- Dinkova, T., Aguilar, R., y Sánchez de Jiménez, E.** (2000). Expression of maize eukaryotic initiation factor (eIF) iso4E is regulated at the translational level. *The Biochemical Journal*, **351 Pt 3**, 825-31.
- Dinkova, T., Keiper, B. D., Nadejda, L., Aamodt, E. J., Rhoads, Robert E, y Korneeva, N. L.** (2005). Translation of a small subset of Caenorhabditis elegans mRNAs is dependent on a specific eukaryotic translation initiation factor 4E isoform. *Molecular and Cellular Biology*, **25**, 100-113.
- Dinkova, T. y Sánchez-de-Jiménez, E.** (1999). Differential expression and regulation of translation initiation factors -4E and -iso4E during maize germination. *Physiologia Plantarum*, **107**, 419-425.
- Duprat, A., Caranta, C., Revers, F., Menand, B., Browning, Karen S, y Robaglia, Christophe** (2002). The Arabidopsis eukaryotic initiation factor (iso)4E is dispensable for plant growth but required for susceptibility to potyviruses. *The Plant Journal*, **32**, 927-34.
- Earley, K. W., Haag, J. R., Pontes, O., Opper, K., Juehne, T., Song, K., y Pikaard, C. S.** (2006). Gateway-compatible vectors for plant functional genomics and proteomics. *The Plant Journal*, **45**, 616-29.
- Frederickson, R. M., Montine, K. S., y Sonenberg, N** (1991). Phosphorylation of eukaryotic translation initiation factor 4E is increased in Src-transformed cell lines. *Molecular and Cellular Biology*, **11**, 2896-900.
- Gebauer, F. y Hentze, M. W.** (2004). Molecular mechanisms of translational control. *Nature reviews. Molecular cell biology*, **5**, 827-35.
- Grens, A. y Scheffler, E.** (1990). The 5'- and 3'- untranslated regions of ornithine mRNA affect the translational efficiency decarboxylase. *Journal of Biological Chemistry*, **265**, 11610-11616.
- von der Haar, T., Gross, J. D., Wagner, G., y McCarthy, J. E. G.** (2004). The mRNA cap-binding protein eIF4E in post-transcriptional gene expression. *Nature structural & molecular biology*, **11**, 503-11.
- Hinnebusch, A. G.** (2005). Translational regulation of GCN4 and the general amino acid control of yeast. *Annual review of microbiology*, **59**, 407-50.
- Hoeffler, C. a, Cowansage, K. K., Arnold, E. C., Banko, J. L., Moerke, N. J., Rodriguez, R., Schmidt, E. K., Klosi, E., Chorev, M., Lloyd, R. E., et al.** (2011). Inhibition of the interactions between eukaryotic initiation factors 4E and 4G impairs

- long-term associative memory consolidation but not reconsolidation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **108**, 3383-8.
- Hoover, D. S., Wingett, D. G., Zhang, J., Reeves, R., y Magnuson, N. S.** (1997). Pim-1 protein expression is regulated by its 5'-untranslated region and translation initiation factor eIF-4E. *Cell Growth & Differentiation*, **8**, 1371-80.
- Humphreys, D. T., Westman, B. J., Martin, D. I. K., y Preiss, T.** (2005). MicroRNAs control translation initiation by inhibiting eukaryotic initiation factor 4E/cap and poly(A) tail function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102**, 16961-6.
- Iborra, F. J., Jackson, D. a, y Cook, P. R.** (2004). The case for nuclear translation. *Journal of Cell Science*, **117**, 5713-20.
- Jackson, R. J., Hellen, C. U. T., y Pestova, T. V.** (2010). The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nature reviews. Molecular cell biology*, **11**, 113-27.
- Joshi, B., Lee, K., Maeder, D. L., y Jagus, R.** (2005). Phylogenetic analysis of eIF4E-family members. *BMC evolutionary biology*, **5**, 48.
- Karplus, K, Barrett, C, y Hughey, R** (1998). Hidden Markov models for detecting remote protein homologies. *Bioinformatics (Oxford, England)*, **14**, 846-56.
- Karplus, Kevin, Karchin, R., Draper, J., Casper, J., Mandel-Gutfreund, Y., Diekhans, M., y Hughey, Richard** (2003). Combining local-structure, fold-recognition, and new fold methods for protein structure prediction. *Proteins*, **53 Suppl 6**, 491-6.
- Katzman, S., Barrett, Christian, Thiltgen, G., Karchin, R., y Karplus, Kevin** (2008). PREDICT-2ND: a tool for generalized protein local structure prediction. *Bioinformatics (Oxford, England)*, **24**, 2453-9.
- Kawaguchi, R. y Bailey-Serres, J.** (2002). Regulation of translational initiation in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, **5**, 460-465.
- Kiriakidou, M., Tan, G. S., Lamprinaki, S., De Planell-Saguer, M., Nelson, P. T., y Mourelatos, Z.** (2007). An mRNA m7G cap binding-like motif within human Ago2 represses translation. *Cell*, **129**, 1141-51.
- Klann, E., Antion, M. D., Banko, J. L., y Hou, L.** (2004). Synaptic plasticity and translation initiation. *Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, **11**, 365-72.
- Koromilas, a E., Lazaris-Karatzas, a, y Sonenberg, N** (1992). mRNAs containing extensive secondary structure in their 5' non-coding region translate efficiently in cells overexpressing initiation factor eIF-4E. *The EMBO Journal*, **11**, 4153-8.
- Larsson, O., Perlman, D. M., Fan, D., Reilly, C. S., Peterson, M., Dahlgren, C., Liang, Z., Li, S., Polunovsky, V. a, Wahlestedt, C., et al.** (2006). Apoptosis resistance downstream of eIF4E: posttranscriptional activation of an anti-apoptotic transcript carrying a consensus hairpin structure. *Nucleic Acids Research*, **34**, 4375-86.

- Martínez-Silva, A. V., Aguirre-Martínez, C., Flores-Tinoco, C. E., Alejandri-Ramírez, N. D., y Dinkova, T. D.** (2012). Translation Initiation Factor AtelF (iso) 4E Is Involved in Selective mRNA Translation in Arabidopsis Thaliana Seedlings. *PLoS one*, **7**.
- Miyoshi, H., Okade, H., Muto, S., Suehiro, N., Nakashima, H., Tomoo, K., y Natsuaki, T.** (2008). Turnip mosaic virus VPg interacts with Arabidopsis thaliana eIF(iso)4E and inhibits in vitro translation. *Biochimie*, **90**, 1427-34.
- Morley, S. J., Coldwell, M. J., y Clemens, M. J.** (2005). Initiation factor modifications in the preapoptotic phase. *Cell Death and Differentiation*, **12**, 571-84.
- Mèndez, R., Myers, M. G., White, M. F., y Rhoads, R E** (1996). Stimulation of protein synthesis, eukaryotic translation initiation factor 4E phosphorylation, and PHAS-I phosphorylation by insulin requires insulin receptor substrate 1 and phosphatidylinositol 3-kinase. *Molecular and Cellular Biology*, **16**, 2857-64.
- Ray, B. K., Brendler, T. G., Adya, S., Daniels-mcqueen, S., Miller, J. K., Hershey, J. W. B., Grifo, J. A., Merrick, W. C., y Thach, R. E.** (1983). Role of mRNA competition in regulating translation: Further characterization of mRNA discriminatory initiation factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **80**, 663-667.
- Rhoads, R.** (2009). eIF4E: new family members, new binding partners, new roles. *The Journal of Biological Chemistry*, **284**, 16711-5.
- Richter, J. D. y Sonenberg, Nahum** (2005). Regulation of cap-dependent translation by eIF4E inhibitory proteins. *Nature*, **433**, 477-80.
- Robaglia, Christophe y Caranta, C.** (2006). Translation initiation factors: a weak link in plant RNA virus infection. *Trends in Plant Science*, **11**, 40-5.
- Rodriguez, C. M., Freire, M. a, Camilleri, C., y 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**, 465-73.
- Rosenwald, I. B., Kaspar, R., Rousseau, D., Gehrke, L., Leboulch, P., Chen, J. J., Schmidt, E. V., Sonenberg, N, y London, I. M.** (1995). Eukaryotic translation initiation factor 4E regulates expression of cyclin D1 at transcriptional and post-transcriptional levels. *The Journal of Biological Chemistry*, **270**, 21176-80.
- Rousseau, D., Kaspar, R., Rosenwald, I., Gehrke, L., y Sonenberg, N** (1996). Translation initiation of ornithine decarboxylase and nucleocytoplasmic transport of cyclin D1 mRNA are increased in cells overexpressing eukaryotic initiation factor 4E. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **93**, 1065-70.
- Ruud, K. a, Kuhlman, C., Goss, D. J., y Browning, K S** (1998). Identification and characterization of a novel cap-binding protein from Arabidopsis thaliana. *The Journal of Biological Chemistry*, **273**, 10325-30.

- Sato, M., Nakahara, K., Yoshii, M., Ishikawa, M., y 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**, 1167-71.
- Sonenberg y Gingras, A.** (1998). The mRNA 5' cap-binding protein eIF4E and control of cell growth. *Current Opinion in Cell Biology*, **10**, 268-75.
- Sonenberg y Hinnebusch** (2009). Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets. *Cell*, **136**, 731-45.
- Topisirovic, I., Culjkovic, B., Cohen, Natalie, Perez, Jacqueline M, Skrabanek, L., y Borden, K. L. B.** (2003). The proline-rich homeodomain protein, PRH, is a tissue-specific inhibitor of eIF4E-dependent cyclin D1 mRNA transport and growth. *The EMBO Journal*, **22**, 689-703.
- Topisirovic, I., Kentsis, A., Perez, Jacqueline M, Guzman, M. L., Jordan, C. T., y Borden, K. L. B.** (2005). Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E Activity Is Modulated by HOXA9 at Multiple Levels Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E Activity Is Modulated by HOXA9 at Multiple Levels. *Molecular and Cellular Biology*, **25**, 1100-1112.
- Topisirovic, I., Siddiqui, N., Lapointe, V. L., Trost, M., Thibault, P., Bangeranye, C., Piñol-Roma, S., y Borden, K. L. B.** (2009). Molecular dissection of the eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E) export-competent RNP. *The EMBO Journal*, **28**, 1087-98.
- Topisirovic, I., Siddiqui, N., Orolicki, S., Skrabanek, L., Tremblay, M., Hoang, T., y Borden, K.** (2009). Stability of eukaryotic translation initiation factor 4E mRNA is regulated by HuR, and this activity is dysregulated in cancer. *Molecular and Cellular Biology*, **29**, 1152-62.
- Zhang, X., Henriques, R., Lin, S.-S., Niu, Q.-W., y Chua, N.-H.** (2006). Agrobacterium-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* using the floral dip method. *Nature protocols*, **1**, 641-6.

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

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

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

Abstract

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

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

Editor: Rajagopal Subramanyam, University of Hyderabad, India

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

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

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

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

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

Introduction

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Results

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

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

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

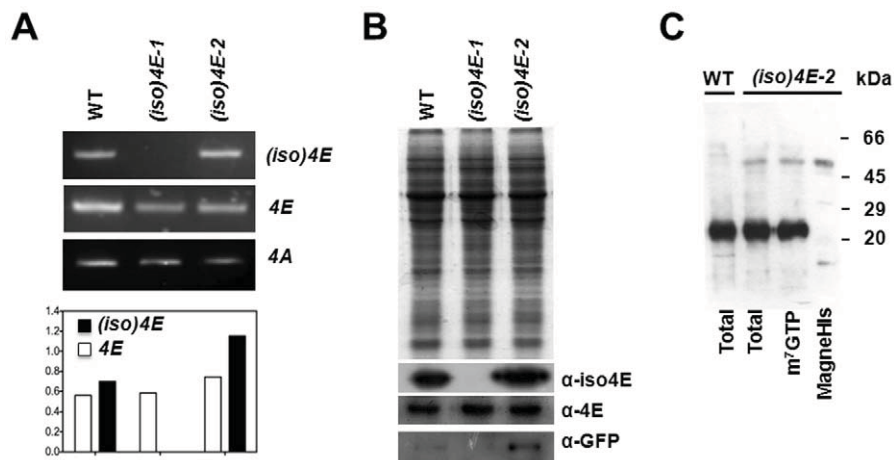


Figure 1. Molecular characterization of *AtEF(iso)4E* mutant plants. Plants from wild type Col-0 [WT], knockout [(*iso*)4E-1] and *35S:eIF(iso)4E:GFP* [(*iso*)4E-2] lines were grown on Gamborg's B5 media for 15 days and total RNA or proteins were extracted from whole seedlings. **A.** Amplification by RT-PCR indicates that *eIF(iso)4E* mRNA is absent in (*iso*)4E-1 and increased about 2 fold in (*iso*)4E-2, whereas *eIF4E* mRNA levels remained similar in all lines. The transcript level of *eIF4A* was used to correct for RNA loading. **B.** Fifty micrograms of total proteins extracted from 15 day-old Arabidopsis seedlings were separated by SDS-PAGE and immunoblotted against *eIF(iso)4E*, *eIF4E* and GFP using specific antibodies. The absence of a 22 kDa band corresponding to *eIF(iso)4E* is observed in the (*iso*)4E-1 mutant, whereas a 25 kDa band corresponding to *eIF4E* is increased. The detection of GFP indicates the presence of a 55 kDa band corresponding to the fusion protein *eIF(iso)4E-GFP* in the (*iso*)4E-2 transgenic line. **C.** Protein extracts from (*iso*)4E-2 15 day-old seedlings were subjected to m^7 GTP-Sepharose (GE Healthcare) or MagneHis system (Promega) purification. One fifth of the eluted proteins from each was separated by SDS-PAGE together with the total extracts from WT and (*iso*)4E-2 plants and immunoblotted against Arabidopsis *eIF(iso)4E*. A 55 kDa band corresponding to the *eIF(iso)4E-GFP* fusion carrying a C-terminal His tag was observed in (*iso*)4E-2 total extract, and the m^7 GTP- or MagneHis-purified fractions, but not in WT total extract. The 22 kDa band corresponding to native *eIF(iso)4E* was detected in WT and (*iso*)4E-2 total extracts, as well as in the m^7 GTP-bound fraction. doi:10.1371/journal.pone.0031606.g001

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

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

Previous reports describing (*iso*)4E-1 did not report any obvious phenotype in leaf development and morphology, plant size, flowering and fertility, inferring that the *eIF4E* protein is able to function in place of *eIF(iso)4E*. However, even though the two proteins belong to Class I and might perform partially redundant function, changes at the level of selective translation of mRNAs due to the lack of either cap-binding protein may not be ruled out [5,25,29]. The polyribosomal distribution of mRNAs in 15 day-old WT Col-0 and (*iso*)4E-1 mutant seedlings was analyzed using Arabidopsis Oligonucleotide Microarray slides obtained from the University of Arizona (29,000 oligonucleotides AROS V.3.0). The developmental stage was chosen on the basis of enriched *eIF(iso)4E* expression in actively growing tissues [19,30]. On the other hand, at the time of the microarray experiment design, proteomic data from *Arabidopsis thaliana* tissues were not available. The sedimentation profiles on 20–60% sucrose gradients [31] monitored at A_{260} indicated no global differences between wild type and (*iso*)4E-1 mutant plants (Figure S4). The fractions from each profile were pooled as non-polyribosomes (NP), containing free ribonucleoprotein complexes, ribosomal subunits 40 S/60 S, monosomes 80 S (fractions 1–5) or polyribosomes (P) containing two or more ribosomes (fractions 6–12). During translation, mRNAs that are initiated efficiently are found on polysomes, whereas a decrease in

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

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

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

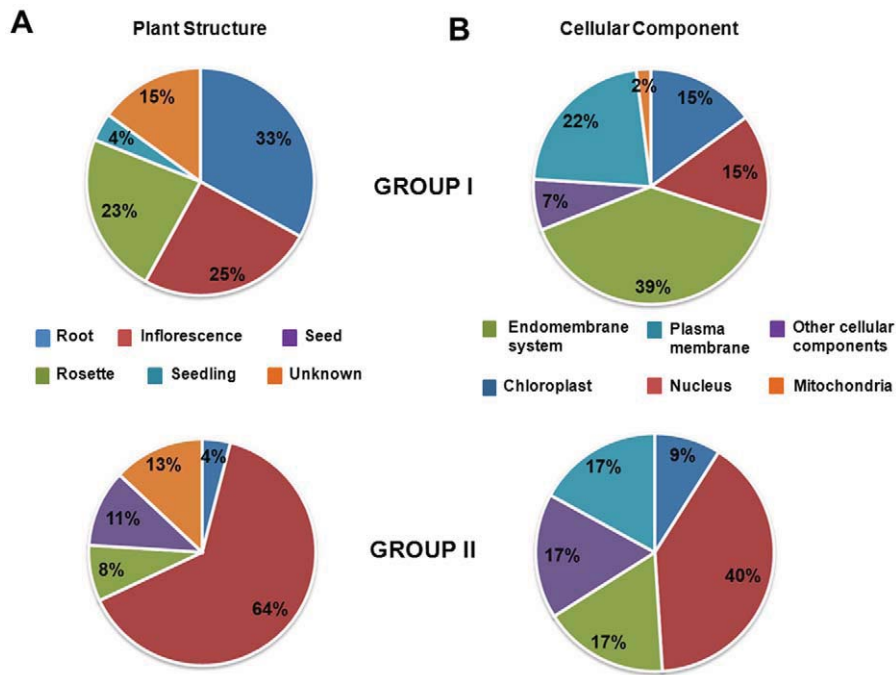


Figure 2. Transcripts differentially translated between WT and *(iso)4E-1* plants are enriched in genes with particular expression and sub-cellular localization patterns. Classification was made according to significant changes ($-1.5 > z\text{-score} > 1.5$) in both, NP and P, fractions obtained from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

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

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

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

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

Untranslated region features of group I and group II mRNAs

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

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

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

Accession	Function/Gene Name	Relative mRNA levels					Change
		T ^a	NP ^a	P ^a	NP ^b	P ^b	
At3g23430	Phosphate transport (<i>PHO1</i>)	0.59	1.58	-2.3	1.9	-15.8	Decrease
At4g02950	Ubiquitin family protein	-0.51	2.80	-2.2	-3.1	-6.8	Decrease
At4g20340	Transcription initiation factor (<i>TFIIIE</i>)	1.15	2.95	-2.8	1.0	-6.2	Decrease
At3g55580	Regulator of chromosome condensation, (<i>RCC1</i>)	0.65	2.5	-2.6	-2.6	-4.2	Decrease
At2g02860	Sucrose transporter 3 (<i>SUC3</i>)	0.97	1.6	-1.9	2.2	-3.4	Decrease
At2g30260	Component of the U2 snRNP complex (<i>U2B''</i>)	0.28	2.5	-2.6	5.6	-2.9	Decrease
At1g21630	Calcium ion binding, EF hand protein	-0.64	3.5	-2.6	3.2	-1.5	Decrease
At2g17630	Pyridoxal phosphate (PLP)-dependent transferase	1.25	2.5	-2.2	2.8	-1.4	Decrease
At1g78240	Tumorous shoot development 2 (<i>TSD2</i>)	0.88	1.6	-1.6	1.5	-1.0	Decrease
At2g27940	RING/U-box protein	-0.04	-1.98	1.8	-2.3	15.6	Increase
At2g28600	P-loop containing nucleoside tri-phosphate hydrolase	0.29	-2.09	1.8	-1.3	8.1	Increase
At1g68670	MYB-like transcription factor family	0.55	-1.8	1.8	1.7	4.3	Increase
At4g06746	Transcription factor ERF/AP2 DREB subfamily A-5 (<i>RAP2.9</i>)	1.63	-1.8	2.1	-1.9	1.9	Increase
At3g57600	Transcription factor ERF/AP2 DREB subfamily A-2 (<i>ERF/AP2</i>)	<i>n.d.</i>	-2.5	1.7	-1.5	1.9	Increase
At2g05710	Aconitase (<i>ACO3</i>)	-1.95	-3.2	2.6	-13.3	1.8	Increase
At5g61430	NAC domain containing protein (<i>NAC5</i>)	1.92	-1.8	2.3	-4.9	1.7	Increase
At1g6880	Transcription factor (<i>BRC2</i>)	-0.7	-1.7	1.6	-11.6	1.5	Increase
At4g18720	Transcription factor IIS protein	0.96	-2.7	3.2	-4.3	1.4	Increase
At5g15850	Transcription factor, constans-like 1 (<i>COL1</i>)	<i>n.d.</i>	-2.0	1.7	-2.2	1.3	Increase
At4g33250	Eukaryotic translation initiation factor 3 K (<i>EIF3K</i>)	<i>n.d.</i>	-1.8	2.6	5.1	4.9	Increase
At5g15630	Cobra-like4 (<i>COBL4</i>)	1.57	2.8	-1.6	6.2	1.4	<i>I.c.</i>
At5g01840	Ovate family protein 1 (<i>OFP1</i>)	0.59	3.6	-2.8	2.3	5.1	<i>I.c.</i>
At1g64580	Pentatricopeptide repeat-containing protein (<i>PPR</i>)	0.86	1.6	-2.0	2.7	6.3	<i>I.c.</i>

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

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

n.d.: not detected.

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

doi:10.1371/journal.pone.0031606.t001

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

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

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

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

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

doi:10.1371/journal.pone.0031606.t002

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

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

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

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

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

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

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

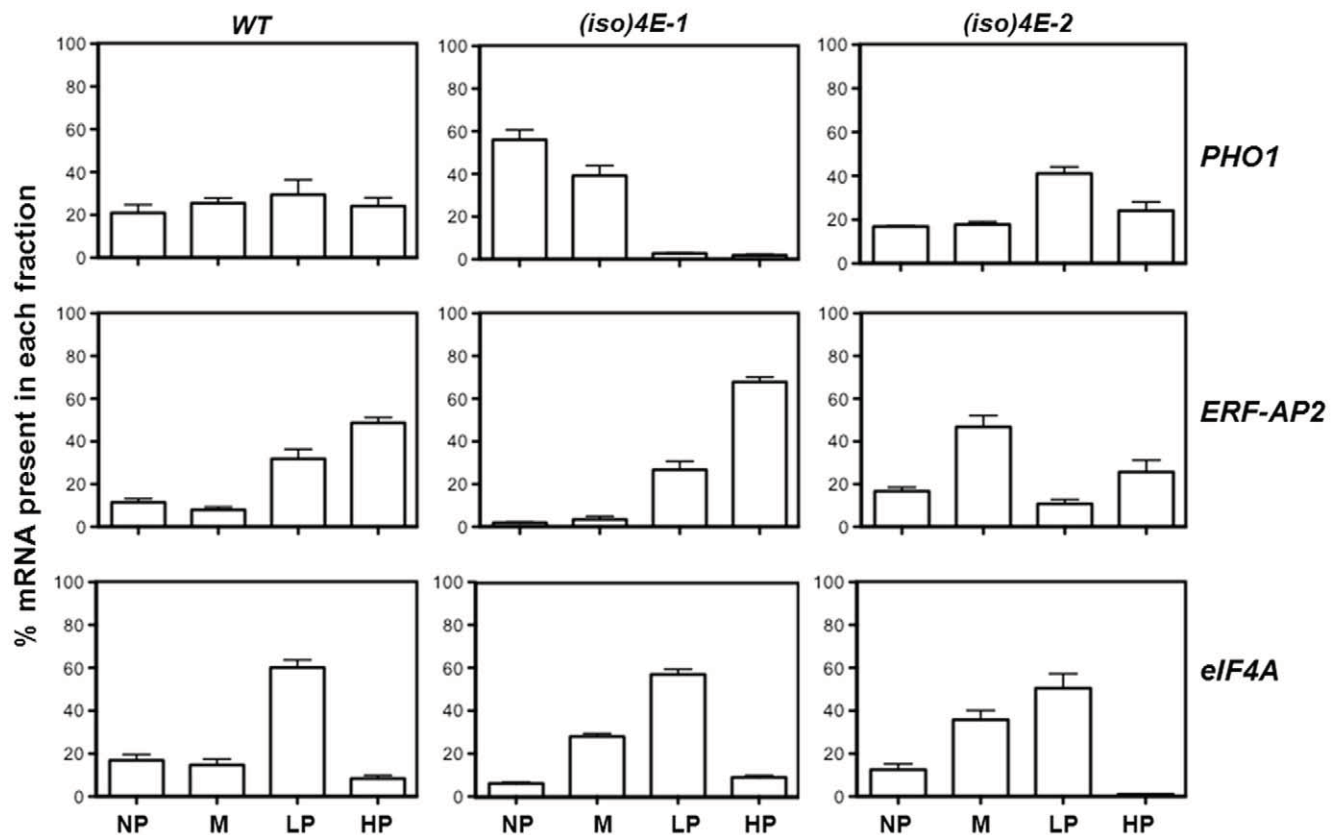


Figure 3. Specific mRNAs show preferential recruitment to polyribosomes depending on eIF(iso)4E levels. The polyribosomal distribution of selected mRNAs was analyzed in the WT, knockout [*(iso)4E-1*] and overexpressing [*(iso)4E-2*] lines at the 15 day-old seedling stage by qRT-PCR. The percentage of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

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

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

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

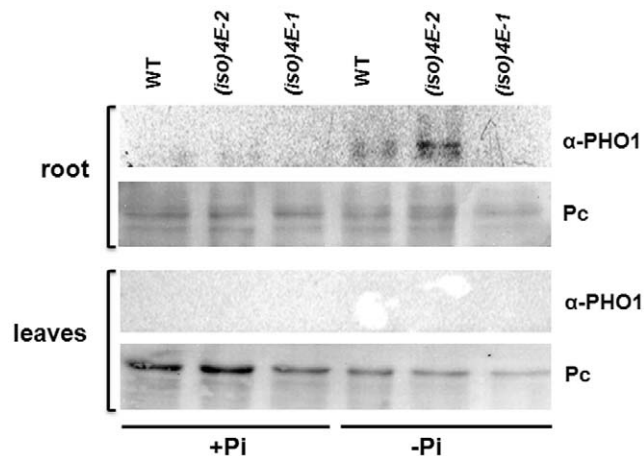


Figure 4. Western blot analysis of *PHO1* protein levels in seedlings grown under phosphate sufficiency (+Pi) or deficiency (–Pi). One week -old seedlings from WT, *(iso)4E-1* and *(iso)4E-2* lines were transferred to liquid medium containing 1 mM (+Pi) or 10 µM (–Pi) phosphate and grown for an additional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

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

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

Discussion

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

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

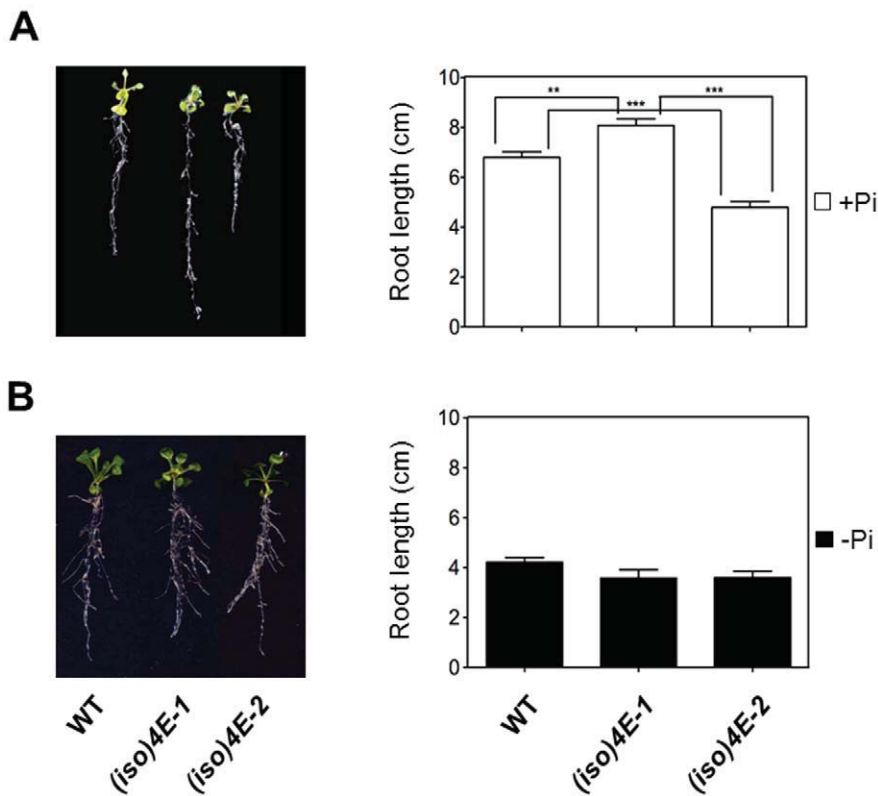


Figure 5. The eIF(iso)4E absence or overexpression is associated with root length alteration in *Arabidopsis thaliana*. Plants from wild type Col-0 [WT], knockout [(iso)4E-1] and overexpressing [(iso)4E-2] lines were grown on Gamborg's B5 for 15 days and then transferred for 10 days to Hoagland medium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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Methods

Plant materials

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

Growth conditions

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

Plants used for protein analysis were grown for one week in a medium containing half-strength Murashige-Schoog (MS), 1% sucrose and 0.6% gellan. Then, seedlings were transferred to a liquid medium containing 1% sucrose, 2.5 mM KNO_3 , 100 μM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 1 mM MgSO_4 , 25 μM Fe-EDTA, 14 μM MnCl_2 , 0.5 μM CuSO_4 , 1 μM ZnSO_4 , 70 μM H_3BO_3 , 0.2 μM NaMoO_4 and 10 μM NaCl (final pH 5.7) supplemented with either 1 mM (+ P_i) or 10 μM ($-P_i$) KH_2PO_4 .

For root phenotype studies, seeds were grown in Gamborg's B5 solid medium for two weeks and afterwards transferred to Hoagland medium containing 6 mM KNO_3 , 4 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 2 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.009 mM $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.046 mM H_3BO_3 , 0.0008 mM $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.0003 mM $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.0001 mM $\text{H}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.005 g/ml Fe-EDTA and 0.5 mM $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ as a phosphate source (+ P_i), or Hoagland medium including all of the above except for the 0.5 mM $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ which was substituted by 0.5 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ($-P_i$) for 10 days.

Root length analysis

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

Protein extraction and Western blot analysis

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

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

Polyribosomal Gradients

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

RNA isolation

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

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

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

Microarrays

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

Data acquisition and analysis of array images

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

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

Quantitative real time PCR (qRT-PCR)

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

UTR analysis

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

Supporting Information

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

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

Figure S3 GFP localization in transgenic plants. (PDF)

References

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

Figure S4 Sucrose gradient sedimentation profiles. (PDF)

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

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

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

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

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

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

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

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

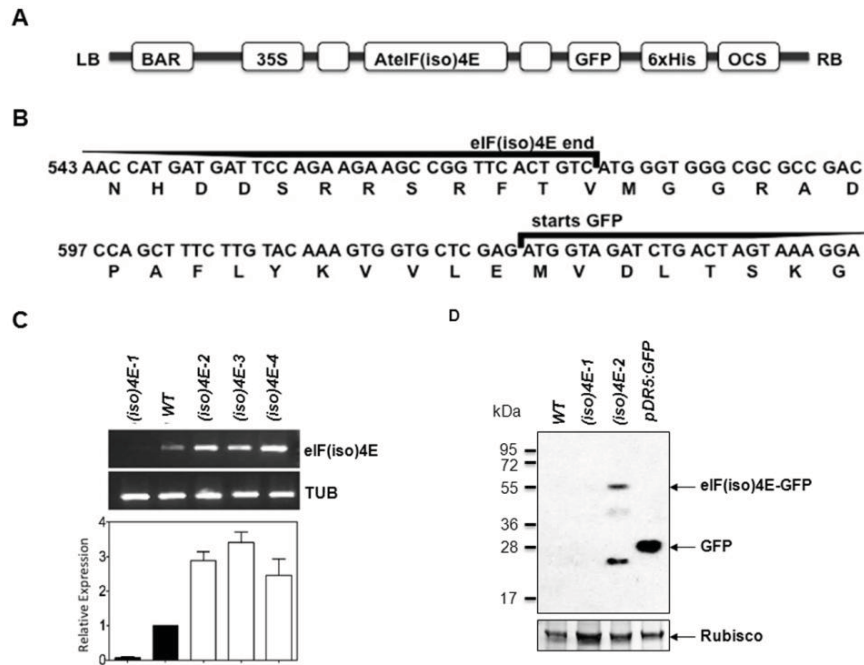
Acknowledgments

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

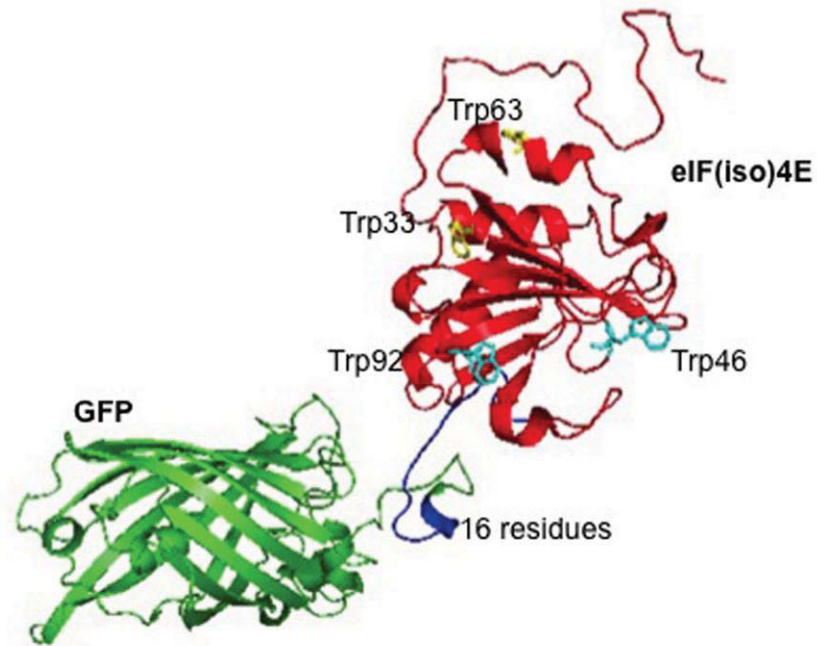
Author Contributions

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

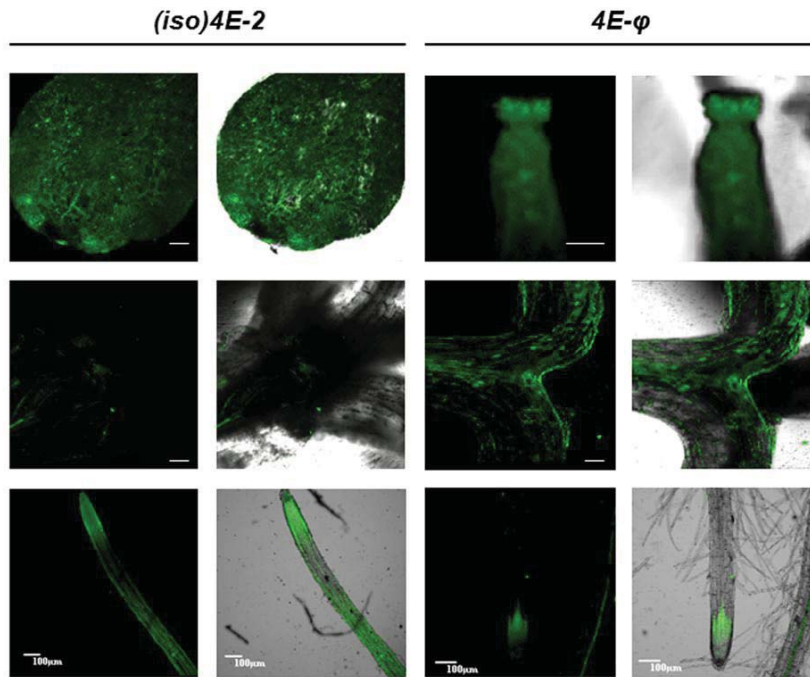
6. Kaye NM, Emmett KJ, Merrick WC, Jankowsky E (2009) Intrinsic RNA binding by the eukaryotic initiation factor 4F depends on a minimal RNA length but not on the m7G cap. *J Biol Chem* 284: 17742–17750.
7. Rhoads RE (2009) eIF4E: New Family Members, New Binding Partners, New Roles. *J Biol Chem* 284: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



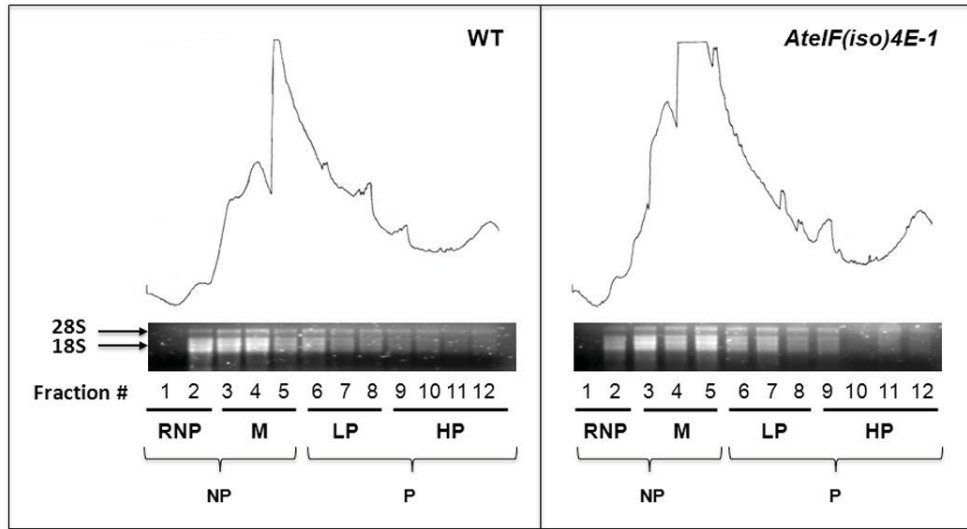
Supplementary Fig. S1: Molecular characterization of eIF(iso)4E overexpressing *Arabidopsis thaliana* transgenic plants. **(A)** Diagram of the construction bearing AteIF(iso)4E fused to GFP under the constitutive CaMV 35S promoter. LB, left border; BAR, glufosinate ammonium (BASTA) resistance gene; 6xHIS, histidine tag; OCS, octopine synthase transcription terminator; RB, right border. **(B)** Amino acid sequence of the above construct at the fusion site between eIF(iso)4E and GFP proteins. **(C)** Overexpression of the eIF(iso)4E transcript was measured by final point RT-PCR in three independent transgenic lines generated with the above construct: *(iso)4E-2*, *(iso)4E-3* and *(iso)4E-4*. The left panel indicates relative expression levels by densitometry in each transgenic line considering WT as 1. Tubulin (TUB) was used as internal control for RNA loading. The results represent three independent experiments. **(D)** Detection of proteins reacting against GFP antiserum. Total proteins were extracted from the lines used in this study as well as from a line expressing GFP alone under the auxin-responsive promoter DR5 (pDR5:GFP) as control. A 55 kDa band corresponding to the eIF(iso)4E-GFP fusion is seen only for *(iso)4E-2*, whereas a 28 kDa band corresponding to GFP is detected in pDR5:GFP. Two lower migrating bands also reacting with the antiserum are observed in the *(iso)4E-2* line suggesting that proteolysis may occur at some degree for the fusion protein.



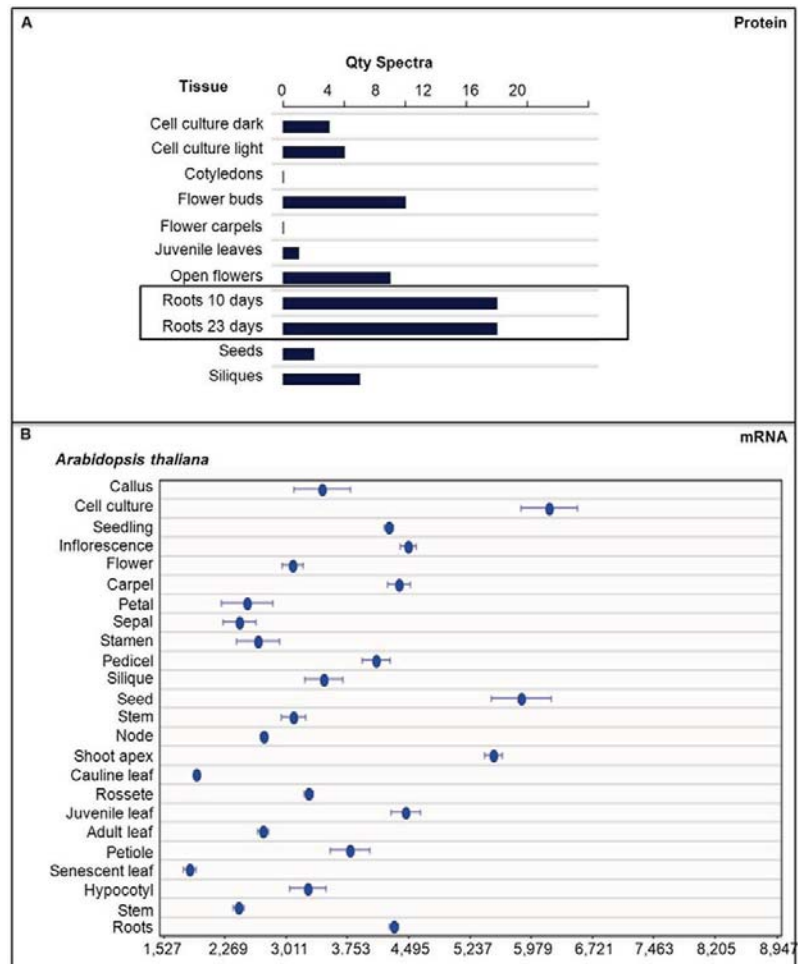
Supplementary Fig. S2 Protein structural modeling of eIF(iso)4E-GFP. The structure was modeled using the SAM-T08 server. Frontal views are shown with eIF(iso)4E in red, GFP in green and the amino acid sequence between the two fused proteins in blue. The residues Trp46, Trp92 involved in cap-binding are shown in cyan, and Trp33, Trp63 involved in eIF(iso)4G interaction in yellow. Amino acid numbering is from *Arabidopsis thaliana* eIF(iso)4E.



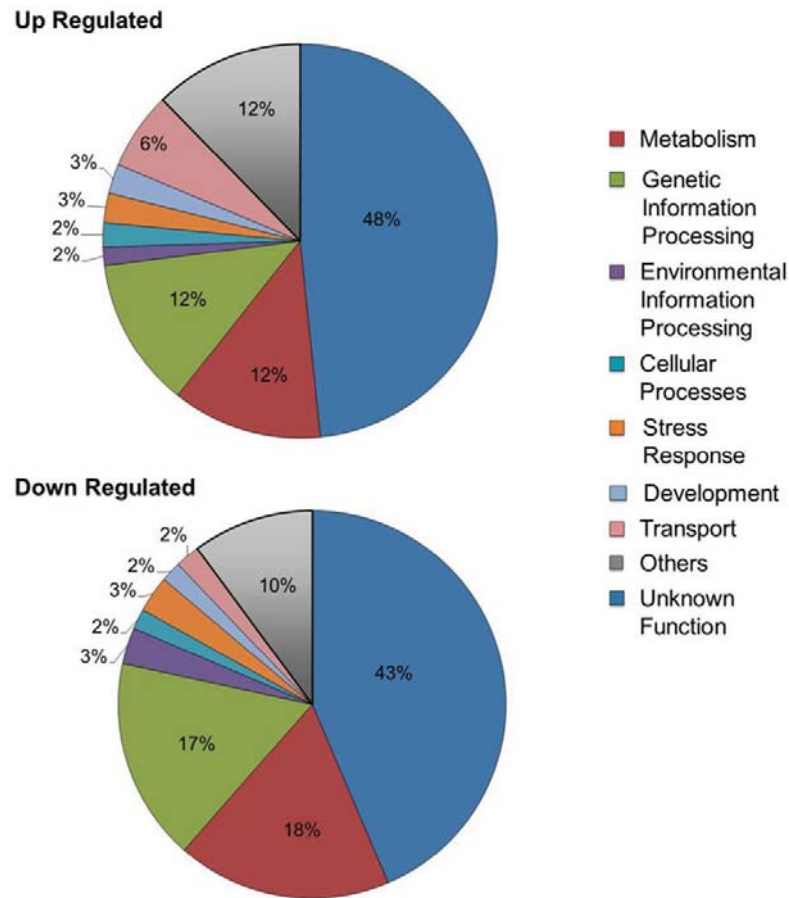
Supplementary Fig. S3 The GFP fusion versions of eIF(iso)4E [*(iso)4E-2*] and eIF4E [*4E-φ*] expressed under the CaMV 35S promoter were observed in the tissues of 15 days-old seedlings, such as leaves, roots and aerial meristem. In addition, eIF4E-GFP detection is shown in pistil (upper panel). Images compiled from Z confocal microscopy are shown with white bars indicating 100 μm .



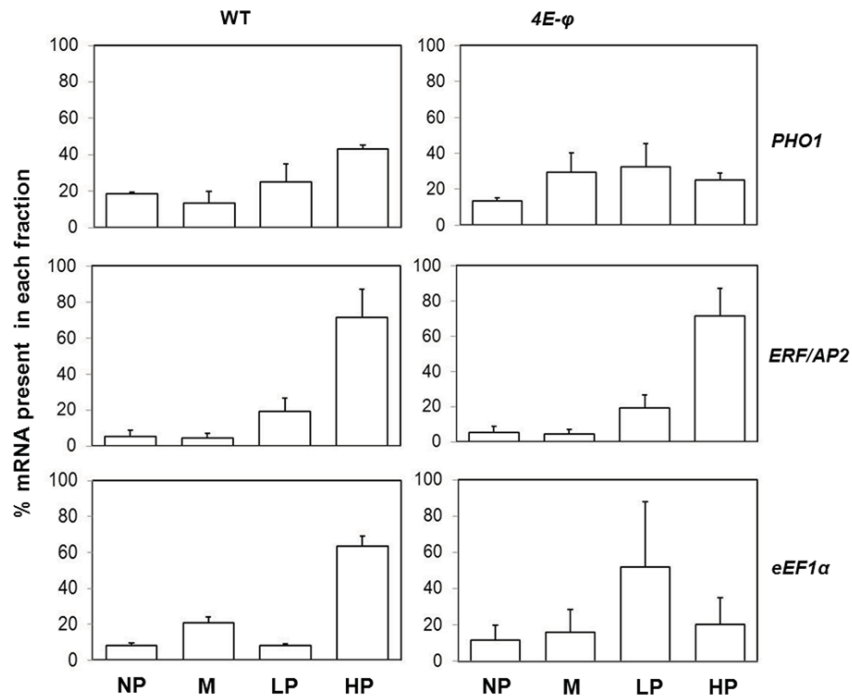
Supplementary Fig. S4 Sucrose gradient sedimentation profiles. Ribosomal fractions from *Arabidopsis thaliana* wild type (WT) and mutant [*(iso)4E-1*] 15 day-old whole seedlings were fractionated on 20-60% sucrose gradients. One milliliter fractions were collected with continuous monitoring of Absorbance at 260 nm (solid line). Each fraction was analyzed by agarose electrophoresis to detect the ribosomal RNA 28S and 18S integrity. Fractions 1-5 were considered as non-polyribosomal (NP) and 6-12 as polyribosomal (P). For some experiments, NP were pooled as free RNP (fractions 1, 2) and monosomes (M; fractions 3-5), whereas polysomes were pooled as low polysomes (LP; fractions 6-8) and high polysomes (HP; fractions 9-12).



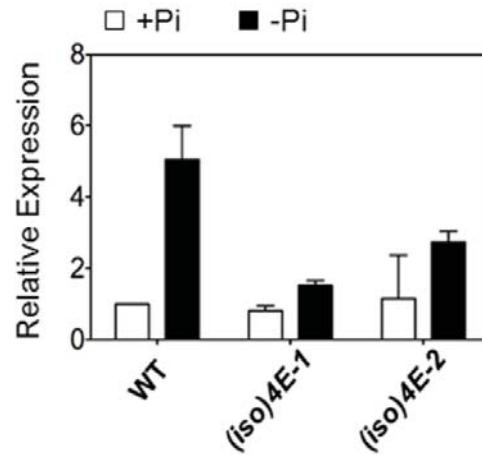
Supplementary Fig. S5 eIF(iso)4E expression patterns in different *Arabidopsis thaliana* tissues and developmental stages. **(A)** According to the AtProteome site (Baerenfaller, et al., 2008), the eIF(iso)4E protein is more abundant in roots of 10 and 23 days old plants. **(B)** According to the microarray data available at Genevestigator (Hruz et al., 2008), the *eIF(iso)4E* mRNA is expressed in most tissues, with greater abundance cell culture, mature seed and shoot apex. Noticeably, the mRNA expression pattern does not overlap with the protein abundance of this protein.



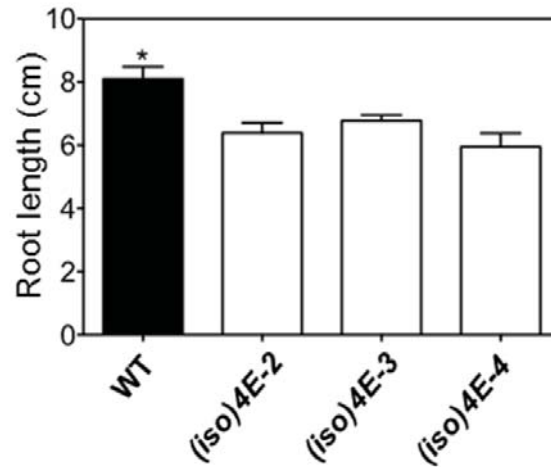
Supplementary Fig. S6 Classification of transcripts significantly changed at steady-state level in the *(iso)4E-1* mutant according to the biological process where they are involved. Total RNA extracted from 15 day-old whole seedlings was used for a Microarray analysis to detect genes significantly changed in their transcription in the *(iso)4E-1* mutant. The threshold for significant changes was a z-score of 2 either up or down. The analysis revealed 496 genes up regulated in *(iso)4E-1* mutant plants, whereas 296 were repressed. According to the reported gene ontology (GO) for Biological Process, a great proportion of genes with unknown function appeared changed, followed by a major group of genes related to metabolism or genetic information processing.



Supplementary Fig. S7 Polyribosomal distribution of selected mRNAs in an eIF4E overexpressing [4E-φ] transgenic line. Ribosomal fractionation on sucrose density gradients (20-60%) was performed for *Arabidopsis thaliana* wild type (WT) and mutant [4E-φ] 15 day-old whole seedlings. The percentage of mRNA found in free RNP (NP), monosomes (M), low polyribosomes (LP) and high polyribosomes (HP), collected according to Supplementary figure S4, was calculated by qRT-PCR as described in Materials and Methods. Translation elongation factor *eIF1α* was used as control mRNA. The data represent average of two independent replicates and bars indicate the standard error.



Supplementary Fig. S8 Increase in *PHO1* transcript level in response to phosphate deficiency. Plants were grown for 15 days in Gamborg's B5 liquid medium and transferred to Hoagland medium containing phosphate (+Pi, white columns) or without phosphate (-Pi, black columns) for 10 days. Total RNA was obtained, DNase treated and assayed by qRT-PCR using as internal control the 18S rRNA gene. Data are shown as the mean of three independent experiments with three replicates each. Bars represent standard error.



Supplementary Fig. S9 Primary root length in three independent transgenic Arabidopsis lines overexpressing eIF(iso)4E. Wild type (WT) and transgenic *(iso)4E-2*, *(iso)4E-3* and *(iso)4E-4* plants were grown for 21 days on Hoagland solid medium placed vertically in growth chamber. Each plant was carefully removed from the medium and measured for primary root length as described in Materials and methods. Data are shown as the mean of 5 independent experiments with 5 plants per experiment. Bars indicate the standard error. One way ANOVA with Tukey's Multiple Comparison Test using a p value < 0.05 was used for statistical analysis. Significant differences between WT and all three transgenic lines overexpressing eIF(iso)4E are indicated by asterisk.

Table S1. Oligonucleotide sequences used in real time PCR experiments (qRT-PCR)

Gene ID	Other Name	Forward	Reverse	Product length (bp)
<i>At1g21630</i>		CACAACAGGGTTCATTGAGCCAG	AGGTGGACCAGAAGCCGCAC	104
<i>At1g64580</i>		TTCTGATTCATTGTTTCTGCCGATG	CGTTGAGGAGAGAGCCAAGAGTGAC	73
<i>At1g68670</i>		TCGGAAGGAGTTATCTGGTACGACG	AAGACAGGACCACCACAAACTTG	84
<i>At1g68800</i>	BRC2	AGGCGAGCAAGACGATTGAATG	CCTTCTCTCTCCTCCGATGC	96
<i>At1g78240</i>	TSD2	CCATTCCCGACTTACCCGAGAAC	TCCCTCTGGACGAAGCAATCG	138
<i>At2g02860</i>	SUC3	CGCAATCGTTATTCCCCAGATG	AAGCAGCAACAGACGCCAAAAC	107
<i>At2g03710</i>	AGL3	CCTTCTCTACCCAGACAGCGTGG	CACCCCATCCAGCAACTCCC	80
<i>At2g17630</i>		AACCCAACACCATCAACCTCACC	AATGCGGCTGGACCTGCG	121
<i>At2g27940</i>		TTCCGCCACTTCGCAGACAG	CCTGAGAATCAAGACCCCTCCG	148
<i>At2g28600</i>		ATGGCGAAAGGAGACGATAATGTG	ATGGCGGCGATACGAGCAG	107
<i>At2g30260</i>	U2B"	CCCAACGACCAAACACGGC	TCGGCTGGAACGAAGGCG	84
<i>At3g23430</i>	PHO1	CCAAACACAGCGTTGCGTTACC	GAGGCTCGGAGGATGAGGTGG	101
<i>At3g55580</i>	RCC1	CAGTCTGACAACATTGACCTCTCGG	GTATGACGACCACCAGCAGCAAC	95
<i>At3g57600</i>	ERF/AP2	TGGAAGAAGGGTCCTGCTCGG	CAAGTCCTTTGCCTGACTCCACG	80
<i>At4g06746</i>	RAP2.9	GTTCATACAAAACCGCCGTTGC	TGAGTCTCGCCGAAGGACCAC	81
<i>At4g18720</i>	TEF-R	AGCGAGACAAAGTGCGTGAGATTC	CCACAGATACAGCCACAACCCAAG	123
<i>At4g20340</i>	TFIIE	AGCCGTTTGTCAAGCTGGTGAG	TCTAACCATTGCCGCTCG	149
<i>At4g33250</i>	EIF3K	CCAGACTTCAGCCTTTGCCTCTTC	CCAGAACTGTTGGAACCTCCCAG	117
<i>At5g01840</i>	OFP1	GGAACCGTCTTCGTACCGAG	ACCTGTTTCTGTGGTAGTGCTGTGCG	80
<i>At5g15630</i>	COBL4	CGGCAGATGGCTATGTGGCTAC	TGTCCAACCTAATGTCCAACCAGG	89
<i>At5g15850</i>	COL1	ATGCTGCCAATCGTCTTGCTTC	TGCGGAATGAATCTCTGAATCACAG	137
<i>At5g61430</i>	NAC5	CCTGCTTCTCCAACCAAACGG	AATCCTGTGAAAAATGTCGGCTTG	101

Table S2. mRNAs shifted from polyribosomes towards non-polyribosomes in *(iso)4E-1* 15 day-old seedlings.

Gene ID	Fraction ^a	Zscore ^b	Function/Gene name ^c	Biological Process ^c	Cellular Component ^c	Plant structure ^d
<i>At1g52940</i>	P	-2.856.419	Purple acid phosphatase 5 (PAP5)	Unknown	Unknown	Inflorescence
	NP	4.008.580				
<i>At5g01840</i>	P	-2.832.152	Member of the plant-specific ovate family protein (OFP1)	Regulation of unidimensional cell growth	Cytoskeleton, nucleolus	Root
	NP	3.645.499				
<i>At1g11300</i>	P	-2.760.778	Protein Serine/Threonine kinase	Protein phosphorylation	Endomembrane system	Inflorescence
	NP	1.536.855				
<i>At4g20340</i>	P	-2.758.056	Transcription initiation factor TFIIE, alpha subunit	RNA polymerase II directed transcription	Endomembrane system	Unknown
	NP	2.952.168				
<i>At4g02465</i>	P	-2.744.616	Unknown protein	Unknown	Unknown	Unknown
	NP	2.094.202				
<i>At4g24490</i>	P	-2.679.040	RAB geranylgeranyl transferase alpha subunit 1 (RGTA1)	Response to cadmium ion	Unknown	Root
	NP	2.840.810				
<i>At1g21630</i>	P	-2.633.983	Calcium ion binding, EF hand family protein	Unknown	Cytosol, plasma membrane	Rosette
	NP	3.550.155				
<i>At3g55580</i>	P	-2.579.383	Regulator of chromosome condensation, (RCC1) family protein	Unknown	Unknown	Root
	NP	2.510.298				
<i>At2g30260</i>	P	-2.567.622	component of the U2 snRNP complex (U2B")	Cis assembly of pre-catalytic spliceosome	Cajal body, cytoplasm, nucleoplasm	Root
	NP	2.542.680				
<i>At5g22610</i>	P	-2.520.831	F-box/RNI-like/FBD-like domains-containing protein	Unknown	Unknown	Unknown
	NP	2.157.099				
<i>At5g48740</i>	P	-2.490.928	Leucine-rich repeat protein kinase family protein	Protein phosphorylation	Endomembrane system	Root
	NP	2.051.598				
<i>At1g50220</i>	P	-2.448.991	Unknown protein	Unknown	Unknown	Unknown
	NP	2.508.035				
<i>At1g12570</i>	P	-2.394.780	Glucose-methanol-choline (GMC)	Alcohol metabolic	Endomembrane	Rosette

	NP	1.757.340	oxidoreductase family protein	process, electron transport	system	
<i>At1g07280</i>	P	-2.372.525	Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily protein	Unknown	Chloroplast	Rosette
	NP	1.986.108				
<i>At1g29700</i>	P	-2.333.855	Metallo-hydrolase/oxidoreductase superfamily protein	Unknown	Chloroplast	Rosette
	NP	2.782.488				
<i>At3g23430</i>	P	-2.324.267	mutant is deficient in the transfer of phosphate from root epidermal and cortical cells to the xylem (PHO1)	cellular response to phosphate starvation, phosphate transport	Integral to the membrane	Root
	NP	1.583.184				
<i>At5g02800</i>	P	-2.308.138	Protein kinase (Serine/Threonine) family protein	Protein phosphorylation	Unknown	Rosette
	NP	3.191.886				
<i>At5g11280</i>	P	-2.240.252	Unknown protein	Unknown	Unknown	Root
	NP	2.047.710				
<i>At5g50590</i>	P	-2.222.029	Encodes a putative hydroxysteroid dehydrogenase (HSD4)	Metabolic process, oxidation-reduction process	Endomembrane system	Root
	NP	2.213.526				
<i>At1g05550</i>	P	-2.183.651	Protein of unknown function (DUF295)	Unknown	Unknown	Rosette
	NP	2.213.054				
<i>At1g68480</i>	P	-2.177.591	Encodes a putative zinc finger transcription factor (JAG)	Abaxial cell fate specification, flower development	Nucleus	Inflorescence
	NP	1.515.466				
<i>At4g02950</i>	P	-2.159.562	Ubiquitin family protein	Protein modification	Unknown	Inflorescence
	NP	2.802.140				
<i>At2g17630</i>	P	-2.157.554	Pyridoxal phosphate (PLP)-dependent transferases superfamily protein	Response to cadmium ion	Chloroplast	Root
	NP	2.505.533				
<i>At5g48140</i>	P	-2.086.828	Pectin lyase-like superfamily protein	Carbohydrate metabolic process	Endomembrane system	Inflorescence
	NP	2.921.912				
<i>At1g22885</i>	P	-2.075.976	Unknown protein	Unknown	Endomembrane system	Rosette
	NP	2.036.507				
<i>At5g19630</i>	P	-2.055.451	alpha/beta-Hydrolases superfamily protein	Unknown	Unknown	Root
	NP	1.908.328				
<i>At1g64580</i>	NP	-2.034.944	Pentatricopeptide repeat (PPR)	Unknown	Unknown	Rosette

	P	1.578.590	superfamily protein			
<i>At1g64330</i>	P	-2.032.722	Myosin heavy chain-related	Unknown	Vacuolar membrane, vacuole	Root
	NP	2.169.154				
<i>At2g07680</i>	P	-2.008.768	Multidrug resistance-associated protein 11 (MRP11)	Transport	Plasma membrane	Root
	NP	1.673.276				
<i>At3g44785</i>	P	-2.004.434	Zinc finger C-x8-C-x5-C-x3-H type family protein	Unknown	Nucleus	Unknown
	NP	1.593.863				
<i>At2g20590</i>	P	-1.982.197	Reticulon family protein	Unknown	Endoplasmic reticulum	Unknown
	NP	2.689.850				
<i>At3g22250</i>	P	-1.978.017	UDP-glycosyl transferase superfamily protein	Metabolic process	Unknown	Inflorescence
	NP	1.686.238				
<i>At1g21020</i>	P	-1.975.634	Transposable element gene, similar to Ulp1 protease family protein	Unknown	Unknown	Inflorescence
	NP	3.302.254				
<i>At1g04650</i>	P	-1.970.616	Unknown protein	Unknown	Unknown	Inflorescence
	NP	3.135.925				
<i>At1g03100</i>	P	-1.966.563	Pentatricopeptide repeat (PPR) superfamily protein	Unknown	Unknown	Inflorescence
	NP	1.818.271				
<i>At2g02860</i>	P	-1.948.161	Sucrose transporter in sieve elements and sink tissues. Sucrose transporter 3 (SUC3)	Response to wounding, sucrose transport	Plasma membrane	Root
	NP	1.612.801				
<i>At1g07390</i>	P	-1.924.124	Receptor like protein 1 (RLP1)	Signal transduction	Unknown	Inflorescence
	NP	2.541.153				
<i>At1g08610</i>	P	-1.879.840	Pentatricopeptide repeat (PPR) superfamily protein	Unknown	Unknown	Rosette
	NP	1.531.292				
<i>At4g09280</i>	P	-1.873.907	Transposable element gene; similar to Ulp1 protease family protein	Unknown	Unknown	Unknown
	NP	2.515.281				
<i>At5g44410</i>	P	-1.873.764	FAD-binding Berberine family protein	Electron transport, oxidation-reduction process	Endomembrane system	Root
	NP	3.821.529				
<i>At3g19130</i>	P	-1.869.365	RNA-binding protein 47B (RBP47B)	Unknown	Unknown	Root
	NP	1.565.215				

<i>At2g24762</i>	P	-1.853.583	Member of the GDU (glutamine dumper) family proteins involved in amino acid export (GDU4)	Regulation of amino acid export	Unknown	Root
	NP	1.771.616				
<i>At4g04220</i>	P	-1.839.983	Receptor like protein 46 (RLP46)	Defense response, signal transduction	Endomembrane system	Rosette
	NP	1.925.787				
<i>At2g20270</i>	P	-1.838.934	Thioredoxin superfamily protein	Electron transport, cell redox homeostasis	Chloroplast	Rosette
	NP	1.784.900				
<i>At1g64185</i>	P	-1.838.622	Lactoylglutathione lyase / glyoxalase I family protein	Metabolic process	Unknown	Inflorescence
	NP	2.239.101				
<i>At3g49000</i>	P	-1.818.054	RNA polymerase III subunit RPC82 family protein	Transcription	Endomembrane system	Inflorescence
	NP	1.509.432				
<i>At4g31310</i>	P	-1.800.673	AIG2-like (avirulence induced gene) family protein	Unknown	Unknown	Rosette
	NP	1.910.589				
<i>At1g63290</i>	P	-1.782.392	Aldolase-type TIM barrel family protein	Carbohydrate metabolic process	Endomembrane system	Seedling
	NP	1.976.152				
<i>At3g20950</i>	P	-1.774.474	Cytochrome P450, family 705, subfamily A, polypeptide 32 (CYP705A32)	Electron transport	Endomembrane system	Inflorescence
	NP	1.859.443				
<i>At4g01925</i>	P	-1.763.523	Cysteine/Histidine-rich C1 domain family protein	Unknown	Unknown	Unknown
	NP	1.642.617				
<i>At5g20510</i>	P	-1.762.377	Member of the Alfin-Like family (AL5), binds to H3K4 di or trimethylated	Regulation of transcription	Nucleus	Rosette
	NP	1.598.593				
<i>At5g23300</i>	P	-1.737.886	Dihydroorotate dehydrogenase, catalyses the fourth step of pyrimidine biosynthesis (PYRD)	pyrimidine ribonucleotide biosynthetic process	Mitochondrion, plastid	Inflorescence
	NP	2.508.113				
<i>At4g26190</i>	P	-1.721.274	Haloacid dehalogenase-like hydrolase (HAD) superfamily protein	Unknown	Unknown	Inflorescence
	NP	3.194.047				
<i>At4g31970</i>	P	-1.716.411	Cytochrome P450, family 82, subfamily C, polypeptide 2 (CYP82C2)	Electron transport, oxidation-reduction process	Endomembrane system	Root
	NP	2.102.280				
<i>At4g08455</i>	P	-1.712.692	BTB/POZ domain-containing protein	Unknown	Unknown	Unknown
	NP	2.225.747				

<i>At1g21310</i>	P	-1.704.186	Encodes extensin 3 (EXT3)	Plant-type cell wall organization	Endomembrane system	Root
	NP	1.904.038				
<i>At4g01570</i>	P	-1.703.545	Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily protein	Unknown	Unknown	Root
	NP	2.020.663				
<i>At2g40560</i>	P	-1.703.451	Protein kinase (Serine/Threonine) superfamily protein	Protein phosphorylation	Unknown	Unknown
	NP	3.181.962				
<i>At3g13175</i>	P	-1.698.878	Unknown protein	Unknown	Endomembrane system	Inflorescence
	NP	1.783.530				
<i>At1g66040</i>	P	-1.694.406	Predicted as a protein with N-terminal PHD domain and two RING domains surrounding an SRA domain (ORTH/VIM)	Unknown	Unknown	Root
	NP	3.165.143				
<i>At2g42350</i>	P	-1.669.320	RING/U-box superfamily protein	Unknown	Unknown	Root
	NP	2.696.397				
<i>At2g22750</i>	P	-1.660.457	basic helix-loop-helix (bHLH) DNA-binding superfamily protein	Regulation of transcription	Nucleus	Root
	NP	3.586.507				
<i>At3g04950</i>	P	-1.656.873	Unknown protein	Unknown	Unknown	Inflorescence
	NP	1.557.073				
<i>At1g21990</i>	P	-1.652.637	F-box/RNI-like/FBD-like domains-containing protein	Unknown	Unknown	Unknown
	NP	1.748.356				
<i>At5g15630</i>	P	-1.642.701	Member of the COBRA family, similar to phytochelatin synthetase	Secondary cell wall biogenesis	Plasma and vacuolar membrane	Seedling
	NP	2.859.030				
<i>At1g53290</i>	P	-1.634.323	Galactosyltransferase family protein	Protein glycosylation	Membrane	Seedling
	NP	3.033.373				
<i>At1g17480</i>	P	-1.621.719	IQ-domain (IQD7), calmodulin binding	Unknown	Unknown	Root
	NP	1.826.055				
<i>At1g19020</i>	P	-1.613.449	Unknown protein	Response to oxidative stress	Unknown	Rosette
	NP	1.565.207				
<i>At3g14560</i>	P	-1.607.103	Unknown protein	Unknown	Unknown	Inflorescence
	NP	1.868.781				
<i>At3g57990</i>	P	-1.598.408	Unknown protein	Unknown	Unknown	Rosette

	NP	1.746.236				
<i>At1g74640</i>	P	-1.586.131	Alpha/beta-Hydrolases superfamily protein	Unknown	Chloroplast	Rosette
	NP	2.856.396				
<i>At3g55920</i>	P	-1.581.875	Cyclophilin-like peptidyl-prolyl cis-trans isomerase family protein	Protein folding	Plasma membrane	Inflorescence
	NP	1.984.927				
<i>At4g14805</i>	P	-1.578.871	Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin superfamily protein	Unknown	Anchored to membrane	Unknown
	NP	1.619.084				
<i>At3g63470</i>	P	-1.570.200	Serine carboxypeptidase (SCPL40)	Proteolysis	Endomembrane system	Root
	NP	2.485.057				
<i>At1g48520</i>	P	-1.569.089	Glu-tRNA(Gln) amidotransferase subunit B (GATB)	glutamyl-tRNA aminoacylation, translation	Chloroplast	Rosette
	NP	3.277.840				
<i>At1g80910</i>	P	-1.552.809	Protein of unknown function (DUF1712)	Unknown	Unknown	Root
	NP	1.707.097				
<i>At1g78240</i>	P	-1.550.465	Tumorous shoot development 2 (TSD2)	Homogalacturonan biosynthetic process, root and shoot development	Golgi apparatus	Root
	NP	1.604.572				
<i>At1g63380</i>	P	-1.548.097	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein	metabolic process, oxidation-reduction	Unknown	Rosette
	NP	2.528.263				
<i>At2g24360</i>	P	-1.534.877	Protein kinase (Serine/Threonine/Tyrosine) superfamily	Protein phosphorylation	Plasma Membrane	Inflorescence
	NP	1.709.761				

^a Polyribosomes (P) and non-polyribosomes (NP) were obtained by sucrose gradient (20-60%) fractionation as described in Materials and methods and shown in Figure S4.

^b The GeneArise software identified differentially distributed mRNAs in *AteIF(iso)4E-1* fractions considering a z-score > 1.5 standard deviations.

^c Data were taken from The Arabidopsis Resource Center (TAIR).

^d The plant structure reported with the higher mRNA level was considered according to the AtGenexpress Visualization Tool (Schmid, M., Davison, T.S., Henz, S.R., et al., 2005, A gene expression map of Arabidopsis thaliana development, Nature Genetics 37: 501-506).

Table S3. mRNAs shifted from non-polyribosomes towards polyribosomes in the *(iso)4E-1* 15 day-old seedlings.

Gene ID	Fraction ^a	Zscore ^b	Function/Gene name ^c	Biological Process ^c	Cellular Component ^c	Plant structure ^d
<i>At4g18720</i>	NP	-2.673.546	Transcription factor IIS protein	Transcription	Nucleus	Inflorescence, Seed
	P	3.161.070				
<i>At1g51000</i>	NP	-2.230.721	Unknown protein	Unknown	Unknown	Seed
	P	3.047.951				
<i>At3g30160</i>	NP	-2.142.414	Unknown protein	Unknown	Endomembrane system	Inflorescence
	P	2.982.585				
<i>At3g47830</i>	NP	-1.545.177	DNA glycosylase superfamily protein	DNA repair, base-excision repair	Unknown	Unknown
	P	2.944.518				
<i>At2g17080</i>	NP	-2.098.657	Arabidopsis protein of unknown function (DUF241)	Unknown	Chloroplast	Root
	P	2.925.778				
<i>At5g56740</i>	NP	-2.538.741	H4 Histone acetyltransferase (HAC7)	Chromatin modification, histone acetylation	Nucleus	Inflorescence
	P	2.816.778				
<i>At2g05710</i>	NP	-3.258.442	Aconitase (ACO3)	Metabolic process, abscisic acid, cadmium ion, oxidative stress, salt stress	Cell wall, chloroplast, cytosol, mitochondrion, plasma membrane	Inflorescence
	P	2.635.277				
<i>At4g33250</i>	NP	-1.787.014	Eukaryotic translation initiation factor 3K (eIF3K)	Regulation of translational initiation	Intracellular	Inflorescence
	P	2.587.417				
<i>At3g62630</i>	NP	-1.902.524	Protein of unknown function (DUF1645)	Unknown	Unknown	Inflorescence
	P	2.341.149				
<i>At5g61430</i>	P	-1.841.136	NAC domain containing protein (NAC5)	Transcription regulation	Unknown	Inflorescence
	NP	2.314.377				
<i>At4g09740</i>	NP	-1.588.788	glycosyl hydrolase 9B14 (GH9B14)	Carbohydrate metabolism	Endomembrane system	Inflorescence
	P	2.277.257				

<i>At5g46660</i>	NP	-1.939.306	Protein kinase C-like zinc finger protein	Unknown	Unknown	Inflorescence
	P	2.230.663				
<i>At1g66310</i>	NP	-1.571.516	F-box/RNI-like/FBD-like domains-containing protein	Unknown	Unknown	Inflorescence
	P	2.148.245				
<i>At5g04680</i>	NP	-2.223.525	Ankyrin repeat family protein	Unknown	Unknown	Inflorescence, Rosette
	P	2.137.576				
<i>At3g16750</i>	NP	-1.675.123	Unknown protein	Unknown	Unknown	Inflorescence, Rosette
	P	2.104.560				
<i>At4g06746</i>	NP	-1.785.573	Encodes a member of the DREB subfamily A-5 of ERF/AP2 transcription factor family (RAP2.9)	Transcription regulation	Nucleus	Unknown
	P	2.075.933				
<i>At5g46870</i>	NP	-1.981.270	RNA-binding (RRM/RBD/RNP motifs) family protein	Oxidation-reduction	Unknown	Unknown
	P	2.074.465				
<i>At2g24255</i>	NP	-1.876.917	Protein of unknown function (DUF295)	Unknown	Unknown	Inflorescence
	P	2.067.121				
<i>At1g77540</i>	NP	-1.680.218	H3/H4 Histone acetyltransferase	Unknown	Peroxisome	Inflorescence
	P	2.035.870				
<i>At2g16587</i>	NP	-2.105.544	Expressed protein (Obsolete)			
	P	2.001.793				
<i>At1g74320</i>	NP	-1.605.135	Choline kinase	Unknown	Unknown	Inflorescence
	P	1.995.300				
<i>At2g40980</i>	NP	-1.934.189	Protein kinase superfamily protein	Unknown	Plasma membrane	Inflorescence
	P	1.985.620				
<i>At5g42990</i>	NP	-1.947.571	Ubiquitin-conjugating enzyme 18 (UBC18)	Ubiquitin-dependent protein catabolic process	Unknown	Seed
	P	1.962.867				
<i>At5g46320</i>	NP	-1.636.239	MADS-box family	Unknown	Unknown	Inflorescence,

	P	1.944.284	protein			Seed
<i>At5g37000</i>	NP	-1.716.726	Exostosin family protein	Unknown	Endomembrane system	Unknown
	P	1.923.488				
<i>At5g58950</i>	NP	-1.552.318	Protein kinase (Serine/Threonine/Tyrosine) superfamily protein	Protein phosphorylation	Cytosol, plasma membrane	Inflorescence
	P	1.906.344				
<i>At2g28430</i>	NP	-1.630.853	Unknown protein	Unknown	Unknown	Rosette
	P	1.853.080				
<i>At5g34895</i>	NP	-1.842.650	Transposable element gene; similar to heat shock protein binding	Unknown	Unknown	Seed
	P	1.847.307				
<i>At2g28600</i>	NP	-2.087.557	P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein	Unknown	Unknown	Inflorescence
	P	1.827.262				
<i>At2g27940</i>	NP	-1.980.991	RING/U-box superfamily protein	Unknown	Unknown	Seed
	P	1.811.982				
<i>At1g68670</i>	NP	-1.831.687	Myb-like transcription factor family protein	Regulation of transcription	Nucleus	Rosette
	P	1.798.796				
<i>At4g16850</i>	NP	-2.202.095	Unknown protein	Unknown	Unknown	Root
	P	1.786.194				
<i>At1g34070</i>	NP	-1.809.017	Retrotransposon gag protein	Unknown	Unknown	Seed
	P	1.781.528				
<i>At5g15850</i>	NP	-2.044.311	Transcription factor, constans-like 1 (COL1)	Regulation of flower development	Nucleus	Rosette
	P	1.716.399				
<i>At4g36420</i>	NP	-1.578.407	Ribosomal protein L12 family protein	Translation	Intracellular	Inflorescence, Root
	P	1.682.111				
<i>At3g57600</i>	NP	-2.521.353	Encodes a member of the DREB subfamily A-2 of	Transcription regulation	Nucleus	Rosette
	P	1.680.785				

			ERF/AP2 transcription factor family			
<i>At1g77815</i>	NP	-1.657.187	Polynucleotidyl transferase, ribonuclease H-like superfamily protein	Unknown	Unknown	Unknown
	P	1.665.614				
<i>At1g28250</i>	NP	-1.675.972	Unknown protein	Unknown	Unknown	Inflorescence, Root
	P	1.661.507				
<i>At5g16260</i>	NP	-2.010.447	RNA binding protein Early Flowering 9 (ELF9)	Flower development, mRNA nonsense-mediated decay	Nucleus	Inflorescence
	P	1.645.528				
<i>At5g16280</i>	NP	-1.924.226	Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily protein	Unknown	Endomembrane system	Inflorescence
	P	1.626.150				
<i>At1g68800</i>	NP	-1.735.674	Encodes a TCP transcription factor, closely related to teosinte branched1 (BRC2)	Transcription regulation, secondary shoot formation	Nucleus	Inflorescence
	P	1.622.053				
<i>At5g41130</i>	NP	-2.335.224	Esterase/lipase/thioesterase family protein	Metabolic process	Unknown	Unknown
	P	1.597.087				
<i>At5g40070</i>	NP	-1.869.780	MADS-box family protein	Unknown	Chloroplast	Inflorescence
	P	1.587.226				
<i>At3g58330</i>	NP	-2.090.172	Phospholipase-like protein (PEARLI 4) family	Unknown	Unknown	Inflorescence
	P	1.562.033				
<i>At1g12460</i>	NP	-1.733.917	Leucine-rich repeat protein kinase family protein	Protein phosphorylation	Plasma membrane	Inflorescence
	P	1.561.872				
<i>At3g60580</i>	NP	-1.798.217	Zinc finger (C2H2 type) family protein	Transcription regulation	Nucleus	Inflorescence
	P	1.537.458				

<i>At5g54110</i>	NP	-1.551.241	Highly polar protein with more than 60% hydrophilic amino acid residues, associated with the plasma membrane (MAMI)	Response to osmotic stress	Plasma membrane	Inflorescence
	P	1.514.329				
<i>At4g04790</i>	NP	-1.954.280	Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily protein	Unknown	Unknown	Inflorescence
	P	1.506.521				

^a Polyribosomes (P) and non-polyribosomes (NP) were obtained by sucrose gradient (20-60%) fractionation as described in Materials and methods and shown in Figure S4.

^b The GeneArise software identified differentially distributed mRNAs in *AteIF(iso)4E-1* fractions considering a z-score > 1.5 standard deviations.

^c Data were taken from The Arabidopsis Resource Center (TAIR).

^d The plant structure reported with the higher mRNA level was considered according to the AtGenexpress Visualization Tool (Schmid, M., Davison, T.S., Henz, S.R., et al., 2005, A gene expression map of Arabidopsis thaliana development, Nature Genetics 37: 501-506).