



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

**“CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y FENOTÍPICA DE PLANTAS DE
Arabidopsis thaliana, MUTANTES DE LA PROTEÍNA nCBP, EN
CONDICIONES DE ESTRÉS”.**

TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA:
JOSÉ ABRAHAM LEÓN DOMÍNGUEZ

MÉXICO, D.F. 2016





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor: Jorge Vázquez Ramos**
VOCAL: **Profesor: Eleazar Martínez Barajas**
SECRETARIO: **Profesor: Tzvetanka Dimitrova Dinkova**
1er. SUPLENTE: **Profesor: Samuel Canizales Quinteros**
2° SUPLENTE: **Profesor: José Ignacio Páramo Ramírez**

LABORATORIO 103 DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA.
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.

ASESOR DEL TEMA:

Dra. Tzvetanka Dimitrova Dinkova

SUPERVISOR TÉCNICO:

SUSTENTANTE:

José Abraham León Domínguez

ÍNDICE

I. Abreviaturas usadas en el texto	6
1. Resumen	7
2. Introducción	8
2.1 Metabolismo del RNA	9
2.2 El factor de inicio eucariótico 4E	12
2.3 Funciones de eIF4E en el metabolismo del RNA	13
2.3.1 Exporte nuclear de mensajeros	13
2.3.2 Papel de eIF4E y eIFiso4E en infecciones virales	14
2.4 Múltiples miembros de la familia eIF4E	15
2.4.1 Los factores tipo eIF4E en plantas	17
2.5 Ciclo de vida de <i>Arabidopsis thaliana</i>	18
2.5.1 Desarrollo vegetativo	18
2.5.2 Desarrollo reproductivo	20
2.5.3 Senescencia y muerte	21
2.5.3.1 Senescencia de la hoja	22
3. Antecedentes	
3.1 Proteína novedosa de unión al cap, nCBP, en <i>Arabidopsis thaliana</i>	25
3.2 Función de proteínas ortólogas de nCBP en otros organismos	26
3.3 Función de nCBP en <i>Arabidopsis thaliana</i>	28
4. Hipótesis	31
5. Objetivos	31
5.1 Objetivo general	31
5.2 Objetivos particulares	31
6. Materiales y métodos	32

6.1	Material biológico	32
6.2	Obtención de ácidos nucleicos	32
6.2.1	Extracción de DNA genómico	32
6.2.2	Extracción de RNA total	33
6.2.3	Cuantificación de ácidos nucleicos	34
6.3	RT-PCR	34
6.4	Caracterización fenotípica	37
6.4.1	Caracterización en condiciones normales de crecimiento	37
6.4.2	Caracterización en condiciones de estrés	38
6.4.2.1	Esterilización y siembra de semillas	38
6.5	Inducción de senescencia	39
6.5.1	Inducción de senescencia en plantas por oscuridad	39
6.6	Medición de muerte celular	40
6.6.1	Tinción con azul de Evans	40
7.	Resultados	41
7.1	Caracterización molecular de plantas silvestres (WT) y mutantes (<i>ncbp-1d</i>)	41
7.2	Caracterización fenotípica de plantas mutantes <i>ncbp-1d</i>	42
7.2.1	Fase vegetativa	43
7.2.2	Fase reproductiva	45
7.2.3	Senescencia y muerte	50
7.3	Participación de nCBP en respuesta a estrés osmótico	53
8.	Discusión	58
8.1	Papel de nCBP en el desarrollo de <i>Arabidopsis thaliana</i>	58
8.2	Papel de nCBP en senescencia inducida por oscuridad	60
8.3	La ausencia de nCBP afecta el desarrollo de raíz en estrés	62
9.	Conclusiones.	64
10.	Perspectivas.	65
11.	Bibliografía.	66

I. ABREVIATURAS

Las abreviaturas usadas en el texto se han puesto de acuerdo a su escritura en inglés.

3'UTR	Región no traducible 3'
5'UTR	Región no traducible 5'
7mGTP	7-metilguanósina-trifosfato o análogo del 5'cap
4E-T	Proteína transportadora de eIF4E
DEPC	Dietilpírocarbonato, inactivador de RNAsas
eIF4E	Factor de inicio eucariótico 4E
nCBC	Complejo nuclear de unión al cap
nCBP	Novedosa proteína de unión al cap
<i>ncbp-1d</i>	Alelo mutante nulo de nCBP de <i>Arabidopsis thaliana</i>
NMD	Vía de degradación de mensajeros sin sentido (no codificantes)
PABP	Proteína de unión a poli(A)
PBs	Cuerpos de procesamiento
SAGs	Genes asociados a senescencia
SGs	Gránulos de estrés
VPg	Proteína unida covalentemente al genoma viral
WT	Tipo silvestre

1. RESUMEN

Uno de los puntos de mayor regulación en la síntesis de proteínas es la etapa inicial del proceso, en la que diversos mecanismos de control traduccional pueden actuar para prevenir la síntesis de proteínas aberrantes. Uno de estos mecanismos involucra el factor de inicio de la traducción eIF4E, indispensable para el reconocimiento del 5' cap y el posterior reclutamiento de la maquinaria traduccional. En plantas superiores existen tres miembros pertenecientes a la familia de proteínas eIF4E; eIF4E, eIFiso4E y la proteína novedosa de unión a Cap, nCBP. Diversos estudios de caracterización de nCBP han mostrado que esta proteína es capaz de interactuar con los factores eIF4G y eIF(iso)4G y llevar a cabo la traducción *in vitro* en ausencia de eIF4E y eIF(iso)4E, aunque a niveles menores que estos. Su ausencia en *Arabidopsis thaliana* se ha asociado con retraso en el tiempo de la floración con respecto a plantas silvestres, mientras que su sobreexpresión induce la formación de gránulos citoplasmáticos, cuya identidad aún no ha sido elucidada. Mediante ensayos de "Pull down" se descubrió que las proteínas asociadas a nCBP poseen una función en el desarrollo de la planta en condiciones de estrés, lo que sugiere una posible participación de nCBP en la regulación de la traducción ante estímulos ambientales no favorables. De tal manera, el propósito del presente trabajo fue estudiar la participación de nCBP en el desarrollo de *Arabidopsis thaliana* en condiciones normales y de estrés. Para el estudio se utilizó la línea *ncbp-1d*, mutante nula de la proteína, y se comparó con plantas silvestres en condiciones normales de desarrollo y en presencia de estrés abiótico. Durante el desarrollo se observaron diferencias significativas para las plantas mutantes en cuanto a retraso en floración (previamente reportado) y mayor producción de hojas de roseta, caulinares, inflorescencias y silicuas (en este trabajo). Por otra parte, durante la inducción de senescencia por oscuridad (un estímulo de estrés externo) se encontró una mayor expresión del gen asociado a senescencia SAG12 en ausencia de nCBP. Finalmente, en presencia de estrés osmótico se observó que las plántulas mutantes presentan una menor longitud de raíz, comparadas con silvestres. Estos resultados indican que la proteína nCBP, además de tener una función en procesos de desarrollo y floración, participa en la respuesta de *Arabidopsis thaliana* bajo condiciones de estrés.

2. INTRODUCCIÓN

La principal función de la regulación de la expresión génica en eucariontes es mantener el adecuado metabolismo del RNA, desde el procesamiento del transcrito nascente en el núcleo (mediante la remoción de los intrones y la adición de la cola de poli-A) hasta el transporte al citoplasma, donde las proteínas unidas al RNA determinarán el programa funcional que desempeñará (Eulalio *et al.*, 2007). En este sentido, muchos de los mensajeros son programados para una inmediata traducción, un proceso que involucra el remodelamiento de las proteínas unidas y el ensamblaje en polisomas. Puede ocurrir también que el mensajero no sea traducido de manera inmediata y mantenerse así en un estado traduccionalmente reprimido, siendo transportado a localizaciones citoplasmáticas específicas donde, dependiendo de las condiciones ambientales y/o de desarrollo, permitan activar su traducción o dictar de manera irreversible su degradación (Anderson and Kedersha, 2006). En cualquiera de los dos escenarios mantener la estabilidad del mRNA es un proceso indispensable, un mecanismo que depende de manera crucial de la formación de complejos proteína-RNA. Por ejemplo, durante la traducción activa los mensajeros son protegidos de la degradación por proteínas que previenen el acceso de ribonucleasas a ambos extremos del mRNA, por un lado la proteína de unión a cap eIF4E protege el extremo 5'UTR mientras que proteínas de unión a la cola de poli(A) protegen el extremo 3'UTR (Newbury *et al.*, 2005). De esta manera, por décadas se han identificado diversas proteínas de unión a RNA eucarióticos y se ha estudiado cómo y cuándo actúan para coordinar su metabolismo. Sin embargo, la contribución dinámica de un determinado factor proteico bajo un estímulo externo ha sido pobremente entendida, debido a que se conoce poco sobre el mecanismo que utilizan para llevar a cabo la regulación de síntesis proteica en un rango de situaciones biológicas diversas, por ejemplo, en respuesta a estrés. Bajo estas condiciones, el control global o específico de un grupo definido de mRNAs debe ser modulado sin afectar la biosíntesis general de proteínas o el estado traduccional del transcriptoma celular por completo. En este sentido, el hecho de que la célula pueda llevar a cabo la inhibición parcial de síntesis de proteínas para estimular la traducción de mensajeros específicos

proporciona una respuesta temporal, altamente dinámica, para el control de la homeostasis.

2.1 Metabolismo del RNA

Como se ha mencionado ya, la regulación de la expresión génica está determinada a diversos niveles del metabolismo del RNA que aseguren su correcto procesamiento, transporte, estabilidad, localización y, su traducción (Garneau *et al.*, 2007). Durante la etapa inicial de transcripción diversas proteínas interactúan con el RNA nascente inmediatamente que esta molécula comienza a sintetizarse para asegurar su estabilidad. La composición de estas proteínas es dinámica y, a lo largo de la maduración del RNA ocurre un remodelamiento de estas que permita el exporte del mRNA maduro al citoplasma, su traducción o su represión (Muench *et al.*, 2012). Gran parte de estas proteínas reconocen una estructura presente en el extremo 5'UTR de la mayoría de los mRNAs eucarióticos, conocida como estructura cap (m^7GpppN , donde m^7G es 7-metilguanósina y N es el primer nucleótido del mRNA; Topisirovic *et al.*, 2011), una guanósina modificada por la adición de un grupo metilo que confiere una carga positiva a la estructura y su reconocimiento específico por varias proteínas especializadas (Issur *et al.*, 2013). El cap es esencial no sólo para la estabilidad del RNA, sino también para promover su maduración (como poliadenilación y splicing), transporte y traducción. En el núcleo, esta estructura es reconocida en el pre-mRNA por el complejo nuclear de unión al cap (nCBC) que consiste de una proteína de unión al cap NCBP20 y, de una proteína auxiliar NCBP80 (ambas proteínas descritas en mamífero) que protegen al mRNA de su degradación por exonucleasas y promueven su exporte al citoplasma (Issur *et al.*, 2013; Topisirovic *et al.*, 2011; Gebhardt *et al.*, 2015). La interacción de este complejo con el cap es debida a la asociación de los residuos Tyr 20 y Tyr 43, presentes en la proteína NCBP20 (Topisirovic *et al.*, 2011). Esta asociación es estabilizada por la interacción del amino terminal de NCBP20 con la subunidad NCBP80. A su vez, esta proteína interactúa con ALYREF, un componente del complejo de exporte/transcripción (TREX) que facilita el exporte del mRNA (Gebhardt *et al.*, 2015). Se ha visto de manera

reciente que el complejo nCBC estimula también la unión de componentes de complejos nucleares de ribonucleoproteínas pequeños (snRNPs) al transcrito nascente, lo que promueve el ensamblado de la maquinaria de splicing en el intron cercano al cap del pre-mRNA (Topisirovic *et al.*, 2010). Adicionalmente, el complejo nCBC está involucrado en el proceso de degradación de mensajeros sin sentido o vía NMD (Nonsense-mediated mRNA Decay), donde RNAs mensajeros enlazados a nCBC y, que contienen un codón de termino prematuro, son reconocidos por la maquinaria de NMD para su degradación (Maquat, 2005).

Una vez que el mRNA maduro ha sido transportado al citoplasma, el complejo ribosomal puede ser reclutado para la traducción activa del mensajero. El factor de inicio de traducción eIF4E se une específicamente a la estructura cap del RNA permitiendo reclutar los demás componentes del complejo traduccional. Una vez unido, el factor eIF4E se asocia con la proteína eIF4G (una proteína de andamiaje) quien se encarga de unir a una helicasa de RNA ATP-dependiente (eIF4A) para formar un complejo conocido como eIF4F (Robaglia *et al.*, 2006; Jackson *et al.*, 2010; Alekhina and Vassilenko, 2012; Topisirovic *et al.*, 2011). Además de la asociación con eIF4A, el factor eIF4G se asocia también con la proteína PABP (una proteína de unión a la cola de poli A presente en el extremo 3' del mensajero) obteniendo así una estructura circularizada del mRNA que permite reclutar el complejo ribosomal 48S mediante la interacción del factor eIF3 (presente en el complejo 48S) con la proteína eIF4G (Ver figura 1; O'Leary *et al.*, 2013; Rajagopal *et al.*, 2012). De esta manera, el complejo de inicio 48S realiza un "escrutinio" de la región 5' no traducible del mRNA en la dirección 5' → 3' en busca del codón de inicio para que, una vez reconocido, forme un complejo traduccional competente con la subunidad ribosomal 60S y llevar a cabo la síntesis de proteínas (Jackson *et al.*, 2010).

Bajo ciertas condiciones sin embargo (por ejemplo en condiciones de estrés), puede ocurrir también que este mRNA pueda mantenerse en un estado reprimido y ser localizado en complejos proteína-mRNA en localizaciones citoplasmáticas específicas, conocidas como cuerpos de procesamiento (PBs) o gránulos de estrés (SGs) donde, dependiendo de las condiciones fisiológicas, pueden regresar a una ronda traduccional normal o ser degradados (Anderson and Kedersha, 2006; Nakaminami *et al.*, 2011). Para que este proceso ocurra es

necesario que gran parte de los componentes de la maquinaria traduccional sufran modificaciones o bien, que el complejo traduccional lleve a cabo un remodelamiento parcial mediante la asociación con otras proteínas para formar los cuerpos de estrés (PBs o SGs), permitiendo así asegurar la estabilidad del mRNA o su degradación.

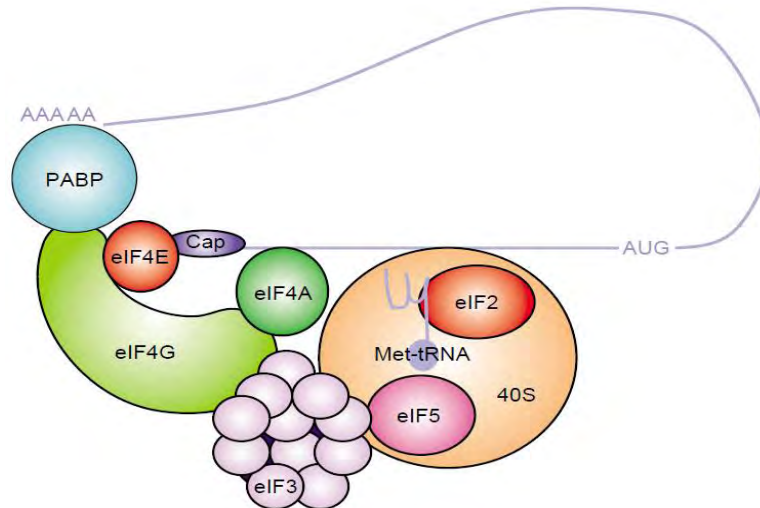


Figura 1. Circularización del complejo de pre-inicio 48S de traducción eucariótica. El complejo eIF4F, compuesto de los factores eIF4E, eIF4G y eIF4A, es el responsable de reclutar al mensajero. eIF4E es la proteína de unión al cap, presente en el extremo 5' del mRNA. eIF4A es una helicasa de RNA ATP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

En células eucarióticas, los cuerpos PBs están involucrados en la degradación de los mensajeros mientras que los cuerpos SGs participan en la estabilización de estos. En este sentido, mucha de la maquinaria que forma a los cuerpos PBs posee actividad de “decapping” (escisión de la estructura cap), desadenilación (escisión de la cola de poli A) y de degradación con actividad de exoribonucleasa (Nakaminami *et al.*, 2011). Las proteínas de decapping conocidas como DCPs son esenciales para la formación de PBs y, aunque su actividad enzimática es quitar el cap, el reconocimiento de esta estructura por las DCPs permite mantener estable al mensajero para su almacenamiento mientras no existan señales para su degradación (Kedersha *et al.*, 2005). A diferencia de PBs, los SGs están compuestos por gran parte de la maquinaria traduccional como la subunidad ribosomal 40S, la proteína PABP y proteínas de unión al RNA como

la proteína eIF4E. En este sentido, se ha propuesto que la gran mayoría de los mensajeros liberados de polisomas son primero dirigidos a este tipo de cuerpos (Kedersha *et al.*, 2005). En estudios recientes se ha observado que ambos tipos de cuerpos se encuentran co-localizados en el citoplasma (Kedersha *et al.*, 2005) lo que sugiere que existe una interacción entre ambos que permite al mRNA estar constantemente localizado en uno u otro dependiendo de las condiciones fisiológicas de la célula y que asegure su ciclo de vida. Este proceso ha cobrado importancia debido a que se ha visto que la respuesta de la célula en estrés requiere de la activación de esta vía.

En diversos estudios (Anderson and Kedersha, 2006; Andrei *et al.*, 2005) se ha observado que en ambos tipos de localizaciones citoplasmáticas se encuentra presente la proteína eIF4E y, aunque su función en estos cuerpos no es aún del todo conocida, se ha planteado que esta proteína proteja al mRNA de la degradación hasta que este sea requerido para su traducción (Schwartz *et al.*, 2000). Sin embargo, en estudios recientes en mamíferos se ha visto que el reclutamiento de eIF4E a estos cuerpos es independiente de su interacción con el cap, pudiendo entonces ser reclutado vía interacción con otras proteínas (Ferrero *et al.*, 2012).

2.2. El factor de inicio eucariótico 4E

La proteína eIF4E (25KDa) es un factor central en el inicio de la traducción ya que es el encargado de reconocer la estructura cap, presente en el extremo 5' de los mRNAs eucarióticos, y reclutar así la maquinaria de síntesis de proteínas para dar inicio al proceso. Esta asociación es mediada por dos residuos aromáticos presentes en eIF4E (Trp 56 y Trp 102, numeración de aminoácidos acorde al eIF4E de humano), que estabilizan la unión al mensajero por puentes de hidrógeno específicos entre la carga positiva de 7-metilguanosina y los residuos ácidos (Fechter *et al.*, 2005; Tomoo *et al.*, 2003; Issur *et al.*, 2013). Por otra parte, la mayoría de las proteínas que interactúan con el factor (incluida eIF4G) lo hacen a través del residuo de triptófano 73, que se encuentra en una cara convexa de la estructura 3D de la proteína. La mayoría de las proteínas interactoras con eIF4E contienen el motivo de unión $Y(X)_4L\Phi$, donde X es

cualquier aminoácido y Φ representa algún residuo hidrofóbico, usualmente leucina, metionina o fenilalanina (Goodfellow and Roberts, 2008). En estudios más recientes se ha demostrado que además de reconocer el 5'cap y a eIF4G, eIF4E estimula la actividad de helicasa de eIF4A en la traducción de mensajeros con secuencias 5'UTR estructuradas (Feoktiskova *et al.*, 2013). La mayoría de los organismos eucariontes presentan más de una proteína eIF4E llamadas isoformas o miembros de la familia eIF4E. Se conoce en animales que uno de los procesos más regulados en la traducción es precisamente la etapa inicial del proceso, es decir la unión del factor eIF4E a la estructura cap (Jackson *et al.*, 2010). Sin embargo, a pesar del alto grado de conservación de los factores y componentes ribosomales, en plantas no se ha comprobado que exista este nivel de regulación, ya que no se han identificado proteínas reguladoras para eIF4E ortólogas a las descritas para animales (Echevarría-Zomeño *et al.*, 2013).

2.3 Funciones de eIF4E en el metabolismo de RNA

EL factor de inicio traduccional 4E posee una función importante en el inicio de la traducción de mRNAs citoplasmáticos, y gran parte de los estudios sobre su estructura, función y regulación han sido enfocados en esta función. Sin embargo, se ha descubierto que este factor también participa en la exportación de mensajeros nucleares al citoplasma, en el control del ciclo celular, en la dinámica de complejos ribonucleoproteicos citoplasmáticos como gránulos de estrés y cuerpos de procesamiento y, como factor de susceptibilidad/resistencia a infecciones virales (figura 2; Goodfellow *et al.*, 2008; Roberts, 2008).

2.3.1 Exporte nuclear de mensajeros

Gran parte del eIF4E se encuentra localizado en el núcleo de células de mamífero (alrededor del 68%), en sitios conocidos como cuerpos nucleares, llevando a cabo la exportación de un grupo de mensajeros que poseen una estructura conocida como elemento sensible a 4E (Culjkovic *et al.*, 2007; Iborra *et al.* 2001). La entrada del factor al núcleo se lleva a cabo por unión a una proteína conocida como 4E-T o transportador de 4E (Goodfellow and Roberts,

2008), a través del motivo Y(X)₄LΦ y la interacción con receptores nucleares de importe (importina α/β; Dostie *et al.*, 2000). Una vez en el núcleo, proteínas con homeodominio se unen al eIF4E y regulan su unión al 5'cap y la capacidad de exporte del mRNA (Culjkovic *et al.*, 2007).

En plantas, la distribución de eIF4E es más dinámica que en mamíferos; por ejemplo, eIF4E de *Arabidopsis thaliana* ha mostrado acumulación en el núcleo de células quiescentes pero en células proliferativas, su localización preferencial es en el citoplasma (Bush *et al.*, 2009).

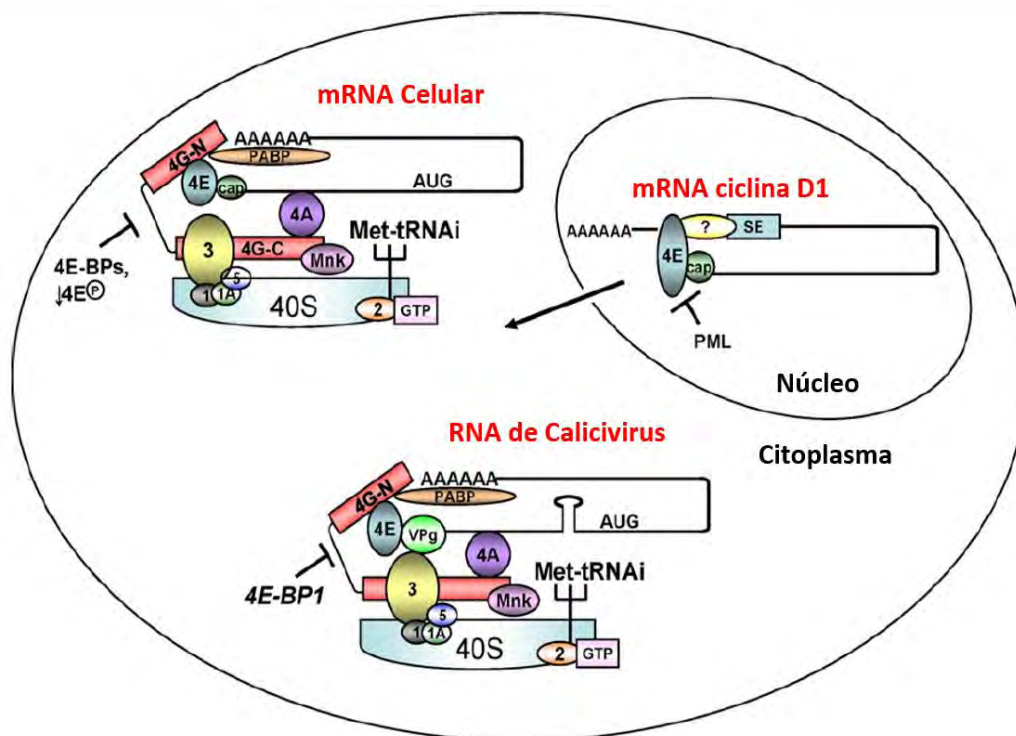


Figura 2. Diferentes funciones de eIF4E. La función mejor conocida de eIF4E en el citoplasma es el inicio de la traducción dependiente de 5'cap. Otra función para eIF4E es la traducción del RNA de ciertos tipos de virus (de un calicivirus en la figura). Aquí, eIF4E se une a la proteína viral VPg que se encuentra en el extremo 5' del RNA; esta interacción es requerida para la traducción del RNA de ciertos virus. La interacción entre eIF4G y eIF4E, como se observa, es inhibida por 4E-BP1 resultando en la inhibición de la traducción. En el núcleo, eIF4E es conocido por interactuar con la estructura 5'cap y funcionar en el exporte de mRNAs específicos (ejemplo ciclina D1) del núcleo al citoplasma. eIF4E reconoce un "elemento específico" presente en el extremo 3' UTR, posiblemente a través de la interacción con un factor desconocido (designado con ?), que define cual mensajero exportar. La unión de proteínas como PML al eIF4E inhibe el exporte de mRNAs. Tomado de Goodfellow *et al.*, 2008.

2.3.2 Papel de eIF4E y eIFiso4E en infecciones virales

Los virus de RNA de cadena positiva han desarrollado numerosos mecanismos para la traducción preferencial de sus mensajeros. En plantas, se ha descrito una función importante para eIF4E y eIFiso4E en la capacidad del virus para

infectar al hospedero. Se ha reportado que los virus de la familia *Potyviridae* requieren a uno u otro de estos factores, dependiendo del hospedero, para la infección (Robaglia y Caranta, 2006). El mecanismo por el cual el virus puede hacer uso de alguno de estos factores aún no es del todo conocido, pero se sabe que su interacción con una proteína unida covalentemente en el extremo 5' del RNA, conocida como proteína VPg es relevante. Se ha propuesto que la unión de eIF4E o eIFiso4E con VPg puede actuar como un análogo de la estructura cap presente en el mRNA de eucariontes y facilitar la traducción y replicación virales (Khan *et al.*, 2008). Por otra parte, mediante dicha unión el virus puede secuestrar a los factores, inhibiendo la traducción de mensajeros del hospedero. Se ha visto que mutaciones en alguno de los factores eIF4E o eIFiso4E que afecten la interacción con el VPg, generan resistencia natural de la planta a la infección por ciertos virus, evidenciando que esta interacción es necesaria para el ciclo viral (Wan and Krishnaswamy, 2012).

2.4 Múltiples miembros de la familia eIF4E

En el 2005, Joshi *et al.* identificaron 411 miembros de la familia eIF4E, de 230 especies, a partir de secuencias depositadas en GenBank. Para estas proteínas se identificó una secuencia de aminoácidos núcleo altamente conservada que contenía varios residuos Trp, algunos de ellos involucrados en la unión del cap y de eIF4G. Basado en la conservación de los Trp, subdividieron a los miembros de la familia eIF4E en tres clases. La clase I presentaba los residuos Trp-43 y Trp-56 correspondientes al eIF4E-1 de *Homo sapiens* (Rhoads, 2009) conservados. Los miembros de la clase II contenían Tyr, Phe o Leu en lugar de Trp 43 y Tyr o Phe en lugar de Trp 56. Los miembros de la clase III presentaban el Trp 43 conservado, pero tenían Cys o Tyr en lugar de Trp 56. Todos los eucariontes tienen al menos un miembro de la clase I que se considera un eIF4E canónico.

La clase I incluye miembros de especies de plantas (eIF4E y eIFiso4E), hongos (eIF4E) y metazoarios (eIF4E-1; figura 3). Estos miembros tienen aproximadamente 35-40% de identidad y 60-65% de similitud entre sí (Joshi *et*

al., 2005) y todos ellos son capaces de reconocer la estructura cap, a eIF4G y, en algunos casos a proteínas regulatorias de unión a eIF4E llamadas 4E-BPs.

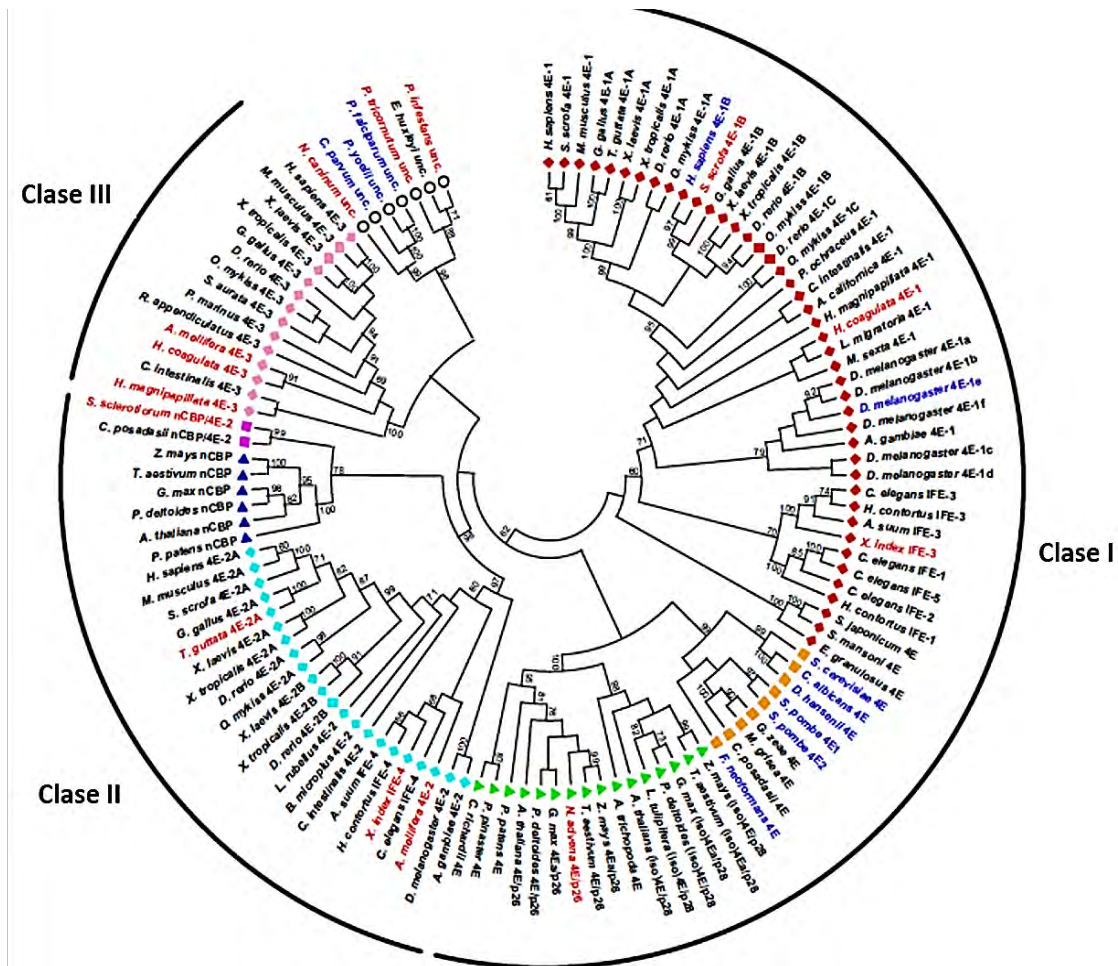


Figura 3. Árbol filogenético radial de los miembros de la familia eIF4E de múltiples especies. El nombre de los miembros de la familia eIF4E se encuentra en letras negras o rojas indicando si hay o no secuencia completa de la región conservada consenso, respectivamente. Las letras en azul indican que datos de secuencia genómica fueron usado para verificar y determinar la secuencia nucleotídica. El icono de la izquierda indica el grupo taxonómico: metazoarios (rombos); hongos (cuadrados); viridiplantae (triángulos) y protistas (círculos). A la derecha del diagrama se indica la clase a la cual pertenecen. Tomado de Joshi *et al.* (2005).

La clase II incluye miembros de la familia eIF4E-2 de Metazoa y la familia nCBP de Viridiplantae (figura 3). Poseen 30-35% de identidad y 60-65% de similitud con miembros de la clase I. Estudios genéticos y bioquímicos han revelado que las proteínas de esta clase, tales como eIF4E-2A (*H. sapiens* y *M. musculus*), IFE-4 (*C. elegans*), 4EHP (*D. melanogaster*) y nCBP (*Arabidopsis thaliana*) son capaces de unirse a la estructura 5' cap, pero su participación en la traducción es variable.

La clase III incluye miembros que han sido encontrados en algunos metazoarios, nidarios, moluscos, insectos o arácnidos, y poseen 25-30% de identidad y 45-55% de similitud con miembros de clase I y clase II (Joshi *et al.*, 2005). Estudios con eIF4E-3 de *M. musculus* han mostrado que la proteína interactúa con la estructura 5'cap *in vitro*, sugiriendo que la presencia de un solo residuo aromático es suficiente para la interacción con este, aunque Osborne *et al.* (2013) sugiere otro tipo de interacción.

Muchos organismos poseen dos o más miembros de la familia eIF4E y, en al menos un miembro ha sido demostrado su participación en el inicio de la traducción y reclutar así ciertos mensajeros específicos (la gran mayoría miembros de clase I). Se ha observado también incluso que aun cuando dos o más miembros de la familia eIF4E se encuentra en un organismo y pueden llevar a cabo el inicio de la traducción, su afinidad por la estructura cap es diferente, interactúan con distintas proteínas o bien, se expresan de manera tejido-específico. Por otra parte, proteínas que no participan en la traducción en cambio pueden actuar como inhibidores de la traducción de algunos mRNAs (Joshi *et al.*, 2005). En este sentido, se ha propuesto que miembros de la clase II pueden tener una función en la regulación traduccional.

2.4.1 Los factores tipo eIF4E en plantas

En plantas existen cinco miembros de la familia eIF4E: cuatro de la clase I, eIF4E (considerado ortólogo del factor eIF4E-1 de mamíferos), eIFiso4E (específico de plantas), y dos ortólogos cercanos a eIF4E recientemente descritos (Patrick *et al.*, 2014); uno de la clase II, nCBP, que tiene ortólogos en metazoarios (Browning *et al.*, 2012; Ruud *et al.*, 1998). eIF4E y eIFiso4E poseen un 50% de identidad a nivel de aminoácidos y cada uno de estos factores forma complejos diferentes; eIF4E y eIF4G forman el complejo eIF4F mientras que eIFiso4E y eIFiso4G constituyen el complejo eIFiso4F (Browning *et al.*, 2004). Estudios iniciales evidenciaron que estos factores se expresan diferencialmente durante el desarrollo (Rodríguez *et al.*, 1998; Dinkova and Sánchez de Jiménez, 1999; Busch *et al.*, 2009). Por otra parte, estudios *in vitro* han indicado que eIFiso4F posee una alta afinidad por 5'cap hipermetilados y menor estructura secundaria

en 5'UTR que eIF4E. Recientemente, utilizando análogos de cap diferentes, se encontró que eIFiso4E posee una afinidad diez veces menor que eIF4E por el 5'cap canónico (Kropiwnicka *et al.*, 2014).

Se ha observado cierta redundancia entre los factores eIF4E y eIFiso4E, ya que las mutantes sencillas son capaces de crecer y reproducirse y solamente la doble mutante resulta letal en *Arabidopsis thaliana* (Duprat *et al.*, 2002; Sato *et al.*, 2005; Lellis *et al.*, 2010). A pesar de la falta de fenotipo evidente en la mutante de eIFiso4E, se encontraron alteraciones en los niveles de traducción de mRNA específicos (Martínez-Silva *et al.*, 2012) y expresión incrementada de eIF4E (Duprat *et al.*, 2002) probablemente para compensar la falta de este factor.

Poco se sabe acerca de la función que la proteína nCBP pueda estar llevando a cabo en las plantas. Estudios realizados por Ruud *et al.*, 1998, mostraron que esta proteína puede funcionar como factor de inicio de la traducción canónico *in vitro*, sin embargo, su menor actividad de traducción respecto a eIFiso4E sugiere que su función *in vivo* sea diferente a la de los factores clase I. Por otra parte, Bush *et al.*, 2009 encontraron que nCBP es particularmente abundante en complejos de unión a cap aislados de cultivos celulares en crecimiento activo, así como en zonas meristemáticas de hojas de *Arabidopsis thaliana*.

2.5 Ciclo de vida de *Arabidopsis thaliana*

2.5.1 Desarrollo vegetativo

El ciclo de vida de la mayoría de los organismos puede ser dividido en diversas fases. En el caso de plantas silvestres de *Arabidopsis thaliana*, este ciclo puede ser clasificado en tres principales etapas, reflejando una secuencia de identidad del meristemo apical, órgano del cual derivan todas las partes aéreas de la planta: 1) etapa vegetativa, que comprende el periodo entre el establecimiento de la plántula y la entrada de la planta al estado reproductivo; 2) una fase reproductiva y 3) maduración de semillas y senescencia (figura 4; Ratcliffe *et al.*, 1998). La transición entre estas fases es dependiente del programa genético y modulado tanto por señales endógenas como por estímulos ambientales (Huijser and Schmid, 2011).

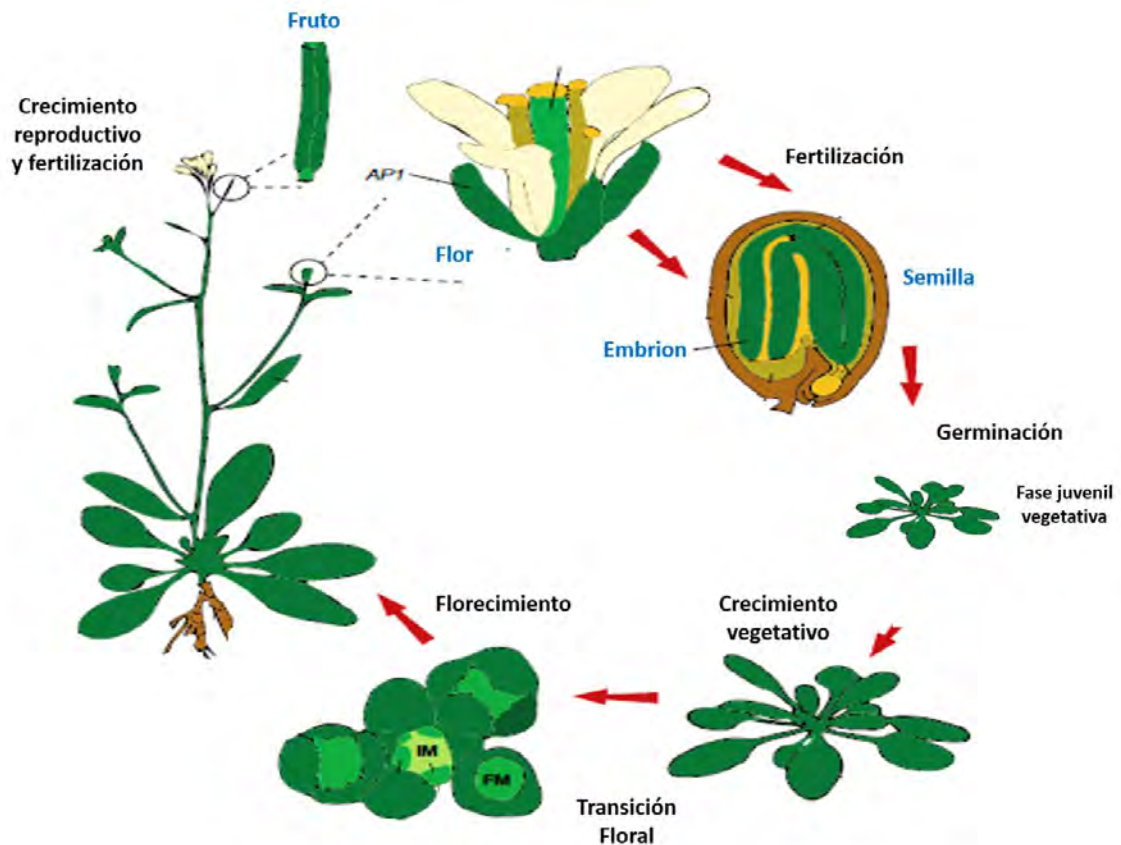


Figura 4. Fases de desarrollo de *Arabidopsis thaliana*. Las plantas progresan a través de varias etapas de desarrollo durante el ciclo de vida. Durante la reproducción sexual, los gametos son producidos. Después de esto, ocurre la fertilización para formar un embrión (semilla). Después de la germinación de la semilla, las plantas pasan a través de un crecimiento vegetativo durante el cual se aumenta rápidamente de tamaño y masa. Esta fase de crecimiento vegetativo puede ser dividida dentro de una fase juvenil y una adulta. Al final de la fase adulta vegetativa las plantas adquieren la capacidad reproductiva para dar paso a la formación del meristemo apical inflorescente y, finalmente los órganos reproductivos, repitiéndose así el ciclo. Tomado y modificado de Smaczniak *et al.*, 2012.

Después de la germinación de la semilla, las plantas pasan a una etapa de crecimiento vegetativo durante el cual el meristemo apical produce meristemos laterales que desarrollan en hojas, dando lugar a la formación de una roseta en la que se incrementa de manera rápida la capacidad fotosintética, así como el aumento de tamaño y masa (Koornneef *et al.*, 1998). Esta etapa puede ser dividida dentro de dos categorías: una fase juvenil y otra fase adulta vegetativa (Huijser and Schmid, 2011). Ambas son diferenciables por parámetros morfológicos, anatómicos y fisiológicos. Por ejemplo, las hojas juveniles son de forma redonda, con bordes suaves y tricomas presentes sólo en el eje adaxial. Por el contrario, las hojas adultas son ovaladas, con bordes dentados y los tricomas están presentes en ambas superficies (Vidal *et al.*, 2014). Además, sólo

durante esta última fase las plantas son capaces de formar órganos reproductivos que, dependiendo de la longitud de la luz, pueden llegar a florecer. Se ha visto que el cambio entre ambas fases es consecuencia de un programa de desarrollo endógeno dependiente de la edad, revelando que ciertos RNAs pequeños (como miR156 y miR157) y su blanco Squamosa Promoter Binding Protein-Like (SPL), un factor transcripcional, regulan esta transición (Vidal *et al.*, 2014). El tiempo que dure esta etapa dependerá en gran medida de las condiciones ambientales y de la regulación de los genes de florecimiento (Ratcliffe *et al.*, 1998).

2.5.2 Desarrollo reproductivo

Durante esta etapa el meristemo apical vegetativo (o SAM) adquiere identidad de meristemo inflorescente (MI). El MI genera células no diferenciadas para dar origen al meristemo floral (MF) del cual emergerán todos los órganos florales. Este desarrollo es especie-específica (Amasino, 2010; Huijser and Shimid, 2011) y su transición está bajo el control de una gran diversidad de reguladores positivos y negativos que integra la información de varias señales endógenas y ambientales (Amasino, 2010). Algunas señales endógenas que regulan esta transición incluye hormonas (como giberelinas), carbohidratos, ciclo circadiano y edad (Moon *et al.*, 2003; Seo *et al.*, 2011), mientras que los factores ambientales que más afectan el programa de regulación son la temperatura y la longitud de luz (o fotoperiodo). En *Arabidopsis thaliana* se conocen cuatro vías principales que integran estas señales de manera independiente: 1) la vía autónoma regula el florecimiento por monitoreo de señales endógenas de diferentes estados de desarrollo, mientras que, 2) la vía de giberelinas afecta el florecimiento particularmente en condiciones de día corto (condiciones de fotoperiodo). Finalmente, 3) la vía de fotoperiodo y 4) la vía de vernalización regulan la respuesta de señales ambientales, como longitud de luz y bajas temperaturas (Liu *et al.*, 2009). Independientemente de la vía, las señales percibidas por cada una convergen en unos pocos genes conocidos como “genes integradores” de la vía floral: Suppressor of Overexpression of Constans 1 (SOC1), Flowering Locus T (FT) y Agamous-Like24 (AGL24). Estos a su vez activan genes de

identidad de meristemo floral como *LEAFY (LFY)*, *APETALA1 (AP1)*, *SEPALATA3 (SEP3)* y *FRUITFULL (FUL)*, los cuales de manera irreversible confieren la transición de meristemo vegetativo a meristemo floral (Blümel *et al.*, 2015). FT tiene una función específica en la transición del meristemo floral ya que constituye el integrador de varias vías de floración y una señal móvil de las hojas a través del floema para poder unirse al factor transcripcional *FLOWERING LOCUS (FD)* y promover así el florecimiento (Blümel *et al.*, 2015). La integración de señales de florecimiento es también altamente controlada por un complejo represor que consiste de dos factores transcripcionales MADS, Flowering Locus C (FLC) y Short Vegetative Phase (SVP; Liu *et al.*, 2009). Las vías autónoma y de vernalización reprimen principalmente la expresión de FLC (Michaels, 2009), lo cual promueve florecimiento por antagonizar el efecto represivo de FLC en la expresión de FT y SOC1.

2.5.3 Senescencia y muerte

La senescencia es un fenómeno universal en todos los organismos vivos, el cual es controlado genéticamente dependiendo de la edad, y puede ser influenciado por otros factores internos y externos al mismo tiempo. Durante este proceso,

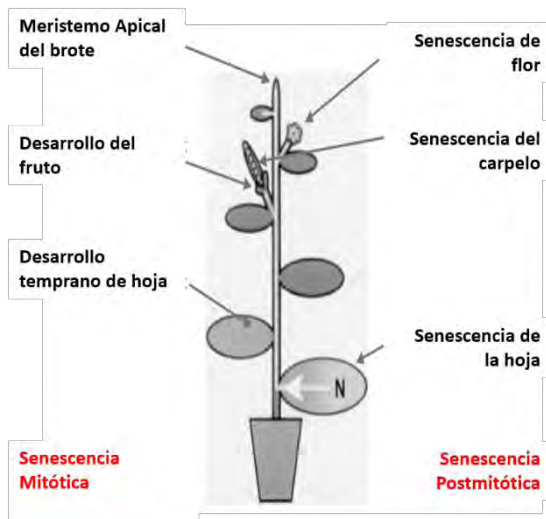


Figura 5. Senescencia mitótica y postmitótica en plantas. Senescencia mitótica ocurre en el brote del meristemo apical, en frutos y hojas que se encuentran tempranas en su desarrollo. En contraste, senescencia postmitótica ocurre en hojas, flores y frutos que están en el último estado de desarrollo (senescencia de la hoja, senescencia floral y senescencia del fruto, respectivamente). Modificado de Gan, 2003.

ocurren cambios en diversos procesos metabólicos que incluyen la disminución de actividades anabólicas, como la síntesis de proteínas, y la aceleración de actividades catabólicas, como la proteólisis y degradación de ácidos nucleicos, inducida por enzimas hidrolíticas (Oh *et al.*, 2003). En plantas, la senescencia se define como el proceso de degradación y degeneración programado (dependiente de la edad de las células, órganos o el organismo entero) que conduce a la muerte (Lim *et al.*, 2007). Se sabe que en estos

organismos se presentan dos tipos de senescencia a nivel celular, conocidos como senescencia mitótica y senescencia postmitótica (Gan S. 2003). El primero es un proceso degenerativo activo (dependiente de la edad) que conduce a la muerte de una célula que ya no se somete a la división mitótica, mientras que el segundo ocurre en tejido somático como hojas, flores y frutos (figura 5). Existe otro proceso denominado quiescencia celular, en el que una célula detiene temporalmente la mitosis debido a las condiciones desfavorables del ambiente pero que, gracias a que conserva su capacidad mitótica, puede regresar a su proceso de división celular para producir células hijas (Stuart and Brown, 2006).

2.5.3.1 Senescencia de la hoja

La senescencia de la hoja (el estado final de desarrollo vegetativo) es el proceso de senescencia más extensivamente estudiado en las plantas. Comprende diversos cambios metabólicos que permiten a la planta reciclar componentes nutricionales valiosos que se han incorporado durante el crecimiento (Breeze *et al.*, 2011) y que de otro modo se perderían cuando la hoja muere. El reciclaje de nutrientes contribuye al crecimiento activo de las partes reproductivas de la planta, como botones florales, flores o semillas (Guo and Gan, 2012).

Bajo condiciones normales de crecimiento, la ocurrencia de senescencia (dependiente de la edad), es caracterizada por un “síndrome senescente” que involucra pérdida de clorofila (amarillamiento de las hojas), pérdida de la capacidad fotosintética (Guo and Gan, 2012), incremento en la peroxidación lipídica y rompimiento de membranas, degradación de RNA, proteínas y DNA y, transporte de macro y micromoléculas a otras partes de la planta (Wu *et al.*, 2012; Ougham *et al.*, 2008).

Este proceso es un tipo de muerte celular programada, en donde todos los cambios ocurren como parte de un desarrollo normal, que se controla por un complemento de factores internos dependientes de la edad, como la concentración de hormonas y reguladores de crecimiento en la planta como citocininas, etileno, ácido jasmónico, ácido abscísico y ácido salicílico (Gan, 2003; Zhou and Gan, 2009), o por factores externos, como la exposición a un estímulo ambiental que constituye estrés para la planta. El estrés ambiental

puede ser biótico, resultado de la interacción con otro organismo, o abiótico, resultado de un cambio en la composición física o química de su ambiente comparada con las condiciones óptimas de crecimiento, por ejemplo: temperaturas extremas, drogas, deficiencia de nutrientes, insuficiencia en luz, sombra u oscuridad (Guo and Gan, 2012). Cada estrés (o señal endógena) es percibido y transmitido por la planta, resultando en cambios de su expresión génica y/o actividad fisiológica (Zhang and Zhou, 2013).

La senescencia es un proceso genéticamente controlado y durante esta etapa ocurre un cambio masivo en la expresión de diversos genes. En general, los genes involucrados en actividades anabólicas, como la fotosíntesis (para proteínas de unión a clorofila a/b y Rubisco) son regulados a la baja, mientras los genes asociados a senescencia (SAGs, "Senescence Associated Genes" por sus siglas en inglés) son regulados a la alza (Gan and Guo, 2012). Los genes SAG son frecuentemente usados como marcadores moleculares de senescencia de la hoja, ya que además de su expresión regulada durante el desarrollo de la planta, pueden ser inducidos por aplicación de hormonas exógenas (como etileno, ácido jasmónico, ácido salicílico, brasinosteroides y ácido abscísico; Sharabi-Schwager *et al.*, 2010) o, por diversos tipos de estrés ambiental como: oscuridad (Weaver *et al.*, 1998), drogas, infección por patógenos, exposición a rayos UV, ozono y otros tipos de estrés oxidativo (Gan and Guo, 2012).

Los SAG pueden ser clasificados en dos clases: la clase I involucra aquellos genes que se expresan exclusivamente durante senescencia y la clase II a aquellos que van incrementando su expresión desde un nivel basal en el desarrollo de la hoja a lo largo de la senescencia (Gan and Amasino, 1997). Estudios de microarreglos han identificado una colección de genes SAG de *Arabidopsis thaliana* clasificándolos en diversas categorías de acuerdo a sus funciones: transportadores (transportadores tipo ABC, permeasas, intercambiadores catiónicos, etc.); cinasas y receptores tipo cinasas; factores transcripcionales; genes de autofagia (Pua and Davey, 2010; Guo and Gan, 2012). Se ha visto que la expresión de estos genes es necesaria para que el proceso de senescencia se lleve a cabo, debido a que inhibidores de estos, tanto a nivel transcripcional como traduccional, previenen la senescencia en hojas (Buchanan *et al.*, 2003). Las enzimas que degradan proteínas representan el

porcentaje mayor de los genes SAG y la mayoría de estas permanecen en agregados inactivos dentro de vacuolas conocidas como SAV (vacuolas asociadas a senescencia), que se activan durante la senescencia. Un ejemplo de enzima proteolítica es la codificada por el gen SAG12 (Wu *et al.*, 2012), un tipo de cisteína proteasa que es altamente expresada en senescencia dependiente de la edad y es usada como marcador molecular de este proceso (Weaver *et al.*, 1998; Gan, 1995) ya que sólo es detectada en hojas senescentes pero no en hojas jóvenes.

3. ANTECEDENTES

3.1. Proteína novedosa de unión al cap, nCBP, en *Arabidopsis thaliana*

En 1998 en *Arabidopsis thaliana* se identificó un nuevo miembro de la familia eIF4E denominada nCBP (novel Cap-Binding Protein). El gen *nCBP* (At5g18110) se encuentra en el cromosoma V, está formado por 6 exones que codifican una proteína de 24KDa y 5 intrones. El alineamiento de secuencia de aminoácidos de nCBP con otros eIF4E (figura 6), revela la sustitución de Trp 43 y Trp 56 por Phe y Tyr, respectivamente, lo que ubica a esta proteína dentro de los eIF4E de la clase II. La caracterización de nCBP inicial indicó que ésta es capaz de unirse al 5' cap con mayor afinidad que las proteínas eIF4E y eIFiso4E, aunque estudios recientes con otros análogos, sugieren afinidades menores respecto a eIF4E (Kropiwnicka *et al.*, 2014).

Ar nCBP	MEVLDRRDEIRDSEGNMDSIKSHYVTDVSVSEERRSTELKDGLHPLRYKESISWYTRRTPGVRNQSEEDNIKKMVEFSTVEG	80
Wh	MTEDTEMRPASAGAEEREELADDGSGSAAAAGRITA---HPLENAWTFWFDNPQOKSRQVANGSTIKPIHTFSTVED	77
Whiso4E	MAEVEAALPVAATEETPEVAEAGDAGAAEAKGP-----HKLQRQWTFWYDIQTKPKPGAAAGTSLKKGYTFDFTVEE	70
Mouse4E	MATVEPETPTTNPPEAEKTESNQEVANPEHYIK-----HPLQNRWALWFFKND---KSKTWOANLRLISKFDTVED	71
Yeast	MSEVEVSKKFEENVSVDDTTATPKTVLSDSAHFVDK-----HPLNTKWTLYTKPAVD-KSESESDLLRPVTSFQTVEE	73
	*1 *2 *3	
Ar nCBP	FVACYCMLARSSLLPSPTDLHFPKDGIRPLWEDGANCNGGKVIIRFSK---VVSARFEDLLLALVGDQLDDADNI-CG	156
Wh 4E	FWGLYNNIHNPSKLVNVDGDFHCFKKNKIEPKWEDPICANGGKWTISCGR---GKSDFWLLHTLLAMIGEQDFGDEI-CG	153
Whiso4E	FWCLYDQIFRPSKLVGSADFHFLFKAGVEPKWEDPECANGGKWTVISRK---TNLDTMLETMCALIGEQFDRSQEI-CG	147
Mouse4E	FWALYNHIQLSSNLMPGCDYSLFKDGIKPKWEDDEKNKRGGRLITLNKQQRSDLDLRFWLETLLCLIGESFDDYSDVCG	151
Yeast	FWAIIQNIPEPKELPLKSDYHVFRNDVVRPEWEDDEANAKGGKWSFQLRGKG--ADIDELWLRLLAVIGETIDEDDSQING	151
	*4 *5 *6 *7	
Ar nCBP	AVLSVRFNEDIISVNRNASDHQAVMGLRDSIKRHLKLPWAYVMEYKPHDASLRDNSSYRNTWLRQ	221
Wh 4E	AVVSVRQKQERVAIITKNAANEAAQISIGKQWKEFLDYKDS--IGFIVHEDAKRSDKGPKNRYTV	215
Whiso4E	VVASVRQRQDKLSLWTKTASNEAVQVDIGKKWKEVIDYNDK--MVYSFHDDSRSQKPSRGGRYTV	209
Mouse	AVVNVRAKGDKIAIHTTECENRDAVTHIGRVYKERLGLPKKIVIGYQSHADTATKSGSTTKNRFVV	217
Yeast	VVLSIRKGGNKFALWTKS-EDKEPLLRIGGKFKQVLKLTDDGHLEFFPHSSANGRHQPQPSITL---	213
	*8	

Figura 6. Alineamiento de secuencia de aminoácidos de nCBP con otros eIF4E. De acuerdo a la clasificación de Joshi *et al.* (2005), nCBP pertenece a la clase II ya que sus W43 y W56 (en el alineamiento 2 y 3, respectivamente), son sustituidos por una F y una Y, respectivamente, en comparación con miembros de la clase I. Ar, *Arabidopsis thaliana*; Wh, trigo. Tomado y modificado de Ruud *et al.*, 1998.

En análisis de doble híbrido se demostró que la proteína puede interactuar con eIF4G y eIF(iso)4G para formar un complejo funcional que soporta parcialmente el inicio de la síntesis de proteínas. *In vitro* se demostró que es capaz de recuperar la traducción hasta un 30% en ausencia de eIF4E y eIFiso4E (Ruud *et al.*, 1998). Sin embargo, aún no es claro si esta proteína participa *in vivo* en la

traducción o si, como sus ortólogos en animales, regula el reclutamiento de mRNAs específicos para la traducción (Cho *et al.*, 2005; Dinkova *et al.*, 2005).

Análisis a nivel de mRNA, en diferentes tejidos de *Arabidopsis*, mostró que la expresión de *nCBP* es ubicua, presentando mayores niveles de expresión en raíz, mientras que en estudios globales de proteómica se detecta a *nCBP* principalmente en botones florales (figura 7), lo que puede sugerir una función tejido específica.

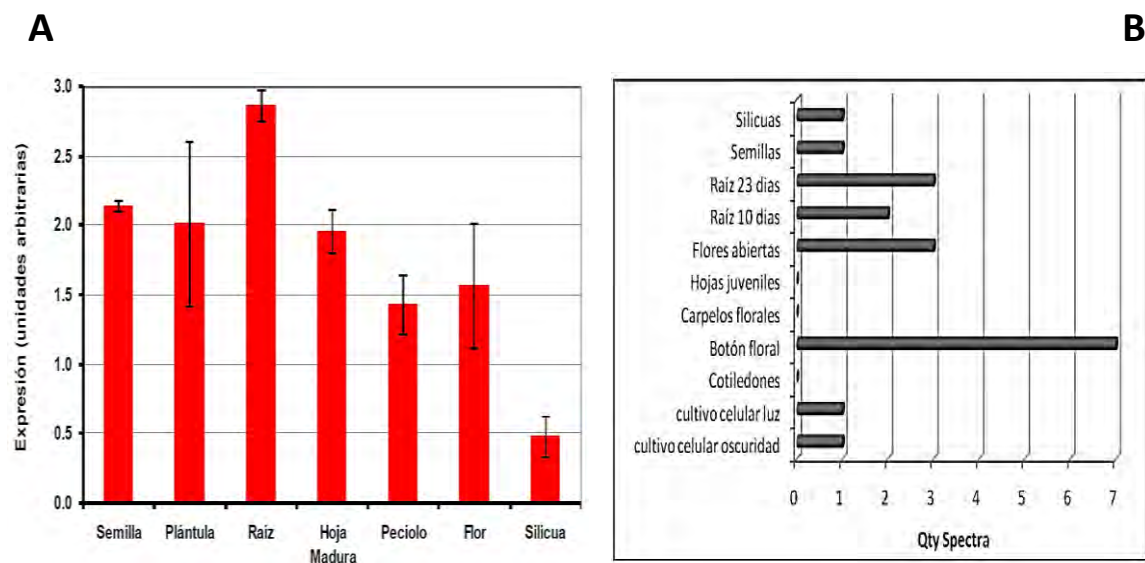


Figura 7. Perfil de expresión del mensajero y proteína de nCBP en *Arabidopsis thaliana*. A. Medición de los niveles de mRNA de *nCBP* por densitometría de RT-PCR semicuantitativa en diferentes tejidos de la planta a lo largo de su desarrollo. B. Expresión de la proteína nCBP en diferentes tejidos de la planta. Tomado de Hidalgo, 2007 y De la Torre, 2009.

3.2. Función de proteínas ortólogas de nCBP en otros organismos

Algunos ortólogos de nCBP en otros organismos son IFE-4 en *Caenorhabditis elegans*, d4E-HP en *Drosophila melanogaster*, eIF4E-1 en *Leishmania* y, en *Homo sapiens* y *Mus musculus*, la proteína h4E-HP. Se ha encontrado que IFE-4 es capaz de unirse al 5' cap y se requiere para traducir selectivamente ciertos transcritos. Su expresión es tejido-específica y la ausencia produce un defecto en la deposición de los huevos (ovoposición), y por tanto un retraso en la reproducción (figura 8), aunque no afecta la viabilidad del organismo (Dinkova *et al.*, 2005).

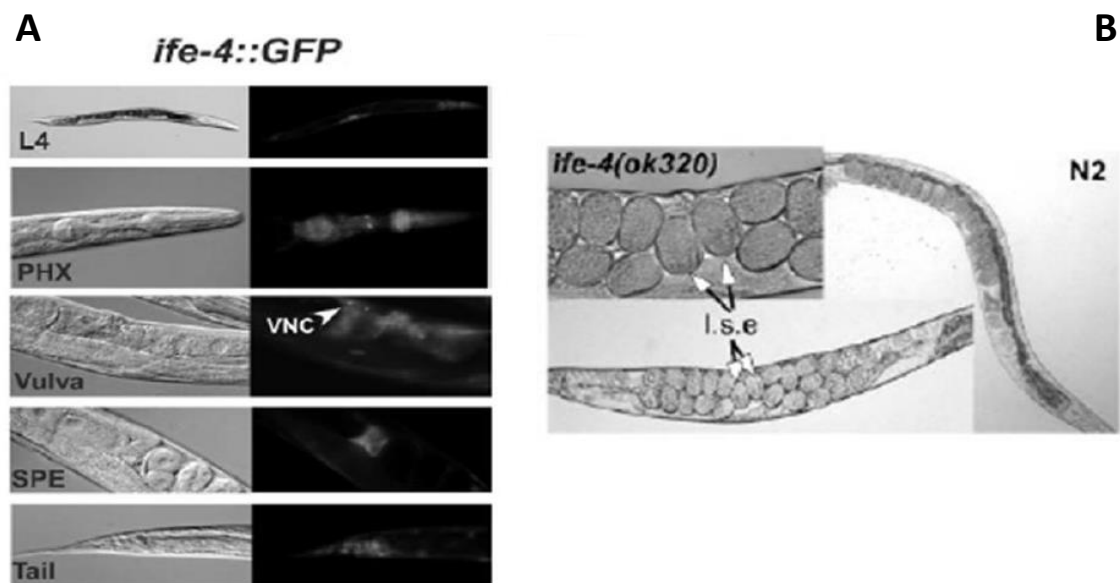


Figura 8. Localización del factor IFE-4 y fenotipo de mutantes en *C. elegans*. A. Localización de IFE-4 fusionada a GFP: la fluorescencia aparece en neuronas y músculos de la faringe (PHX), en el cordón neuronal ventral (VNC), neuronas y músculos de la vulva y espermatoca (SPE). B Fenotipo de la mutante nula *ife-4* (*ok320*), que muestra retención de huevos comparado con la cepa WT (N2). Los embriones en estado tardío son mostrados en la mutante (l.s.e.). Tomado y modificado de Dinkova *et al.*, 2005.

En *Drosophila melanogaster* la ausencia de la proteína d4E-HP produce defectos en el desarrollo embrionario, en específico, en la formación del eje antero-posterior (Cho *et al.*, 2005). d4E-HP muestra selectividad para ciertos mRNA durante el desarrollo, y ejerce una función regulatoria negativa sobre su traducción. Tal es el caso del mRNA de Caudal reconocido en una secuencia específica en el 3'UTR (BBR, región de unión a Bicoide) por la proteína Bicoide (BCD), quien a su vez interacciona con d4E-HP unido al 5' cap, formando así un círculo cerrado que impide la traducción del mensajero (figura 9). El correcto desarrollo del embrión de *D. melanogaster* requiere una distribución asimétrica antero-posterior de la proteína Caudal, por lo que d4E-HP actúa como regulador negativo de la traducción de su mRNA durante etapas específicas del desarrollo, promoviendo dicha distribución (Cho *et al.*, 2005; Hernández *et al.*, 2005).

En *Homo sapiens* y en *Mus musculus* la proteína 4E-HP interacciona con 4E-BP, pero no con eIF4G, lo que sugiere que 4E-HP podría desempeñar una función en el mecanismo de regulación de la traducción en estas dos especies

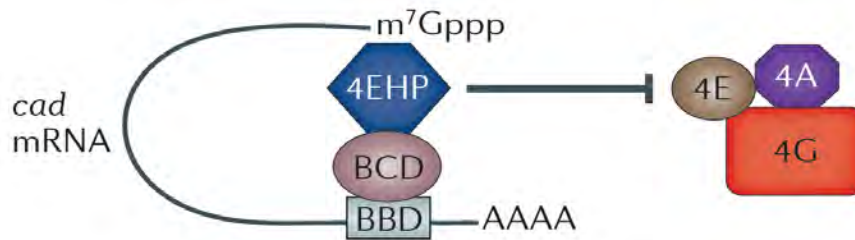


Figura 9. El complejo d4EHP-Bicoide en *D. melanogaster*. La represión traduccional del mensajero Caudal involucra la proteína d4EHP (una proteína que no puede unirse al eIF4G) debido a una interacción competitiva por el cap con eIF4E. La interacción simultánea de 4EHP con la estructura cap del mRNA y BCD, esta a su vez con la BBR (región de unión a bicoide) ubicada en la región 3'UTR, da por resultado una estructura circularizada del mensajero y lo inactiva para su traducción. Tomado de Kong and Lasko, 2005.

3.3. Función de nCBP en *Arabidopsis thaliana*

En estudios previos del laboratorio se obtuvo una línea mutante homociga nula para la proteína nCBP, la cual mostró un desarrollo similar al de las plantas silvestres (WT), a excepción de un retraso en el tiempo de floración de aproximadamente 10 días bajo condiciones de fotoperiodo de día largo, de día corto y con tratamiento de ácido giberélico. Dicho fenotipo se perdía en presencia de un período de vernalización prolongado (figura 10). Esto sugirió que nCBP podría participar en la regulación de la expresión de algunos genes involucrados en la vía autónoma para la floración, ya que mutantes en esta vía presentan el mismo fenotipo.

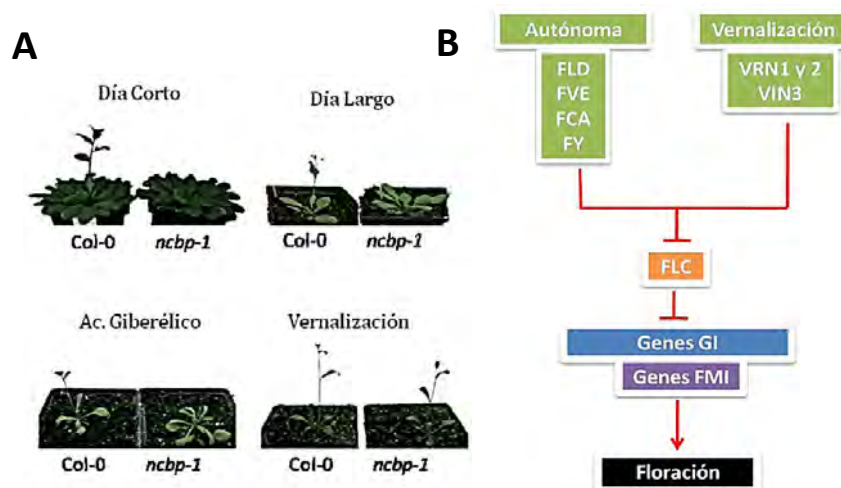


Figura 10. Caracterización fenotípica de plantas mutantes *ncbp-1* y vías de floración de *Arabidopsis thaliana*. A. Plantas silvestres (Col.0) y mutantes *ncbp-1* bajo diferentes condiciones de floración. En vernalización la mutante revierte el fenotipo. B. Vías de floración, donde FLC es un represor de la floración sobre el cual convergen la vía autónoma como la vía de vernalización. Los integrantes de cada una de estas vías regulan de manera negativa la expresión de FLC. Tomado de De la Torre. 2009.

Al analizar los niveles de mRNA de algunos genes representativos de diferentes vías de floración se encontró que en ausencia de nCBP bajan los niveles del transcrito *FCA* de la vía autónoma y aumentan los de *FLC*, represor general de la floración, lo que podría explicar el fenotipo observado en la mutante. Los cambios a nivel de transcrito de estos genes podrían deberse a cambios en la traducción de algún regulador transcripcional y de manera indirecta explicar el papel de nCBP (figura 11; De la Torre, 2009). Sin embargo, hasta el momento se desconoce la identidad del enlace entre nCBP y la vía autónoma de floración.

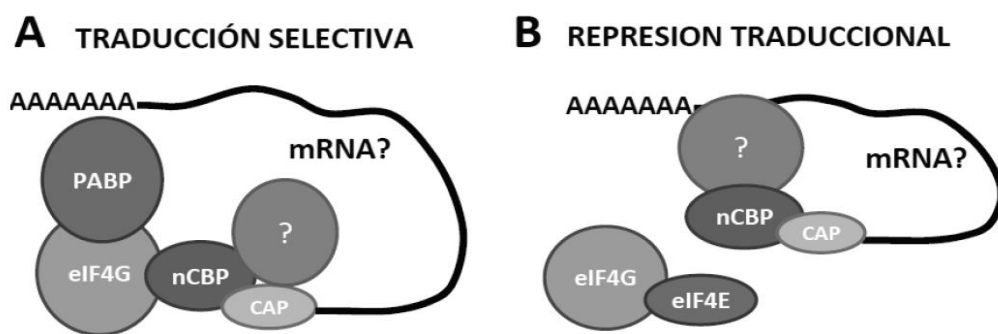


Figura 11. Posibles modelos de regulación por nCBP. A. Traducción mediada por nCBP de mRNAs específicos. B. Represión de la traducción de mRNAs específicos mediante la unión de nCBP con otras proteínas que puedan reconocer a su vez secuencias en la región 3'UTR. Tomado de Martínez- Silva *et al.*, 2009.

Otro fenotipo de la mutante de nCBP fue un porcentaje de aborción de embriones de aproximadamente el 13% comparado con el 0.5% que se presenta en una planta silvestre, lo que podría sugerir que nCBP también regule la expresión de proteínas involucradas en la embriogénesis de la planta (De la Torre, 2009).

Mediante la fusión de nCBP a GFP se demostró en protoplastos de *Arabidopsis thaliana* que nCBP es una proteína citoplasmática cuya distribución asemeja gránulos de tipo procesamiento o de estrés, hasta en un 75% de las células analizadas, en comparación con la distribución de eIF4E-GFP, o GFP sola, que presentan 0% de distribución en gránulos citoplasmáticos (figura 12).

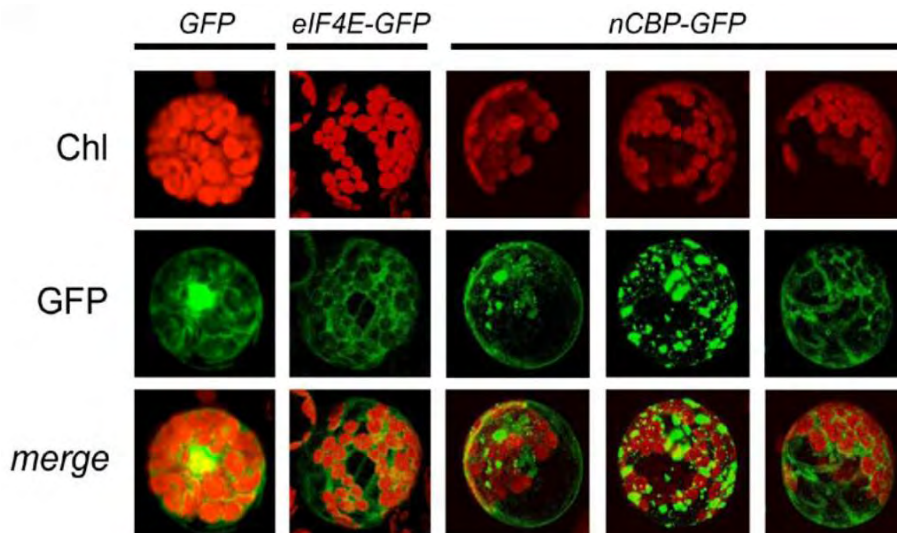


Figura 12. Localización subcelular de nCBP-GFP en protoplastos de *Arabidopsis thaliana*. La proteína nCBP-GFP es mayoritariamente citoplasmática y, comparada con eIF4E-GFP o GFP sola, tiende a formar algún tipo de granulo hasta ahora no identificado. Chl: clorofila. Resultados no publicados De la Torre, 2009.

Finalmente, en ensayos de “Pull down” con la proteína nCBP recombinante y extractos proteicos de plántulas mutantes, se identificaron por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC/MS/MS) diversas proteínas interactoras que parecen estar involucradas en procesos de respuesta a estrés y no en la formación del complejo de inicio de la traducción (figura 13). La interacción de nCBP con proteínas diferentes a los factores de inicio de la traducción, podría sugerir que participa en algún proceso del metabolismo del RNA, diferente a la traducción, como exportación nuclear, localización en gránulos citoplasmáticos o incluso, inhibición traduccional.

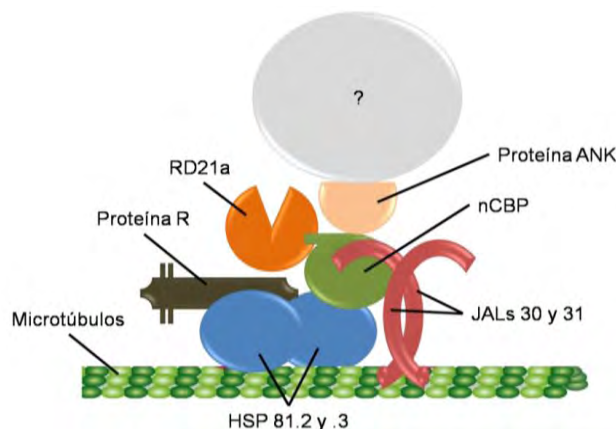


Figura 13. Posibles interacciones de nCBP. Dadas las características de las proteínas encontradas mediante ensayos de “Pull down”, nCBP podría estar interactuando directa o indirectamente con ellas para la formación de algún tipo de gránulos citoplasmáticos o un complejo de transporte vesicular. Tomado de Flores A., 2013.

4. HIPÓTESIS

Considerando que las plantas mutantes de nCBP muestran fenotipos pleiotrópicos durante el desarrollo de *Arabidopsis thaliana*, la distribución citoplasmática de nCBP en gránulos y su asociación con proteínas relacionadas a estrés, proponemos que la ausencia de esta proteína en las plantas tendrá efecto en su desarrollo ante un estímulo de estrés, osmótico o de oscuridad.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Caracterizar a nivel fenotípico y molecular plantas de *Arabidopsis thaliana*, mutantes de la proteína nCBP, en condiciones de estrés y normales de desarrollo.

5.2. Objetivos particulares

- Realizar un análisis fenotípico detallado del estado de crecimiento de plantas mutantes *ncbp-1d*, comparadas con WT, en condiciones normales de desarrollo.
- Evaluar el efecto de la senescencia inducida por oscuridad.
- Evaluar el nivel de expresión del gen SAG12 en hojas de plantas mutantes y silvestres.
- Evaluar el impacto del estrés osmótico en el desarrollo de raíz de plantas de *Arabidopsis thaliana*.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Material biológico

A partir de una línea mutante por inserción de T-DNA en el cuarto exón del gen *nCBP* (SALK-131503.32.70) se obtuvieron plantas mutantes homocigotas nulas (*ncbp-1*). A partir de estas se obtuvieron más generaciones filiales para enriquecer la línea con plantas homocigotas, que se utilizaron para el desarrollo de los experimentos (una vez verificada la presencia de la mutación).

6.2 Obtención de ácidos nucleicos

6.2.1 Extracción de DNA genómico

Para el aislamiento de DNA genómico, a partir de hojas de roseta, se ocupó el Kit DNeasy Plant Mini que permite obtener el DNA libre de contaminantes e inhibidores enzimáticos, siguiendo el protocolo indicado por el proveedor QIAGEN. De manera breve, se pesaron 100 mg de hojas de la roseta de plantas adultas WT y mutantes (*ncbp-1d*) y se colocaron en un mortero (previamente esterilizado y enfriado a -20°C), se adicionó nitrógeno líquido y se pulverizó hasta obtener un polvo fino que, inmediatamente, se colocó en un tubo eppendorff de 1.5 mL (estéril). Se agregaron 4 μL de RNasa y 400 μL de amortiguador AP1, se agitó con vórtex y se dejó incubando por 10 min a 65°C para permitir la lisis celular y degradación de RNA (durante el período de incubación se invirtió el tubo 2 ó 3 veces). Terminado el período, se adicionaron 130 μL de amortiguador AP2, se mezcló y dejó incubando 5 min en hielo para después, centrifugar el lisado a 14000 rpm durante 5 min a temperatura ambiente (para precipitar proteínas y polisacáridos). Se removió el lisado, teniendo cuidado de no deshacer el pellet, y se pasó a una columna QIAshredder Mini Spin en un tubo colector de 2 mL; se centrifugó a 14000 rpm durante 2 min, para eliminar completamente el precipitado. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo adicionando 1.5 volúmenes de amortiguador AP3/E y se mezcló por pipeteo, después 650 μL de la mezcla se transfirieron a una columna DNeasy Mini Spin

(en un tubo colector de 2 mL) y se centrifugó durante 1 min a 8000 rpm, el sobrenadante se descartó para repetir este paso con la muestra restante. A continuación se hicieron dos lavados de la columna, con 500 μ L amortiguador Aw, en un nuevo tubo colector, centrifugando en cada lavado a 8000 rpm durante 1 y 2 min, respectivamente.

Finalmente, para la elución del DNA, se transfirió la columna a un tubo Eppendorff de 1.5 mL y se adicionaron 50 μ L de amortiguador AE, dejando incubar por 5 min a temperatura ambiente, para después centrifugar a 8000 rpm durante 1 min. Este paso se repitió una vez más para tener en total 2 eluciones de 50 μ L. El DNA se almacenó a -20 °C hasta su uso.

6.2.2 Extracción de RNA total

La extracción de RNA se realizó siguiendo la técnica recomendada por el fabricante del reactivo Trizol (Invitrogen Carlsbad CA, USA). El procedimiento se describe a continuación: se pesaron 100 mg de tejido y se colocaron en un tubo Eppendorf de 1.5 mL (estéril), con nitrógeno líquido se congeló el tejido y, con un pistilo estéril, se pulverizó el material hasta obtener un polvo fino. Enseguida, se adicionó 1 mL del reactivo Trizol agitando la mezcla en un vórtex hasta resuspensión total. El homogenizado se dejó incubando por 5 min a temperatura ambiente (para permitir la disociación completa de los complejos nucleoproteína); después, se adicionaron 200 μ L de cloroformo y se agitó vigorosamente por 15 segundos la mezcla, dejando incubar por 3 min a temperatura ambiente, seguido por una centrifugación a 12000 x g durante 15 min a 4 °C. En esta etapa, la mezcla se separa en dos fases, una inferior compuesta por fenol cloroformo, una interface, y finalmente una fase superior acuosa que contiene el RNA. De esta última, se transfirió un volumen (aproximadamente el 60% del volumen total de Trizol adicionado) a un nuevo tubo eppendorff de 1.5 mL para precipitar el RNA adicionando 500 μ L de isopropanol. Se dejó incubando por 10 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 12000 x g durante 10 min a 4 °C. Se removió el sobrenadante, y el precipitado (de un color blanco gelatinoso) se lavó con 1 mL de etanol al 75%, centrifugando a 7500 x g a 4 °C durante 5 min. Después, se eliminó el sobrenadante y se dejó secando sobre papel

absorbente a temperatura ambiente. La resuspensión del RNA se hizo en agua tratada con DEPC.

Finalmente, el RNA se separó en un gel de agarosa al 1.5% con amortiguador TAE 1X y bromuro de etidio, para observar la integridad y pureza del RNA. El RNA se almacenó a -70°C hasta su uso.

6.2.3 Cuantificación de ácidos nucleicos

La cuantificación de los ácidos nucleicos (DNA o RNA) se realizó directamente en las muestras extraídas, sin hacer diluciones, ocupando un equipo NANODROP que permite cuantificar por absorbancia a 260nm.

6.3 RT-PCR

Reverso Transcripción (RT)

Para la transcripción reversa del RNA se ocupó el sistema de ImProm-II de Promega Corporation, que incluye una enzima reversa transcriptasa y un set de reactivos que permiten una eficiente síntesis de cDNA de cadena sencilla.

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

- En un tubo, adicionar:

RNA (a tratar)	1-8 µL
Amortiguador RQ1 DNasa 10X	1 µL
Enzima DNasa	1 µL
H ₂ O (Tratada con DEPC)	c.b.p. 10 µL
- Incubar a 37 °C por 30 min.
- Adicionar 1µL de solución de paro de DNasa (RQ1 DNase Stop Solution) para detener la reacción.

- Incubar por 10 min a 65 °C para inactivar la DNasa.

Una vez tratado el RNA, se siguió el protocolo indicado por el proveedor del sistema RT que se describe a continuación:

- En un tubo, agregar:

RNA experimental (hasta 1µg)	X µL
Cebador (oligo dT; 0.5µg/reacción)	1 µL
Agua (tratada con DEPC)	X µL
Volumen Final	= 5 µL
- Incubar a 70 °C por 5 min. Finalmente enfriar a 4 °C y mantener en hielo.

Por otra parte, se preparó una mezcla de reacción combinando los siguientes componentes:

Agua tratada con DEPC (c.b.p. 15 µL)	X µL
Amortiguador Reacción 5X	4 µL
MgCl ₂ (25mM)	2.4 µL
dNTP Mix (10mM)	1 µL
ImProm-II RT (enzima)	1 µL

Por vórtex, se mezclaron los componentes anteriores y se dispensó en un tubo de reacción (0.2 mL) adicionando 5 µL del templado (RNA con cebador dT) para un volumen final de reacción de 20 µL. Las reacciones siguientes se realizaron en un agitador térmico marca Eppendorff:

- Alineación del primer, a 25°C durante 5 minutos.
- Extensión de la cadena primaria, a 42°C por 60 minutos.
- Inactivación de la enzima RT, incubando a 70°C por 15 minutos.

El cDNA obtenido se almacenó a -20°C hasta su uso.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Cada reacción de PCR se realizó utilizando un termociclador marca BioRad. Para cada una se ocupó un volumen final de 20 μ L, conformado los componentes como se describe a continuación:

- 1 μ L de cDNA
- 2 μ L de Amortiguador 10X
- 1.8 μ L de $MgCl_2$ 25mM
- 0.4 μ L de dNTPs 10mM
- 0.2 μ L de cebador Forward 10mM (Tabla 1)
- 0.2 μ L de cebador Reverse 10mM (Tabla 1)
- 0.3 μ L de Taq Polimerasa
- 13.3 μ L de Agua estéril

Las condiciones de PCR fueron las siguientes, siendo el número de ciclos y la temperatura de alineación acorde al gen que se amplificó.

- Pre-desnaturalización: 1 ciclo de 5 min a 94 °C
- Amplificación por PCR: 45 s a 94 °C (desnaturalización), 45 s a 55-60 °C (alineamiento) y 1 min a 72 °C (extensión) por 28-35 ciclos.
- Extensión final de la cadena: 1 ciclo de 8 min a 72 °C, seguido de incubación a 4 °C para detener la reacción.

Los productos de PCR se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 1.5%, en solución TAE 1X, y se tiñeron con bromuro de etidio para observarlos en UV.

Tabla 1. Oligonucleótidos empleados en las PCRs

Nombre cebador	Secuencia 5'→3'
LP-AtnCBP	GGTTTTGCGAATTTGTTTAGAT
RP-AtnCBP	TCTCACCTGATGGTCAGAAGC
LBa1	TGGTTCACGTAGTGGGCCATCG
ncbp F	CAGGGACTCGGAAACATGGACAGC

ncbp R	GCCGCTTGATTGAGTCTCTCAAACCCATCAC
pENTR-ncbp-F	CACCATGGCGGAGGTTTTGGATAGG
pENTR-ncbp-R	TCCTCTCAGCCATGTGTTTCTGTAGG
18S F	GGAAACTTACCAGGTCCAGACATAG
18S R	GTGGCCTAAACGGCCATAGTCCCTC
SAG 12 Fw	GATGAAGGCAGTGGCACACCAACCG
SAG 12 Bw	GACATCAATCCCACACAAACATACACA

6.4 Caracterización fenotípica

6.4.1 Caracterización en condiciones normales de crecimiento

El análisis del tiempo de floración y de otros parámetros de desarrollo en plantas de *Arabidopsis thaliana*, se llevó a cabo en una plataforma de siembra en suelo de acuerdo a Boyes *et al*, 2001, donde se describe el análisis fenotípico basado en estados del crecimiento. Las mediciones que se realizaron para cada planta fueron: (1) número de días en el que se presenta la transición floral (tiempo de floración); (2) número de hojas de roseta en el día del bolting (cuando la inflorescencia primaria mide 1 cm); (3) número de hojas caulinares; (4) número total de silicuas producidas y (5) número de escapos florales secundarios.

Para llevar a cabo lo anterior, las semillas de *Arabidopsis thaliana* (de plantas mutantes y silvestres) se sembraron en una maceta con sustrato Metro Mix 200 o turba-agrolita-vermiculita en una relación 3:1:1.5, humedecido con agua, y se mantuvieron a 4°C por 48h en la oscuridad (para sincronizar la germinación). Posteriormente las macetas se pasaron a una cámara de incubación a 22 °C con un fotoperiodo de día largo (16 horas de luz y 8 horas de oscuridad). Después de 2 semanas (o cuando las plantas presentaban ya 4 hojas) se trasplantaron a macetas individuales, con el mismo sustrato, y se mantuvieron en las mismas condiciones de crecimiento.

Las mediciones se realizaron cada dos días, a partir de que aparecen las primeras hojas verdaderas, y se continuaron a través de la vida de la planta.

6.4.2 Caracterización en condiciones de estrés

Para evaluar el efecto del estrés osmótico en el desarrollo de las plantas, las semillas fueron esterilizadas previo a la siembra en cajas Petri, para evitar contaminación y crecimiento de microorganismos que interfiriesen en la evaluación. El procedimiento de esterilización se describe a continuación. Todo el procedimiento (incluida la siembra) se realizó en condiciones estériles, trabajando en una campana de flujo laminar.

6.4.2.1 Esterilización y siembra de semillas

Material y Reactivos

- Cajas Petri cuadradas de 15 x 15 cm
- Sacarosa
- MES hidratado
- Agar
- Manitol

Soluciones

- Solución de Cloro 20% + Tween 0.1%
- Solución de Cloro al 20%
- Agua estéril
- Soluciones MS
- Solución KOH al 0.1%

Metodología

Las semillas se colocaron en un tubo Eppendorff y se les adicionó 1 mL de una solución que contenía Cloro 20% + Tween 0.1%. Después, se mantuvo en agitación vigorosa durante 20 min. Posteriormente se eliminó el sobrenadante y se adicionó 1 mL de cloro al 20%, para dejar de nueva cuenta en agitación por 10 min más. Una vez concluido el tiempo, se eliminó el sobrenadante y se enjuagaron las semillas cinco veces con 1 mL de agua estéril por 30 s (por cada

enjuague), hasta eliminar completamente el hipoclorito/Tween. Después del último lavado se adicionó 1 mL de agua estéril.

Las semillas desinfectadas se sembraron en las cajas Petri (de 15 x 15 cm) con medio MS, que se compone de: 50 mL de un preparado de cinco soluciones de cultivo (nitratos, halógenos, sulfatos, fosfatos y quelantes); 10.0 g de Sacarosa, 0.5 g de MES hidratado (amortiguador), 10 g de Agar y 36.4 g de Manitol (o sin manitol, en el caso de las condiciones control), ajustando el pH del medio a 5.7 con una solución de KOH (las cantidades mencionadas de cada reactivo corresponden a 1 L de medio MS).

Una vez sembradas las semillas, se sellaron las cajas con parafilm y se taparon con papel aluminio para dejarlas a 4 °C por 48 h (para sincronizar germinación). Después, se pasaron a una cámara de incubación, de manera vertical, a 22 °C con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad (día largo).

Cada tercer día se realizó el registro de longitud de la raíz principal hasta los 24 días después de la germinación.

6.5 Inducción de senescencia

6.5.1 Inducción de senescencia en plantas por oscuridad

Para promover la senescencia en hojas individuales de las plantas, por oscuridad (Weaver and Amasino, 2001; Guo and Crawford, 2005), se tomaron plantas de tres semanas de crecimiento (después de la germinación) y se les cortó la hoja # 5 verdadera, de idéntica edad, para hacer un pool y colocarlas dentro de una caja Petri de 9 mm de diámetro que contenía un papel filtro y 15 mL de agua destilada. Las cajas Petri se taparon y sellaron con parafilm, envolviéndolas en papel aluminio y dejándolas en una cámara en oscuridad total a una temperatura de 22 °C. Después de 2, 4 ó 6 días de tratamiento en la oscuridad, las hojas fueron congeladas en nitrógeno líquido y almacenadas a -70 °C hasta su análisis.

Como control no tratado se tomaron hojas cosechadas el mismo día y se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido.

6.6 Medición de muerte celular

6.6.1 Tinción con Azul de Evans

La muerte celular, que indica pérdida de la integridad de la membrana plasmática, fue medida espectrofotométricamente por tinción con azul de Evans de hojas desprendidas como se describe previamente (Wright *et al.*, 2000; Rea *et al.*, 2004) con menores modificaciones. El diagrama mostrado en la figura 14 indica de manera resumida el procedimiento seguido. Las hojas que se tiñeron fueron tratadas por oscuridad previamente, como se describió en el punto 6.5.

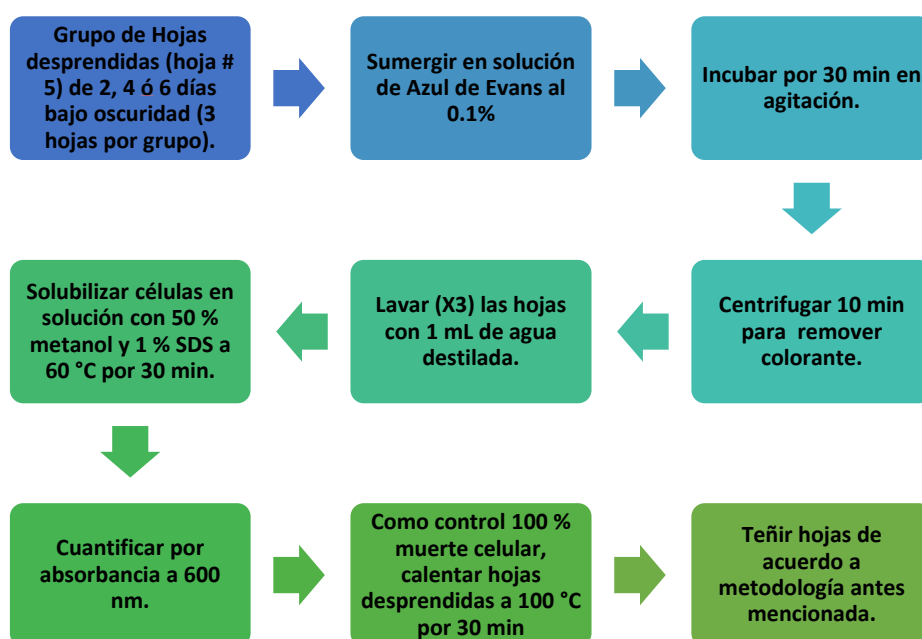


Figura 14. Tinción con azul de Evans. Medición espectrofotométrica de senescencia con Azul de Evans descrita por Wright *et al.*, 200; Rea *et al.*, 2004, con menores modificaciones.

7. RESULTADOS

7.1 Caracterización molecular de plantas silvestres (WT) y mutantes (*ncbp-1*)

Antes de poder iniciar cualquier tipo de experimento con las líneas de trabajo, plantas WT y mutante nula para la proteína nCBP (*ncbp-1*), fue necesario determinar que cada línea tuviera el genotipo deseado. Para ello se amplificó la región de DNA correspondiente al gen nCBP que abarca la inserción de T-DNA. Se utilizaron hojas de roseta de plántulas de 30 días. Como se observa en las figuras 15 y 16, los cebadores LP y RP (ver tabla, figura 15 inciso C), que rodean el sitio de inserción de T-DNA en la mutante, permitieron amplificar un fragmento del tamaño esperado para las plantas silvestres mientras que, utilizando el cebador LB en combinación con LP y RP, sólo se amplificó el fragmento esperado para el genotipo mutante.

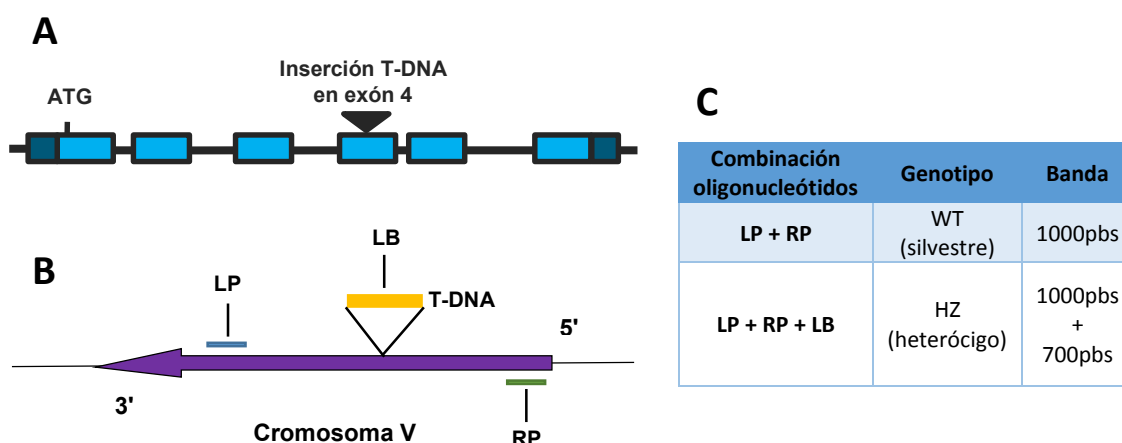


Figura 15. Esquema de la inserción de T-DNA en la secuencia génica de nCBP. En la figura A se observa la región en la que está insertado el T-DNA, que corresponde al exón 4 de *nCBP*. En B se muestran los cebadores que flanquean el sitio de inserción: LP y RP que en PCR amplifican una banda correspondiente al tipo silvestre; LB es el cebador que corresponde a una secuencia del T-DNA y, que en combinación con RP, sólo amplificaría un fragmento correspondiente al genotipo mutante. En C se muestra la combinación de cebadores y el tamaño de amplicon esperado. Modificado de Hidalgo, 2007 y de la Torre, 2009.

Los resultados mostrados en la figura 16 indican que la línea *ncbp-1* presenta el T-DNA y es homociga para la mutación (el inserto se encuentra en los dos alelos) ya que la combinación de los tres cebadores no amplificó el fragmento indicativo de genotipo silvestre (ver esquema figura 15) que si se observó en la línea WT. De esta manera se pudo continuar con el trabajo experimental una vez

asegurado el genotipo deseado en cada línea. Como se observa también en la figura 16, se comprobaron dos plantas de cada línea y para fines del trabajo, se tomaron semillas sólo de una planta (en el caso de la mutante de la línea *ncbp-1d*) para obtener más y realizar los experimentos correspondientes.

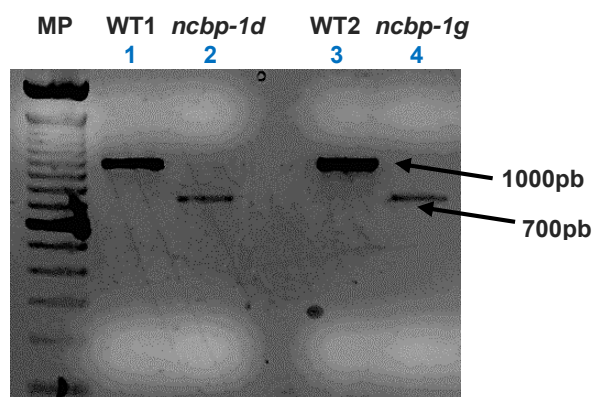


Figura 16. Productos de PCR, a partir de DNA genómico, para la identificación de mutantes homocigas *ncbp-1*. Carriles 1 y 3, amplificación correspondiente a plantas WT con los cebadores LP y RP. Carriles 2 y 4, amplificación correspondiente a plantas mutantes *ncbp-1* con la combinación de cebadores LP, RP y LB. MP= marcador de peso molecular, escalera de 100pb. Con flechas se muestra el tamaño del producto esperado.

7.2 Caracterización fenotípica de plantas mutantes *ncbp-1d*

Una vez comprobado el genotipo de las líneas, se tomaron semillas de cada planta y se sembraron en tierra para realizar la caracterización fenotípica, evaluando diversos parámetros de crecimiento y desarrollo (ver punto 6.4 de metodología). Las plantas crecieron bajo las mismas condiciones de temperatura (21°C), humedad relativa (65%) y fotoperiodo (día largo), desde su germinación hasta la senescencia y muerte de las mismas (alrededor de 2-3 meses después de su siembra). Se hicieron en total tres evaluaciones en réplicas biológicas independientes para comprobar la reproducibilidad de los resultados. Para cada una de las réplicas se ocuparon 21 individuos mutantes y 21 silvestres, haciendo registros de fenotipo cada dos días. Todos los individuos germinaron al mismo tiempo (entre 0-4 días), sin mostrar diferencias apreciables en las primeras semanas. Después de dos semanas (14 días después de la germinación) se trasplantaron a macetas individuales para continuar con la evaluación. La caracterización fenotípica de las plantas se realizó en tres etapas principales de crecimiento: fase vegetativa, fase reproductiva y senescencia y muerte. A continuación se describen los resultados representativos de una de las réplicas

biológicas y en la tabla 2 (página 51) se muestra el conjunto de resultados de las tres réplicas. El desglose detallado de los resultados obtenidos en las otras dos replicas se encuentra en anexos.

7.2.1 Fase vegetativa

En esta fase la raíz y hojas de roseta se desarrollan para el aprovechamiento y almacenamiento de nutrientes, mismos que serán ocupados después para la producción de flores y semillas. Esta primer etapa concluye cuando las hojas de roseta completan su crecimiento (alcanzan su tamaño final) y comienza a emerger la inflorescencia, hacia la cual se destinarán todas las reservas de nutrientes (fase reproductiva).

Durante esta etapa se encontraron diferencias importantes en las plantas mutantes con respecto a las silvestres. La primera diferencia fenotípica evidente fue una mayor producción de hojas de roseta en las mutantes *ncbp-1d* por planta, comparadas con plantas silvestres. Aunque esto ya se había encontrado previamente (De la Torre, 2009), no se había realizado la evaluación desde las primeras etapas del desarrollo, quedando la duda de si realmente se trataba de un fenotipo de retraso de floración o retraso general del desarrollo en la mutante *ncbp-1d*. Se contó el número de hojas de roseta desde la aparición de las primeras hojas verdaderas hasta la aparición del escape floral (bolting). La figura 17 (inciso A) muestra el gráfico del número de hojas de roseta contadas en el tiempo. Se observa que hasta el día 28 de evaluación ambas plantas presentan en promedio el mismo número de hojas mientras que, a partir del día 32 hasta el día 40, se observa que plantas *ncbp-1d* muestran diferencia significativa con respecto a plantas WT. Es decir, que las plantas mutantes siguen produciendo hojas de roseta mientras que las plantas silvestres ya presentan escape floral en este período. Este análisis indicó que efectivamente *ncbp-1d* no muestra un retraso en el desarrollo de la etapa vegetativa, pero sí en la aparición de la inflorescencia (o paso a la etapa reproductiva), lo que ocasionó que el desarrollo vegetativo continuara por más tiempo que en plantas silvestres (véase figura 17, incisos B y C). Como se describió antes, entre los días 28 a 32 las plantas WT habían alcanzado ya el desarrollo final de hojas de roseta (15 hojas en promedio)

dando paso al inicio de la fase reproductiva, mientras que plantas *ncbp-1d* continuaron la producción de más hojas hasta alcanzar su tamaño final (entre 20 y 25 hojas) que ocurre en el día 42, al mismo tiempo que comienza a emerger la inflorescencia. Como se observa en el inciso C (figura 17), esta aparición del escapo floral en las mutantes ocurre en promedio 10 días después de que emerge en plantas silvestres (días 40 y 30 de evaluación, respectivamente).

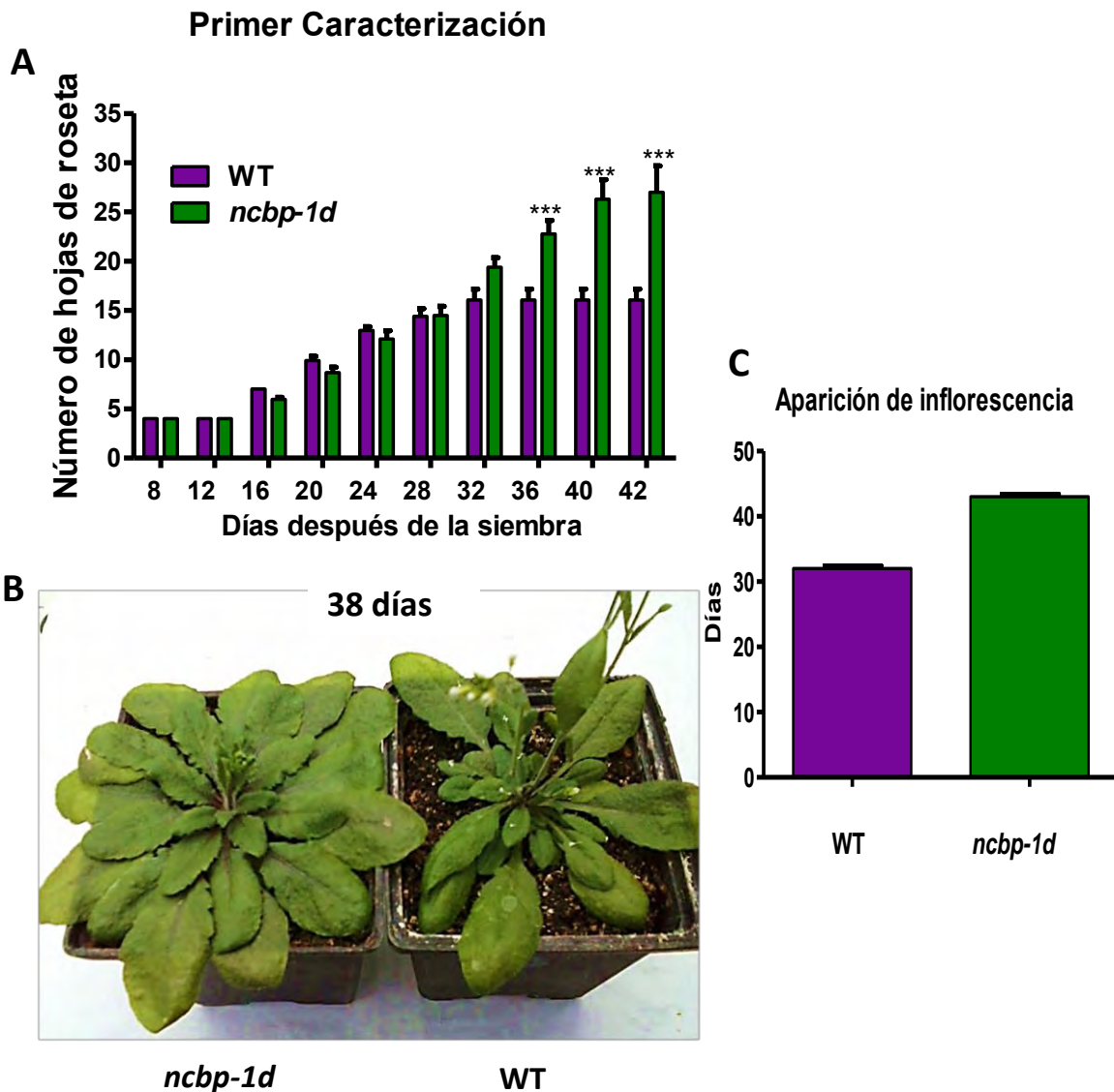


Figura 17. Tiempo de floración de plantas mutantes *ncbp-1d* y silvestres WT. A. Número total de hojas de roseta contadas en el tiempo (después de la germinación). A partir de los 28 días plantas WT cesan la producción de hojas de roseta y dan paso a la aparición de inflorescencias, mientras que en plantas mutantes esta etapa ocurre días después. B. Fenotipo de plantas representativas *ncbp-1d* y WT. Se observa que en la mutante hay un retraso en la emergencia de la inflorescencia comparada con la silvestre, quien ya presenta una inflorescencia de más de 15 cm de altura a los 38 días después de la siembra. C. Número de días promedio en los que el 100% de las plantas presenta inflorescencia. Se observa que la diferencia es de aproximadamente 10 días. Las plantas fueron crecidas simultáneamente bajo condiciones de día largo. Las barras indican el error estándar de la media (n=21). Columnas con *** indican diferencia estadística significativa con respecto a WT (P<0.001).

Estos resultados sugieren que la ausencia de la proteína nCBP en las plantas mutantes afecta sólo la reprogramación del meristemo apical para alcanzar la identidad de meristemo floral, es decir, el paso hacia la etapa reproductiva, ya que la etapa vegetativa se mantiene a la par que plantas mutantes alargándose sólo el período de inicio de la etapa reproductiva.

7.2.2 Fase reproductiva

Como ya se ha mencionado, el inicio de la fase reproductiva ocurre cuando emerge la inflorescencia y cesa el desarrollo de hojas de roseta. En esta etapa se produce otro tipo de hojas, las caulinares, que serán las que brinden la energía necesaria (junto con las hojas de roseta) para la producción de flores y silicuas. El final de la fase reproductiva se presenta cuando todas las flores han abierto y se ha producido el 100 % de silicuas. Ya que esta fase inicia tardíamente en las plantas *ncbp-1d* comparadas con las silvestres (véase figura 18), las diferencias fenotípicas que se acentúan a través del tiempo, como aparición de flores, la formación de silicuas y maduración de semillas, se inicia primero en plantas silvestres y, varios días después, en las mutantes (véase figura 19).

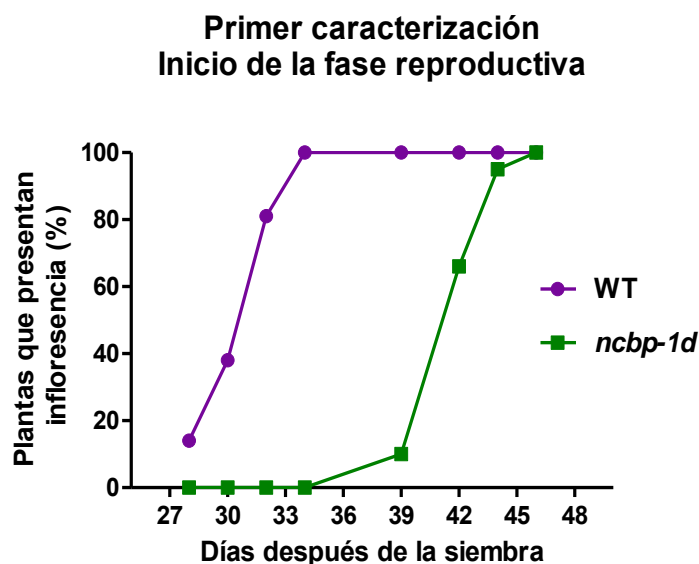
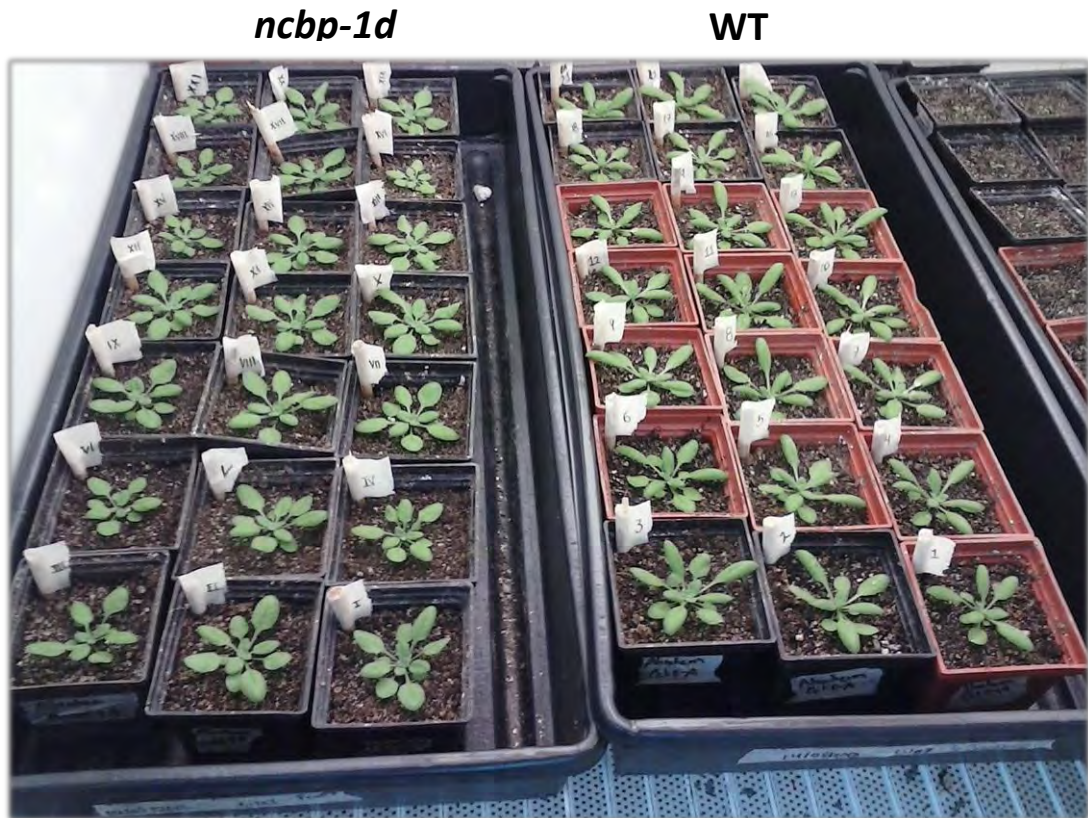


Figura 18. Inicio de la fase reproductiva en plantas *ncbp-1d* y WT. El gráfico muestra el porcentaje de plantas que presentan inflorescencia a través del tiempo. Como se ve en la figura, plantas silvestres inician la fase reproductiva a partir del día 28 y hasta el día 33 alcanzan el 100% de plantas con inflorescencia, mientras que plantas mutantes inician esta etapa a partir del día 39 (aproximadamente 10 días después del tiempo en que iniciaron las silvestres) y se completa en todas las plantas hasta el día 45. 100% = 21 individuos evaluados por línea.

Día 22



Día 34

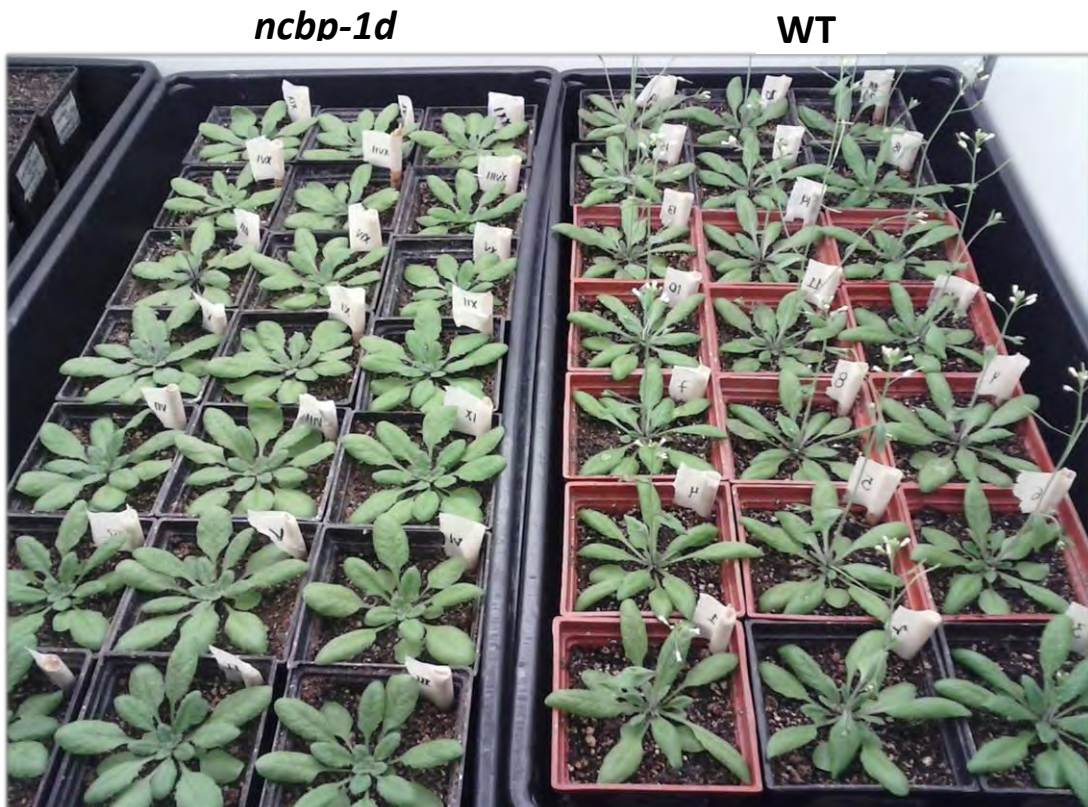
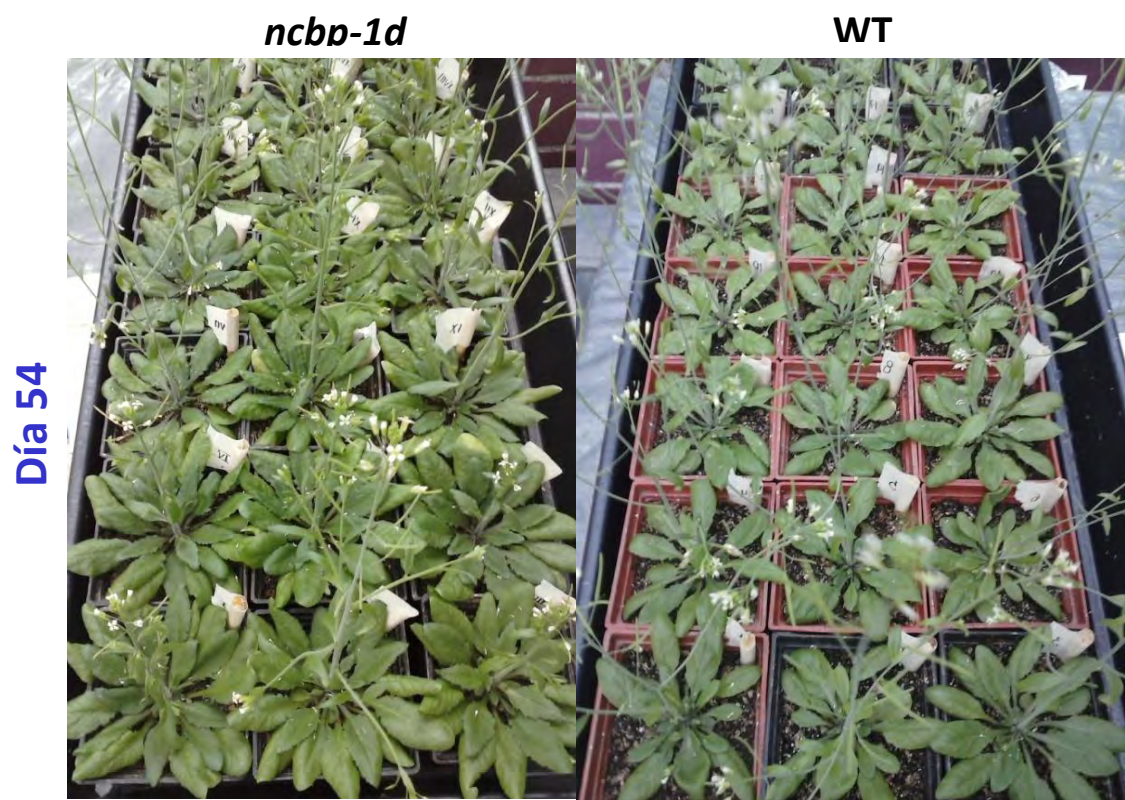
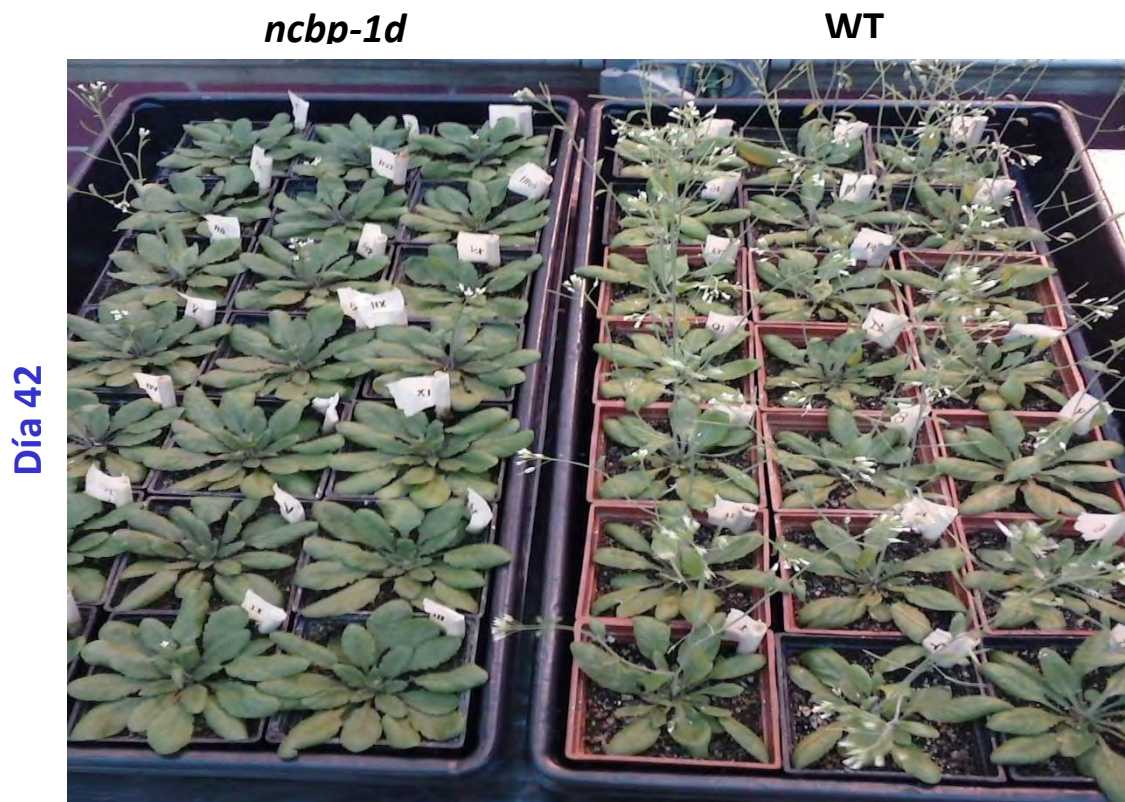


Figura 19. Fenotipo de plantas mutantes *ncbp-1d* comparadas con plantas WT, a lo largo del desarrollo. Durante la primera etapa del desarrollo (fase vegetativa) no se observa diferencia entre plantas silvestres y mutantes *ncbp-1d* (día 22 de evaluación), si no que esta es evidente a partir de que inicia la fase reproductiva en las plantas WT (día 34) y se acentúa en los subsiguientes días (día 42 y 54 de evaluación), debido a un retraso en la aparición de la inflorescencia en plantas mutantes (como se observa en la imagen esto ocurre en el día 42, ver imagen en siguiente hoja).



Continuación figura 19. Fenotipo de plantas mutantes *ncbp-1d* comparadas con plantas WT, a lo largo del desarrollo

En la etapa reproductiva, las plantas *ncbp-1d* mostraron diferencias significativas con respecto a las silvestres respecto al número de hojas caulinares totales y de inflorescencias laterales, siendo mayor (en ambos casos) para plantas mutantes (véase figura 20). En segundo lugar, el número de silicuas totales también fue mucho mayor para plantas mutantes que para plantas silvestres (ver también figura 20). Parámetros como la altura final de la inflorescencia principal y el número de semillas por silicua fueron similares para ambas líneas.

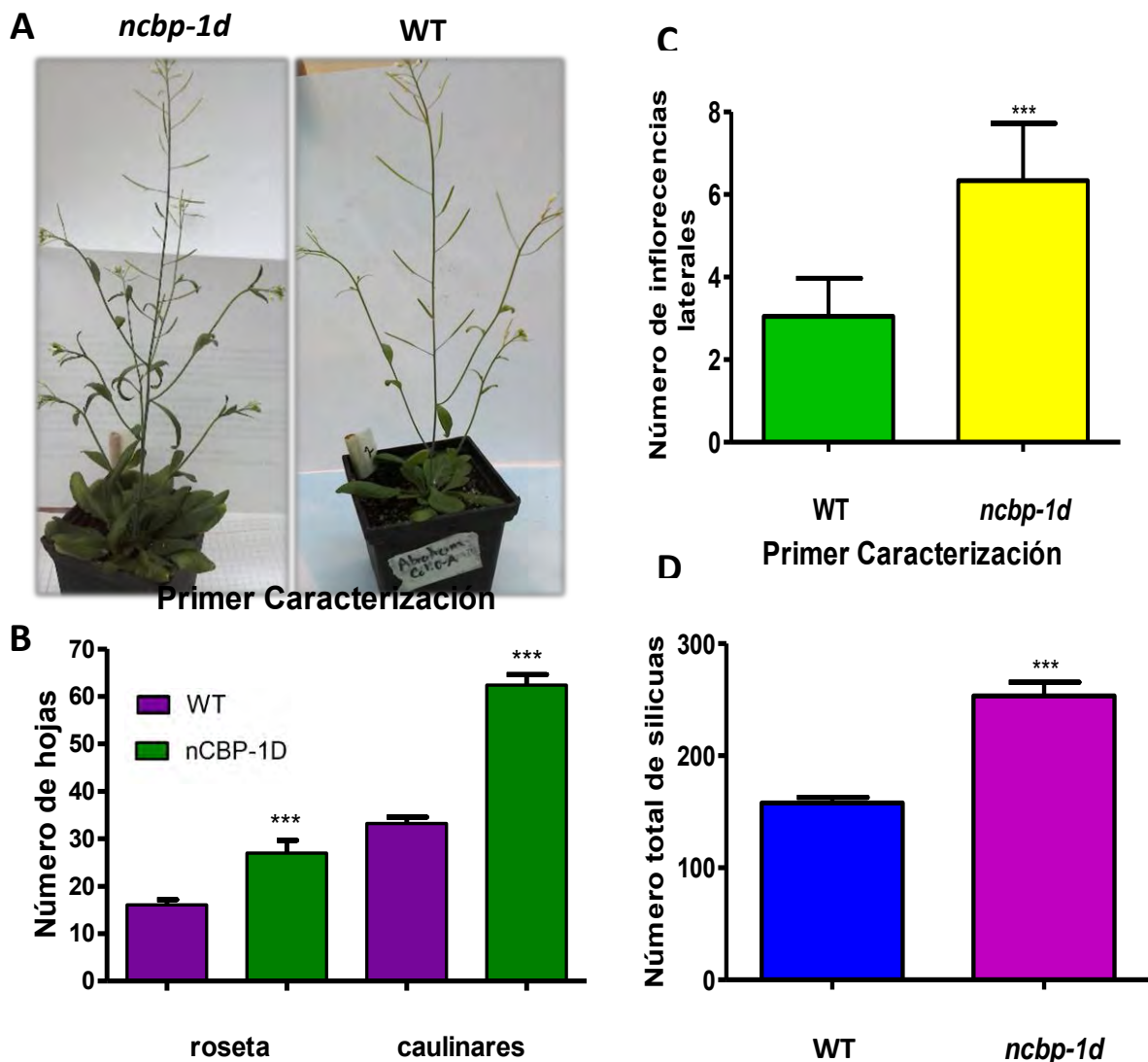


Figura 20. Detección de diferencias fenotípicas entre plantas mutantes y silvestres, durante la fase reproductiva. A. Planta mutante y silvestre durante la fase reproductiva. Se observa mayor número de inflorescencias laterales y de hojas caulinares en la mutante, comparada con la silvestre. B. Número total de hojas caulinares y de roseta. C. Número total de inflorescencias laterales (que emergen a partir de la inflorescencia principal). D. Número total de silicuas al final de la fase reproductiva. Barras indican el error estándar de la media (n=21). Columnas con *** indican diferencia estadística significativa con respecto a WT (P<0.001).

Estas diferencias estadísticamente significativas apoyan la posibilidad de alteraciones en la vía autónoma de floración y la participación de nCBP en su regulación, ya que mutantes de genes que componen esta vía causan florecimiento tardío (Simpson *et al.*, 2003; Lim *et al.*, 2004). Sin embargo, no se puede descartar que el fenotipo observado sea también una simple consecuencia del mayor número de hojas que desarrollan las plantas mutantes *ncbp-1d* durante la etapa vegetativa.

Para evaluar la reproducibilidad de los resultados obtenidos durante las etapas vegetativa y reproductiva, en esta primer réplica biológica se llevaron a cabo dos replicas más. Las plantas en estas réplicas tampoco mostraron diferencia en cuanto al tiempo de germinación ni de desarrollo en las primeras tres semanas.

Los parámetros evaluados en cada una de las réplicas durante las fases vegetativa y reproductiva mostraron también diferencias estadísticas significativas, repitiéndose el patrón observado en la primera réplica. Como se aprecia en la tabla 2, los resultados obtenidos en la primer y tercer réplicas biológicas son más parecidos que si se comparan con la segunda réplica (tanto para plantas silvestres como para plantas mutantes), lo que puede deberse al hecho de que en la segunda réplica plantas silvestres florecieron más tempranamente (día 28) en comparación con la primer y tercer réplicas (día 32 y 33, respectivamente), lo que determinó que la diferencia en el número de hojas de roseta entre mutantes *ncbp-1d* y silvestres fuera aún mayor. Por otra parte, plantas mutantes en la segunda réplica mostraron una senescencia más temprana comparada con la primera y tercera réplicas, lo que debió influir en el número de hojas caudales producidas y el número total de silicuas. Sin embargo, pese a estas diferencias los resultados son reproducibles en la mutante en cuanto al retraso en la aparición de la inflorescencia, mayor número de hojas de roseta y caulinares, mayor número de inflorescencias laterales y mayor número de silicuas totales producidas, en comparación con plantas silvestres donde los parámetros mencionados fueron significativamente más bajos.

Número de réplica	Parámetro	Número total de silicuas	Número de hojas caulinares	Número de inflorescencias laterales	Número de hojas de roseta	Tiempo de floración (días)
	Línea					
Primer réplica biológica	WT	157.8±5.0	33.2±1.3	3.0±0.2	16.1±0.2	32.0±0.4
	<i>ncbp-1d</i>	253.3±12.2	62.4±2.2	6.3±0.3	26.9±0.6	43.0±0.4
Segunda réplica biológica	WT	86.1±4.3	15.8±0.9	1.4±0.1	12.1±0.2	28.7±1.1
	<i>ncbp-1d</i>	174.3±4.9	38.6±2.0	6.3±0.4	28.4±1.2	41.7±1.4
Tercer réplica biológica	WT	147.8±7.9	25.9±1.2	3.1±0.2	16.8±0.4	33.5±1.0
	<i>ncbp-1d</i>	243.7±10.2	75.1±2.8	6.9±0.3	32.6±0.7	45.3±1.7

Tabla 2. Resultados obtenidos en las tres réplicas biológicas. Como se aprecia en la tabla, los resultados obtenidos en la primer y segunda réplicas biológicas son muy parecidos en comparación con los de la segunda réplica biológica; sin embargo, para las tres réplicas se mantuvo el patrón de mayor producción de hojas (caulinares y de roseta), silicuas y escapos secundarios para plantas *ncbp-1d* comparado con plantas silvestres, crecidas bajo las mismas condiciones. Los valores son expresados como la media (n=21) y error estándar (±SD).

7.2.3 Senescencia y muerte

En esta etapa, una vez que se ha desarrollado gran parte de las inflorescencias (principales y laterales), las hojas de roseta comienzan a morir, para dar paso al reciclaje de valiosos componentes nutricionales que serán ocupados en partes reproductivas de la planta, como flores y semillas. En esta etapa se observó que

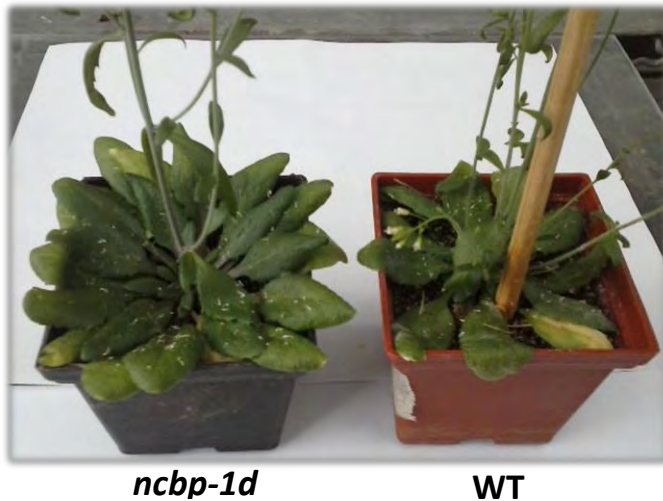


Figura 21. Inicio de la senescencia foliar. Plantas representativas a los 60 días de evaluación. Se observa que algunas hojas de roseta de plantas silvestres ya comienzan a morir, mientras que en plantas mutantes esto no es tan evidente.

plantas mutantes conservaban hojas de roseta en estado fotosintético por más tiempo comparado con hojas de plantas silvestres, ya que en estas últimas las hojas comenzaron a tornarse amarillas antes que en plantas *ncbp-1d*; sin embargo, como se aprecia en la figura 21, la diferencia entre el estado de deterioro de las hojas entre mutantes y silvestres no es tan

evidente.

Como se describió en la introducción, la senescencia foliar es un proceso degenerativo y genéticamente controlado, que se encuentra regulado por diversos factores internos, pero que puede ser inducido de manera prematura debido a señales exógenas como déficit de luz y agua. Debido a que la caracterización fenotípica del inicio de la senescencia fue realizada sólo de manera cualitativa, se decidió investigar si un estrés que induce senescencia en las hojas opera de manera diferente entre las plantas mutantes vs. silvestres. Para esto, la senescencia fue inducida por oscuridad en hojas desprendidas, un procedimiento que es comúnmente usado para inducir senescencia de manera artificial (Weaver and Amasino, 2001; Del Rio *et al.*, 2003; Oh *et al.*, 2003; Chrost *et al.*, 2004). Bajo esta condición, se observó que las hojas de *ncbp1-d* permanecieron verdes a los 2 y 4 días de tratamiento, mientras que hojas de plantas silvestres presentaban amarillamiento a partir del día 4 (véase figura 22). Por otra parte, la evaluación de viabilidad con Azul de Evans mostró una muerte celular significativamente mayor para plantas silvestres a los días 2 y 6 de tratamiento (véase figura 22, inciso B). Estos resultados indican que en ausencia de nCBP las células de las hojas presentan un progreso más lento de senescencia inducida por oscuridad.

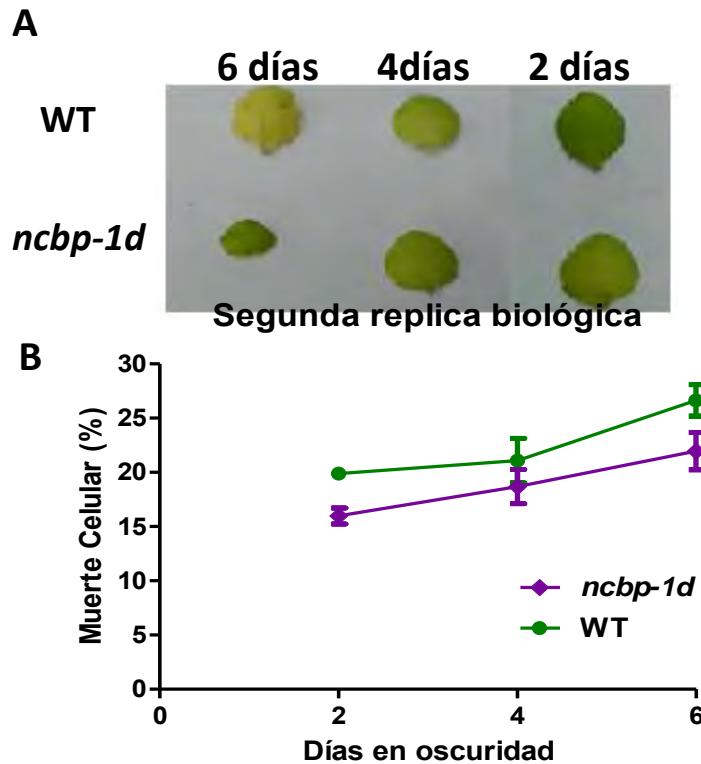


Figura 22. Senescencia de la hoja y muerte celular. A. Imagen de hojas tratadas bajo período de oscuridad (2, 4 ó 6 días). B. Muerte celular medida espectrofotométricamente, por tinción con azul de Evans, en hojas desprendidas de plantas mutantes y silvestres, como se describe en metodología. Barras de error indican SD (n=5).

Para profundizar en la respuesta a senescencia a nivel molecular, se decidió evaluar la expresión del gen SAG 12, que pertenece a la familia de genes SAGs (Senescence Associated Genes, por sus siglas en inglés) que se han reportado como estimulados en respuesta a varios eventos que inducen senescencia (Lohman *et al.*, 1994; Lim *et al.*, 2007). Se ha observado que SAG 12 se induce específicamente en la senescencia natural, lo que implica que no existe expresión detectable del gen en hojas jóvenes (Weaver and Amasino, 2001). A partir de hojas tratadas por 2, 4 o 6 días en oscuridad se extrajo RNA total y se realizó una RT-PCR de punto final para ver el nivel de expresión del mensajero de SAG 12.

Como se observa en la figura 23, en las plantas mutantes el transcrito fue detectado desde los dos días de tratamiento y su nivel aumenta conforme el período en oscuridad incrementa. Por otra parte, el transcrito en plantas silvestres fue detectable a partir del día 4 de tratamiento y aumenta un poco al

día 6. El nivel de expresión fue mucho mayor en plantas mutantes que en silvestres, lo que indicaría que la ausencia de la proteína nCBP induce altos niveles de SAG 12, a pesar de que a nivel fenotípico muestra menores niveles de senescencia y muerte celular en hojas. Como se discutirá más adelante, la asociación entre niveles del transcrito de SAG12 y el progreso de la senescencia, no está relacionada de manera directa en algunos casos.

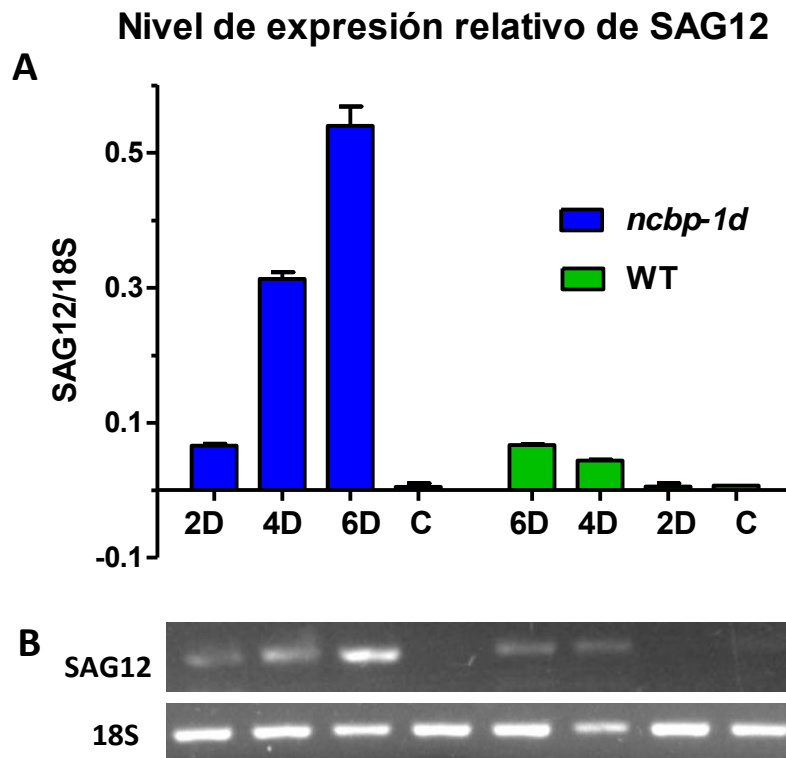


Figura 23. Nivel relativo del transcrito (mRNA) del gen SAG 12, inducido por oscuridad. A. Representación gráfica del nivel de expresión relativa del gen SAG 12. B. RT-PCR de mRNA extraído de hojas de plantas tratadas bajo oscuridad en 2, 4 y 6 días. Como se observa, el mensajero de SAG 12 es expresado en plantas mutantes desde los dos días (2D) de tratamiento mientras que en plantas silvestres es detectable hasta el día 4 (4D) de tratamiento. Se observa que los niveles de expresión son mayores para las plantas mutantes que para silvestres. 18S es amplificado como control constitutivo de plantas de *Arabidopsis thaliana*. Barras indican el error estándar de la media (n=2).

7.3. Participación de nCBP en respuesta a estrés osmótico

En estudios previos del laboratorio se encontró que la proteína nCBP forma un complejo multiproteico con proteínas que desempeñan una función en el desarrollo de la planta bajo condiciones de estrés, y también se observó que ésta forma gránulos citoplasmáticos tipo cuerpos P o SGs (aunque su naturaleza no ha sido bien identificada) que pueden aparecer frente a un estímulo de estrés,

lo que podría implicar a nCBP en la regulación de mRNAs bajo un estrés ambiental que comprometa el desarrollo de la planta.

De esta manera se decidió averiguar el papel que puede tener la proteína nCBP bajo condiciones de estrés osmótico y frío, para lo cual se realizó un análisis previo *in silico* que pudiera indicarnos el cambio en el nivel de expresión del mensajero del gen *nCBP* bajo una determinada condición de estrés (ver figura 24).

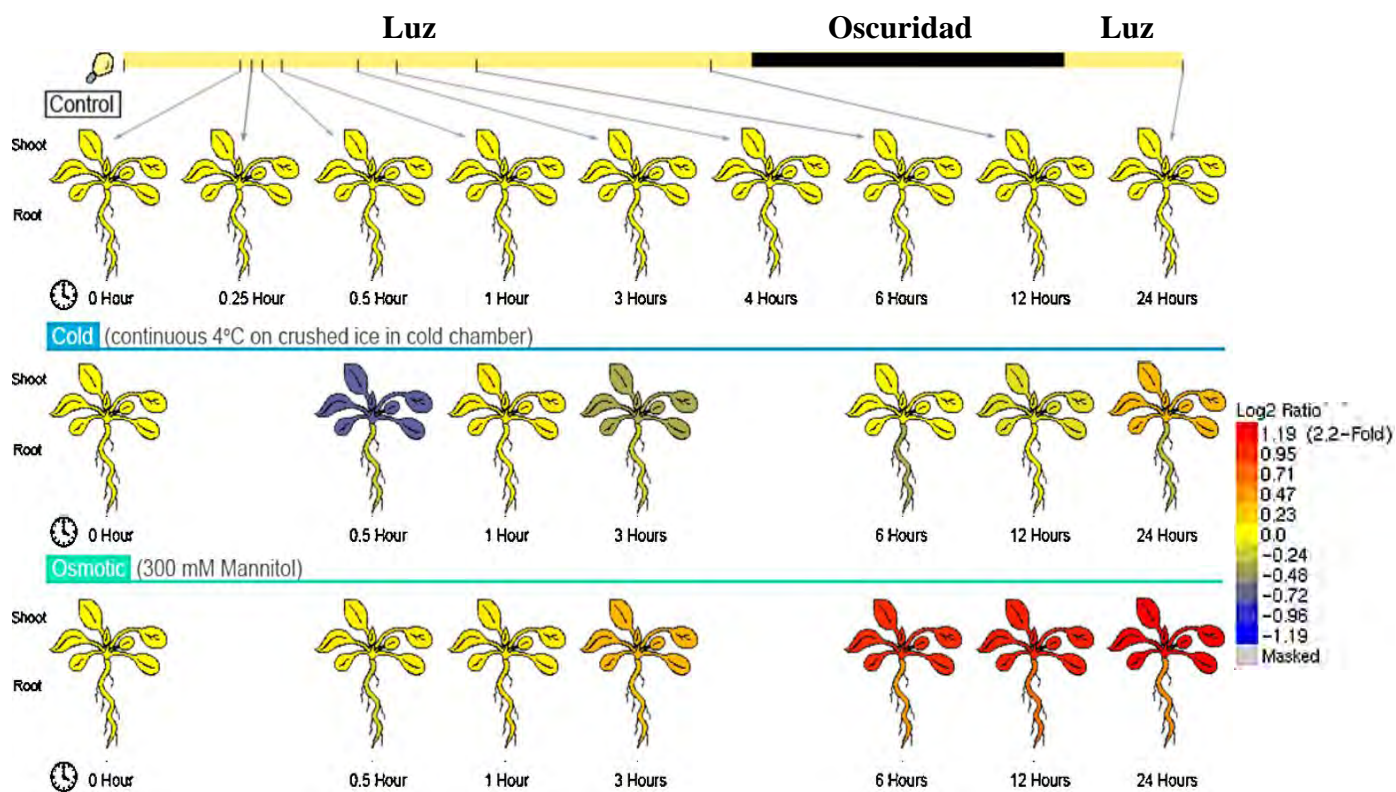


Figura 24. Análisis *in silico* del nivel de expresión del gen nCBP, a distintos tiempos, bajo condiciones de estrés abiótico. El análisis fue llevado a cabo en la base de Arabidopsis eFP Browser, que contiene datos de microarreglos de germinación de semillas. El gen *nCBP* (At5g18110) fue probado bajo condiciones de estrés abiótico, en particular por frío a 4°C y por manitol a 300mM. Como se observa, bajo condiciones de frío los niveles de expresión del mensajero no cambian con respecto a la condición control, mientras que en estrés osmótico los niveles aumentan desde la primera hora de evaluación.

Como se observa en la figura 24, bajo condiciones de estrés por frío, a 4 °C, el nivel de expresión relativo del gen en raíz se mantiene similar a las condiciones control (en la mayoría de los tiempos de evaluación) aunque se muestra una ligera disminución del transcrito a 0.5 y 3 horas de exposición a esa temperatura (ver escala, a mayor intensidad del color azul menor la expresión). Por el contrario, bajo condiciones de estrés osmótico en presencia de 300 mM de

Manitol, el nivel de expresión de *nCBP* en raíz aumenta a partir de la primer hora de evaluación (0.23 veces en comparación con la condición control), aumentando a las tres horas (0.47 veces) y llegando a un nivel máximo de 2.2 veces a las 24 horas de evaluación (ver escala, a mayor intensidad del color rojo, mayor el nivel de expresión). A partir de este análisis *in silico*, se decidió evaluar el efecto de estrés osmótico, en el desarrollo de plantas de *Arabidopsis thaliana* en ausencia de *nCBP*. Para lo anterior se ocuparon tres concentraciones diferentes de manitol: 100, 200 y 300 mM, con la finalidad de que en cualquiera de ellas pudiera observarse un fenotipo diferente entre las plantas mutantes y silvestres. Las semillas fueron germinadas directamente en cajas con la concentración de manitol deseada y, después de 25 días de crecimiento bajo condiciones de estrés, se registró la longitud de la raíz principal y el fenotipo que presentaron las plántulas. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 25.

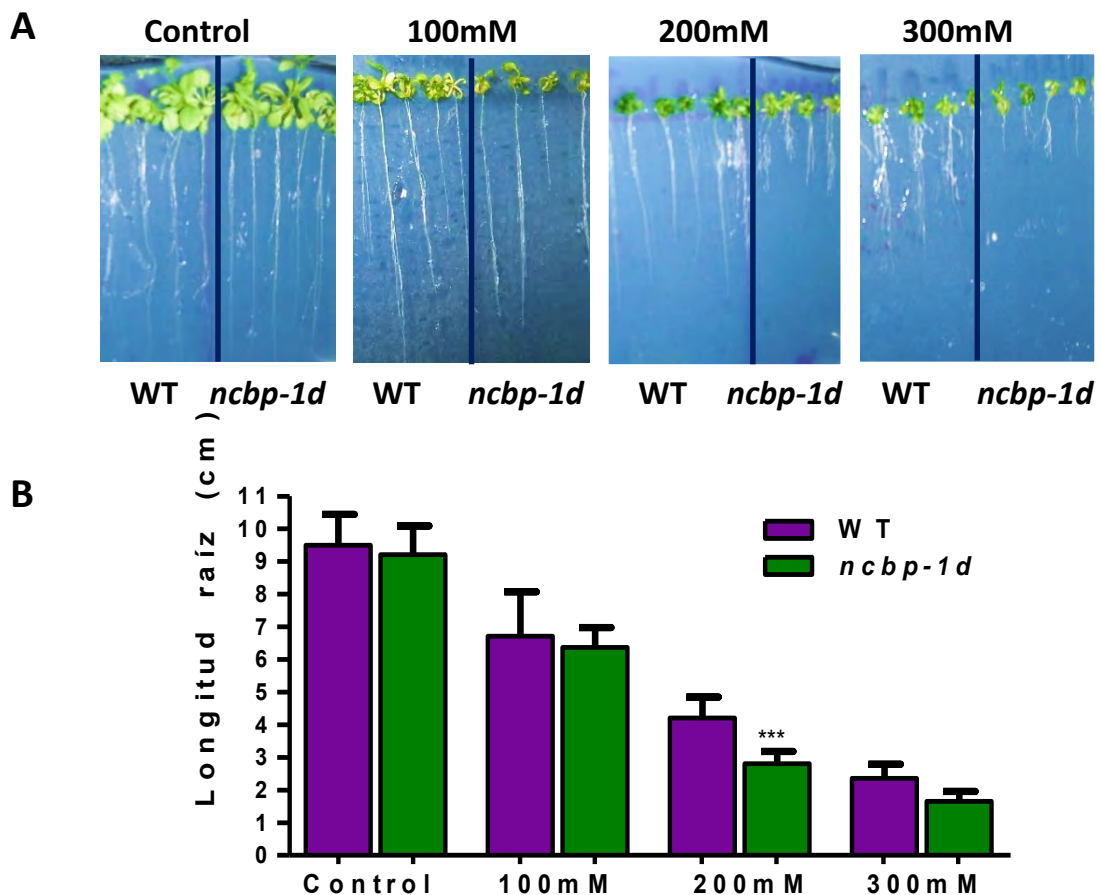


Figura 25. Análisis fenotípico del desarrollo de raíz de *Arabidopsis thaliana*, bajo estrés osmótico. A. Fenotipo de plántulas a los 25 días de evaluación, después de la germinación, en condiciones control y con manitol a 100, 200 y 300 mM. B. Longitud final de raíz de plántulas a los 25 días bajo condiciones de estrés. Las barras indican el error estándar de la media (n=20). Columna con *** indican diferencia estadística significativa con respecto a WT (P<0.001).

Como se aprecia en la figura 25, bajo condiciones control (sin manitol) la longitud de raíz de las plantas mutantes y silvestres es del mismo tamaño. De igual forma el fenotipo a este tiempo de evaluación es igual entre ambas líneas. En condiciones de estrés osmótico la longitud de la raíz principal fue disminuyendo conforme la concentración de manitol aumentaba, para ambas líneas. Para cada una de las concentraciones de manitol empleadas, la longitud de raíz fue menor para *ncbp-1d*, comparada con las plantas silvestres. Sin embargo, sólo bajo la concentración de 200mM de manitol la diferencia resultó estadísticamente significativa.

A una concentración de 300mM el fenotipo producto del estrés fue el más drástico (obsérvese figura 25, inciso A), sin embargo, la diferencia entre plántulas mutantes y silvestres no fue significativa. Teniendo en cuenta estos resultados, se decidió realizar una segunda y tercer réplica del estrés osmótico con 200mM de manitol para ver la reproducibilidad (figura 26).

En la figura 26 se muestran los resultados obtenidos en la segunda réplica biológica. Se observa que bajo condiciones control ambas plantas, mutantes *ncbp-1d* y silvestres, mantienen a lo largo del desarrollo una longitud similar de raíz y un fenotipo de roseta también similar, sin diferencias apreciables. Por el contrario, en condiciones de estrés osmótico a 200mM se observa que las plantas mutantes presentan una longitud de raíz significativamente más corta que las plantas silvestres. A nivel de roseta, no se observan diferencias entre las líneas.

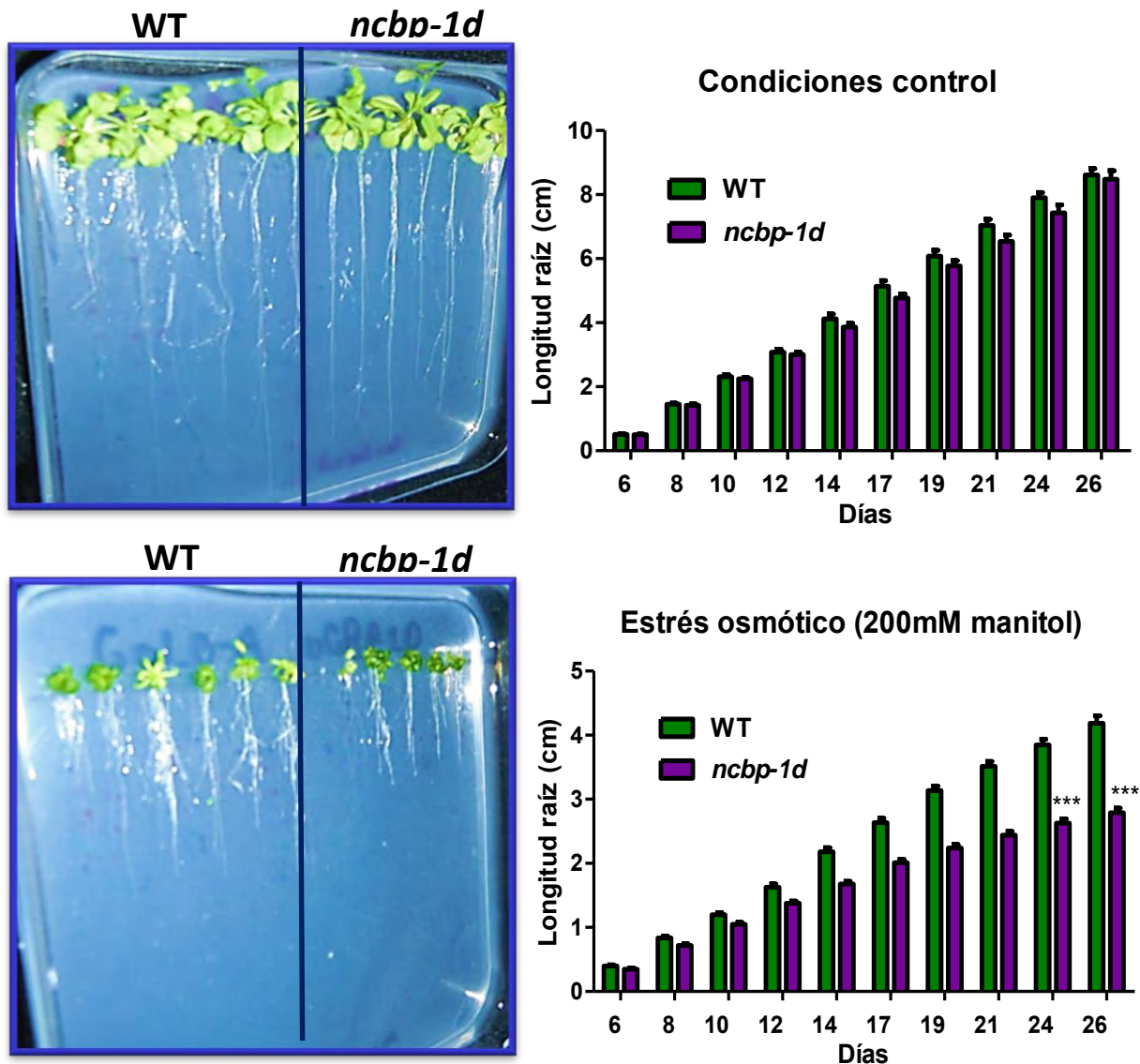


Figura 26. Análisis fenotípico del desarrollo de raíz en estrés osmótico y control. Las imágenes de la izquierda muestran el fenotipo de plántulas a los 25 días de evaluación, después de la germinación, en condiciones control y con manitol 200 mM. Los gráficos de la izquierda muestran la longitud de raíz, a lo largo del tiempo, de plántulas bajo condiciones control y en estrés osmótico a 200 mM. Las barras indican el error estándar de la media (n=30). Columna con *** indican diferencia estadística significativa con respecto a WT (P<0.001).

8. DISCUSIÓN

8.1 Papel de nCBP en el desarrollo de *Arabidopsis thaliana*.

Estudios previos en el laboratorio (Hidalgo, 2007; De la Torre, 2009) mostraron que la ausencia de la proteína nCBP, en plantas de *Arabidopsis thaliana*, promueve un retraso en el tiempo de floración; sin embargo, el análisis no mostraba si este retraso era debido a un desarrollo tardío de la etapa vegetativa. En el presente trabajo se amplió el análisis fenotípico de estas mutantes *ncbp-1d* durante el desarrollo, descartando la posibilidad de una participación de nCBP en el desarrollo vegetativo (en condiciones normales de día largo), mostrando que *ncbp-1d* sólo difiere en el desarrollo reproductivo con respecto a plantas WT. La aparición tardía de esta etapa en plantas *ncbp-1d* tuvo como consecuencia que estas desarrollaran una arquitectura inflorescente diferente comparada con WT, arrojando diferencias estadísticamente significativas en el número de inflorescencias laterales, hojas caulinares y producción de silicuas, lo cual sugiere la presencia de alteraciones de la vía autónoma de floración que promueve identidad de meristemas florales (De la Torre, 2009; Kobayashi and Shimizu, 2013). Los resultados fueron repetidos en tres réplicas biológicas independientes, la finalidad de esto fue observar la reproducibilidad de los resultados obtenidos en la primera de ellas y asegurar que las características fenotípicas observadas fueran debidas a la mutación presente en el gen nCBP y no debido a variables ambientales que interfiriesen con el desarrollo de las plantas.

Se ha visto que la transición de la etapa vegetativa a la reproductiva involucra un cambio en la expresión de genes para la reprogramación del meristemo apical (MA). El balance correcto en la expresión de estos genes promueve el mantenimiento del meristemo inflorescente (MI), o la adquisición de la identidad de meristemo floral (MF), determinando el patrón de ramificación de las inflorescencias (Benlloch *et al.*, 2007). Esto repercute directamente en el apropiado desarrollo reproductivo de la planta. Se conoce que los genes *TFL1* (Flor Terminal 1) por un lado y *AP1* (*APETALA1*), *LFY* (*LEAFY*) y *SOC1* (genes integradores de identidad de meristemo floral) por otro lado, regulan esta

reprogramación en plantas de *Arabidopsis thaliana* al actuar de manera antagónica (Ratcliffe *et al.*, 1999). La alteración en su expresión repercute de manera importante en el tiempo de la floración. La sobreexpresión de *TFL1* (*35S:TFL1*; Ratcliffe *et al.*, 1998) previene la transición de MI a MF, lo que resulta en la extensión del estado MI, la producción de más hojas y la proliferación de flores secundarias. De igual manera, se ha visto que en mutantes *lfy* y *ap1* se promueve un incremento en la extensión de la etapa vegetativa (Ratcliffe *et al.*, 1998; Weigel *et al.*, 1992). Por el contrario, la sobreexpresión de genes florales como *FT* (Flowering locus T), el cual actúa de manera contraria a *TFL1*, o la sobreexpresión de *AP1* ó *LFY* induce el desarrollo de flores terminales y fenotipo de florecimiento temprano (Ratcliffe *et al.*, 1998). En la mutante *ncbp-1d* se observa una extensión de la etapa vegetativa y, como consecuencia, un inicio tardío de la reproductiva, fenotipo que coincide con el de las mutantes ya mencionadas. nCBP podría estar participando en la regulación de los mensajeros de *AP1* y *LFY*, genes que se sabe reprimen la expresión de *TFL1* al unirse al locus de este (Ferrándiz *et al.*, 2000; Kaufmann *et al.*, 2010). Al afectar la expresión de estos reguladores en ausencia del factor nCBP, podría aumentar la expresión de *TFL1*, dando origen al fenotipo de retraso en floración observado. Esta hipótesis debe abordarse para determinar el posible rol de nCBP en la vía de floración, ya que los fenotipos observados coinciden con los reportes mencionados. Por otra parte, y acorde a análisis previos (De la Torre, 2009), nCBP podría estar implicada en una regulación indirecta de los factores transcripcionales *SOC1*, *SVP*, *AGL24* y/o *SEP4* que actúan de manera redundante para suprimir a *TFL1* en meristemas florales emergentes, un mecanismo indispensable para el buen funcionamiento y expresión de *LFY* y *AP1* en la especificación meristemática floral (Liu *et al.*, 2013). Una expresión incrementada de *TFL1* reprime a genes activados por *FT* y *FD*, ambos promotores de floración (Hanano and Goto, 2011). Por ende, la represión de *TFL1* determina la arquitectura de ramificación y el desarrollo de *Arabidopsis thaliana*.

En nuestro grupo de trabajo (De la Torre, 2009) se evaluó la expresión de algunos genes que integran las vías de floración, en especial aquellos que forman parte de la vía autónoma. En aquel estudio se observó que en la mutante

ncbp-1d hay mayores niveles del transcrito FLC (gen considerado como represor general de la floración) y disminuyen los niveles del transcrito *FCA* (gen que actúa como represor de la expresión del gen *FLC*), además de disminuir los niveles de *SOC1* y *AP1* (genes integradores) con respecto a plantas WT. Sin embargo, el fenotipo observado en las plantas *ncbp-1d* no se puede atribuir, al menos exclusivamente, a los mayores niveles de *FLC*, ya que se ha visto que este gen además de regular el tiempo de inicio de floración, también está involucrado en el desarrollo vegetativo (Deng *et al.*, 2011) afectando la progresión de hojas juveniles a hojas adultas, lo que no coincide con el fenotipo observado. Es por ello que habría que analizar si en la mutante *ncbp-1d* se encuentra afectada la expresión de *TFL1*.

8.2 Papel de nCBP en senescencia inducida por oscuridad

En *Arabidopsis thaliana*, la principal función de la senescencia foliar es el reciclamiento de nutrientes y almacenamiento de energía de tejido somático a órganos de desarrollo joven y reproductivos. Existen un sinnúmero de métodos descritos para evaluar este proceso en hojas y cada uno representa un modelo que evalúa una determinada condición que no necesariamente representa la fisiológica. Se decidió evaluar la senescencia en las mutantes *ncbp-1d* ya que los fenotipos observados en desarrollo sugerían un retraso en la aparición de hojas senescentes, después de la floración, en esta línea. Utilizando hojas desprendidas, sometidas a oscuridad, por un tiempo determinado se observó que la mutante presentaba un porcentaje menor de muerte celular, a lo largo de la evaluación, comparado con plantas silvestres (figura 26). Curiosamente, la expresión de *SAG12* (un gen marcador que se induce en este proceso; Noh and Amasino, 1999a), fue mayor en las mutantes, lo que resulta contrario al fenotipo observado.

SAG12 codifica para una cisteína-proteasa que se localiza en vacuolas asociadas a senescencia (SAVs: Carrión *et al.*, 2013; Noh and Amasino, 1999a) y su expresión es inducida tanto a nivel de transcrito como a nivel de proteína por el estrés (Grbic, 2003; Gambert *et al.*, 2006). Si bien, el mecanismo de señalización y de eventos regulatorios involucrados en la senescencia difieren

entre hojas que permanecen en la planta y hojas desprendidas e incubadas en oscuridad, un mecanismo en común es la degradación del cloroplasto por proteínas presentes en SAVs que aumentan de expresión (Carrion *et al.*, 2013). Es por ello que se esperaba encontrar correlación entre expresión de SAG12 y senescencia. Sin embargo, hay evidencias que indican que esta correlación no siempre es directa. Algunas mutantes que permanecen verdes en oscuridad, muestran inhibida la actividad de degradación de cloroplastos tanto en hojas no desprendidas como en hojas desprendidas (Thomas *et al.*, 2002), pese a que algunas cisteínas-proteasas son sobre-reguladas en ambos escenarios (Buchanan-Wallaston *et al.*, 2005; Martínez *et al.*, 2007) y en respuesta a etileno (Grbic, 2003).

Con respecto a etileno, se sabe también que esta hormona, junto con ácido jasmónico, regula la senescencia a través de la integración de factores transcripcionales, microRNAs y otras hormonas. El etileno representa una hormona fundamental para el programa de desarrollo de plantas en respuesta a estrés biótico y abiótico y también afecta el programa de senescencia en plantas completas y en hojas individuales (Kim *et al.*, 2015). Su señalización se lleva a cabo mediante la inactivación de una cisteína proteasa de respuesta constitutiva (CTR1) lo que, mediante una cascada de señalización, activa a factores transcripcionales responsables de la respuesta a etileno (Ju *et al.*, 2012; Wen *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2015). Plantas mutantes insensibles a etileno presentan retraso en la senescencia de hoja. Por otra parte, mutantes *ctr1* en *Arabidopsis* (Kieber *et al.*, 1993) no presentan senescencia precoz a pesar de tener una señalización de etileno constitutivamente activa. Este fenotipo puede ser parcialmente debido a que las mutantes presentan un retraso en el inicio de floración comparado con plantas silvestres (Hall and Bleeker, 2003; Kim *et al.*, 2015).

Estos datos sugieren que nCBP, además de participar en la regulación de la expresión de genes que participan en floración, probablemente interviene en la respuesta a etileno, dando origen al fenotipo de senescencia tardía observado para las mutantes *ncbp-1d*, tanto en las hojas en la planta entera como en las desprendidas e inducidas en oscuridad pese a los niveles elevados de SAG12. En este sentido, entre las proteínas interactoras con nCBP (Flores, 2014), se

encontró RD21, una cisteína proteasa de respuesta a desecación que se acumula en cuerpos de retículo y ejerce su función al traslocarse en el interior de vacuolas tipo SAVs (Hayashi *et al.*, 2001). Habría que comprobar la presencia de nCBP en SAVs, pero su localización en acúmulos citoplasmáticos apoya esta hipótesis (De la Torre, 2009).

8.3 La ausencia de nCBP afecta el desarrollo de raíz en estrés

Las plantas han logrado desarrollar diversas estrategias para contender a una gran variedad de condiciones externas a las que se encuentran expuestas. La mayor parte de estas involucran la modulación de la expresión génica (a nivel transcripcional y post-transcripcional) que, bajo diversas situaciones de estrés biótico o abiótico, permiten a la planta reducir el consumo de energía y sintetizar proteínas que permitan una adecuada respuesta de adaptación o bien, modular mensajeros pre-existentes como una rápida vía de control (Echevarría-Zomeño *et al.*, 2013).

En el presente trabajo observamos que el crecimiento de plántulas de *Arabidopsis thaliana*, bajo condiciones de estrés osmótico inducido por manitol a 200mM (estrés abiótico), afecta en gran medida su desarrollo, comparado con el de plántulas crecidas en condiciones control. Los resultados mostraron que bajo estrés osmótico, en ausencia de la proteína nCBP, la longitud de raíz principal de las plantas es significativamente menor que en plantas silvestres. Los datos de expresión global bajo este tipo de estrés indican que el transcrito de nCBP aumenta su expresión por el estímulo, sugiriendo que nCBP posee una función importante en modular esta respuesta, además se ha visto que la proteína correspondiente ha sido detectada principalmente en botones florales y raíces (Hidalgo, 2007; de la Torre, 2009). Probablemente nCBP esté afectando de manera directa la respuesta de las plántulas WT al regular la expresión de los mensajeros que permiten contender en esta situación, o bien, al interactuar con otras proteínas que puedan mantener una respuesta adecuada bajo el estrés.

En estudios previos, mediante ensayos de pull-down con nCBP-GST recombinante, se demostró que nCBP es capaz de interactuar con otras

proteínas diferentes a las que forman el complejo traduccional y, dada su naturaleza, formar complejos proteicos involucrados en procesos de respuesta a estrés (Flores, 2013). Se ha visto que PBP1/JAL 30 y JAL 31, dos lectinas relacionadas a jacalinas que interaccionan con nCBP, participan en cuerpos derivados de retículo endoplásmico, estructuras que desempeñan una función importante en la planta para contener estímulos de estrés (Matsushima *et al.*, 2003). En *Arabidopsis thaliana* estos cuerpos de retículo endoplásmico (ERBs) se encuentran presentes de manera constitutiva en cotiledón, hipocotilo y raíz de plántulas y, ausentes en hojas de roseta. Sin embargo, el daño mecánico o el tratamiento con ácido jasmónico en este tejido inducen la formación de estos cuerpos, revelando su función en estímulos de estrés. El componente más abundante de los ERBs en *Arabidopsis* es una β -glucosidasa llamada PYK10/BGLU23 (Matsushima *et al.*, 2003). Se ha visto que las JALs (en especial PBP1) forman un gran complejo proteico junto con PYK10 (Nagano *et al.*, 2008) para estimular su actividad enzimática en el proceso de degradación de β -O-glucósidos, cuyo producto de hidrólisis permite contener el estrés (Nakano *et al.*, 2014). De manera importante, se ha visto que estos azúcares son fuertemente sobre-regulados en raíces de plantas de *Arabidopsis thaliana* crecidas en placas de agar y que están expuestas a luz artificial, comparado con raíces crecidas en suelo (Hemm *et al.*, 2004). De esta manera, el hecho de que raíces de plantas silvestres alcanzaran una longitud significativamente más larga que raíces de plantas *ncbp-1d* pudo deberse a la presencia de la proteína nCBP y su capacidad para interaccionar con las proteínas ya mencionadas, permitiendo responder ante el estímulo externo de estrés.

Tomando en cuenta esto, sería importante abordar a nivel molecular la regulación de la expresión de nCBP en respuesta a estrés osmótico, así como dilucidar el tipo de asociaciones (gránulos) citoplasmáticas que forma esta proteína en respuesta a estrés. Esto contribuiría a entender mejor el rol de nCBP en la planta y esclarecer las razones por las que esta clase de proteínas eIF4E está ampliamente conservada en las plantas.

9. CONCLUSIONES

- En condiciones normales de crecimiento, la ausencia de nCBP no afecta el desarrollo vegetativo de *Arabidopsis thaliana*, solo afecta el tiempo de floración y el paso a la etapa reproductiva. Este retraso conlleva a un incremento significativo del número de hojas de la roseta al bolting, inflorescencias laterales, hojas caulinares y silicuas.
- La ausencia de nCBP retrasa la senescencia natural, y la inducida por oscuridad medida por amarillamiento de las hojas de *Arabidopsis thaliana*. Este retraso no se debe a una menor expresión del marcador de senescencia SAG12, por el contrario, la mutante *ncbp-1d* muestra niveles del mRNA de SAG12 mayores a plantas silvestres. Acorde a esto, el retraso de senescencia observado en *ncbp-1d* probablemente involucra una vía independiente de SAG12.
- En presencia de estrés osmótico, el crecimiento de la raíz principal es significativamente menor en ausencia de nCBP que en plantas silvestres, lo que apoya la participación de la proteína en la respuesta a este tipo de estrés.

10. PERSPECTIVAS

- Analizar la regulación de la expresión de la proteína nCBP en el tiempo de floración, senescencia y respuesta a estrés osmótico mediante fusiones transcripcionales y/o transcripcionales-traduccionales con proteínas reporteras.
- Acorde a los fenotipos observados en los análisis de este trabajo se sugiere explorar la vía de *TFL1* como una opción alternativa a la vía autónoma de floración que podría estar afectada en la mutante *ncbp-1d*.
- Evaluar la expresión del gen *nCBP* a nivel mensajero y proteína, en plantas crecidas en condiciones de estrés osmótico y control, para determinar si el estímulo externo promueve una mayor expresión de la proteína endógena en comparación con los niveles de expresión de los factores eIF4E y eIFiso4E.
- Analizar la localización subcelular de nCBP en condiciones normales y en presencia de estrés e identificar el tipo de gránulos que forma mediante co-localización con marcadores específicos de gránulos citoplasmáticos.

11. BIBLIOGRAFÍA

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

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

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

Benlloch R., Berbel A., Serrano-Mislata A. and Madueño F. Floral initiation and inflorescence architecture: a comparative view. *Ann. Bot.*, 2007. Voll. 100: 659-676.

Blümel M., Dally N. and Jung C. Flowering time regulation in crops – what did we learn from *Arabidopsis*? *Plant Biotechnology*, 2015. Vol. 32: 121-129.

Browning K.S. Plant translation initiation factors: it is not easy. *Bioch. Soc. Trans.*, 2004. Vol. 32: 589-591.

Breeze E., Harrison E., McHattie S., Hughes L., Hickman R., Hill C., Kiddle S. and Kim Y. High-Resolution Temporal Profiling of Transcripts during *Arabidopsis* Leaf Senescence Reveals a Distinct Chronology of Processes and Regulation. *The Plant Cell*, 2011. Vol. 23: 873-894.

Buchanan W., Earl S., Harrison E., Mathas E., Navadpour S., Page T. and Pink D. The molecular analysis of senescence a genomics approach. *Plant Biotechnology Journal*: Vol 1:3-22.

Buchanan W., Page T., Harrison E., Breeze E., Lim P., Nam H., Lin J., Wu S., Swidzinski J., Ishizaki K. and Leaver C. Comparative transcriptome analysis reveals significant differences in gene expression and signalling pathways between developmental and dark/starvation-induced senescence in *Arabidopsis*. *Plant J*, 2005. Vol. 42: 567-585.

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

Cho P., Poulin F., Cho-Park A., Cho-Park I., Chicoine J., Lasko P. and Sonenberg N. A new paradigm for translation control: inhibition via 5'-3' mRNA tethering by Bicoid and the eIF4E cognate 4EHP. *Cell*, 2005. Vol. 121: 411-423.

Clemens M. J. Translational regulation in cell stress and apoptosis. Roles of the eIF4E binding proteins. *J. Cell Mol. Med.*, 2001. Vol. 5: 221-239.

Combe J.P., Petracek M.E., van Eldik G., Meulewaeter F. and Twell D. Translation initiation factors eIF4E and eIFiso4E are required for polysome formation and regulate plant growth in tobacco. *Plant Mol. Biol.*, 2005. Vol. 57: 749-760.

Culjkovic B., Topisirovic I. and Borden K. Controlling gene expression through RNA regulons. *Cell Cycle*, 2007. Vol. 6: 65-69.

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

Deng W., Ying H., Helliwell C., Taylor J., Peacock J. and Dennis E. FLOWERING LOCUS C (FLC) regulates development pathways throughout the life cycle of *Arabidopsis*. *PNAS*, 2011. Vol. 108: 6680-6685.

Dinkova T., Keiper B., Korneeva N., Aamodt E. and Rhoads R. Translation of a small subset of *Caenorhabditis elegans* mRNAs is dependent on a specific eukaryotic translation initiation factor 4E isoform. *Mol Cell Biol*, 2005. Vol. 25: 100-113.

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

Dostie J., Ferraiuolo M., Pause A., Adam S.A. and Sonenberg N. A novel shuttling protein, 4E-T, mediates the nuclear import of the mRNA 5' cap binding protein, eIF4E. *EMBO J.*, 2000. Vol. 19: 3142-3156.

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

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

Fechter P. and Brownlee G. Recognition of mRNA cap structures by viral and cellular proteins. *J Gen Virol*, 2005. Vol. 86: 1239-1249.

Feoktistova K., Tuvshintogs E., Do A. and Fraser C.S. Human eIF4E promotes mRNA restructuring by stimulating eIF4A helicase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2013. Vol. 110: 13339-13344.

Ferrández C., Gu Q., Martienssen R. and Yanofsky M. Redundant regulation of meristem identity and plant architecture by FRUITFULL, APETALA 1 and CAULIFLOWER. *Development*, 2000. Vol 127: 725-734.

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

Flores A. (2013) Análisis de complejos ribonucleoprotéicos formados por la proteína de unión a Cap, nCBP de *Arabidopsis thaliana*. Tesis de Maestría, Facultad de Química, UNAM.

Gambert J., Etienne P., Ourry A. and Le Dily F. The expression patterns of SAG12/Cab genes reveal the spatial and temporal progression of leaf senescence in *Brassica napus L.* with sensitivity to environment. *Journal of Experimental Botany*, 2006. Vol. 57: 1949-1956.

Gan S. Molecular characterization and genetic manipulation of plant senescence. PhD Dissertation, University of Wisconsin-Madison, Madison, 1995.

Garneau N., Wilusz J., Wilusz C. The highways and byways of mRNA decay. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2007. Vol. 8: 113-126.

Gebhardt A., Habjan M., Benda C., Meiler A., Haas D., Hein M., Mann A., Mann M., Habermann B. and Pichlmair A. mRNA export through an additional cap-binding complex consisting of NCBP-1 and NCBP3. *Nature communications*, 2015. Vol. 6: 1-13.

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

Grbic V. SAG2 and SAG12 protein expression in senescing *Arabidopsis* plants. *Physiologia Plantarum*, 2003. Vol. 119: 1-7.

Gregersen P., Culetic A., Boschian L. and Krupinska K. Plant senescence and crop productivity. *Plant Mol Biol.*, 2013. Vol. 82: 603-622.

Guo Y. and Gan S. Convergence and divergence in gene expression profiles induced by leaf senescence and 27 senescence-promoting hormonal, pathological and environmental stress treatments. *Plant, Cell and Environment*, 2012. Vol. 35: 644-655.

Hall A. and Bleecker A. Analysis of combinatorial loss-of-function mutants in the *Arabidopsis* ethylene receptors reveals that *ers1 etr1* double mutants has severe developmental defects that are EIN2 dependent. *Plant Cell*, 2003. Vol. 15: 2032-2041.

Hanano S. and Goto K. *Arabidopsis* TERMINAL FLOWER1 is involved in the regulation of flowering time and inflorescence development through Transcriptional repression. *Plant Cell*, 2011. Vol. 23: 3172-3184.

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

Hernández G. and Vázquez P. Functional diversity of the eukaryotic translation initiation factors belonging to eIF4 families. *Elsevier*, 2005. Vol. 122: 865-876.

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

Huijser P. and Schmid M. The control of developmental phase transitions in plants. *Development*, 2011. Vol. 138: 4117-4129.

Hye R., Hyo J., Hong G. and Pyung O. Plant leaf senescence and death-regulation by multiple layers of control and implications for aging in general. *Journal of Cell Science*, 2013. Vol. 126: 4823-4833.

Issur M., Bougie I., Despins S. and Bisailon M. Enzymatic Synthesis of RNAs Capped with Nucleotide analogues Reveals the Molecular Basis for Substrate Selectivity of RNA Capping Enzyme: Impacts on RNA Metabolism. PLoS One, 2013. Vol. 8: 1-12.

Jackson R., Hellen C. and Pestova T. The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. Nature Rev. Molecular Cell Biological, 2010. Vol. 11: 113-127.

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

Ju C., Yoon G., Shemansky J., Lin D., Ying Z., Chang J et al. CTR1 phosphorylates the central regulator EIN2 to control ethylene hormone signaling from the ER membrane to the nucleus in *Arabidopsis*. Proc. Natl. Acad. Sci., 2012. Vol. 109: 19486-19491.

Kamenska A., Simpson C. and Standart N. eIF4E-binding proteins: new factors, new locations, new roles. Biochemical Society Transactions, 2014. Vol. 42: 1238-1245.

Kaufman K., Wellmer F., Muiño J., Ferrier T., Wuest S., Kumar V., Serrano-Mislata A., Madueño F., Krajewski P., Meyerowitz E. Orchestration of floral initiation by APETALA 1. Science, 2010. Vol 328, 85-89.

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

Khan M., Miyoshi H., Gallie D. and Goss D. Potyvirus genome-linked protein, VPg, directly affects wheat germ in vitro translation: Interactions with translation initiation factors eIF4F and eIFiso4F. J Biol Chem, 2008. Vol. 121: 189-194.

Kieber J., Rothenberg M., Roman G., Feldman K. and Ecker J. CTR1, a negative regulator of ethylene response pathway in *Arabidopsis*, encodes a member of the raf family of protein kinases. Cell, 1993. Vol. 72: 427-441.

Kim J, Caren C. and Mark L. To grow old: regulatory role of ethylene and jasmonic acid in senescence. Plant Science, 2015. Vol. 6: 1-7.

Kobayashi M. and Shimizu K. Challenges in studies on flowering time: interfaces between phenological research and the molecular network of flowering genes. *Ecol Research*, 2013. Vol. 28: 161-172.

Koornneef M., Alonso-Blanco C., M. Peeters A. and Soppe W. Genetic control of flowering time in *Arabidopsis*. *Annu. Rev. Plant Physiol*, 1998. Vol. 49: 345-370.

Lim M., Kim J., Kim Y., Chung K., Seo Y., Lee I., Hong C., Kim H. and Park C. A new *Arabidopsis* gene, FLK, encodes an RNA binding protein with K homology motifs and regulates flowering time via FLOWERING LOCUS C. *Plant Cell*, 2004. Vol. 16: 731-740.

Lim P., Kim J. and Nam H. Leaf senescence. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 2007. Vol. 58: 115-136.

Liu C., Norman Z., Bi Y., Song S., Xi W., Yang X. and Yin Z. A conserved Genetic Pathway Determines Inflorescence Architecture in *Arabidopsis* and Rice. *Developmental Cell*, 2013. Vol. 24: 612-622.

Liu C., Thong Z. and Yu H. Coming into Bloom: the specification of floral meristems. *Development*, 2009. Vol. 136: 3379-3391.

Martinez D., Bartoli C., Grbic V. and Guamet J. Vacuolar cysteine proteases of wheat (*Triticum aestivum* L.) are common to leaf senescence induced by different factors. *Journal of experimental Botany*, 2007. Vol. 58: 1099-1107.

Martínez-Silva A., De la Torre S. y Dinkova T. Los factores de traducción tipo eIF4E en plantas: redundancia y diversidad funcional. *Mensaje Bioquímico*, 2009. Vol. 33: 25-37.

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

Maquat L. Nonsense-mediated mRNA decay in mammals. *J Cell Sci*, 2005. Vol. 118: 1773-1776.

Muench D., Zhang C. and Dahodwala M. Control of cytoplasmic translation in plants. *WIREs RNA*, 2012. Vol. 3: 178-194.

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

Nakaminami K., Matsui A., Shinozaki K. and Seki M. RNA regulation in plant abiotic stress responses. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2012. Vol. 1819: 149-153.

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

Noh Y. and Amasino R. Identification of a promoter region responsible for the senescence-specific expression of SAG12. *Plant Molecular Biology*, 1999^a. Vol.41: 181-194.

O'Brien J., Mayberry L., Murphy P., Browning K. and Brodbelt J. Evaluating the conformation and binding interface of cap-binding proteins and complexes via ultraviolet photodissociation mass spectrometry. *Journal of Proteome Research*, 2013. Vol. 12: 5867-5877.

Oh Min-Hyuk, Moon Y. and Lee C. Increased Stability of LHCII by Aggregate Formation during Dark-Induced Leaf Senescence in the *Arabidopsis* Mutant, *ore10*. *Plant Cell Physiol*, 2003. Vol. 44(12): 1368-1377.

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

Ougham H., Hortensteiner S., Armstead I., Donnison I., King I. and Mur L. The control of chlorophyll catabolism and the status of yellowing as a biomarker of leaf senescence. *Plant Biol*, 2008. Vol 10: 4-14.

Ozretic P., Bisio A., Inga A. and Levanat S. The growing relevance of cap-independent translation initiation in cancer-related genes. *Periodicum Biologorum*, 2012. Vol. 114: 471-478.

Patrick R., Mayberry L., Choy G., Woodard L., Liu J., White A., Mullen R., Tanavin T., Latz C. and Browning K. Two *Arabidopsis* loci encode novel eukaryotic initiation factor 4E isoforms that are functionally distinct from the conserved plant eukaryotic initiation factor 4E. *Plant Physiology*, 2014. Vol. 164: 1820-1830.

Pua Eng-Chong and Davey M. *Plant developmental Biology-Biotechnological perspectives*. Berlin, Editorial Springer, 2010. Vol. 1: 151-169.

Ratcliffe O., Amaya I., Vincent C., Rothstein S., Carpenter R., Coen E. and Bradley D. A common mechanism controls the life cycle and architecture of plants. *Development*, 1998. Vol. 125: 1609-1615.

Ratcliffe O., Bradley D. and Coen E. Separation of shoot and floral identity in *Arabidopsis*. *Development*, 1999. Vol. 126: 1109-1120.

Rhoads R. E. eIF4E: New Family Members, New Binding Partners, New Roles. *J. Biol. Chem.*, 2009. Vol. 284: 16711-16715.

Robaglia C. and Caranta C. Translation initiation factors: a weak link in plant RNA virus infection. *ELSEVIER*, 2006. Vol. 11: 40-45.

Rong L., Livingstone M., Sukarieh R., Petroulakis E., Gringas A., Crosby K., Smith B., Polakiewicz R., Pelletier J., Ferraiuolo M. and Sonenberg N. Control of eIF4E cellular localization by eIF4E-binding proteins, 4E-BPs. *RNA Journal*, 2008. Vol. 14: 1318-1327.

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

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

Sharabi-Schwager M., Samach A. and Porat R. Overexpression of the CBF2 transcriptional activator in *Arabidopsis* suppresses the responsiveness of leaf tissue to the stress hormone ethylene. *Plant Biology*, 2010. Vol. 12: 630-638.

Simpson G., Dijkwel P., Quesada V., Henderson I. and Dean C. FY is an RNA 3' end-processing factor that interacts with FCA to control the *Arabidopsis* floral transition. *Cell*, 2003. Vol. 113: 777-787.

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

Smaczniak C., H. Immink R., Angenent G. and Kaufmann K. Developmental and evolutionary diversity of plant MADS-domain factors: insights from recent studies. *Development*, 2012. Vol. 139: 3081-3098.

Stuart J. and Brown M. Energy, quiescence and the cellular basis of animal life spans. *Comp. Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 2006. Vol. 143: 12-23.

Thomas H., Ougham H., Canter P. and Donnison I. What stay Green mutants tell us about nitrogen remobilization in leaf senescence. *Journal of Experimental Botany*, 2002. Vol. 53: 801-808.

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

Topisirovic I., Svitkin Y., Sonenberg N. and Shatkin A. Cap and cap-binding proteins in the control of gene expression. *Advanced Review*, 2011. Vol. 2: 277-298.

Vidal E., Moyano T., Canales J and Gutiérrez R. Nitrogen control of developmental phase transitions in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*, 2014. Vol. 65: 5611-5618.

Volpon L., Osborne M. J., Capul A., de la Torre J. and B. Borden K. Structural characterization of the Z RING-eIF4E complex reveals a distinct mode of control for eIF4E. *PNAS*, 2010. Vol. 107: 5441-5446.

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

Weaver L. and Amasino R. Senescence is induced in individually Darkened *Arabidopsis* leaves, but inhibited in whole darkened plants. *Plant Physiology*, 2001. Vol. 127: 876-886.

Weaver L. M., Gan S., Quirino B., Amasino R.M. A comparison of the expression patterns of several senescence-associated genes in response to stress and hormone treatment. *Plant Mol Biol.*, 1998. Vol. 37: 455-469.

Wen X., Zhang C., Ji Y., Zhao Q., He W., An F. et al. Activation of ethylene signaling is mediated by nuclear translocation of cleaved EIN2 carboxyl terminus. *Cell Res.*, 2012. Vol. 22: 1613-1616.

Woo H. R., Kim H., Nam H. and Lim P. Plant leaf senescence and death-regulation by multiple layers of control and implications for aging in general. *Journal of Cell Science*, 2013. Vol. 126: 4823-4833.

Wu X. Y., Kuai B. K., Jia J. Z. and Jing H. C. Regulation of leaf senescence and crop genetic improvement. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2012. Vol. 54: 936-952.

Zhang H. and Zhou C. Signal transduction in leaf senescence. *Plant Mol Biol*, 2013. Vol. 82: 539-545.

Zhou C. and Gan S. Senescence. *Plant developmental biology: biotechnological perspectives*, 2009. Vol. 54: 151-169.

12. ANEXOS

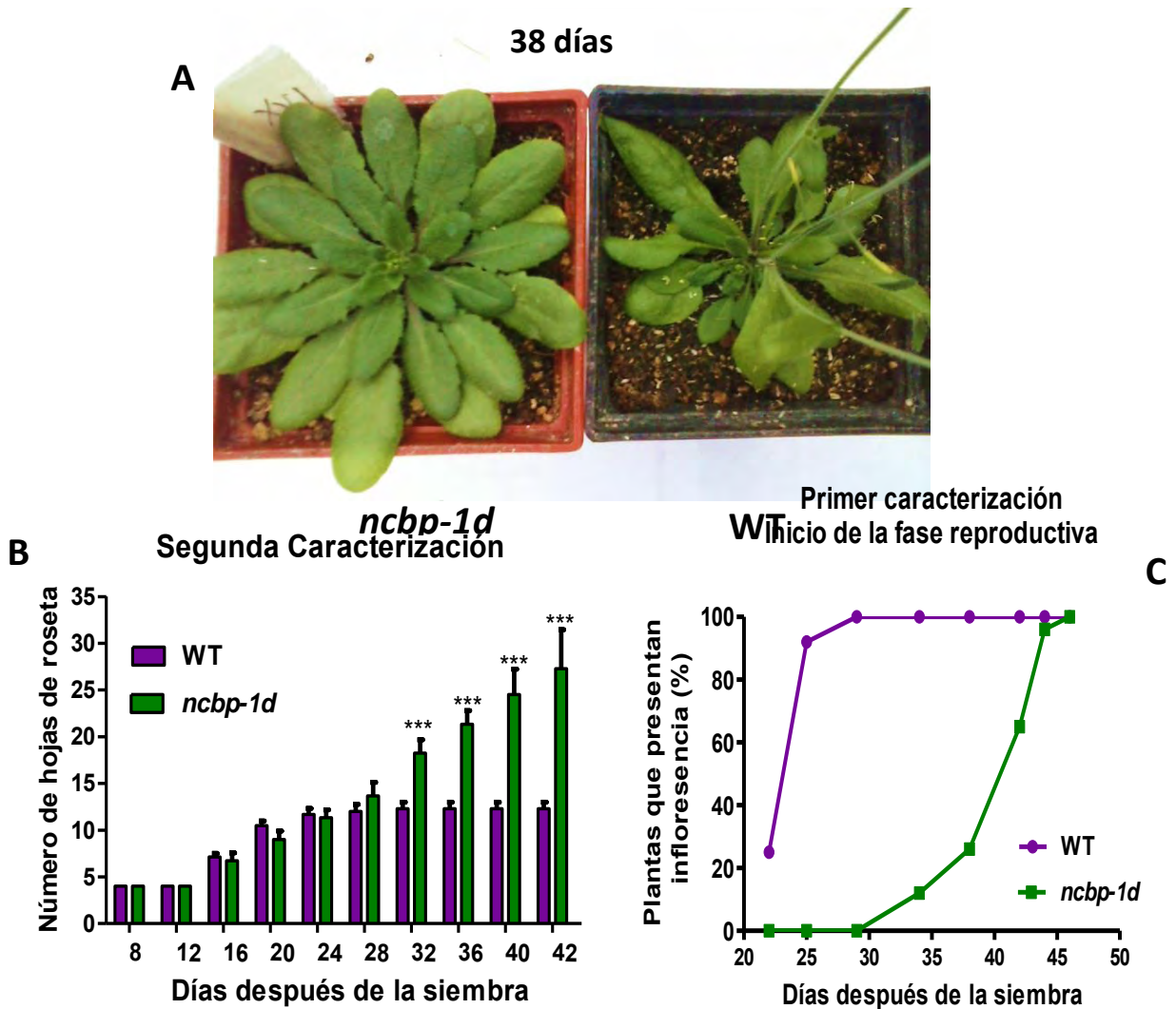


Figura S1. Tiempo de floración de plantas mutantes *ncbp-1d* y silvestres WT, segunda réplica biológica. A. Se observa la floración tardía y mayor número de hojas en plantas mutantes con respecto a silvestres. B. Número total de hojas de roseta, de plantas mutantes y silvestres, contadas en el tiempo (después de la germinación). Como se puede ver, plantas silvestres detienen tempranamente el desarrollo de hojas (24-28 días) lo que acentúa aún más la diferencia de hojas con respecto a mutantes. C. Porcentaje de plantas que presentan inflorescencia a través del tiempo. Las plantas fueron crecidas simultáneamente bajo condiciones de día largo. Las barras indican el error estándar de la media (n=21). Columnas con *** indican diferencia estadística significativa con respecto a WT (P<0.001).

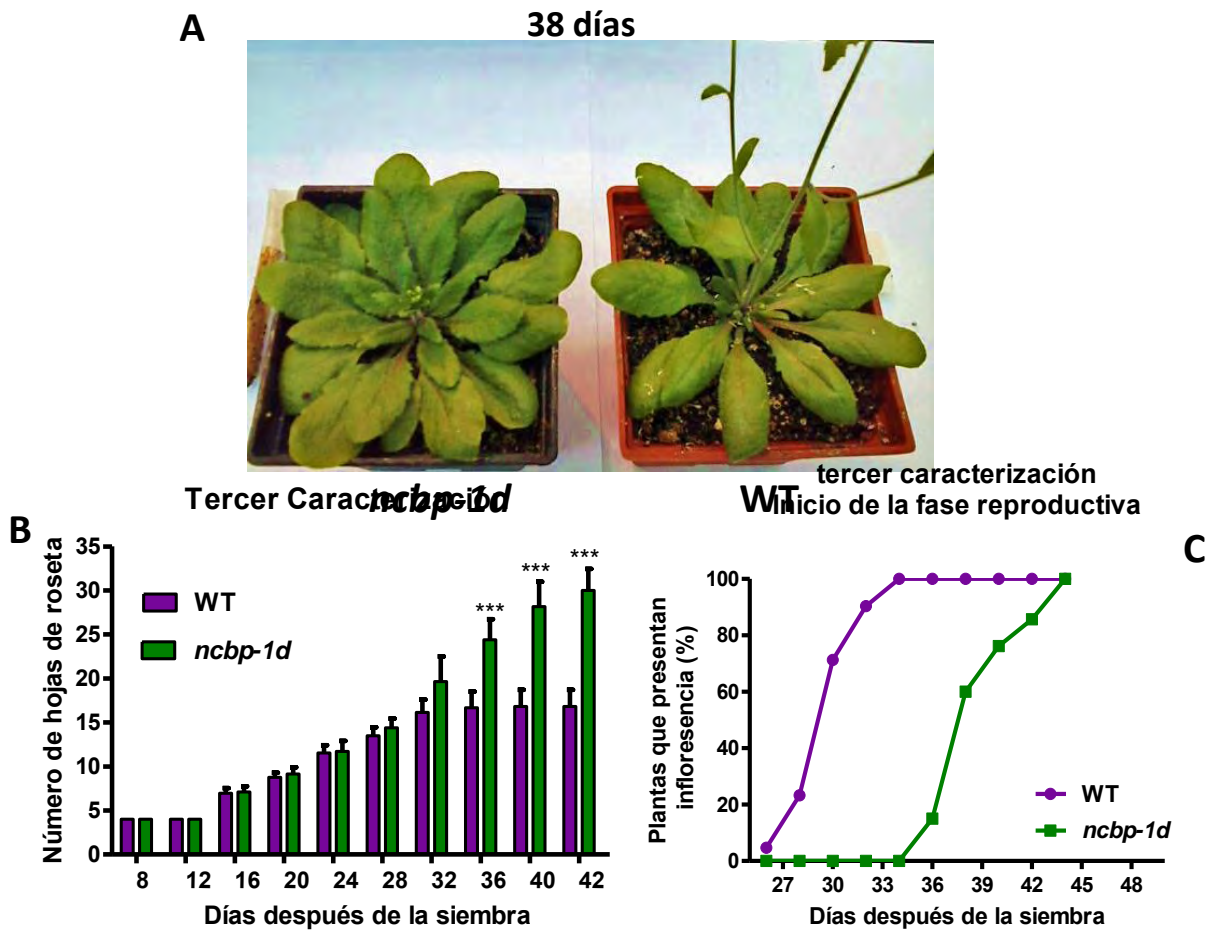


Figura S2. Tiempo de floración de plantas mutantes *ncbp-1d* y silvestres WT, tercer réplica biológica. A. Se observa floración tardía en plantas mutantes con respecto a silvestres. B. Número total de hojas de roseta, de plantas mutantes y silvestres, contadas en el tiempo (después de la germinación). Como se puede ver, plantas silvestres detienen tempranamente el desarrollo de hojas (32-36 días), mientras que plantas mutantes lo hacen aproximadamente 10 días después (40-42 días). B. Porcentaje de plantas que presentan inflorescencia a través del tiempo. Las plantas fueron crecidas simultáneamente bajo condiciones de día largo. Las barras indican el error estándar de la media (n=21). Columnas con *** indican diferencia estadística significativa con respecto a WT (P<0.001).

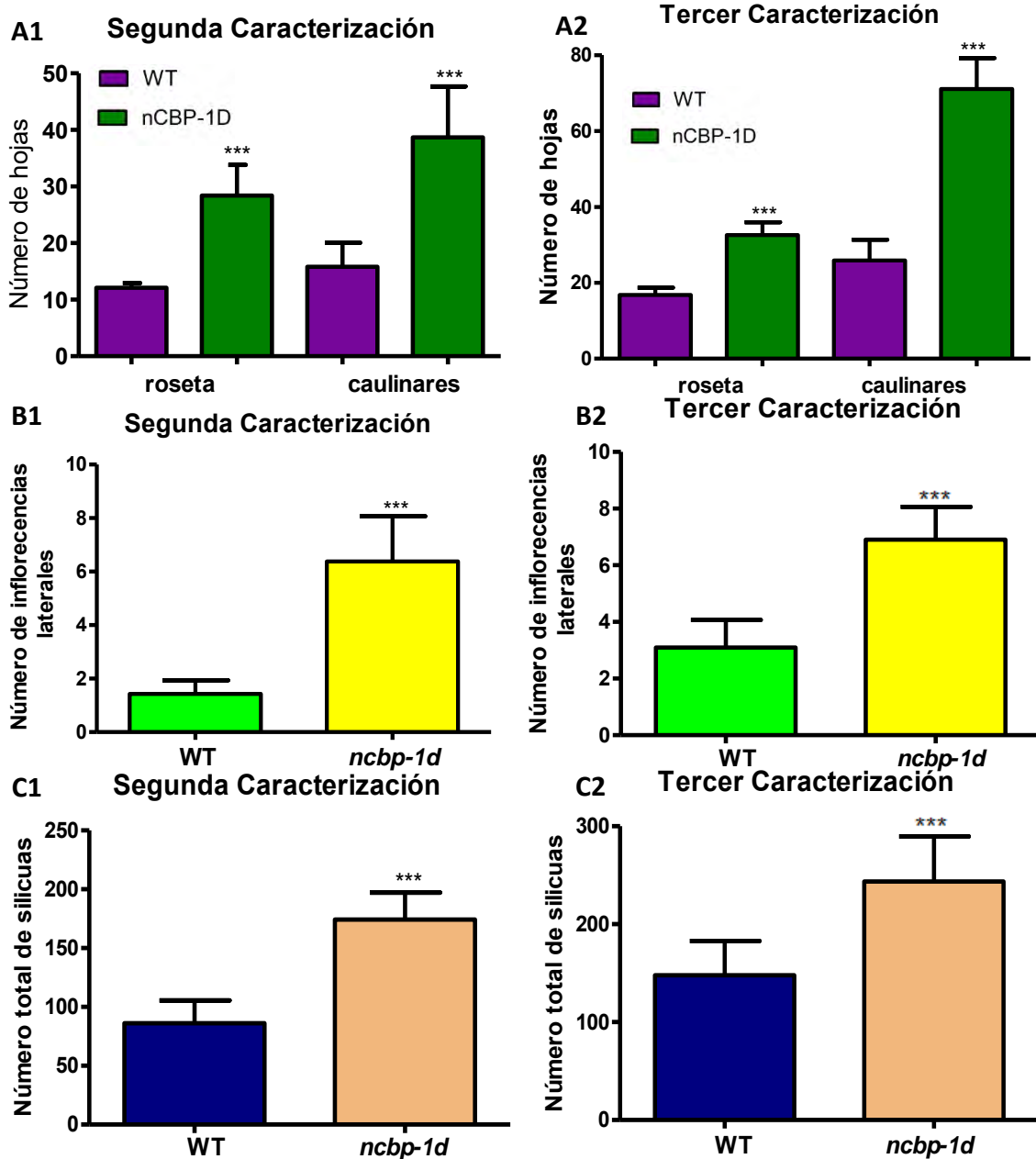


Figura S3. Detección de diferencias fenotípicas entre plantas mutantes y silvestres, de la segunda y tercer replica biológica, durante la fase reproductiva. A1, B1 y C1 corresponden a características observadas en la segunda replica biológica. A2, B2 y C2 corresponden a datos obtenidos en la tercer replica biológica. Barras indican el error estándar de la media (n=21). Columnas con *** indican diferencia estadística significativa con respecto a WT (P<0.001).