



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**Papel de los factores de inicio de la traducción eIF4E y
eIF(iso)4E durante el estrés por congelamiento en
*Arabidopsis thaliana***

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Maestro en Ciencias

Presenta:

Kenia Salazar Díaz

TUTOR PRINCIPAL:

Dra. Tzvetanka Dimitrova Dinkova

Facultad de Química

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

Dra. Marina Gavilanes Ruiz

Facultad de Química

Dra. Berenice García Ponce de León

Instituto de Ecología

Ciudad Universitaria, Cd.Mx., febrero 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Índice

Resumen	4
Agradecimientos.....	5
1. Introducción.....	6
1.1 Estrés abiótico y aclimatación a las bajas temperaturas. Mecanismos de protección y regulación de la expresión genética.	6
1.2 El factor de inicio de la traducción (eIF4E). Estructura, funciones y regulación de su actividad.....	9
1.3 Isoformas del factor eIF4E en <i>Arabidopsis thaliana</i> . Expresión y funciones diferenciales..	11
Antecedentes.....	14
Papel de los factores de inicio de la traducción durante el estrés por frío en plántulas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	14
Genes de respuesta a estrés por frío controlados de manera selectiva por los factores de inicio de la traducción eIF4E y eIF(iso)4E.....	17
Transcritos reconocidos preferencialmente por el factor eIF4E.....	17
Transcritos reconocidos preferencialmente por el factor eIF(iso)4E.....	18
Planteamiento del problema	19
Hipótesis	20
Objetivo general	20
Objetivos particulares	20
2. Metodología	21
2.1 Material biológico. Aclimatación, estrés por congelamiento y recuperación.	21
2.3 Análisis de perfiles polisomales en plantas aclimatadas versus no aclimatadas.....	23
2.4 Análisis de elementos regulatorios en <i>cis</i> de respuesta a estrés en los promotores de <i>eIF4E</i> y <i>eIF(iso)4E</i>	24
3. Resultados.....	25
3.1 Análisis fenotípico y porcentaje de sobrevivencia de plantas sometidas a estrés por congelamiento.....	25
3.2 Determinación de la expresión transcripcional de los factores eIF4E y eIF(iso)4E, así como de genes de respuesta a estrés por frío. Análisis en plantas silvestres, en condiciones normales de crecimiento y en respuesta a las bajas temperaturas.....	28
3.2.1 Análisis de la expresión de genes de referencia en la respuesta a las bajas temperaturas.....	28
3.2.2 Análisis de la expresión de los factores eIF4E y eIF(iso)4E inducida por las bajas temperaturas.....	29

3.2.3	Análisis de la expresión de genes regulados preferencialmente por eIF(iso)4E.....	30
3.2.4	Análisis de la expresión de genes regulados preferencialmente por eIF4E.	31
4.	Discusión	33
5.	Conclusiones	37
6.	Perspectivas	38
Anexo 1	Análisis de los promotores de los factores de inicio de la traducción eIF4E y eIF(iso)4E de <i>Arabidopsis thaliana</i>	39
Anexo 2	Perfiles polisomales de plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> aclimatadas comparándolas con las no aclimatadas.	42
Anexo 3	Fenotipos de las plantas sometidas a estrés por congelamiento (1h -20 °C) antes del estrés y después del período de recuperación.....	43
	Referencias Bibliográficas	48

Resumen

El estrés abiótico se define como las condiciones ambientales que reducen el crecimiento y rendimiento de las plantas, como la disponibilidad de agua y nutrientes, la salinidad y las temperaturas extremas. Las plantas han desarrollado complejos mecanismos adaptativos que les permiten contender con el estrés, entre estos destaca la fina regulación de la síntesis de proteínas. En condiciones de estrés se produce una disminución global de la traducción pero se potencia la expresión selectiva de proteínas involucradas en el mantenimiento de la homeostasis. Hasta el momento no se conoce totalmente cómo se produce el control de la traducción en estas condiciones. Teniendo en cuenta que el inicio de la síntesis de proteínas es el paso más controlado de este proceso y que los factores 4E de inicio de la traducción son importantes blancos de los mecanismos regulatorios en otros organismos, en este trabajo se planteó estudiar su papel durante la respuesta a estrés por congelamiento en la planta modelo *Arabidopsis thaliana*.

En este estudio se observó que la sobreexpresión de eIF4E o eIF(iso)4E le confiere a las plantas una mayor resistencia y capacidad de sobrevivencia ante el estrés por congelamiento. Además, se encontró que en estas condiciones la función de estas isoformas no parece ser redundante. Por otro lado, también se obtuvo que durante la exposición de las plantas a las bajas temperaturas se produce un aumento de la expresión transcripcional de ambos factores de inicio de la traducción, lo cual podría estar relacionado con el aumento de los polirribosomas que observamos en estas condiciones. Por último, a los siete días de exposición a las bajas temperaturas se determinó la expresión de transcritos de respuesta a estrés potencialmente reconocidos de manera selectiva por los factores eIF4E y eIF(iso)4E de *Arabidopsis thaliana* y se encontró que para la mayoría no existen cambios en su expresión transcripcional en el tiempo estudiado. Por lo tanto, planteamos que se requiere analizar su expresión transcripcional en otros tiempos más tempranos durante la exposición de las plantas a las bajas temperaturas. Además sería importante determinar su expresión a nivel de proteína ya que los mecanismos postranscripcionales también podrían ser importantes en la regulación de la actividad de estos genes.

Agradecimientos

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

A los proyectos de Ciencia Básica CONACyT 238439 y de infraestructura CONACyT 252001, así como de la Facultad de Química PAIP 5000-9118 por el financiamiento aportado.

Al Biol. Jorge Herrera Díaz y la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y la Industria USAII de la Facultad de Química por los servicios brindados.

A mis tutoras por sus consejos y confianza.

A todas las personas que me han acogido en este país y demostrado su sincero afecto.

1. Introducción

1.1 Estrés abiótico y aclimatación a las bajas temperaturas. Mecanismos de protección y regulación de la expresión genética.

El estrés abiótico se define como las condiciones ambientales que reducen el crecimiento y rendimiento de las plantas. Entre estas condiciones están la disponibilidad de agua y nutrientes, salinidad, insolación y temperatura (Cramer et al. 2011). Específicamente, las temperaturas congelantes producen un desbalance hídrico entre el espacio extracelular y el interior de la célula, provocando la salida de agua del citoplasma y el aumento de su osmolaridad. También promueven la transición de los lípidos de membrana de la fase lamelar a la hexagonal II, lo que ocasiona la ruptura de las membranas celulares. En estas condiciones se produce la desnaturalización de algunas proteínas y el aumento en la producción de radicales libres (Thomashow 1999).

Las plantas de zonas templadas adquieren resistencia a las temperaturas por debajo de 0°C a través de un proceso denominado aclimatación al frío, durante el cual están expuestas a bajas temperaturas, no congelantes, por un tiempo prolongado. Durante este período se producen en la planta cambios en la expresión genética y una serie de mecanismos de protección destinados principalmente a la estabilización de las membranas celulares. Entre estos mecanismos están la síntesis de proteínas hidrofílicas, antioxidantes, azúcares simples y cambios en la composición lipídica de las membranas (Thomashow 1999, Xiong et al. 2002).

Aunque no se conoce totalmente el mecanismo de señalización que conlleva al proceso de aclimatación, se sabe que en estas condiciones se produce una disminución de la fluidez de la membrana citoplasmática y el reordenamiento del citoesqueleto (Orvar et al. 2000, Sangwan et al. 2001) estos eventos preceden a la acumulación de calcio intracelular y la activación de cinasas (Tahtiharju et al. 1997) lo cual es requerido para la estimulación de la expresión de genes regulados en estas condiciones (Monroy and Dhindsa 1995, Sangwan et al. 2001).

Durante el proceso de aclimatación se ha encontrado la inducción de la expresión, principalmente a nivel transcripcional, de un grupo de factores transcripcionales específicos que a su vez regulan la expresión de genes efectores que confieren protección a las temperaturas congelantes (Figura 1.1). Por ejemplo, los factores DREB (*Dehydration Responsive Element Binding*) y ERF (*Ethylene Responsive Factor*) de la familia AP2/ERF (*APETALA 2/ Ethylene Responsive Element binding factor*). Específicamente, los factores de tipo DREB han sido ampliamente estudiados y se han

identificado tanto en plantas monocotiledóneas como el arroz, el maíz y la cebada como en plantas dicotiledóneas como *Arabidopsis thaliana* y tomate e incluso en el musgo *Physcomitrella patens* lo cual indica su importancia en la respuesta a estrés de las plantas terrestres (Mizoi et al. 2012).

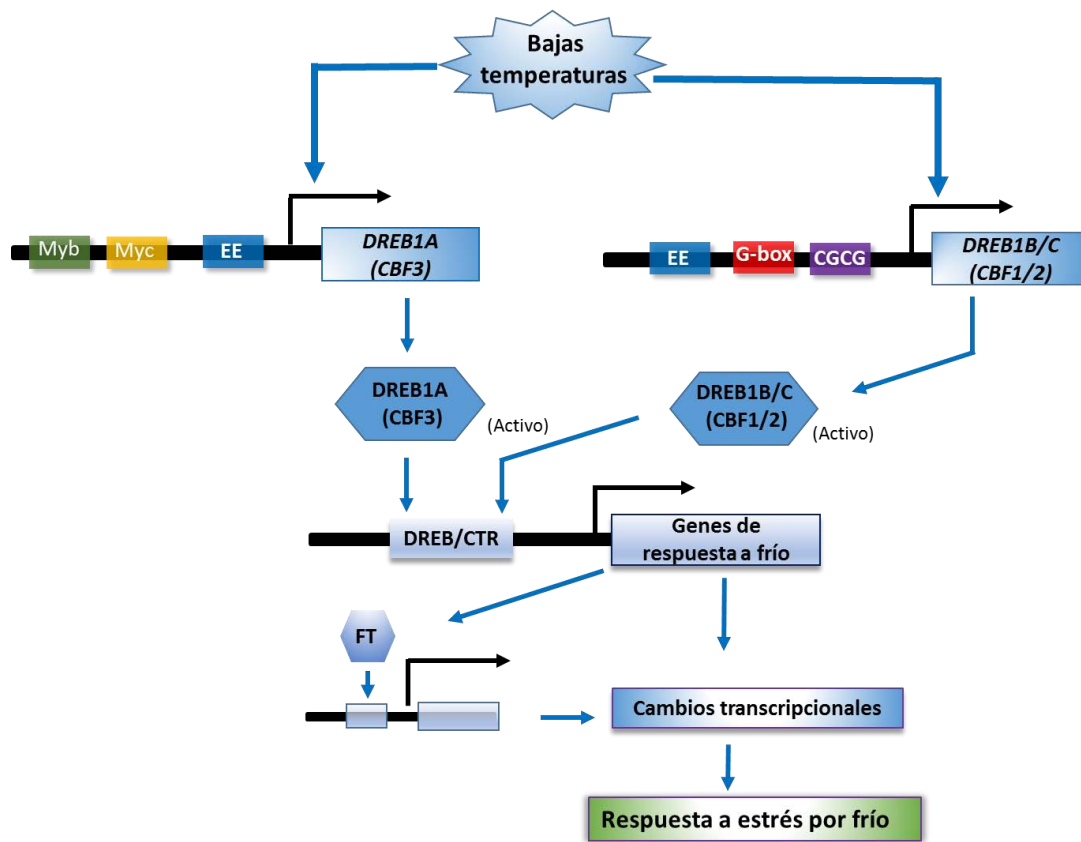


Figura 1.1 Regulación transcripcional mediada por los factores DREB1 en respuesta a las bajas temperaturas. Los factores DREB1 estimulan la transcripción de otros genes que contienen en sus secuencias promotoras elementos de regulación en *cis* denominados DRE/CRT (*Dehydration Responsive Element/C-repeat*). Se señalan elementos importantes para el control de la expresión de los genes DREB (EE: *evening element* y *G-box* relacionados con el control por el ciclo circadiano; Myc y Myb: sitio de reconocimiento de factores Myc y Myb, respectivamente, relacionados con la inducción de la expresión de estos factores en respuesta a las bajas temperaturas). FT: factores transcripcionales. Tomada y modificada de (Mizoi et al. 2012).

En la actualidad se considera que la respuesta mediada por los factores DREB es solo una pequeña parte de la cascada de eventos que se producen dentro del proceso de aclimatación o de la respuesta a estrés. Se ha utilizado el estudio de plantas transgénicas para la validación de las funciones de otros factores. Por ejemplo, en la soya se han identificado factores transcripcionales de tipo *C2H2 finger protein* que, al contrario de lo que se sabe para la mayoría de los genes DREB

del grupo A1, tienen un papel importante en la respuesta mediada por ácido abscísico (Kim et al. 2001). Así mismo, en el arroz, a pesar de ser un cultivo que no resiste las temperaturas congelantes, se han identificado factores transcripcionales de tipo MYB que parecen actuar en la adaptación a las bajas temperaturas y cuya expresión heteróloga en *Arabidopsis* estimula la expresión de genes COR (*Cold Responsive*) aún en condiciones normales de crecimiento (Dai et al. 2007).

Además de la reprogramación en la transcripción, otros mecanismos de regulación postranscripcional como la retención de intrones y el *splicing* alternativo son importantes durante la aclimatación y respuesta a estrés. Por ejemplo, las bajas temperaturas inducen el *splicing* alternativo del transcrito COR15A que actúa en la estabilización del cloroplasto. Defectos en el factor de *splicing* *sta1* conllevan a que no se produzca el transcrito correspondiente y a una menor tolerancia de plantas de *Arabidopsis* a las bajas temperaturas. Por otro lado, la regulación mediada por RNAs pequeños también juega un papel importante en estas condiciones. Por el ejemplo, el aumento de las especies reactivas de oxígeno que se produce en diferentes condiciones de estrés, desencadena la disminución del microRNA miR398 y permite el aumento de sus transcritos blanco, las enzimas Superóxido Dismutasa 1 y 2 que catalizan la conversión del radical superóxido en peróxido de hidrógeno contribuyendo a la detoxificación de las células (Chinnusamy et al. 2010).

Además de los mecanismos de regulación de la expresión de genes a nivel transcripcional, entre las principales estrategias adaptativas de las plantas sometidas a estrés abiótico se encuentra la fina regulación de la síntesis de proteínas. En estas condiciones hay una disminución global de la síntesis de estas biomoléculas, mientras que aumenta la de un grupo cuya función es mantener la homeostasis celular (Yanguez et al. 2013). No se conoce totalmente la manera en que las plantas seleccionan aquellos transcritos que son preferencialmente traducidos. Algunos estudios sugieren que las características del extremo 5'UTR como el contenido de G/C pudieran tener un papel importante en los mecanismos de discriminación por la maquinaria traduccional (Branco et al. 2005). Por otro lado, el inicio de la traducción es uno de los pasos más regulados de la síntesis de proteínas. En las plantas no se ha descrito cuál es el papel de los factores 4E de inicio de la traducción durante el estrés abiótico, sin embargo, se conoce que de manera general, estos son unos de los principales blancos de los mecanismos regulatorios que afectan el inicio de la traducción.

1.2 El factor de inicio de la traducción (eIF4E). Estructura, funciones y regulación de su actividad.

El factor eucariótico de inicio de la traducción 4E (eIF4E) es el encargado de reconocer la estructura CAP (7-metilguanositri-fosfato, m⁷GpppN) en el extremo 5' de los RNAs mensajeros (mRNAs) eucariontes y reclutar la maquinaria para la síntesis proteica (Fischer 2009). Esta proteína está formada por ocho hojas β que descansan en una plataforma de tres α hélices (Marcotrigiano et al. 1997, Tomoo et al. 2002) y adopta una conformación que algunos han denominado "mano ahuecada" que permite la interacción con la estructura CAP (Figura 1.2). Esta interacción se produce a través de dos residuos de triptófano (Trp 56 y Trp 102, numeración acorde a la secuencia de la proteína en humanos) que estabilizan la base alquilada, así como a través del contacto directo de residuos cargados positivamente con los grupos fosfato de la estructura CAP.

En los organismos eucariontes la síntesis del 95 % de las proteínas es iniciada por el factor eIF4E a través del reconocimiento de la estructura CAP (Fischer 2009). En la figura 1.2 se muestra un esquema que representa el inicio de la traducción.

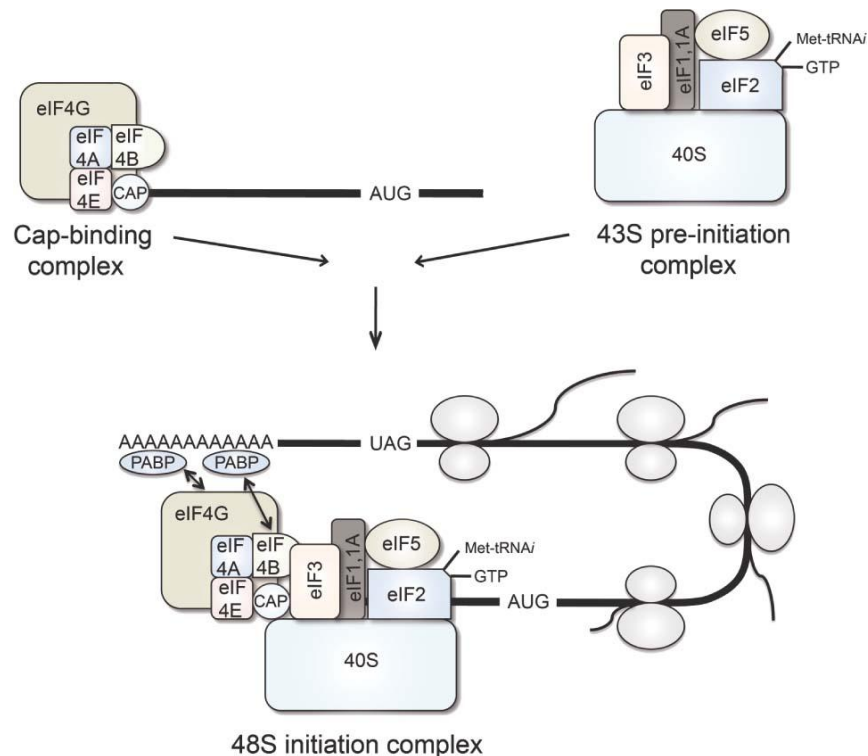


Figura 1.2 Representación esquemática del inicio de la traducción en eucariontes. Primeramente se produce el reconocimiento de la estructura 5'CAP por un complejo de factores integrado por el factor eIF4E que se une directamente a esta estructura, las helicasas de RNA dependientes de ATP eIF4A y eIF4B y el factor

eIF4G, proteína de anclaje para otros factores de traducción. Posteriormente, a través de la interacción entre eIF4G y el factor eIF3 se recluta el complejo de preinicio 43S que contiene a la subunidad pequeña del ribosoma y el complejo ternario eIF2/tRNA^{Met} /GTP, así como los factores eIF1 (involucrado en el reconocimiento del codón de inicio) y eIF1A (que impide la re-asociación con la subunidad 40S). La proteína de unión a la cola de poli A (PABP) permite la circularización del mensajero a través de su interacción con eIF4G. Una vez que la subunidad 40S se une al mRNA comienza el escrutinio de la región 5'UTR en busca del codón de inicio (Muench et al. 2012).

Una vez que el factor eIF4E se une al RNA mensajero a través de su interacción con la estructura 5'CAP, este se asocia con la proteína de anclaje eIF4G, con lo cual aumenta la afinidad del primero por el mRNA. El factor 4G recluta a la helicasa eIF4A y a la proteína de unión a la cola de poli A (PABP, por sus siglas en inglés). La helicasa facilita el desenrollamiento de estructuras secundarias en el mRNA, mientras que la interacción 4G-PABP permite la circularización del mRNA, protegiéndolo de la degradación por nucleasas y permitiendo el reciclaje de los componentes de la maquinaria y el reinicio múltiple de la traducción. El complejo formado por los factores eIF4E, eIF4G y la helicasa se denomina eIF4F. Este complejo recluta, a través de 4G, al resto de la maquinaria de inicio de la traducción que recorre el mRNA en dirección 5'-3' en busca del codón de inicio (Martínez-Silva and Dinkova 2010).

El inicio de la traducción se considera la etapa más regulada de la síntesis de proteínas y el factor de inicio 4E es uno de los principales blancos de los mecanismos regulatorios. Estos mecanismos permiten mantener la homeostasis celular y asegurar los niveles óptimos de síntesis proteica. Una de las estrategias de regulación, identificada en mamíferos y *Drosophila*, consiste en la inhibición de la traducción por proteínas de unión al factor 4E (4E-BP, por sus siglas en inglés) al competir con eIF4G por el mismo sitio de interacción con 4E (Martínez-Silva and Dinkova 2010). Aunque hasta el momento no se han identificado este tipo de proteínas en las plantas, se considera que pudieran existir otras proteínas de unión a 4E que regulan su presencia en los complejos de inicio así como su función. Por otra parte se ha propuesto que la fosforilación del factor 4E en un residuo conservado de serina modifica su capacidad de unión a CAP, sin embargo, no existe consenso en cuanto al impacto de esta modificación en la actividad de la proteína. En plantas se ha encontrado al factor 4E hiperfosforilado en condiciones de hipoxia (Manjunath et al. 1999).

Además de su función en el inicio de la traducción, eIF4E participa en la exportación citoplasmática de mRNAs que contienen una estructura conocida como elementos sensibles a 4E (Strudwick and Borden 2002). En el citoplasma, forma partículas ribonucleoproteicas que pueden estabilizar los

transcritos para su traducción o promover su degradación en cuerpos citoplasmáticos de procesamiento (Weber et al. 2008). Adicionalmente, esta proteína está muy relacionada con el ciclo celular, ya que regula la traducción de varios genes que dirigen la progresión del mismo, como la ciclina D1 que promueve el paso a la fase S (Rosenwald et al. 1993).

1.3 Isoformas del factor eIF4E en *Arabidopsis thaliana*. Expresión y funciones diferenciales.

Se conoce que en casi todos los organismos existe más de una isoforma perteneciente a la familia 4E de los factores de inicio de la traducción. Estas se agrupan en tres clases de acuerdo a la conservación de dos residuos de triptófano presentes en la proteína eIF4E de humanos. La proteínas de la clase I presentan los Trp 43 y 56 conservados según la secuencia en humanos, las de la clase II presentan ambos residuos sustituidos por Phe, Tyr o Leu y las de la clase III presentan conservado el Trp en posición 43 pero sustituido el residuo en la posición 56 por Cys o Tyr (Joshi et al. 2005). En *Arabidopsis thaliana* existen cinco isoformas del factor eIF4E: los factores canónicos de traducción eIF4E1 (At4g18040) (en el resto del texto nos referiremos a esta isoforma como eIF4E) y eIF(iso)4E (At5g35620) que pertenecen a la Clase I, la proteína novedosa de unión a la estructura CAP (nCBP) de la clase II y dos parálogos del factor eIF4E1 denominadas eIF4E2 (At1g29590) y eIF4E3 (At1g29550), los cuales a pesar de que conservan la capacidad de unión a la estructura CAP y a la proteína eIF4G *in vitro*, presentan una expresión muy baja y localizada en la planta por lo que no pueden suplir las funciones de los factores 4E canónicos en *Arabidopsis thaliana* (Patrick et al. 2014).

La estructura proteica de las principales isoformas, eIF4E, eIF(iso)4E y nCBP, en *Arabidopsis thaliana* es muy similar (Figura 1.3), aunque sus secuencias de aminoácidos presentan un porcentaje de identidad moderado del 51% entre eIF4E y eIF(iso)4E y aproximadamente del 35 % entre estas y nCBP (TAIR arabidopsis.org). Se conoce que la mutación en residuos implicados en la unión a la estructura CAP le confieren diferentes afinidades por el ligando, siendo la proteína eIF4E la más afín por esta estructura (Kropiwnicka et al. 2015). Como se muestra en la figura 1.3, el factor eIF(iso)4E carece de una pequeña hélice que une las hojas β 7 y 8 que se presume está relacionada con la estabilización de la ribosa de la estructura 5'CAP. Por otro lado, nCBP tiene sustituido uno de los triptófanos en el sitio de unión a CAP por una tirosina. En este trabajo se sugiere que esta mutación pudiera repercutir negativamente en la afinidad de esta proteína por la

estructura CAP, aunque análisis de unión *in vitro* han demostrado una alta afinidad de nCBP por m⁷GTP (Ruud et al. 1998).

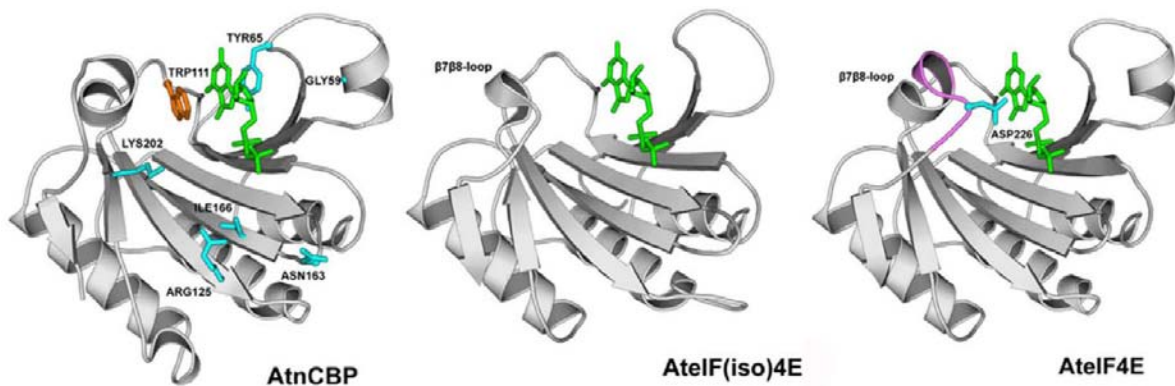


Figura 1.3. Modelado estructural de las tres isoformas del factor eIF4E en *Arabidopsis thaliana* unidas a la estructura 5'CAP (Kropiwnicka et al. 2015).

Existen pocos estudios *in vivo* donde se reporten las posibles funciones especializadas de estos factores. La mayoría de estos están relacionados con su papel en la interacción virus-planta. Particularmente en el caso de la infección por potivirus, se requiere la unión de la proteína VPg (*Viral Protein genome linked*) con el factor eIF4E o eIF(iso)4E para la replicación y movimiento del virus de célula a célula. Sin embargo, esta interacción se produce específicamente con una de las isoformas dependiendo del hospedero y de la especie viral en cuestión. Por ejemplo, en *Arabidopsis thaliana* se requiere del factor eIF(iso)4E para la infección por LMV (*Lettuce mosaic virus*) y TEV (*Tobacco etch virus*) y la mutación de este factor le confiere a la planta resistencia a la infección por los mismos, lo cual indica que los demás miembros de la familia eIF4E no pueden suplir sus funciones en el ciclo replicativo de estos virus. En contraste, la mutación de eIF4E no afecta la replicación de LMV y TEV en la planta pero confiere resistencia a la infección por C1YVV (*Clover yellow vein virus*) (Robaglia and Caranta 2006, Dinkova et al. 2016).

Por otro lado, los miembros de la familia eIF4E se expresan de manera diferencial dependiendo del tejido y estadio del desarrollo de la planta. El factor eIF4E se considera ubicuo ya que su RNA mensajero se encuentra en todos los órganos de la planta, sin embargo los mayores niveles fueron reportados en hojas y tallo. Por otro lado eIF(iso)4E se expresa principalmente en flor y ambos factores se expresan preferencialmente en células en división (Rodriguez et al. 1998, Bush et al. 2009). A nivel de la proteína, análisis globales por espectrometría de masas indican que eIF4E es más abundante en silicuas, la proteína eIF(iso)4E abunda en raíces y nCBP en órganos florales (TAIR arabidopsis.org). Antes de la germinación del maíz ambos transcritos se expresan en semilla

seca, sin embargo eIF(iso)4E es mucho más abundante y la proteína correspondiente se mantiene a niveles elevados durante las primeras 24 horas de la germinación (Dinkova et al. 2011). Se conoce menos sobre la proteína nCBP aunque se ha reportado el aumento de su expresión durante las etapas tempranas del crecimiento celular (Bush et al. 2009) y su relación con el proceso de floración (datos del grupo no publicados).

Además de su expresión diferencial, se ha descrito que estos factores se unen de manera selectiva y controlan la traducción de diferentes RNAs mensajeros. En semillas de maíz se observó que los factores eIF4E y eIF(iso)4E traducen diferentes mRNAs (Dinkova et al. 2011). Por otra parte se ha postulado que eIF(iso)4E presenta mayor afinidad por mRNAs con regiones no traducibles hipermetiladas (Carberry et al. 1991). En nuestro laboratorio se demostró, mediante el uso de perfiles polisomales, que la mutación del factor eIF(iso)4E en *Arabidopsis thaliana* conduce a un cambio en la distribución en las fracciones polisomales de un grupo de RNAs mensajeros con respecto a las plantas silvestres (Martinez-Silva et al. 2012). La mutación promovió la disminución en las fracciones polisomales (polisomas ligeros y polisomas pesados) de un grupo de 79 transcritos, con respecto a las plantas silvestres, con el concomitante aumento en las fracciones no polisomales (monosomas y partículas ribonucleoprotéicas). Se considera que los transcritos presentes en la fracción polisomal están destinados a la traducción. Por otra parte un grupo de 47 transcritos aumentaron su presencia en la fracción polisomal.

Dentro de las proteínas codificadas por los transcritos cuya presencia se vio aumentada en las fracciones polisomales en ausencia de eIF(iso)4E, se encontró un predominio de proteínas nucleares como factores transcripcionales, proteínas de unión a DNA y acetiltransferasas de histonas. Además que estos poseían una región 5'UTR más larga y con mayor presencia de estructuras secundarias, lo cual corresponde a las características reportadas para los mensajeros a los que se une el complejo eIF4F (Carberry and Goss 1991). Según se conoce, la ausencia del factor eIF(iso)4E produce un aumento de la expresión de la proteína eIF4E (Duprat et al. 2002), lo cual está en correspondencia con el aumento de la traducción de transcritos traducidos preferencialmente por eIF4E en las plantas mutantes para eIF(iso)4E.

Por otro lado, un alto porcentaje de las proteínas codificadas por los transcritos cuya presencia en la fracción polisomal se vió disminuida, corresponde a proteínas de sistemas endomembranales como transportadores de nutrientes y de electrones e involucradas en la transducción de señales.

Además estas se expresan principalmente en inflorescencia y raíz, al igual que, como habíamos mencionado anteriormente, la proteína eIF(iso)4E.

Antecedentes

Papel de los factores de inicio de la traducción durante el estrés por frío en plántulas de *Arabidopsis thaliana*.

No se conoce el papel de las isoformas de los factores 4E de inicio de la traducción durante la respuesta a estrés abiótico en las plantas. Sin embargo, algunas evidencias recopiladas en nuestro laboratorio y en estudios globales de expresión transcripcional, indican que estas proteínas pudieran estar relacionadas con la resistencia a estrés y que pudieran actuar de manera coordinada para dar respuesta a estas condiciones.

Entre los mRNAs traducidos de manera diferencial por los factores eIF4E y eIF(iso)4E (Martinez-Silva et al. 2012) existe un predominio de genes cuya transcripción se estimula por estrés abiótico y específicamente estrés por frío (análisis *in silico*) (Trabajo post-doctoral, Eloisa Hernández, 2013). Como se ilustra en la Tabla 1, cada uno de los factores se asocia a la traducción preferencial de un grupo distinto de transcritos potencialmente relevantes en la respuesta al estrés por frío. Estos genes pudieran actuar de manera coordinada tanto temporal como funcionalmente durante el estrés.

Tabla 1. Número de acceso y el nombre de los genes regulados de manera preferencial por los factores de traducción eIF4E y eIF(iso). Se señalan los genes que cambian su expresión transcripcional en respuesta a estrés por frío, en azul aquellos que son reconocidos selectivamente por eIF(iso)4E y en rojo por eIF4E. Tomada y modificada de (Martinez-Silva et al. 2012).

Accession	Function/Gene Name
At3g23430	Phosphate transport (<i>PHO1</i>)
At4g02950	Ubiquitin family protein
At4g20340	Transcription initiation factor (<i>TFIIIE</i>)
At3g55580	Regulator of chromosome condensation, (<i>RCC1</i>)
At2g02860	Sucrose transporter 3 (<i>SUC3</i>)
At2g30260	Component of the U2 snRNP complex (<i>U2B''</i>)
At1g21630	Calcium ion binding, EF hand protein
At2g17630	Pyridoxal phosphate (PLP)-dependent transferase
At1g78240	Tumorous shoot development 2 (<i>TSD2</i>)
At2g27940	RING/U-box protein
At2g28600	P-loop containing nucleoside tri-phosphate hydrolase
At1g68670	MYB-like transcription factor family
At4g06746	Transcription factor ERF/AP2 DREB subfamily A-5 (<i>RAP2.9</i>)
At3g57600	Transcription factor ERF/AP2 DREB subfamily A-2 (<i>ERF/AP2</i>)
At2g05710	Aconitase (<i>ACO3</i>)
At5g61430	NAC domain containing protein (<i>NAC5</i>)
At1g6880	Transcription factor (<i>BRC2</i>)
At4g18720	Transcription factor IIS protein
At5g15850	Transcription factor, constans-like 1 (<i>COL1</i>)
At4g33250	Eukaryotic translation initiation factor 3 K (<i>EIF3K</i>)
At5g15630	Cobra-like4 (<i>COBL4</i>)
At5g01840	Ovate family protein 1 (<i>OFP1</i>)
At1g64580	Pentatricopeptide repeat-containing protein (<i>PPR</i>)

Adicionalmente, estudios globales de expresión en plántulas *Arabidopsis thaliana* (Arabidopsis eFP Browser: www.bar.utoronto.ca) muestran que cuando estas son sometidas a bajas temperaturas ambos factores de traducción aumentan su expresión transcripcional a partir de las 12 horas de exposición a 4°C. En nuestro laboratorio se determinó que el aumento de la proteína eIF4E en estas condiciones precede a la eIF(iso)4E, la primera aumenta a las 12 horas de exposición mientras que disminuye a las 24 horas. El comportamiento de eIF(iso)4E es el inverso, aumentando a las 24 horas (Figura 1.4).

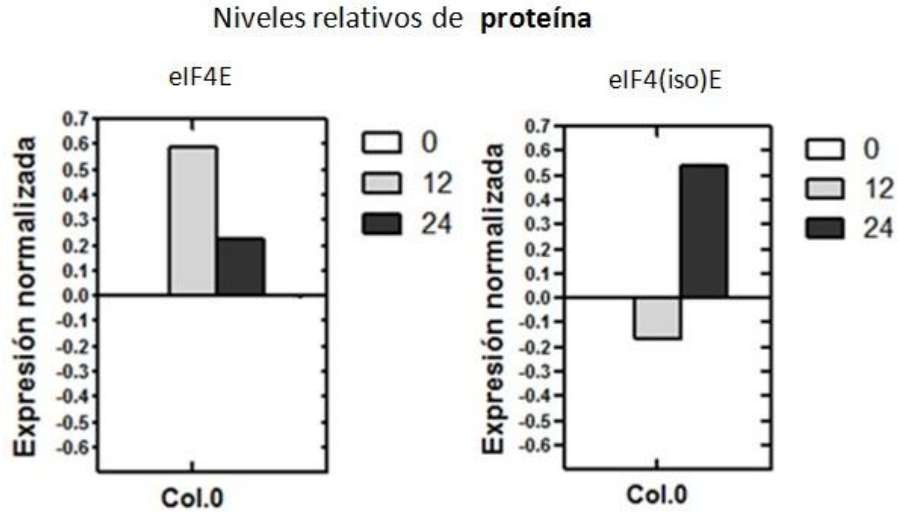


Figura 1.4. Niveles de expresión de las proteínas eIF4E y eIF(iso)4E en plantas silvestres (Col-0) a las 0, 12 y 24 horas de exposición a 4°C. *Western blot*, expresión relativa a las 0 horas de exposición, control normalizador el factor de elongación eEF1β. (Trabajo post-doctoral, Hernández, 2013).

Por otro lado, plántulas de 15 días post-germinación sobreexpresoras de los factores de inicio de la traducción eIF4E o eIF(iso)4E mostraron menor reducción del crecimiento de la raíz en presencia de bajas temperaturas (4°C) con respecto a las condiciones control (22°C) en comparación con las plantas silvestres (Figura 1.5).

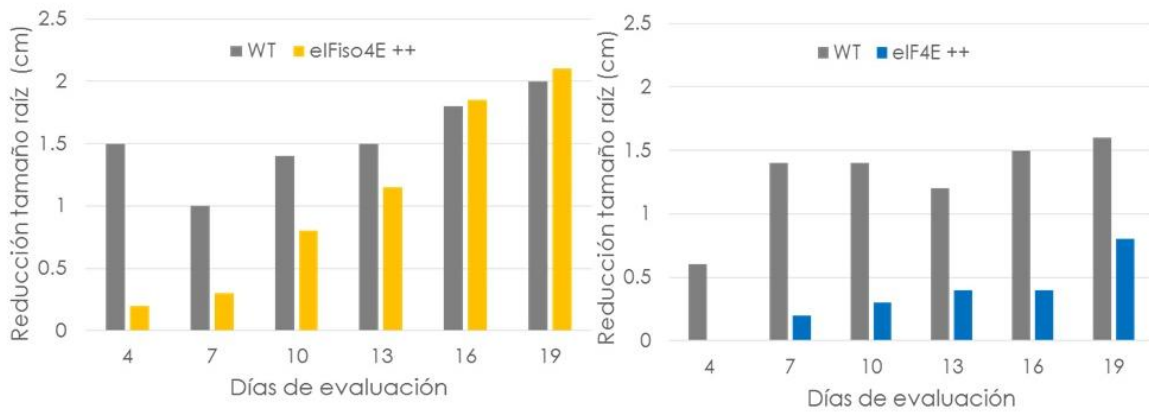


Figura 1.5. Reducción del tamaño de la raíz de plantas crecidas a 4°C con respecto a las condiciones normales de crecimiento (22°C). Plantas silvestres (WT), sobreexpresoras del factor eIF4E (eIF4E++) y sobreexpresoras del factor eIF(iso)4E [eIF(iso)4E++]. La evaluación se realizó durante 15 días en intervalos de tres días. (Tesis de Licenciatura David Flores, 2013).

Genes de respuesta a estrés por frío controlados de manera selectiva por los factores de inicio de la traducción eIF4E y eIF(iso)4E.

Transcritos reconocidos preferencialmente por el factor eIF4E.

Dentro de los genes de respuesta a frío cuya traducción es estimulada por eIF4E se encuentra el factor de transcripción DREB2F (At3g57600). Esta proteína pertenece a la superfamilia ERF/AP2 específica de plantas y se incluye en el grupo A2 de la subfamilia DREB. Estos factores se unen a la secuencia DRE: 5'-TACCGACAT-3', presente en el promotor de genes implicados en la resistencia a estrés abiótico, entre los cuales muchos han sido caracterizados como agentes fundamentales en la respuesta a estrés (Sakuma et al. 2002).

Particularmente, dentro del grupo A1 existen tres genes ubicados en tándem en el cromosoma 3 de *Arabidopsis thaliana*: DREB1A, DREB1B, DREB1C, que aumentan su expresión en condiciones de estrés, principalmente por frío y deficiencia de agua, confiriéndole a las plantas una mayor resistencia (Shinwari et al. 1998). La sobreexpresión de los genes DREB1 incrementa la resistencia a estrés por frío a través del estímulo de la expresión de genes denominados COR. Entre ellos *KIN2*, que codifica una proteína que actúa en el sistema SOS de respuesta a deshidratación; *GOLS3*, que codifica una galactinol sintasa que promueve la formación de polisacáridos densos y *COR15A*, que codifica una proteína que participa en la remodelación estructural de la membrana de cloroplasto bajo condiciones de estrés por frío (Oakenfull et al. 2013).

Por otro lado, los factores DREB pertenecientes al grupo A2 son promovidos y aumentan la resistencia de las plantas principalmente ante la deficiencia de agua, alta concentración de sales y altas temperaturas (Sakuma et al. 2006). Aunque también se ha reportado su aumento en respuesta a frío en arroz y trigo (Shen et al. 2003, Matsukura et al. 2010). En el caso específico del factor DREB2F, no se conoce su función en la planta y hasta el momento no existen plantas mutantes para este gen, sólo se ha aislado el cDNA correspondiente en *Arabidopsis* y su homólogo putativo en arroz OsDREB2E (Mizoi et al. 2012).

Otro de los factores de transcripción cuya traducción se ve incrementada por eIF4E, es el factor de tipo MYB HHO2 (At1g68670). En *Arabidopsis thaliana* existe una gran diversidad de estos factores de transcripción. Entre sus funciones se encuentran el control del ciclo celular, regulación del ciclo circadiano y el metabolismo secundario, entre otras (Stracke et al. 2001). Estas proteínas pueden actuar como activadores o como represores de la transcripción y también tienen un papel en la

respuesta a estrés abiótico. Se conoce que varios genes de respuesta a estrés contienen en sus promotores elementos de unión a los factores MYB, entre ellos los genes DREB; cuya expresión es estimulada por LHY y CCA1, factores de tipo MYB promovidos por el ciclo circadiano (Mizoi et al. 2012). Adicionalmente, la sobreexpresión en *Arabidopsis* de un gen OsMYB4 de arroz, le confiere a la planta mayor resistencia a estrés por frío, déficit hídrico y salinidad (Dai et al. 2007).

Por otra parte eIF4E estimula la traducción del factor de transcripción COL-1, perteneciente a una familia de factores que controlan la floración. No se conoce la función de este factor durante el estrés por frío, pero se ha visto que en estas condiciones se produce un aumento rápido del transcrito correspondiente. Adicionalmente, se ha reportado que un miembro de los factores *constants-like* (COL-15) se asocia con una proteína chaperona implicada en la tolerancia a estrés por frío (Kim et al. 2013).

Transcritos reconocidos preferencialmente por el factor eIF(iso)4E.

Entre los transcritos reconocidos de manera preferencial por el factor eIF(iso)4E se encuentra *TCF1* (*Tolerant to Chilling and Freezing 1*) que pertenece a la familia RCC1 de intercambiadores de GTP para la proteína Ran y que está presente en una gran variedad de organismos (Lee et al. 1993). Sin embargo, recientemente se ha descrito que esta proteína en las plantas no tiene esta actividad aunque sí conserva la capacidad de unión a la cromatina a través de las histonas H3 y H4. Su expresión aumenta considerablemente cuando las plantas son sometidas a bajas temperaturas, lo cual parece ocurrir específicamente en estas condiciones. En las plantas mutantes de este factor se produce una menor acumulación de lignina, lo que les confiere una mayor resistencia al estrés aunque se plantea que existen otros mecanismos a través de los cuales esta proteína pudiera regular la expresión genética durante la aclimatación (Ji et al. 2015).

También dentro de los blancos de eIF(iso)4E se encontró una proteína con función desconocida denominada DUF295 (At1g05550). Su papel en estrés no ha sido descrito, sin embargo, su expresión transcripcional se promueve notablemente cuando las plantas son sometidas a estrés (*Arabidopsis* eFP Browser: www.bar.utoronto.ca). Adicionalmente, estudios previos realizados en nuestro laboratorio mostraron que su mRNA se distribuye principalmente en la fracción polisomal cuando las plantas son sometidas a estrés por frío.

Planteamiento del problema

En la actualidad el cambio climático y la reducción de los recursos hídricos imponen desafíos a la ciencia en la búsqueda de estrategias para aumentar la capacidad de los cultivos de resistir a estas condiciones. La temperatura es uno de los factores limitantes para el desarrollo y rendimiento de las plantas, por lo tanto resulta de vital importancia entender los mecanismos que les permiten resistir a las temperaturas extremas. Hasta el momento se ha descrito una serie de genes que confieren protección a las plantas a las bajas temperatura, la mayoría están involucrados en la reprogramación genética que ocurre en condiciones de estrés (Dai et al. 2007, Oakenfull et al. 2013). Sin embargo, se conoce muy poco sobre cómo se produce la regulación traduccional que se presenta durante estos procesos. Estudios globales de expresión indican que en estas condiciones la traducción es selectiva y que no siempre existe una correlación entre la estimulación de la transcripción y el reclutamiento eficiente del transcrito correspondiente por la maquinaria traduccional (Branco et al. 2005). En *Arabidopsis thaliana* los factores de inicio de la traducción eIF4E y eIF(iso)4E son los encargados de reconocer los transcritos y reclutar el resto de la maquinaria traduccional (Martínez-Silva and Dinkova 2010) además presentan selectividad en el reconocimiento de transcritos involucrados en la respuesta a estrés (Martinez-Silva et al. 2012). Estos datos sugieren que estos factores podrían estar involucrados en la respuesta a estrés abiótico en las plantas.

Hipótesis

Los factores de inicio de la traducción eIF4E y eIF(iso)4E tienen un papel durante la respuesta a estrés por congelamiento en *Arabidopsis thaliana* a través de la regulación de la expresión de genes estimulados en estas condiciones.

Objetivo general

Estudiar el papel de los factores de inicio de la traducción eIF4E y eIF(iso)4E durante la respuesta a estrés por congelamiento en *Arabidopsis thaliana*.

Objetivos particulares

1. Evaluar el fenotipo de recuperación de plantas de *Arabidopsis thaliana* mutantes para el factor AtelF(iso)4E, sobreexpresoras del factor AtelF4E, sobreexpresoras del factor AtelF(iso)4E así como de las plantas silvestres sometidas a estrés por congelamiento.
2. Determinar la expresión de los factores eIF4E y eIF(iso)4E cuando las plantas son sometidas a un período de exposición a las bajas temperaturas (4°C) en comparación con plantas crecidas en condiciones normales (22°C).
3. Analizar la expresión de genes de respuesta a estrés por frío potencialmente controlados de manera diferencial por los factores eIF4E cuando las plantas son sometidas a un período de exposición a las bajas temperaturas (4°C) en comparación con plantas crecidas en condiciones normales (22°C).

2. Metodología

2.1 Material biológico. Aclimatación, estrés por congelamiento y recuperación.

Se utilizaron cuatro líneas de plantas de *Arabidopsis thaliana* del ecotipo Columbia (Tabla 2.1). Las plantas sobreexpresoras de los factores de inicio de la traducción fueron generadas en el laboratorio (Flores, 2013) a través de la introducción de la secuencia de cDNA correspondiente bajo el control del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor. La línea *AteIF(iso)4E-1* fue donada por el laboratorio del Dr. Christophe Robaglia de la UNM, Francia (Duprat et al. 2002).

Tabla 2.1 Líneas de plantas de *Arabidopsis thaliana* (Col-0) utilizadas en el estudio del papel de los factores de inicio de la traducción eIF4E y eIF(iso)4E durante el estrés por congelamiento.

Líneas	Genotipo
Col-0 (WT)	Silvestre
<i>35S:AteIF4E</i>	Expresión constitutiva de <i>eIF4E</i>
<i>35S:AteIF(iso)4E</i>	Expresión constitutiva de <i>eIF(iso)4E</i>
<i>35S:AteIF(iso)4E-1</i>	Mutación nula de <i>eIF(iso)4E</i>

Las plantas se sembraron en tierra de manera individual y fueron cultivadas en condiciones normales (22°C) y fotoperíodo de día corto (8h de luz x 16h de oscuridad) durante 7 semanas. Transcurrido este período, la mitad de las plantas de cada línea fue transferida al cuarto de aclimatación (4 ± 1°C) durante una semana (aclimatadas), la otra mitad se mantuvo en condiciones normales de crecimiento (no aclimatadas). Luego del período de aclimatación, se registró el fenotipo de las plantas de 8 semanas de edad aclimatadas (4 plantas por línea) y no aclimatadas (5 plantas por línea) antes del estrés. Posteriormente las plantas fueron sometidas al estrés por congelamiento, 1h a -20°C, y recuperación corta durante 40 minutos a 4 ± 1°C. Por último, fueron colocadas en la cámara de crecimiento bajo condiciones controladas durante 4 semanas y se registró el fenotipo de recuperación a las 2 y 4 semanas post-estrés. También se registró el porcentaje de sobrevivencia en la cuarta semana de recuperación (2 réplicas biológicas).

2.2 Análisis de la expresión genética de los factores eIF4E y de genes blanco en respuesta a la exposición a las bajas temperaturas.

Se extrajo RNA total de hojas de plantas silvestres de *Arabidopsis thaliana* de 8 semanas de edad utilizando el método fenol/cloroformo de acuerdo al protocolo del reactivo TRIzol LS Reagent. Se verificó la integridad del RNA obtenido en gel de agarosa 1.2%. Posteriormente, aproximadamente 5µg de RNA se trataron con DNAsa RQ1 (Promega) durante 1:20 h a 37°C en una reacción de 50µL. Estas muestras se purificaron en columnas con el kit *RNA Clean and Concentrator* (Zymo Research). La síntesis de cDNA, amplificación y detección de los transcritos de interés se realizó utilizando el kit SuperScript III Platinum SYBR Green One-Step (Invitrogen). Para determinar las veces de cambio de expresión respecto a la condición control se utilizó el método del $\Delta\Delta C_T$ y se empleó como normalizador el transcrito de rRNA 18S.

Se analizó la expresión transcripcional de los factores eIF4E en las plantas silvestres sometidas a un período de exposición a las bajas temperaturas (en el resto del texto se denominan plantas aclimatadas) y en plantas mantenidas en condiciones normales de crecimiento (se denominan plantas no aclimatadas). Además se analizó la expresión de genes de respuesta a estrés por frío potencialmente regulados de manera diferencial por estos factores de traducción (Tabla 2.2). Los oligonucleótidos empleados como cebadores en las reacciones de qRT-PCR se diseñaron utilizando el *software* Primer3Plus (<http://primer3plus.com/cgi-bin/dev/primer3plus.cgi>) y sus características energéticas se verificaron utilizando la herramienta OligoAnalyzer 3.1 (<https://www.idtdna.com/calc/analyzer>).

Tabla 2.2. Genes de respuesta a estrés por frío potencialmente regulados de manera selectiva por los factores eIF4E analizados en este trabajo. Se muestran las secuencias de los oligonucleótidos utilizados para la amplificación por PCR para los genes blanco analizados así como para los factores de traducción.

	Genes	No de acceso	Secuencias oligonucleótidos
Regulados por eIF4E	<i>eIF4E</i>	At4g18040	FW: GGTAGAAGACACTCCCAAATC RV: CATCACCTTCCTCATGGTATCG
	Factor de tipo MYB <i>HHO2</i>	At1g68670	FW: ACCGTCCGATGTAGCCAAC RV: GCAACTTCTCTCCAACGAACG
	<i>DREB2F</i>	At3g57600	FW: ACCGTCCGATGTAGCCAAC RV: GCAACTTCTCTCCAACGAACG

Regulados por eIF(iso)4E	<i>eIF(iso)4E</i>	At5g35620	FW: GAGAAACAACCACACAAGCTC RV: CCAAAAATCTTCGACGGTGTC
	<i>TCF1</i>	At3g55580	FW: ATGACGACCACCAGCAGCAAC RV: TCTGACAACATTGACCTCTCGG
	<i>BCB</i>	At5g20230	FW: TGGCCGGAGTTTTCAAAACG RV: TCGTCCATTCCGTATCATCACC
Genes control positivo	<i>DREB1A</i>	At4g25480	FW: TGAGATGCCGAGTTTGTGG RV: ATTCCACTGTACGGACGGAAG
	<i>COR15A</i>	At2g42540	FW: AGGAGAAAGGAAAAGAAGCC RV: AAGACCCTACTTTGTGGCATCC

Adicionalmente, como control del proceso de aclimatación a nivel molecular, se determinó la expresión de los genes *DREB1A* y *COR15A* (Tabla 2.2).

2.3 Análisis de perfiles polisomales en plantas aclimatadas versus no aclimatadas.

Se utilizaron aproximadamente 1.2 gramos de tejido de hojas de *Arabidopsis thaliana* de todas las líneas de plantas en estudio para el análisis del comportamiento de la síntesis de proteínas durante el proceso de aclimatación comparándolo con el de las plantas no aclimatadas.

Se maceró la muestra en mortero con nitrógeno líquido hasta polvo fino y posteriormente se le agregaron de 3mL a 5mL de buffer de lisis (200mM Tris-HCl pH 8.5, 50mM KCl, 25mM MgCl₂, 2mM EGTA, 2% PTE, 1% IGEPAL, 1% Tritón X-100, 0.1 % DTT 1M, 0.2mg/mL CHX, 0.5mg/mL Heparina). Seguidamente se aplicó vórtex y las muestras se centrifugaron a 12,000g durante 15 minutos a 4°C, posteriormente se tomó el sobrenadante y se repitió la centrifugación en nuevos tubos. Luego se agregaron al sobrenadante 2mL de buffer de gradiente (50mM Tris-HCl pH 8.5, 20mM KCl, 10mM MgCl₂) y se ajustó el peso de los tubos con buffer de lisis. Posteriormente se centrifugaron las muestras a 50,000rpm durante 3h en rotor 80Ti. El sobrenadante se resuspendió en buffer de lisis (300μL- 450μL) y se aplicó a un gradiente de 20% a 60% de sacarosa, luego se centrifugó a 45,000 rpm durante 2h a 4°C en rotor SW55Ti. Por último se colectaron de 10 a 11 fracciones de 500μL de cada perfil polisomal utilizando una bomba Labconco conectada a un detector ECONO UV MONITOR marca BIO-RAD (absorbancia 260nm).

2.4 Análisis de elementos regulatorios en *cis* de respuesta a estrés en los promotores de *eIF4E* y *eIF(iso)4E*.

Se analizó la secuencia de los promotores de *eIF4E* (*At4g18040*) y *eIF(iso)4E* (*At4g35620*) 1500 nt hacia el 5' del sitio de inicio de la transcripción (región promotora). Estas se obtuvieron del sitio PlantPAN 2.0 (<http://plantpan2.itps.ncku.edu.tw>) y se analizaron en el *software* PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) en busca de elementos de regulación en *cis* de respuesta a estrés.

3. Resultados

3.1 Análisis fenotípico y porcentaje de sobrevivencia de plantas sometidas a estrés por congelamiento.

Las plantas de las cuatro líneas en estudio fueron sometidas al esquema experimental mencionado anteriormente. De cada línea se utilizaron plantas aclimatadas a 4°C durante una semana así como plantas no aclimatadas de la misma edad que se mantuvieron en condiciones normales de crecimiento (22°C). Para evaluar la respuesta de las plantas ante el estrés por congelamiento, estas fueron sometidas 1h a -20°C y posteriormente puestas en recuperación durante cuatro semanas a 22°C.

Las plantas aclimatadas de todas las líneas en estudio mostraron una notable resistencia al congelamiento en las condiciones utilizadas. No se apreciaron diferencias fenotípicas considerables de estas plantas durante la recuperación posterior al estrés (Véase la Figura 3.1.1).

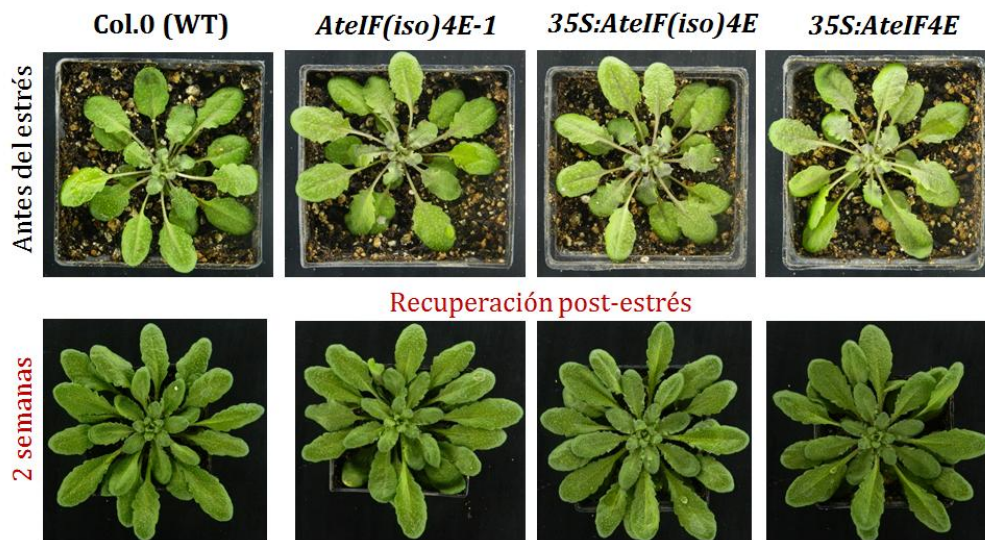


Figura 3.1.1. Fenotipos correspondientes a las plantas aclimatadas (7 días a 4°C) antes del estrés (1h a -20°C) y después de la recuperación durante 2 semanas. Plantas silvestres (Col-0 WT), plantas sobreexpresoras del factor eIF4E (35S:AteIF4E), plantas sobreexpresoras del factor eIF(iso)4E (35S:AteI(iso)F4E), plantas *knockout* para el factor eIF(iso)4E (AteIF(iso)4E-1).

Se conoce que las plantas de regiones templadas como *Arabidopsis thaliana* han desarrollado mecanismos de protección desencadenados por las bajas temperaturas, no congelantes, que les permiten resistir mejor a las temperaturas bajo 0°C que se presentan en las heladas, este proceso se denomina aclimatación a las bajas temperaturas (Thomashow 1999). Más adelante se muestra

que en nuestras condiciones, la aclimatación durante siete días produce la activación de mecanismos genéticos que parecen actuar en todas las plantas independientemente de su genotipo.

Por otro lado, las plantas no aclimatadas fueron severamente afectadas por la exposición al estrés (Figura 3.1.2). Como se observa, las hojas más jóvenes muestran una mayor resistencia al daño producido por las temperaturas congelantes, esto pudiera deberse a diferencias metabólicas, hormonales y en la expresión génica con respecto a las hojas más adultas. Es importante notar que en ausencia de aclimatación, las plantas sobreexpresoras de los factores 4E de inicio de la traducción mostraron un fenotipo de mayor resistencia a las 2 semanas post-estrés en comparación con las plantas silvestres, especialmente las *35S:AtelF4E*. Como se mencionó en los antecedentes, esto pudiera estar relacionado con que en estas líneas de sobreexpresión, aún en ausencia de aclimatación, se favorece la expresión de genes de protección ante este tipo de estrés. También es de notar que las plantas *AtelF(iso)4E-1* mostraron una mayor sensibilidad ante este tipo de estrés, lo cual podría indicar que en estas condiciones el factor eIF(iso)4E tiene una función que no puede ser asumida por eIF4E, tal como la expresión traduccional de transcritos reconocidos de manera preferencial por eIF(iso)4E; sin embargo es necesario un mayor número de réplicas de estos experimentos así como análisis a nivel molecular que nos permitan dilucidar este aspecto.

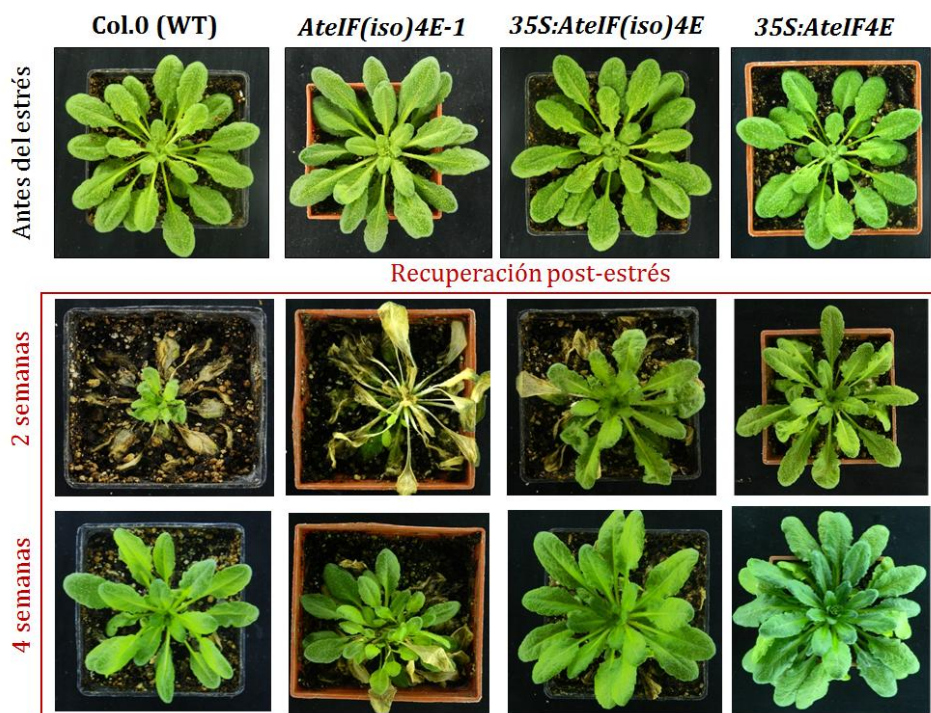


Figura 3.1.2. Fenotipos correspondientes a las plantas no aclimatadas antes del estrés (1h a -20°C) y después de la recuperación durante 2 y 4 semanas. Se realizaron dos réplicas biológicas, se muestran imágenes representativas de los fenotipos observados (ver anexo 3). Plantas silvestres (Col-0 WT), plantas sobreexpresoras del factor eIF4E (*35S:AtelF4E*), plantas sobreexpresoras del factor eIF(iso)4E (*35S:Atel(iso)F4E*), plantas *knockout* para el factor eIF(iso)4E (*AtelF(iso)4E-1*).

Adicionalmente, se determinó el porcentaje de sobrevivencia de las plantas no aclimatadas transcurridos 30 días después del estrés (figura 3.1.3). El comportamiento más claro de este parámetro es que, en correspondencia con los fenotipos observados a las dos semanas post-estrés, las plantas sobreexpresoras del factor eIF4E presentaron el mayor porcentaje de sobrevivencia con respecto a las plantas silvestres, cercano al 100 %. En el caso de las plantas sobreexpresoras de eIF(iso)4E se observa cierta tendencia a una mayor sobrevivencia con respecto a las plantas silvestres que debe ser corroborada en próximas réplicas de este experimento. Lo mismo ocurre para las plantas mutantes *AtelF(iso)4E-1* cuya sobrevivencia tiende a disminuir con respecto a las plantas silvestres.

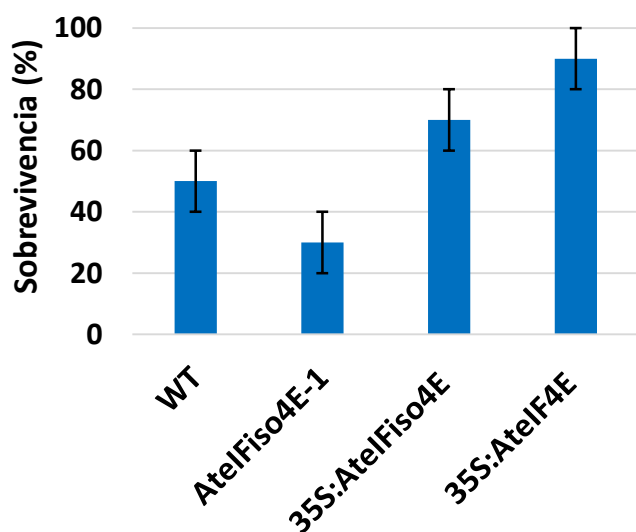


Figura 3.1.3. Sobrevivencia de las plantas a los 30 post-estrés. Se muestran los valores promediados de dos réplicas biológicas (5 plantas de cada línea por réplica). Las barras de error corresponden al error estándar. Plantas silvestres Col-0 (WT), plantas sobreexpresoras del factor eIF4E (*35S:AtelF4E*), plantas sobreexpresoras del factor eIF(iso)4E (*35S:Atel(iso)F4E*), plantas *knockout* para el factor eIF(iso)4E (*AtelF(iso)4E-1*).

3.2 Determinación de la expresión transcripcional de los factores eIF4E y eIF(iso)4E, así como de genes de respuesta a estrés por frío. Análisis en plantas silvestres, en condiciones normales de crecimiento y en respuesta a las bajas temperaturas.

Se colectaron muestras de plantas silvestres adultas de 8 semanas de edad crecidas en condiciones normales y plantas de la misma edad sometidas a bajas temperaturas (4°C durante 1 semana). Se extrajo RNA total de las plantas en las condiciones mencionadas anteriormente y se realizó la RT-qPCR como se describe en Materiales y Métodos.

3.2.1 Análisis de la expresión de genes de referencia en la respuesta a las bajas temperaturas.

Como control positivo a nivel molecular de la exposición a las bajas temperaturas se realizó la determinación de los transcritos *DREB1A* y *COR15A* cuyo papel durante este proceso ha sido bien descrito (Mizoi et al. 2012). *DREB1A* es un factor transcripcional que estimula la expresión de genes de respuesta a bajas temperaturas a través del reconocimiento de la secuencia DREB/CTR presente en sus promotores. Entre sus blancos se encuentra *COR15A*, proteína hidrofílica que estabiliza la membrana del cloroplasto en estas condiciones.

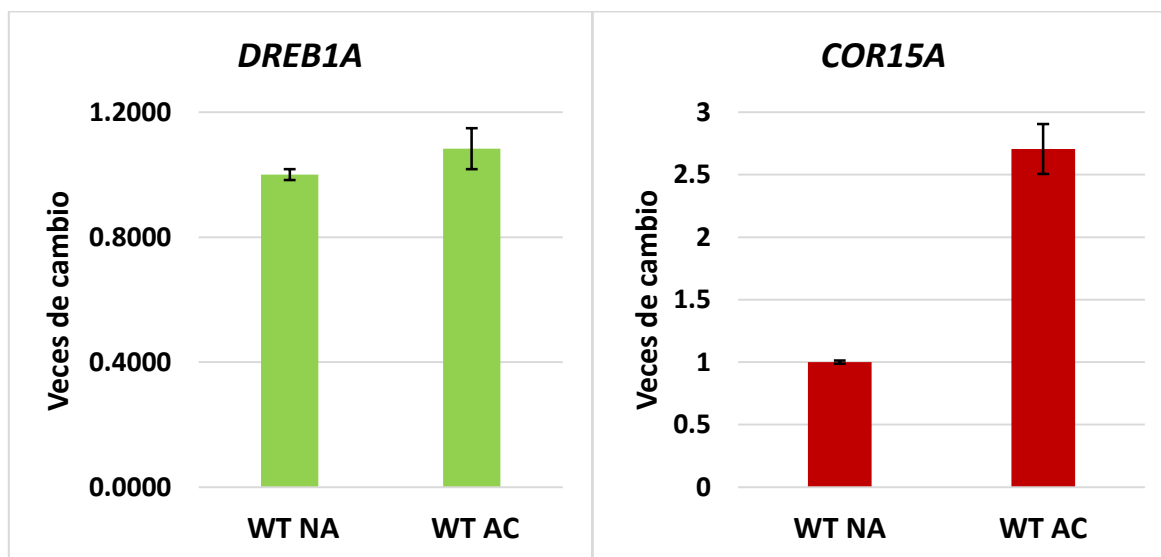


Figura 3.2.1 Expresión transcripcional de *DREB1A* y *COR15A* en plantas silvestres Col-0 (WT) de 8 semanas de edad. No aclimatadas (NA) y aclimatadas (AC) durante 1 semana a 4°C. Se muestra el promedio de las veces de cambio de dos réplicas técnicas, cada muestra por triplicado. Las barras de error representan el error estándar. Se utilizó el transcrito de rRNA 18S como normalizador.

Como se observa (Figura 3.2.1) las bajas temperaturas promueven la expresión de *COR15A* en plantas adultas de *Arabidopsis thaliana*. Se ha demostrado que en condiciones de deshidratación,

provocada por diferentes tipos de estrés, esta proteína se une a la membrana interna del cloroplasto y disminuye la transición a la fase hexagonal II de dominios lipídicos ricos en monogalactosil diacilglicerol, protegiéndola así de la ruptura. Por lo tanto, el aumento de su expresión durante la exposición a las bajas temperaturas constituye un mecanismo de protección que prepara a las células para enfrentarse a las temperaturas congelantes. También se sabe que la expresión de *COR15A* es promovida por los factores transcripcionales DREB, sin embargo, al tiempo de aclimatación analizado (1 semana) no encontramos cambios en la expresión de *DREB1A* (Figura 3.2.1). Esto puede deberse a que este es un gen de respuesta rápida y transitoria a la exposición a bajas temperaturas, cuya expresión precede a la de sus blancos (Medina et al. 1999, Kim et al. 2004, Novillo et al. 2004). Por lo cual a los siete días de aclimatación solo es posible observar su efecto en los genes cuya expresión estimula, como *COR15A*.

3.2.2 Análisis de la expresión de los factores eIF4E y eIF(iso)4E inducida por las bajas temperaturas.

Se determinaron los niveles de los transcritos de los factores 4E de inicio de la traducción en plantas no aclimatadas con respecto a plantas aclimatadas de la misma edad. El análisis indicó que ambos transcritos aumentan su expresión en respuesta a las bajas temperaturas (Figura 3.2.2).

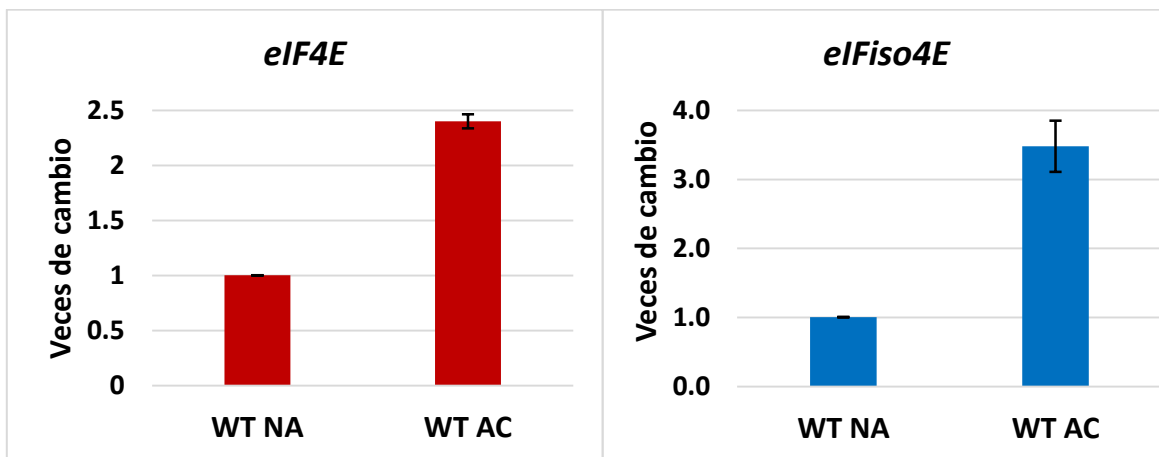


Figura 3.2.2 Expresión transcripcional de *eIF4E* y *eIF(iso)4E* en plantas silvestres Col-0 (WT) de 8 semanas de edad. No aclimatadas (NA) y aclimatadas (AC) durante 1 semana a 4°C. Se muestra el promedio de las veces de cambio de dos réplicas técnicas y las barras de error representan el error estándar. Se utilizó el transcrito de rRNA 18S como control normalizador. Este análisis se realizó para dos réplicas biológicas independientes, cada muestra por triplicado y se obtuvieron resultados similares.

Como nos indican estos resultados, durante la exposición a las bajas temperaturas, se produce un aumento de la expresión de estos factores de inicio de la traducción. Interesantemente, un análisis de los promotores de estos genes arrojó que contienen elementos de regulación en *cis* estimulados en diferentes condiciones de estrés (ver anexo 1). Hasta el momento, no se conoce cómo actúan los factores 4E durante la aclimatación a las bajas temperaturas. Sin embargo, datos obtenidos recientemente muestran que en nuestras condiciones de desarrollo (8 semanas, fotoperíodo de día corto) en presencia de aclimatación durante 1 semana a 4°C, se produce un aumento de los polisomas en comparación con plantas de la misma edad crecidas en condiciones normales a 22°C (ver anexo 2). Esto sugiere que la aclimatación induce un aumento de la actividad traduccional en las hojas de plantas adultas, la cual normalmente es baja en estos tejidos. Estudios previos realizados en trigo muestran que además del aumento en la síntesis de proteínas, cuando las plantas crecen a bajas temperaturas se produce el reclutamiento selectivo a las fracciones polisomales de transcritos asociados a la resistencia al estrés por frío (Perras and Sarhan 1990).

Como hemos mencionado anteriormente, el inicio de la traducción es el paso más regulado de este proceso y específicamente el factor eIF4E es uno de los principales blancos de los mecanismos de control, por lo tanto, el aumento de la expresión de ambas isoformas de este factor durante la aclimatación en *Arabidopsis thaliana* pudiera estar íntimamente relacionado con el aumento de la actividad traduccional observada. El estudio de la expresión de estos factores a nivel proteico (se propone analizar su distribución en perfiles polisomales de plantas aclimatadas) nos permitirá entender con mayor claridad su papel durante la aclimatación.

3.2.3 Análisis de la expresión de genes regulados preferencialmente por eIF(iso)4E.

Se analizaron los genes *TCF1* y *BCB* (*Blue Copper Binding Protein*). Recientemente se reportó que *TCF1* es una proteína de unión a cromatina que aumenta considerablemente su expresión en respuesta específicamente a estrés por frío. Se ha propuesto que actúa estimulando la expresión de *BCB*, proteína de membrana que está involucrada en la regulación de la síntesis de lignina (Ji et al. 2015). Las propiedades de la pared celular son importantes durante la aclimatación y el estrés por congelamiento, ya que esta regula la flexibilidad y la permeabilidad al agua de las células, de ahí la importancia del estudio de estos genes en estas condiciones.

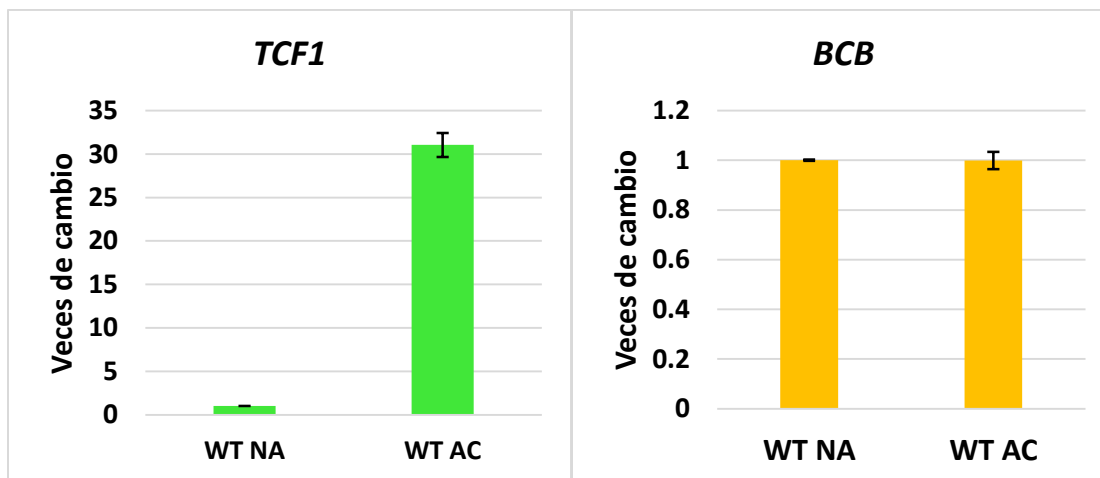


Figura 3.2.3 Expresión transcripcional de *TCF1* y *BCB* en plantas silvestres Col-0 (WT) de 8 semanas de edad. No aclimatadas (NA) y aclimatadas (AC) durante 1 semana a 4°C. Se muestra el promedio de las veces de cambio de dos réplicas técnicas, cada muestra por triplicado y las barras de error representan el error estándar. Se utilizó el transcrito de rRNA 18S como normalizador.

En correspondencia con reportes anteriores, se observó un considerable aumento de la expresión de *TCF1* en respuesta a la aclimatación (Figura 3.2.3). Sin embargo, no se observaron cambios en el transcrito *BCB*. Como se propone en el trabajo de Ji Wang, seguramente *TCF1* actúa regulando otros blancos involucrados en la respuesta a las bajas temperaturas.

3.2.4 Análisis de la expresión de genes regulados preferencialmente por eIF4E.

Dentro de los genes cuyos transcritos son reconocidos de manera preferencial por el factor eIF4E se encuentran los factores transcripcionales *DREB2F* y el factor de tipo MYB *HHO2* (Martinez-Silva et al. 2012). Como se ha mencionado, los miembros de la subfamilia *DREB* de factores de transcripción tienen un efecto protector en diferentes condiciones de estrés. En el caso específico de *DREB2F* no se conoce su función en la planta (Mizoi et al. 2012).

En nuestras condiciones, no se observaron variaciones notables de la expresión de *DREB2F* en las plantas aclimatadas (Figura 3.2.4). Ya que se ha demostrado que los genes *DREB* aumentan rápidamente su expresión transcripcional en respuesta a las bajas temperaturas, sería interesante determinar el comportamiento de este transcrito durante las primeras horas de exposición de la planta a 4°C. Por otro lado, es importante analizar su expresión a nivel proteico ya que se ha descrito que los factores *DREB* del grupo 2 poseen una compleja regulación donde interviene el

splicing alternativo y modificaciones postraduccionales relacionadas con la estabilidad de estas proteínas (Guerra et al. 2015).

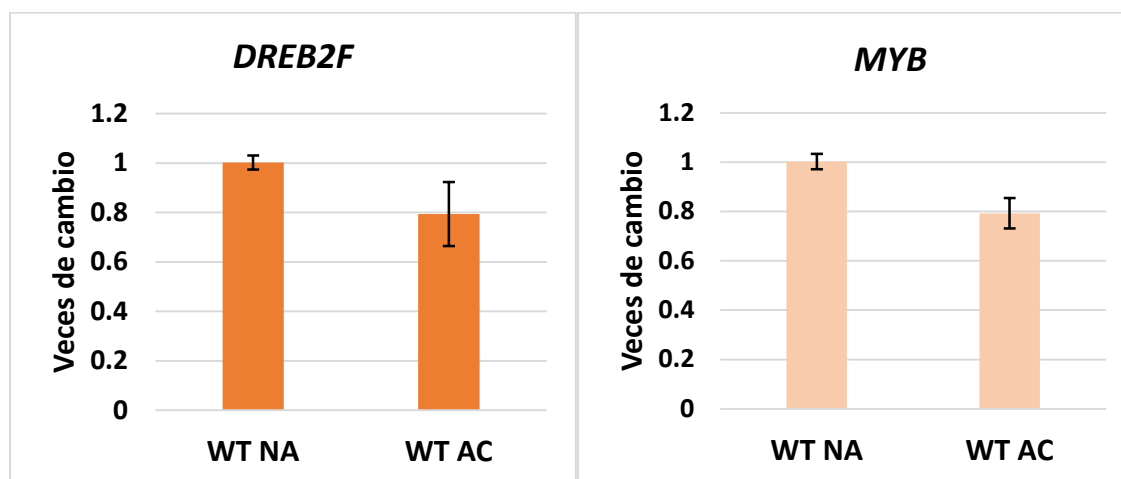


Figura 3.2.4 Expresión transcripcional de *DREB2F* y *MYB* (At1g68670) en plantas silvestres Col-0 (WT) de 8 semanas de edad. No aclimatadas (NA) y aclimatadas (AC) durante 1 semana a 4°C. Se muestra el promedio de las veces de cambio de dos réplicas técnicas y las barras de error representan el error estándar. Se utilizó el transcrito 18S como control constitutivo.

En el caso del factor MYB en estudio, tampoco se observaron cambios en su expresión en las plantas aclimatadas al tiempo de aclimatación analizado. Recientemente se describió que este factor está involucrado en la formación de raíces laterales y que su expresión es estimulada en condiciones de deficiencia de fosfato (Nagarajan et al. 2016) por lo que es posible que juegue un papel importante en otros tipos de estrés, específicamente en el tejido radicular. En nuestro resultado seguramente influyó el tiempo de estudio analizado ya que se conoce que diversos genes de respuesta a bajas temperaturas, como *DREB1A* y *RD22* contienen secuencias de unión a factores MYB en sus promotores, por lo que estos actuarían río arriba en la cascada inducida por la aclimatación.

4. Discusión

Las plantas presentan complejos mecanismos adaptativos que les permiten enfrentarse exitosamente a diferentes condiciones de estrés presentes en su entorno. Estos mecanismos ocurren a nivel transcripcional, postranscripcional, así como durante la síntesis de proteínas, y conllevan a importantes cambios fisiológicos que incluyen respuestas hormonales, control del crecimiento, la reproducción, etc. (Thomashow 1999, Guerra et al. 2015). La regulación de la traducción es una parte esencial de la respuesta al estrés abiótico, en varias condiciones de estrés se produce la inhibición general de la síntesis de proteínas. Se ha planteado que, dado el elevado costo energético de este proceso, el objetivo de esta regulación es optimizar el uso de energía en la planta. Sin embargo, a pesar de la disminución en la traducción general, durante el estrés se potencia la expresión de proteínas importantes para contrarrestar sus efectos (Branco et al. 2005, Yanguéz et al. 2013). Poco se conoce sobre cómo ocurre esta regulación y cómo se logra la selectividad traduccional observada. En determinados casos se produce la fosforilación del factor eIF2 α la cual impide la formación del complejo ternario de inicio de la traducción (Lageix et al. 2008). Al contrario de lo que sucede en los mamíferos, donde se ha observado que el estrés conlleva al secuestro del factor eIF4E por las proteínas 4EBPs, en las plantas no se sabe cómo se regula la actividad de este factor durante el estrés abiótico. Adicionalmente, la presencia del factor eIF(iso)4E específico de plantas plantea la interrogante de si este también pudiera actuar durante la respuesta al estrés.

En este trabajo, utilizando líneas de plantas que expresan de manera constitutiva a los factores de inicio de la traducción eIF4E o eIF(iso)4E, encontramos que ambos tienen una función protectora durante el estrés por congelamiento en plantas adultas (ver anexo 3). Se pudo comprobar con mayor reproducibilidad el efecto protector del factor eIF4E en las plantas no aclimatadas sometidas a este tipo de estrés. Para próximos estudios, sugerimos analizar plantas mutantes que no expresen a eIF4E, de las cuales esperaríamos obtener fenotipos de mayor daño ocasionado por el estrés en comparación con las plantas silvestres, si las funciones de este factor no pudieran ser suplidas por eIF(iso)4E. Este último también parece tener un papel importante en la respuesta al estrés por congelamiento, ya que las plantas mutantes *AteIF(iso)4E-1*, que solamente expresan el factor eIF4E en niveles elevados, mostraron una mayor sensibilidad mientras que las que expresan a eIF(iso)4E de manera constitutiva tuvieron una mayor resistencia a este tipo de estrés. En contraste, las plantas aclimatadas durante una semana a 4°C mostraron una notable resistencia y

capacidad de sobrevivencia al estrés por congelamiento, independientemente de su genotipo. Sería interesante observar la respuesta a nivel fenotípico de plantas de las diferentes líneas durante varios tiempos de aclimatación de manera que se pueda analizar si la función de los factores 4E depende del tiempo de respuesta a las bajas temperaturas.

El mecanismo mediante el cual estos factores protegen a las plantas en condiciones de estrés por congelamiento es una pregunta esencial en las perspectivas de este estudio. El fenotipo de resistencia a las temperaturas congelantes asociado a su expresión constitutiva podría deberse a que, como en el caso de la sobreexpresión de otros genes cuya función en la respuesta a estrés ha sido caracterizada (Vannini et al. 2004, Dai et al. 2007, Oakenfull et al. 2013) en estas plantas se produce una mayor expresión de genes que les confieren protección ante este tipo de estrés, aún en condiciones normales de crecimiento.

De acuerdo a nuestros antecedentes (Tabla 1.1) entre los genes favorecidos en su expresión por el factor eIF4E podrían encontrarse factores transcripcionales de las familias DREB y MYB que a su vez estimulan la expresión de genes que actúan en el mantenimiento del equilibrio osmótico, la estabilización de las membranas de compartimentos subcelulares y promoviendo mecanismos antioxidantes. Por otra parte, entre los genes estimulados a nivel traduccional por eIF(iso)4E se encuentran genes importantes en la regulación de la permeabilidad y flexibilidad de las células como TCF1 y At1g21630 (perteneciente a la familia *Calcium-binding EF hand proteins*) que están relacionados con la síntesis de la pared celular (Zhou et al. 2010, Ji et al. 2015). Estos son solo algunos ejemplos de genes potencialmente importantes en la respuesta al estrés mediada por los factores, sin embargo otros también podrían ser relevantes en estas condiciones. Un análisis cuantitativo global de la expresión inducida por las bajas temperaturas en estas líneas de sobreexpresión y mutante comparándolas con las plantas silvestres podría arrojar datos interesantes acerca de los genes importantes en la respuesta a frío mediada por los factores 4E de inicio de la traducción en *Arabidopsis*.

Además de estos mecanismos específicos, dado que los factores de la familia eIF4E son los encargados del reconocimiento de la estructura 5'CAP en el mRNA y el reclutamiento del resto de la maquinaria de traducción a través de su interacción con el factor eIF4G, estos podrían estar relacionados con la selección traduccional que se ha observado durante el estrés. Se conoce que el factor eIF4E de maíz es fosforilado en condiciones de estrés (Manjunath et al. 1999) aunque no se

ha determinado si esta modificación postraduccional pudiera influir en su función o especificidad en estas condiciones. También se ha encontrado a eIF4E en acúmulos citoplasmáticos denominados gránulos de estrés donde podría participar en la estabilización de transcritos que no están siendo traducidos (Weber et al. 2008) y su papel en estas estructuras podría ser fundamental en el enfrentamiento al estrés.

Interesantemente, los estudios realizados hasta el momento apuntan a que en condiciones normales de desarrollo los factores 4E pueden ejercer funciones parcialmente redundantes, ya que la mutación del factor eIF(iso)4E no parece ocasionar defectos en el desarrollo de *Arabidopsis thaliana* (Duprat et al. 2002). Sin embargo, de acuerdo a nuestros resultados, durante la respuesta de plantas adultas a las temperaturas congelantes, estos factores no parecen actuar de manera redundante. Las plantas que no expresan al factor eIF(iso)4E son más sensibles a este tipo de estrés aún cuando expresan normalmente al factor eIF4E. Resulta interesante que las plantas mutantes del factor eIF(iso)4E aclimatadas que fueron sometidas a estrés por congelamiento mostraron buena resistencia al igual que el resto de los genotipos estudiados. Una explicación posible para este comportamiento es que durante la aclimatación, además del incremento en la expresión de los factores eIF4E, actúan otros mecanismos de regulación que propician la expresión de los genes esenciales para contender con temperaturas más bajas y que no se encuentran operando cuando la planta crece en condiciones óptimas.

Por otra parte, dado que la expresión de estos factores en plantas aclimatadas se encuentra aumentada, hipotetizamos que su función podría estar relacionada con el aumento de la actividad traduccional durante la aclimatación (ver anexo 2). Además de esto, como hemos mencionado anteriormente, las isoformas eIF4E y eIF(iso)4E de *Arabidopsis thaliana* presentan selectividad en el reconocimiento de transcritos de respuesta al estrés (Martinez-Silva et al. 2012). Por lo tanto, variaciones en la expresión y actividad relativas de estos factores durante la aclimatación podrían conducir a la expresión diferencial de proteínas importantes en estas condiciones. Para abordar este aspecto, planteamos estudiar la distribución en polisomas de transcritos que pudieran ser relevantes en la respuesta al estrés, comparando las líneas de sobreexpresión con respecto a las plantas silvestres.

En este trabajo se analizó la expresión de estos transcritos cuando las plantas son sometidas a un período de aclimatación (apartados 3.2.3 y 3.2.4). Por una parte, encontramos que la aclimatación

induce un considerable aumento en la expresión del gen *TCF1*. Existe un solo estudio sobre la función de *TCF1* durante la respuesta a las bajas temperaturas, en el cual se analizaron plántulas de *Arabidopsis* del ecotipo Col-0 y se demostró que en condiciones de aclimatación *TCF1* induce la expresión del gen *BCB*, posiblemente a través de su activación a nivel epigenético. En nuestro estudio, analizando plantas adultas de 8 semanas de edad, obtuvimos el mismo comportamiento en cuanto a la expresión de *TCF1*, sin embargo, no se observaron cambios en el transcrito *BCB*, por lo tanto, planteamos que en estas condiciones *TCF1* actúa a través de otros blancos aún por identificar. Por otro lado, observamos que a los siete días a 4°C no existen cambios a nivel del transcrito de los factores transcripcionales *HHO2* y *DREB2F*. Sin embargo, tampoco se encontraron cambios en el transcrito del factor transcripcional *DREB1A* utilizado como control positivo, mientras que sí se observó la inducción de su blanco *COR15A*. Por lo tanto, hipotetizamos que, dado que nuestros candidatos son factores transcripcionales que podrían estar involucrados en la estimulación de la expresión de genes efectores durante la aclimatación como los genes *COR*, su estimulación a nivel de transcrito se produce en etapas tempranas durante este proceso (ver figura 1.1). Sería interesante determinar la expresión de nuestros candidatos desde las primeras horas de exposición a las bajas temperaturas. Además, es importante tener en cuenta que al tiempo estudiado estos genes podrían ser regulados a través de otros mecanismos de control postranscripcional, lo cual podría abordarse analizando su distribución en polisomas como se ha propuesto para los factores 4E de inicio de la traducción.

5. Conclusiones

- Los factores de inicio de la traducción eIF4E y eIF(iso)4E tienen un papel protector en la respuesta al estrés por congelamiento en *Arabidopsis thaliana*.
- La expresión constitutiva de los factores eIF4E y eIF(iso)4E le confiere a las plantas de *Arabidopsis thaliana* una mayor resistencia a las temperaturas congelantes, mientras que las plantas que no expresan al factor eIF(iso)4E presentan una mayor sensibilidad a este tipo de estrés. Por lo tanto, en condiciones naturales, estos factores podrían estar relacionados con mecanismos de resistencia a este tipo de estrés, que deberán ser dilucidados en el futuro.
- La exposición a bajas temperaturas estimula la expresión de ambos factores de inicio de la traducción, lo cual podría estar relacionado con el aumento de los polirribosomas observado en nuestras condiciones y también con otras funciones de estos factores relacionadas con el metabolismo de transcritos importantes en la respuesta a bajas temperaturas que deben ser estudiadas posteriormente.
- La exposición a bajas temperaturas de plantas adultas de *Arabidopsis thaliana* estimula notablemente la expresión del remodelador de cromatina TCF1, lo cual indica que este tiene una función importante en este proceso. Interesantemente, en las condiciones ensayadas, este no parece actuar a través de la regulación de la expresión de BCB para la cual no se encontraron cambios.
- Los factores transcripcionales HHO2 (factor de tipo MYB) y DREB2F mostraron poco cambio en su expresión transcripcional a los siete días de exposición a las bajas temperaturas lo cual puede deberse a que su expresión se estimule de manera temprana en la cascada de eventos desencadenada por las bajas temperaturas.

6. Perspectivas

- Analizar la expresión a nivel de proteína de los factores 4E de inicio de la traducción de *Arabidopsis thaliana* en plantas sometidas a bajas temperaturas comparándola con plantas de la misma edad crecidas en condiciones normales.
- Determinar la expresión de los genes regulados de manera diferencial por los factores eIF4E y eIF(iso)4E en las diferentes líneas de plantas en estudio mediante el uso de perfiles polisomales y RT-qPCR.
- Determinar la expresión de genes regulados de manera diferencial por los factores eIF4E y eIF(iso)4E a tiempos más cortos de exposición a las bajas temperaturas.

Anexo 1 Análisis de los promotores de los factores de inicio de la traducción eIF4E y eIF(iso)4E de *Arabidopsis thaliana*.

Se analizaron las secuencias promotoras de los factores 4E de inicio de la traducción (1500 nt *upstream* del sitio de inicio de la transcripción) y se localizaron los elementos de respuesta a estrés presentes en la cadena codificante correspondiente (Tabla A.1, Figura A1.1 y Figura A1.2).

Tabla A.1 Elementos de respuesta a estrés en los promotores de los factores 4E de inicio de la traducción de *Arabidopsis thaliana*.

Elemento regulatorio	Promotor	Posición	Secuencia	Función
ABRE	eIF4E	-685	GCCACGTACA	Elemento de respuesta a ácido abscísico
ARE	eIF4E	-646, -394	TGGTTT	Elemento de respuesta a hipoxia
ARE	eIF(iso)4E	-1470, -336	TGGTTT	Elemento de respuesta a hipoxia
Motivo CGTCA	eIF4E	-292	CGTCA	Elemento de respuesta a metil jasmonato
HSE	eIF4E	-606	AAAAAATTTTC	Elemento de respuesta a choque térmico
MYB	eIF4E	-519 -776	TAACTG CAACTG	Sitio de unión a factores MYB, relacionado con la inducción en respuesta a estrés por sequía
ERE	eIF(iso)4E	-538	ATTTCAAA	Elemento de respuesta a etileno
TCA	eIF4E	-185	GAGAAGAATA	Elemento de respuesta a ácido salicílico

Figura A1.1 Elementos de actuación en *cis* de respuesta a estrés en el promotor de eIF4E de *Arabidopsis thaliana*.

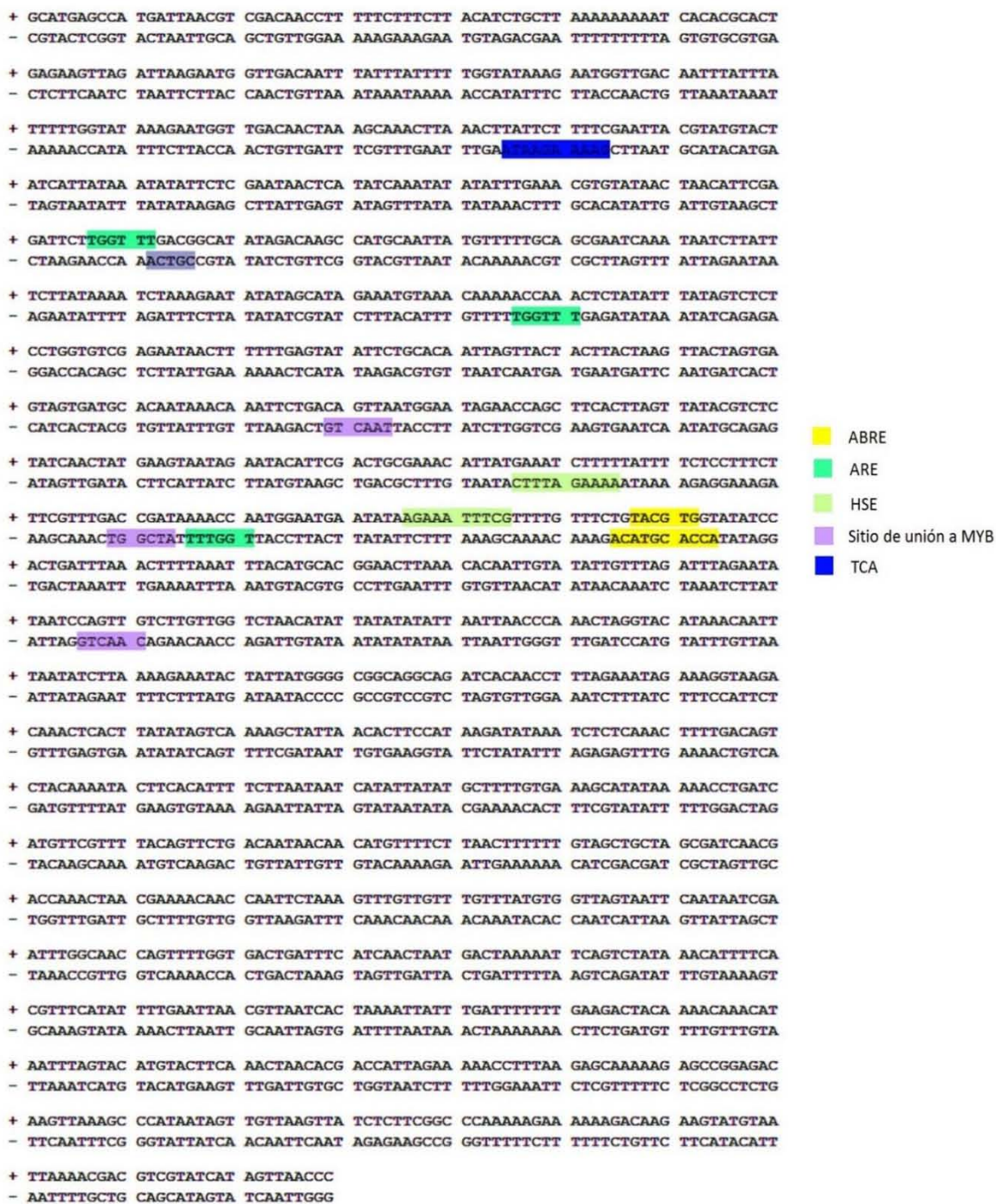


Figura A1.2 Elementos de actuación en *cis* de respuesta a estrés en el promotor de eIF(iso)4E de *Arabidopsis thaliana*.

```

+ ACCACAAAGT CTAAAAATGA TTTCTAAAGA TTTTAAACCT TCAAAACTAA ATCCTAAACC CTAAAAATTA
- TGGTGTTC A GATTTTTACT AAAGATTCT AAAATTTGGA AGTTTTGATT TAGGATTTGG GATTTTTAAAT

+ AACACAAAT ATTAATGCA GACCCAAAGT TTAATATA GGTGAATTTT AGTTTTGTGG GATTTTCAAA
- TTGTGTTTA TAATTTACGT CTGGGTTTCA AATTTAATAT CCACTTAAA TCAAAACACC CTAAAAAGTT

+ AAAAGTATCT TTTACTGGTA CTGTTACGAA AAAAAGTAT GGTGTTACTT TTGGAACAAA AAACCTATCT
- TTTTCATAGA AAATGACCAT GACAATGCTT TTTTGACTA CCACAATGAA AACCTGTGTT TTTGAATAGA

+ TAGTGGTATT TTTGAGAATT GTCTATTATT ATATCTTATT ATATAAAGTA TGGTTTCGA TTTTAGATTT
- ATCACCATAA AAACCTTAA CAGATAATAA TATAGAATAA TATATTTTAT ACCAAAAGCT AAATCTAAA

+ TGACACATGT AATCTTATTA TCAATTTTAT TAAATGAGTA AAAATATAAA TATAAAAACC AAAGTAAAAT
- ACTGIGTACA TTAGAATAAT AGTTAAAATA ATTTACTCAT TTTTATATTT ATATTTTGG TTTTCAATTTTA

+ ATTAATATAT CTTATATAAA ACAATTTTAA AAAATGAAA GAAGATAAAT ATTAGAAAAT TATATGTATC
- TAATATATA GAATATATTT TGTTAAAATT TTTTAACTTT CTCTATTTA TAATCTTTA ATATACATAG

+ TTATCAAACA AAGATAGAAA ATATAAGATT ACATATTATT TTAAGAAAAT AAAATGTAA AGAAGATAAT
- AATAGTTTGT TTCTATCTTT TATATTCTAA TGTATAATAA AATTTCTTTA TTTTACATT TCTCTATTA

+ TATATGTATC TTAAGTAAAG AAATTATAAA TCAATTTACTA ATTCTAATTT GAAATTTACTA ATTCTAAAAG
- ATATACATAG AATGACTTTC TTTAATATTT AGTTAATGAT TAAGATTTAA CTTTATGAT TAAGATTTTC

+ AAAATGATT ACCGCTTCC TAAAAATTTT AAAAAGGATT TAAGGAAACG ATCTTATTAT ATTAATATA
- TTTTAACTAA TGGCAGAAGG ATTTTAAAAA TTTTCTTAA ATTCCTTGC TAGAATAATA TAATTTATAT

+ ATACATAAAG GAATTTTACA ATTAATTATA ATCTTAGAAG GAAAAGATT TCAATTTACTC ACCTCTATAT
- TATGATTTTC CTTAAAATGT TAATTAATAT TAGAATCTTC CTTTTTCTAA AGTTTATGAG TGGAGATATA

+ AATTAGTAGC CGGATTTTAT GCGGTAACG ATACAGAATG TACAGTTTTT GCCACTTCTT CTCGCTTAA
- TTAATCATCG GCCTAAAATA CGCCATTGAC TATGCTTTAC ATGCAAAAAA CGGTGAAGAA GAGCAGAATT

+ GAGAGAACGA CGGCGATCAA ACAACGTCG CCGAAGTTTA GGGCGGAGT GAGAGTATAT GAGTTTATCA
- CTCTCTTGT GCGCTAGTT TGTGTCAGC GGCTTCAAAT CCGCCGCTCA CTCTCATATA CTCAAATAGT

+ AGCAGAGATT TGTAAGTTTT CTTGTTTTG GGGGAAAAG ATTAGGAATT ATAATAACTT TATTTTTTTA
- TCGTCTCTAA ACATTTAAA GAACAAAAC CCCCTTTTTC TAATCTTAA TATTATTGAA ATAAAAAAT

+ ATTTATATTT GGAACATAAA TATAAAAATC TTATTTACAT TTTTAAACT ATTTGTTTC TTTAATTTAT
- TAAATATAAA CCTTGATATT ATATTTTATG AATAAATGTA AAAATTTTGA TAAAACAAAG AAATTAATA

+ CTTATTTTAT ATTAAAAATT TTAATTTTAA TAATAAAT ACATGTACCA AAATCTAAGA TCTACAAAAA
- GAATAAATA TAATTTTAA AATTTTAAAT ATTATTTTAA TGTACATGTT TTTAGATTTCT AGATGTTTTT

+ TAACACATGT AACAGTCATA TGAATTTACTA AATTTAAAAA TCATGCTTTA TATAATAAAA TATCTTTTAT
- ATTTGTGACA TTGTAGTAT ACTTAATGAT TTAATTTT AGTACGAAAT ATATTTTAT ATAGAAAATA

+ TACTCTAGAA CCTCTAATGT AAACAATATT TTCTAATTTG ATACTACTAA TTAAGATTTT GCATTGACAA
- ATGAGATCTT GGAGATTACA TTTGTTATAA AAGATTAAAC TATGATGATT AATTTCTAAA CGTAACGTT

+ TATGAAAGAA ATTCCGCTAT TTGGAATTA GATCTCATA CTTGGTGTAT TTTTTTTTAT TTTTTTTTAA
- ATACTTTCTT TAAGGCGATA AACCTTTAAT CTAGAGTATG GAACCACATA AAAAAAATA AAAAAAAT

+ ACAACACCTT GTTGTAAAAA AAAATACTTT AAACCTTGT CTATTGGGAT TCCACTTGCA ATTAATTTT
- TGTGTTGAA CRAATTTTT TTTTATGAAA TTTGGGAACA GATAACCCTA AGGTGAACGT TAATTAAC

+ GAGATTTTAA TTTTACTTG TTTTAAAT ACCAAAAGAC AATAGAAAAA GAAAAAGAA GAAAAGAAGA
- CTCTAAAAAT AAAAAAGAAC AAAAAATTTA TGGTTTTCTG TTATCTTTT CTTTTTCTT CTTTTTCTT

+ GTTAAATGCT CTGATGGACC GGCCAAAAT TGACCAATA GAGTCCAGAA ATAGCCCTTT TCACTTCTTA
- CAATTTACGA GACTACCTGG CCGGTTTTA ACTGGGTTAT CTCAGTCTT TATCGGAAA AGTGAAGAA

+ AACCATTCCA AAATACATCT CAAAAACA
- TTGGTAAGGT TTTATGTAGA GTTTTTGTT

```

 ARE
 ERE

Anexo 2 Perfiles polisomales de plantas de *Arabidopsis thaliana* aclimatadas comparándolas con las no aclimatadas.

Se obtuvieron perfiles polisomales de todas las líneas de plantas en estudio de acuerdo al protocolo señalado en los materiales y métodos, se analizaron los perfiles correspondientes a plantas aclimatadas durante una semana comparándolos con los de plantas no aclimatadas (Figura A2.1).

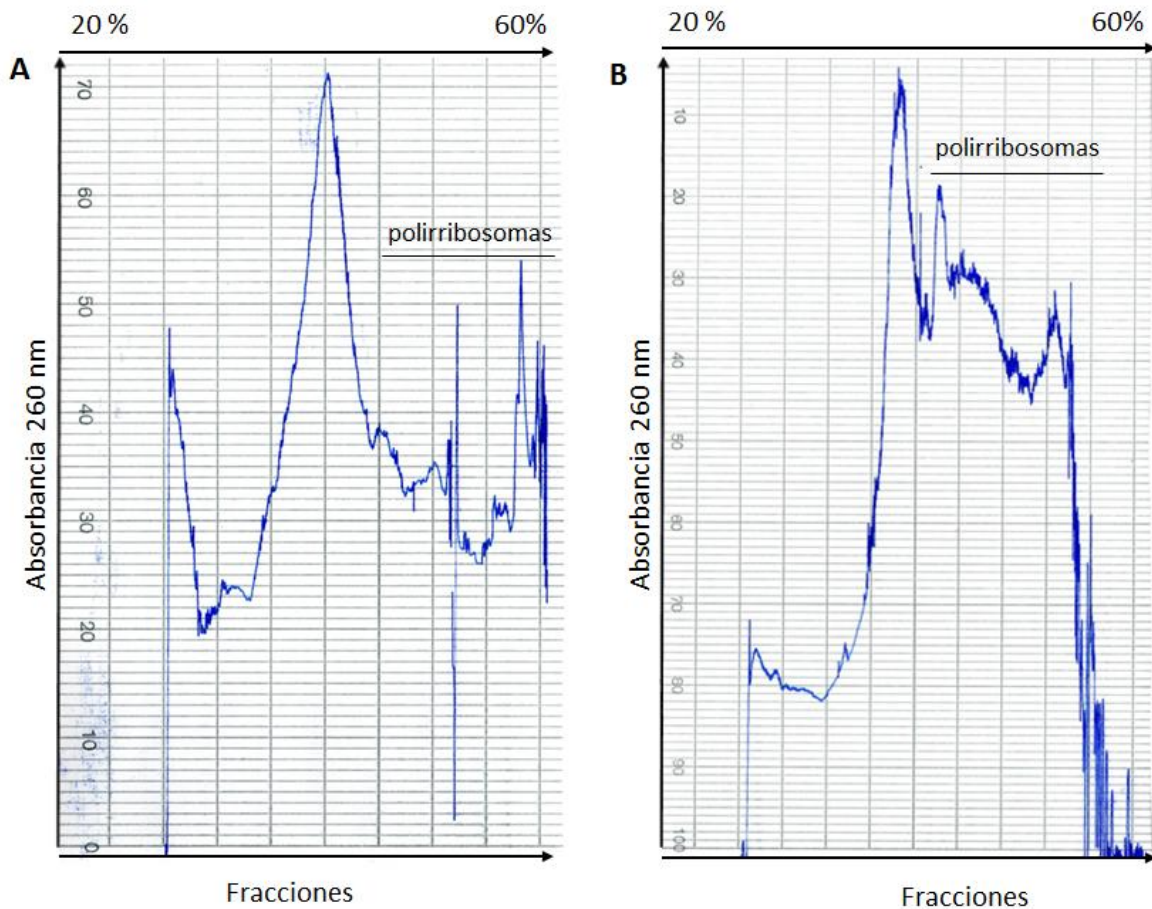
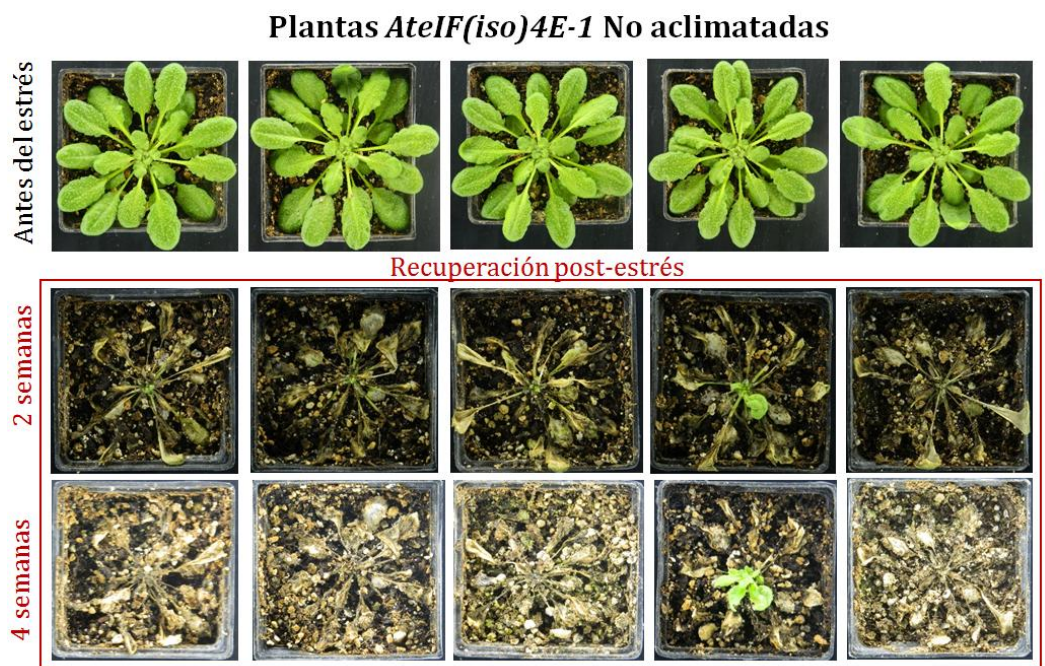
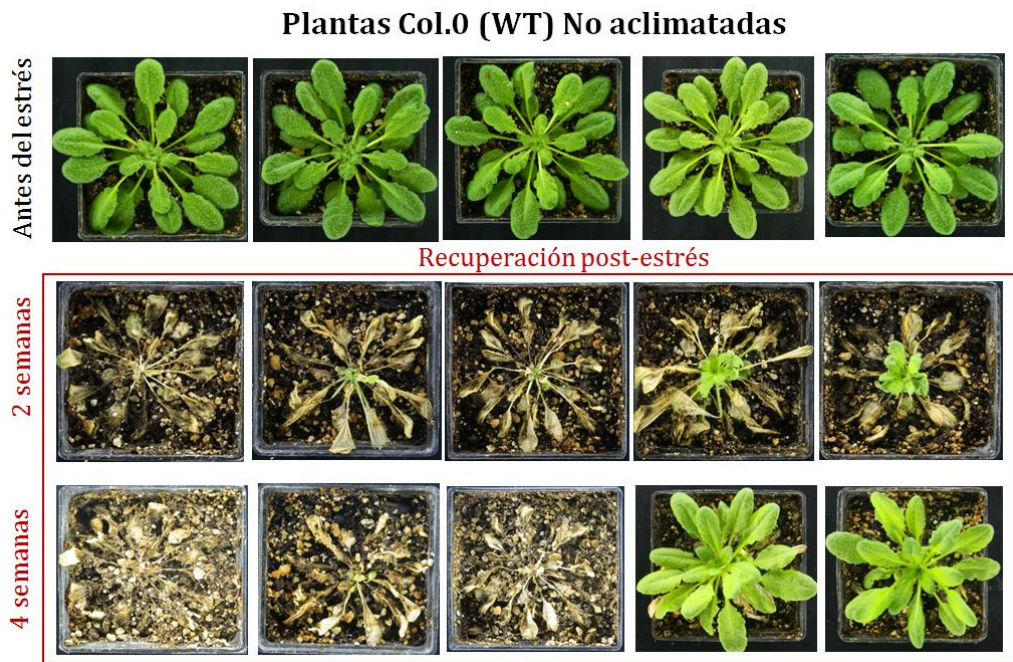


Figura A2.1 Perfiles polisomales de hoja de *Arabidopsis thaliana* A: plantas no aclimatadas, B: plantas aclimatadas durante una semana a 4°C. Se señalan las fracciones que se corresponden con los polirribosomas. Los extractos de cada una de las líneas de plantas en estudio fueron aplicados a un gradiente de 20% - 60% de sacarosa y se colectaron de 10-11 fracciones de 500µL. La figura corresponde a perfiles representativos obtenidos a partir de la línea 35S:AteIF4E. (Se realizaron dos réplicas biológicas para las plantas silvestres y una réplica biológica para las restantes líneas de plantas observándose resultados similares independientemente de la línea).

Anexo 3 Fenotipos de las plantas sometidas a estrés por congelamiento (1h -20 °C) antes del estrés y después del período de recuperación.

Se muestran los fenotipos de plantas aclimatadas y no aclimatadas de todas las líneas en estudio réplica biológica 1 y réplica biológica 2.

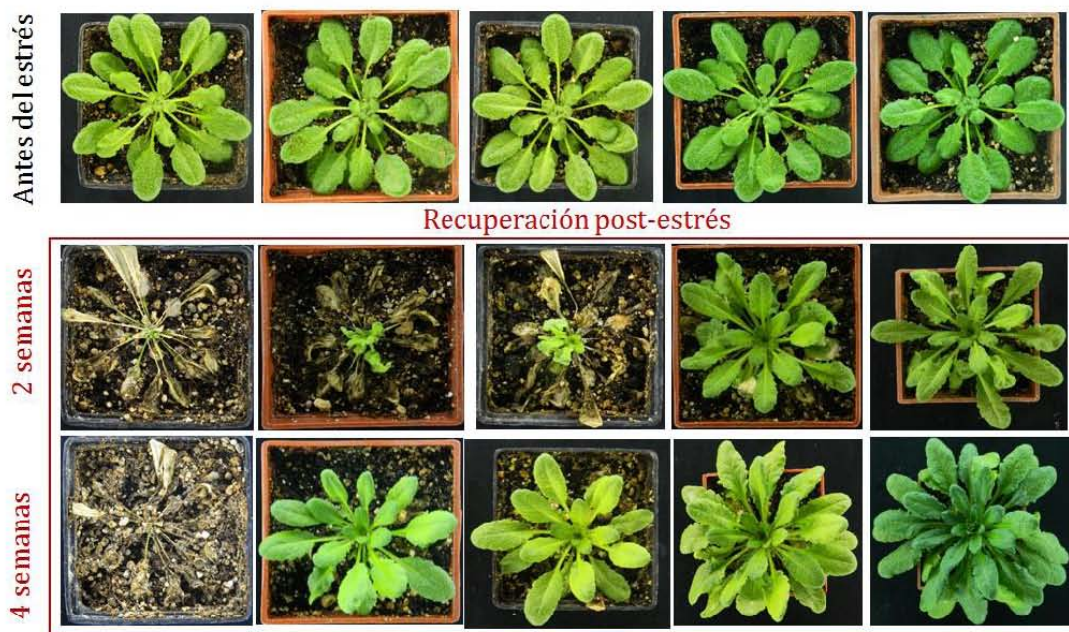
Réplica 1 plantas no aclimatadas



Plantas 35S:AteIF(iso)4E No aclimatadas

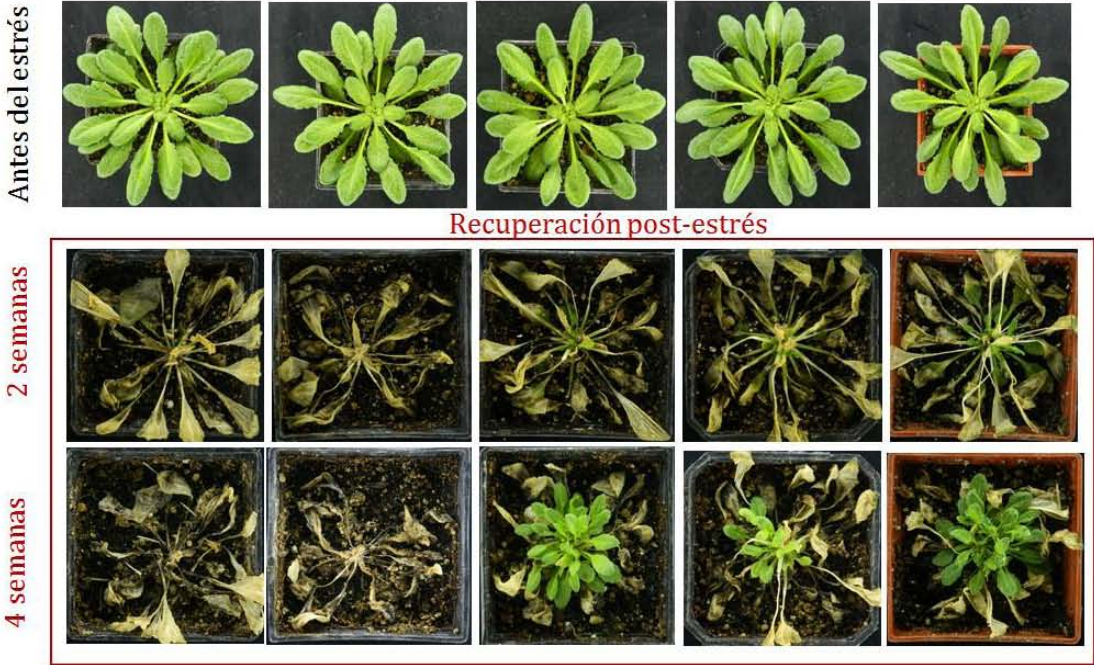


Plantas 35S:AteIF4E No aclimatadas



Réplica 2 plantas no aclimatadas

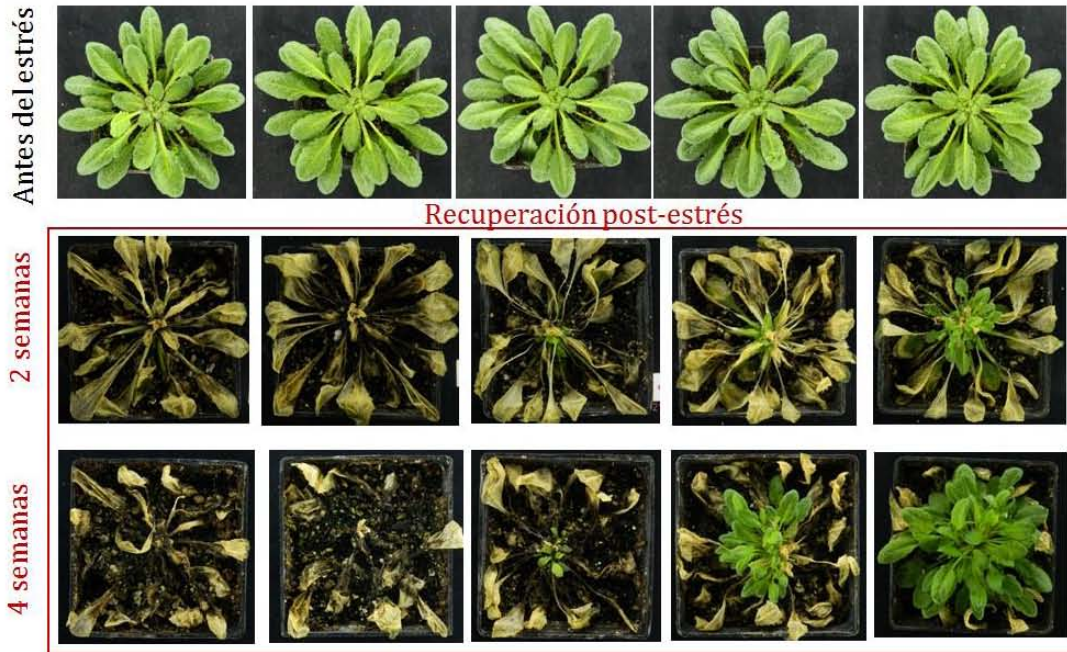
Plantas Col.0 (WT) No aclimatadas



Plantas *AteIF(iso)4E-1* No aclimatadas



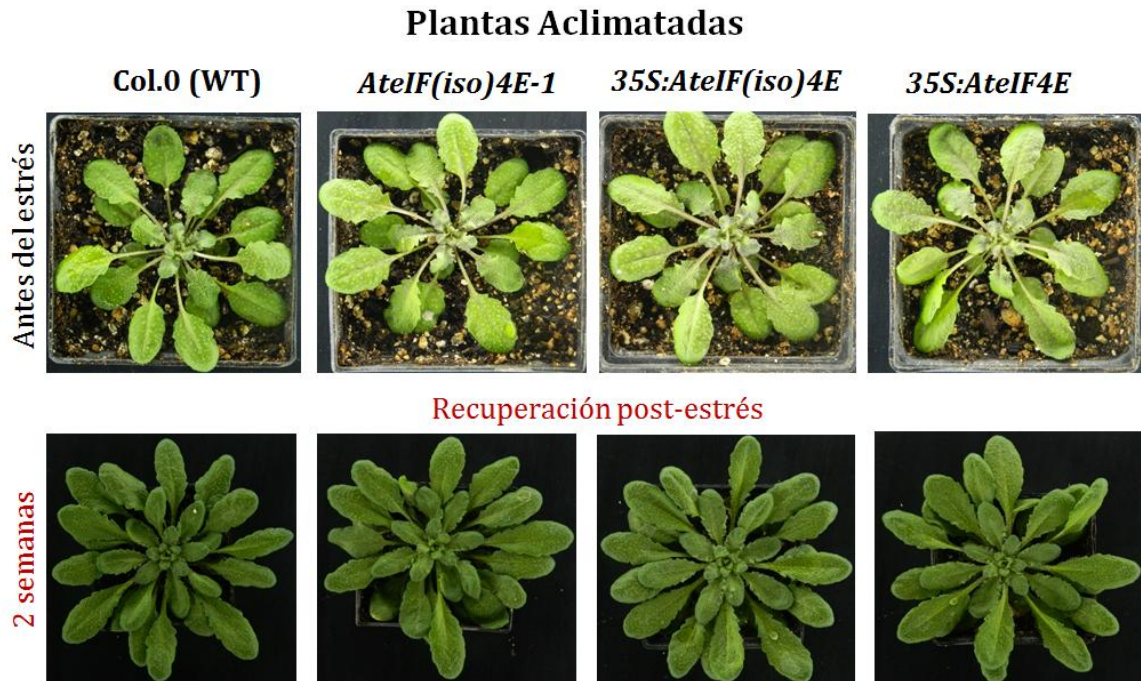
Plantas 35S:*AteIF(iso)4E* No aclimatadas



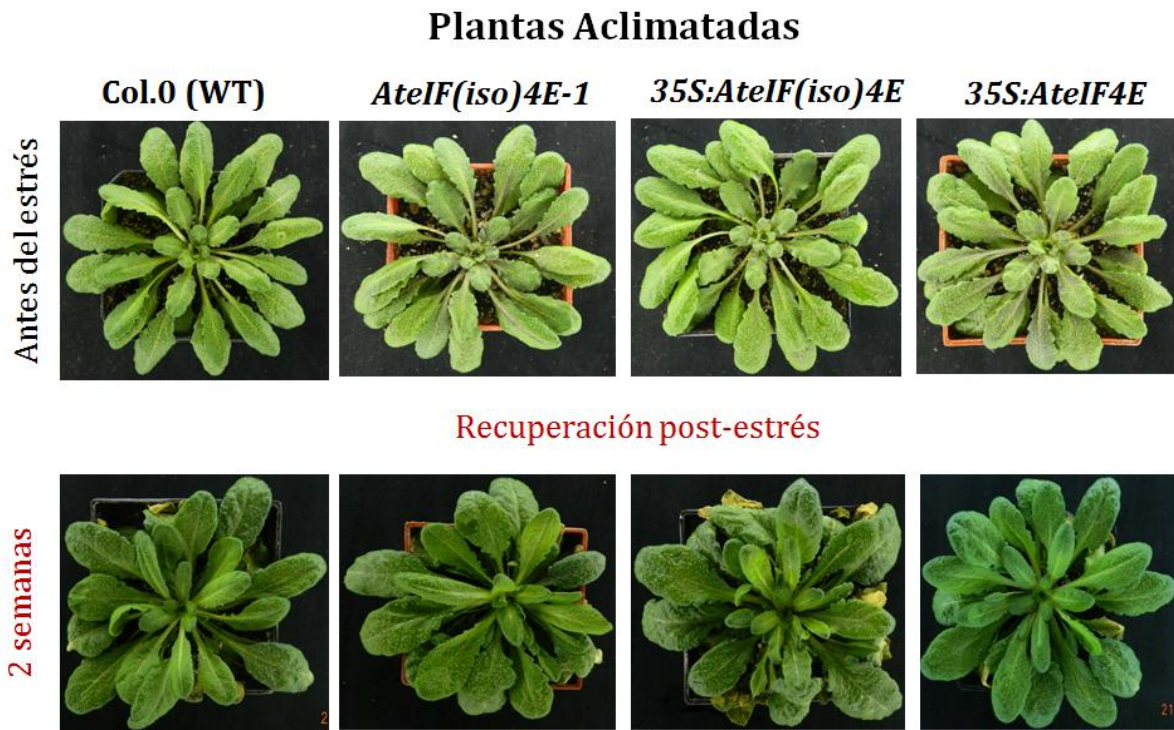
Plantas 35S:*AteIF4E* No aclimatadas



Réplica 1 plantas aclimatadas



Réplica 2 plantas aclimatadas



Referencias Bibliográficas

- Branco, C., R. Kawaguchi, R. B. Ferreira and J. Bailey-Serres (2005). "Genome-wide analysis of transcript abundance and translation in *Arabidopsis* seedlings subjected to oxygen deprivation." Ann Bot **96**: 647-60.
- Bush, M. S., A. P. Hutchins, A. M. Jones, M. J. Naldrett, A. Jarmolowski, C. W. Lloyd and J. H. Doonan (2009). "Selective recruitment of proteins to 5' cap complexes during the growth cycle in *Arabidopsis*." Plant J **59**: 400-12.
- Carberry, S. E., E. Darzynkiewicz and D. J. Goss (1991). "A comparison of the binding of methylated cap analogues to wheat germ protein synthesis initiation factors 4F and (iso)4F." Biochemistry **30**: 1624-7.
- Carberry, S. E. and D. J. Goss (1991). "Wheat germ initiation factors 4F and (iso)4F interact differently with oligoribonucleotide analogues of rabbit alpha-globin mRNA." Biochemistry **30**: 4542-5.
- Cramer, G. R., K. Urano, S. Delrot, M. Pezzotti and K. Shinozaki (2011). "Effects of abiotic stress on plants: a systems biology perspective." BMC Plant Biol **11**: 163.
- Chinnusamy, V., J. K. Zhu and R. Sunkar (2010). "Gene regulation during cold stress acclimation in plants." Methods Mol Biol **639**: 39-55.
- Dai, X., Y. Xu, Q. Ma, W. Xu, T. Wang, Y. Xue and K. Chong (2007). "Overexpression of an R1R2R3 MYB gene, OsMYB3R-2, increases tolerance to freezing, drought, and salt stress in transgenic *Arabidopsis*." Plant Physiol **143**: 1739-51.
- Dinkova, T. D., N. A. Márquez-Velázquez, R. Aguilar, Lázaro-Mixteco, P.E., and E. Sánchez de Jiménez (2011). "Tight translational control by the initiation factors eIF4E and eIF(iso)4E is required for maize seed germination." Seed Sci. Res. **21**: 85-93.
- Dinkova, T. D., L. Martinez-Castilla and M. A. Cruz-Espindola (2016). "The diversification of eIF4E family members in plants and their role in the plant-virus interaction. ." Springer International Publishing: 187-205.
- Duprat, A., C. Caranta, F. Revers, B. Menand, K. S. Browning and C. Robaglia (2002). "The *Arabidopsis* eukaryotic initiation factor (iso)4E is dispensable for plant growth but required for susceptibility to potyviruses." Plant J **32**: 927-34.
- Fischer, P. M. (2009). "Cap in hand: targeting eIF4E." Cell Cycle **8**: 2535-41.
- Guerra, D., C. Crosatti, H. H. Khoshro, A. M. Mastrangelo, E. Mica and E. Mazzucotelli (2015). "Post-transcriptional and post-translational regulations of drought and heat response in plants: a spider's web of mechanisms." Front Plant Sci **6**: 1-14.
- Ji, H., Y. Wang, C. Cloix, K. Li, G. I. Jenkins, S. Wang, Z. Shang, Y. Shi, S. Yang and X. Li (2015). "The *Arabidopsis* RCC1 family protein TCF1 regulates freezing tolerance and cold acclimation through modulating lignin biosynthesis." PLoS Genet **11**: e1005471.
- Joshi, B., K. Lee, D. L. Maeder and R. Jagus (2005). "Phylogenetic analysis of eIF4E-family members." BMC Evol Biol **5**: 48.

- Kim, H.-J., Y. Hyun, J.-Y. Park, M.-J. Park, M.-K. Park, M. D. Kim, H.-J. Kim, M. H. Lee, J. Moon, I. Lee and J. Kim (2004). "A genetic link between cold responses and flowering time through FVE in *Arabidopsis thaliana*." Nat Genet **36**: 167-71.
- Kim, J. C., S. H. Lee, Y. H. Cheong, C. M. Yoo, S. I. Lee, H. J. Chun, D. J. Yun, J. C. Hong, S. Y. Lee, C. O. Lim and M. J. Cho (2001). "A novel cold-inducible zinc finger protein from soybean, SCOF-1, enhances cold tolerance in transgenic plants." Plant J **25**: 247-59.
- Kim, M. H., Y. Sonoda, K. Sasaki, H. Kaminaka and R. Imai (2013). "Interactome analysis reveals versatile functions of *Arabidopsis* cold shock domain protein 3 in RNA processing within the nucleus and cytoplasm." Cell Stress Chaperones **18**: 517-25.
- Kropiwnicka, A., K. Kuchta, M. Lukaszewicz, J. Kowalska, J. Jemielity, K. Ginalski, E. Darzynkiewicz and J. Zuberek (2015). "Five eIF4E isoforms from *Arabidopsis thaliana* are characterized by distinct features of cap analogs binding." Biochem Biophys Res Commun **456**: 47-52.
- Lageix, S., E. Lanet, M. N. Pouch-Pelissier, M. C. Espagnol, C. Robaglia, J. M. Deragon and T. Pelissier (2008). "*Arabidopsis* eIF2alpha kinase GCN2 is essential for growth in stress conditions and is activated by wounding." BMC Plant Biol **8**: 134.
- Lee, A., R. Tam, P. Belhumeur, T. DiPaolo and M. W. Clark (1993). "Prp20, the *Saccharomyces cerevisiae* homolog of the regulator of chromosome condensation, RCC1, interacts with double-stranded DNA through a multi-component complex containing GTP-binding proteins." J Cell Sci **106** 287-98.
- Manjunath, S., A. J. Williams and J. Bailey-Serres (1999). "Oxygen deprivation stimulates Ca²⁺-mediated phosphorylation of mRNA cap-binding protein eIF4E in maize roots." Plant J **19**: 21-30.
- Marcotrigiano, J., A. C. Gingras, N. Sonenberg and S. K. Burley (1997). "X-ray studies of the messenger RNA 5' cap-binding protein (eIF4E) bound to 7-methyl-GDP." Nucleic Acids Symp Ser **36**: 8-11.
- Martinez-Silva, A. V., C. Aguirre-Martinez, C. E. Flores-Tinoco, N. D. Alejandri-Ramirez and T. D. Dinkova (2012). "Translation initiation factor AtelF(iso)4E is involved in selective mRNA translation in *Arabidopsis thaliana* seedlings." PLoS One **7**: e31606.
- Martínez-Silva, A. V. and T. D. Dinkova (2010). "Mecanismos de regulación traduccional mediados por el factor de inicio 4E: las dos caras de la moneda." Revista de Educación Bioquímica **29**: 82-91.
- Matsukura, S., J. Mizoi, T. Yoshida, D. Todaka, Y. Ito, K. Maruyama, K. Shinozaki and K. Yamaguchi-Shinozaki (2010). "Comprehensive analysis of rice DREB2-type genes that encode transcription factors involved in the expression of abiotic stress-responsive genes." Mol Genet Genomics **283**: 185-96.
- Medina, J., M. Bargues, J. Terol, M. Perez-Alonso and J. Salinas (1999). "The *Arabidopsis* CBF gene family is composed of three genes encoding AP2 domain-containing proteins whose expression is regulated by low temperature but not by abscisic acid or dehydration." Plant Physiol **119**: 463-70.
- Mizoi, J., K. Shinozaki and K. Yamaguchi-Shinozaki (2012). "AP2/ERF family transcription factors in plant abiotic stress responses." Biochim Biophys Acta **1819**: 86-96.
- Monroy, A. F. and R. S. Dhindsa (1995). "Low-temperature signal transduction: induction of cold acclimation-specific genes of alfalfa by calcium at 25 degrees C." Plant Cell **7**: 321-31.

- Muench, D. G., C. Zhang and M. Dahodwala (2012). "Control of cytoplasmic translation in plants." Wiley Interdiscip Rev RNA **3**: 178-94.
- Nagarajan, V. K., V. Satheesh, M. D. Poling, K. G. Raghothama and A. Jain (2016). "*Arabidopsis* MYB-related HHO2 exerts a regulatory influence on a subset of root traits and genes governing phosphate homeostasis." Plant Cell Physiol **57**: 1142-52.
- Novillo, F., J. M. Alonso, J. R. Ecker and J. Salinas (2004). "CBF2/DREB1C is a negative regulator of CBF1/DREB1B and CBF3/DREB1A expression and plays a central role in stress tolerance in *Arabidopsis*." Proc Natl Acad Sci U S A **101**: 3985-90.
- Oakenfull, R. J., R. Baxter and M. R. Knight (2013). "A C-repeat binding factor transcriptional activator (CBF/DREB1) from European bilberry (*Vaccinium myrtillus*) induces freezing tolerance when expressed in *Arabidopsis thaliana*." PLoS One **8**: e54119.
- Orvar, B. L., V. Sangwan, F. Omann and R. S. Dhindsa (2000). "Early steps in cold sensing by plant cells: the role of actin cytoskeleton and membrane fluidity." Plant J **23**: 785-94.
- Patrick, R. M., L. K. Mayberry, G. Choy, L. E. Woodard, J. S. Liu, A. White, R. A. Mullen, T. M. Tanavin, C. A. Latz and K. S. Browning (2014). "Two *Arabidopsis* loci encode novel eukaryotic initiation factor 4E isoforms that are functionally distinct from the conserved plant eukaryotic initiation factor 4E." Plant Physiol **164**: 1820-30.
- Perras, M. and a. F. Sarhan (1990). "Polysome metabolism during cold acclimation in Wheat." Plant Cell Physiol **31**: 1083-9.
- Robaglia, C. and C. Caranta (2006). "Translation initiation factors: a weak link in plant RNA virus infection." Trends Plant Sci **11**: 40-5.
- Rodriguez, C. M., M. A. Freire, C. Camilleri and C. Robaglia (1998). "The *Arabidopsis thaliana* cDNAs coding for eIF4E and eIF(iso)4E are not functionally equivalent for yeast complementation and are differentially expressed during plant development." Plant J **13**: 465-73.
- Rosenwald, I. B., A. Lazaris-Karatzas, N. Sonenberg and E. V. Schmidt (1993). "Elevated levels of cyclin D1 protein in response to increased expression of eukaryotic initiation factor 4E." Mol Cell Biol **13**: 7358-63.
- Ruud, K. A., C. Kuhlow, D. J. Goss and K. S. Browning (1998). "Identification and characterization of a novel cap-binding protein from *Arabidopsis thaliana*." J Biol Chem **273**: 10325-30.
- Sakuma, Y., Q. Liu, J. G. Dubouzet, H. Abe, K. Shinozaki and K. Yamaguchi-Shinozaki (2002). "DNA-binding specificity of the ERF/AP2 domain of *Arabidopsis* DREBs, transcription factors involved in dehydration- and cold-inducible gene expression." Biochem Biophys Res Commun **290**: 998-1009.
- Sakuma, Y., K. Maruyama, F. Qin, Y. Osakabe, K. Shinozaki and K. Yamaguchi-Shinozaki (2006). "Dual function of an *Arabidopsis* transcription factor DREB2A in water-stress-responsive and heat-stress-responsive gene expression." Proc Natl Acad Sci U S A **103**: 18822-7.
- Sangwan, V., I. Foulds, J. Singh and R. S. Dhindsa (2001). "Cold-activation of *Brassica napus* BN115 promoter is mediated by structural changes in membranes and cytoskeleton, and requires Ca²⁺ influx." Plant J **27**: 1-12.

- Shen, Y. G., W. K. Zhang, S. J. He, J. S. Zhang, Q. Liu and S. Y. Chen (2003). "An EREBP/AP2-type protein in *Triticum aestivum* was a DRE-binding transcription factor induced by cold, dehydration and ABA stress." Theor Appl Genet **106**: 923-30.
- Shinwari, Z. K., K. Nakashima, S. Miura, M. Kasuga, M. Seki, K. Yamaguchi-Shinozaki and K. Shinozaki (1998). "An *Arabidopsis* gene family encoding DRE/CRT binding proteins involved in low-temperature-responsive gene expression." Biochem Biophys Res Commun **250**: 161-70.
- Stracke, R., M. Werber and B. Weisshaar (2001). "The R2R3-MYB gene family in *Arabidopsis thaliana*." Curr Opin Plant Biol **4**: 447-56.
- Strudwick, S. and K. L. Borden (2002). "The emerging roles of translation factor eIF4E in the nucleus." Differentiation **70**: 10-22.
- Tahtiharju, S., V. Sangwan, A. F. Monroy, R. S. Dhindsa and M. Borg (1997). "The induction of kin genes in cold-acclimating *Arabidopsis thaliana*. Evidence of a role for calcium." Planta **203**: 442-7.
- Thomashow, M. F. (1999). "Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms." Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol **50**: 571-99.
- Tomoo, K., X. Shen, K. Okabe, Y. Nozoe, S. Fukuhara, S. Morino, T. Ishida, T. Taniguchi, H. Hasegawa, A. Terashima, M. Sasaki, Y. Katsuya, K. Kitamura, H. Miyoshi, M. Ishikawa and K. Miura (2002). "Crystal structures of 7-methylguanosine 5'-triphosphate (m(7)GTP)- and P(1)-7-methylguanosine-P(3)-adenosine-5',5'-triphosphate (m(7)GpppA)-bound human full-length eukaryotic initiation factor 4E: biological importance of the C-terminal flexible region." Biochem J **362**: 539-44.
- Vannini, C., F. Locatelli, M. Bracale, E. Magnani, M. Marsoni, M. Osnato, M. Mattana, E. Baldoni and I. Coraggio (2004). "Overexpression of the rice Osmyb4 gene increases chilling and freezing tolerance of *Arabidopsis thaliana* plants." Plant J **37**: 115-27.
- Weber, C., L. Nover and M. Fauth (2008). "Plant stress granules and mRNA processing bodies are distinct from heat stress granules." Plant J **56**: 517-30.
- Xiong, L., K. S. Schumaker and J. K. Zhu (2002). "Cell signaling during cold, drought, and salt stress." Plant Cell **14 Suppl**: S165-83.
- Yanguez, E., A. B. Castro-Sanz, N. Fernandez-Bautista, J. C. Oliveros and M. M. Castellano (2013). "Analysis of genome-wide changes in the translome of *Arabidopsis* seedlings subjected to heat stress." PLoS One **8**: e71425.
- Zhou, C., Y. Yin, P. Dam and Y. Xu (2010). "Identification of novel proteins involved in plant cell-wall synthesis based on protein-protein interaction data." J Proteome Res **9**: 5025-37.