



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Funciones de las poliaminas en procesos de autofagia vegetal

Safir Malonda Costa

Trabajo Fin de Máster

Director:

Dr. Alejandro Ferrando Monleón

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	2
OBJETIVOS	8
RESULTADOS	9
1. Validación de la construcción mRFP-ATG8e	9
2. Caracterización de líneas transgénicas GFP-ATG8	10
3. Inducción de autofagia en condiciones de estrés	11
4. Tratamiento con espermidina de plantas transgénicas GFP-ATG8f	12
5. Estudios bioquímicos de la autofagia con la proteína NBR1.....	13
6. Abordajes genéticos para el estudio de eIF5A en autofagia.....	15
DISCUSIÓN	17
CONCLUSIONES	18
MATERIALES Y MÉTODOS	19
1. Material biológico, manipulación y condiciones de crecimiento.....	19
1.1. <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	19
1.1.1. Transformación de <i>A. tumefaciens</i>	19
1.2. <i>Nicotiana benthamiana</i>	19
1.2.1. Cultivo y condiciones de crecimiento	19
1.2.2. Expresión transitoria en <i>N. benthamiana</i>	19
1.3. <i>Arabidopsis thaliana</i>	19
1.3.1. Cultivo <i>in vitro</i>	19
1.3.2. Cultivo en invernadero.....	21
2. Técnicas de microscopía.....	21
3. Técnicas de análisis y manipulación de proteínas.....	21
3.1. Extracción de proteínas de <i>A. thaliana</i>	21
3.2. Electroforesis SDS-PAGE.....	22
3.3. Tinción Coomassie.....	22
3.4. Análisis <i>Western Blot</i> (WB).....	22
BIBLIOGRAFÍA	24

INTRODUCCIÓN

El cambio climático y particularmente el aumento de la temperatura, afecta a los ecosistemas en todo el mundo. Numerosas especies vegetales y animales corren un elevado riesgo de extinción si el aumento de la temperatura media global supera los 1.5-3°C por encima del nivel preindustrial [1][2]. El cambio climático está asociado con la concentración atmosférica de CO₂, de manera que, si las emisiones de gases de efecto invernadero continúan con la tasa actual o por encima de ella, el efecto perjudicial del cambio climático en los ecosistemas naturales será dramático. Probablemente, esto conducirá a desplazamientos de población y en consecuencia a conflictos.

La agricultura es responsable de gran parte de las emisiones de gases de efecto invernadero, por ello se debe adaptar y evolucionar para mitigar las emisiones, y así reducir el impacto sobre el cambio climático. A su vez, la agricultura tiene que hacer frente al reto de alimentar de forma sostenible a una población mundial en crecimiento y reducir la hambruna. Según Naciones Unidas (Objetivo 2 para el desarrollo sostenible [3]), hay 821 millones de personas que padecen hambre en el mundo y se estima que para 2050 habrá dos mil millones más de personas desnutridas. Por ello es crucial aumentar la capacidad productiva agrícola y tener sistemas sostenibles de producción de alimentos.

Los fertilizantes de nitrato de amonio son responsables de la liberación de óxido nitroso (N₂O). El óxido nitroso contribuye con el 6% al efecto invernadero, pues tiene un potencial global de calentamiento 200-300 veces superior al dióxido de carbono (CO₂). Además, su conversión a óxido nítrico (NO) le lleva a alterar la capa de ozono. Por otra parte, la producción de nitrato consume hasta el 2% del consumo mundial de energía, lo que también afecta el balance de carbono. Reducir el uso de fertilizantes de nitrato es, por tanto, uno de los objetivos de la agricultura. Sin embargo, reducir el uso de fertilizantes sin afectar el rendimiento y la calidad del producto requiere de estrategias de mejora y nuevas técnicas de manejo de cultivos. Por todo ello, una de las estrategias para alcanzar una agricultura sostenible y productiva consiste en el estudio del reciclaje interno de las plantas y la movilización de nitrógeno [4].

La macroautofagia (seguidamente denominada autofagia) es un mecanismo intracelular común conservado evolutivamente en eucariotas para la degradación de los componentes celulares dañados o en desuso, que opera tanto en condiciones favorables como en condiciones de estrés. Es decir, es un proceso esencial para la homeostasis celular y la adaptación al estrés. La autofagia se inicia con la formación de una estructura denominada *pre-autofagosoma* (PAS) y luego de un *fagóforo*, que se forma alrededor de los componentes que van a ser degradados. Una vez cerrada la estructura se denomina *autofagosoma* y se caracteriza por ser una estructura de doble membrana. Finalmente, cuando se trata de células animales, el autofagosoma se fusiona con el lisosoma para depositar los componentes a degradar. Pero hay que tener en cuenta que, en células vegetales el citoplasma representa un espacio altamente restringido en comparación con las células de mamíferos o levadura. Esto es así porque las vacuolas de las células vegetales son compartimentos altamente pleomórficos, que cambian de forma, función y contenido de acuerdo con el desarrollo celular y la etapa de crecimiento. De manera que una de las características específicas de las plantas, es la capacidad de realizar una fusión directa de los autofagosomas con las vacuolas líticas, sin la necesidad de compartimentos líticos intermedios, como se ha descrito en células de mamíferos. De manera que, en plantas, la membrana externa del autofagosoma se fusiona con el tonoplasto, entregando su contenido como un único compartimento unido a la membrana (o cuerpo autofágico) en la luz vacuolar [Figura 1, [5]].

Las proteínas involucradas en el proceso de autofagia (ATG) se descubrieron inicialmente en la levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) [6]. Los genes *ATG* se pueden dividir en tres categorías con respecto a su función [7]:

- ATG1-ATG13, constituyen un complejo quinasa, y se trata de un regulador aguas arriba de la vía de autofagia que inicia la formación del autofagosoma.
- Los complejos ATG9 y ATG6/vps30 participan en el proceso de expansión del autofagosoma. El complejo ATG9/vps30 interactúa con ATG2 y ATG18, aumentando la expansión de los fagóforos a través del sistema endomembranoso (retículo endoplásmico, aparato de Golgi y mitocondrias). Por otro lado, el complejo ATG6/vps30 interacciona con ATG14, que se localiza en el PAS y en la membrana vacuolar, para acabar de formar los autofagosomas.
- Sistemas de conjugación tipo ubiquitina: los complejos ATG5-ATG12 y ATG8-PE, esenciales para las etapas finales de la formación del autofagosoma y su fusión a la membrana vacuolar. Se ha demostrado que el complejo ATG8-PE recluta la carga citoplásmica para garantizar la maduración y el cierre del autofagosoma y posteriormente se transporta a la vacuola para su degradación.

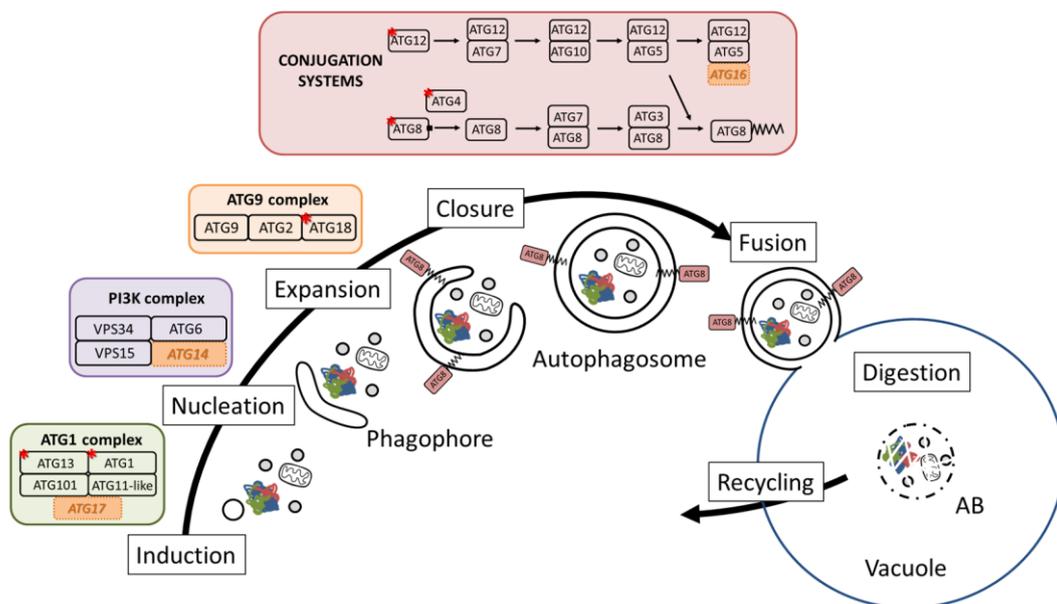


Figura 1. Conservación de la maquinaria principal de autofagia en *Arabidopsis thaliana* (Marion et al. 2018).

En su día se observó mediante estudios genómicos, que la mayoría de los genes *ATG*, caracterizados inicialmente en levadura, están bien conservados a lo largo de la evolución y se descubrió la existencia de genes homólogos funcionales en mamíferos y plantas. En sistemas animales, la autofagia cumple funciones importantes, desde el desarrollo hasta la participación en enfermedades neurodegenerativas. Sin embargo, la información sobre autofagia en plantas es menor, pero en estos últimos años la investigación se ha focalizado sobre todo en la planta modelo *Arabidopsis thaliana*, pero también en organismos eucariotas fotosintéticos acuáticos, gimnospermas y angiospermas, incluidas monocotiledóneas y dicotiledóneas. En plantas se ha demostrado que este proceso de reciclaje está involucrado en respuestas inmunes innatas [8], en senescencia [9] y en condiciones de déficit de nutrientes [10]. Ahora bien, para comprender la implicación fisiológica de la autofagia se necesitan métodos de análisis adecuados.

Se están realizando esfuerzos para describir los componentes, el ensamblaje y los factores reguladores de la maquinaria de autofagia en las plantas. En *Arabidopsis thaliana* se ha llegado a caracterizar el complejo quinasa ATG1-ATG13. También se han descrito homólogos de plantas de ATG1, ATG13, ATG11, ATG17 y ATG101. ATG1 está codificado por una familia de cuatro miembros; ATG13 por un par de genes; ATG17 no se ha identificado como un gen separado, sino como un dominio similar a ATG17 dentro de la proteína ATG11 [11]. Hay que tener en cuenta que la maquinaria de autofagia funciona de una manera específica y está muy finamente regulada [Figura 2, [12]].

En condiciones de falta de nutrientes, la actividad quinasa de TOR (inhibidor de la autofagia) se inhibe por acción de la actividad quinasa AMPK (SnRK1 en plantas) y, por lo tanto, ATG1 y ATG13 se ensamblan, formando así el complejo quinasa ATG1-ATG13. La adición de fosfatidilinositol-3 al PAS permite que ATG9 agregue lípidos a la estructura y eventualmente se forme el fagóforo. A continuación, se da la lipidación de ATG8 con fosfatidiletanolamina (PE, un componente lipídico de la membrana del autofagosoma) mediada por ATG5-ATG12. Esto hace que ATG8 sea una proteína particularmente atractiva como biomarcador para observar el proceso de autofagia, ya que queda anclada a la membrana de una autofagosoma. La lipidación con PE de ATG8 ocurre después de la escisión de una extensión en C-terminal por una proteasa Cys-ATG4. Como resultado se obtiene ATG8 con un residuo Gly expuesto en C-terminal, que será activado mediante la enzima ATG7 a través de un enlace tioéster entre el residuo Gly de ATG8 y el residuo Cys de ATG7, que posteriormente será donado a la enzima ATG3. Finalmente, ATG8 queda conjugado a PE a través de un enlace amida entre el residuo Gly de ATG8 y el grupo amino de PE. Por tanto, la desconjugación de ATG8 por ATG4 también resulta esencial para la regulación de los autofagosomas.

Los estudios sobre los mecanismos de regulación de la autofagia han puesto de manifiesto la conservación de distintos mecanismos en eucariotas.

El complejo SnRK1 en *Arabidopsis* es una proteína quinasa que funciona como sensor metabólico detectando cambios en los niveles de energía e integrando respuestas que permiten la supervivencia celular. Su ortólogo de mamíferos, AMPK, y el ortólogo de levadura, Snf-1, activan la autofagia en respuesta a condiciones de baja energía. La activación de la autofagia en plantas también se da por SnRK1, ya que se ha visto que la sobreexpresión de la subunidad catalítica de SnRK1 KIN10 en condiciones control aumenta la presencia de autofagosomas mientras que el mutante *kin10* bloquea la inducción de autofagia por estrés. En *Arabidopsis* la inhibición de TOR conduce a la activación de la autofagia, pero la inhibición de SnRK1 no bloquea dicha activación de la autofagia mediada por TOR. Asimismo, el aumento de la actividad SnRK1 no induce la autofagia cuando TOR permanece activo, por lo tanto SnRK1 actúa aguas arriba de TOR en la activación de la autofagia [13].

La visualización en 3D de la morfología del autofagosoma en las células epidérmicas de la raíz de *Arabidopsis* ayudó a definir el papel de ATG5 en la determinación de la estructura del autofagosoma en crecimiento. Tras la inducción de autofagia, se demostró que ATG5 se localiza en la superficie externa del retículo endoplásmico cortical (RE) y recluta ATG8 para el fagóforo en crecimiento. Una vez cerrada la membrana del fagóforo, ATG5 abandona la estructura y el autofagosoma recién formado se desplaza de la membrana del RE. Este proceso de formación del autofagosoma también está regulado por la proteína 2 que contiene un dominio SH3 (SH3P2) [11].

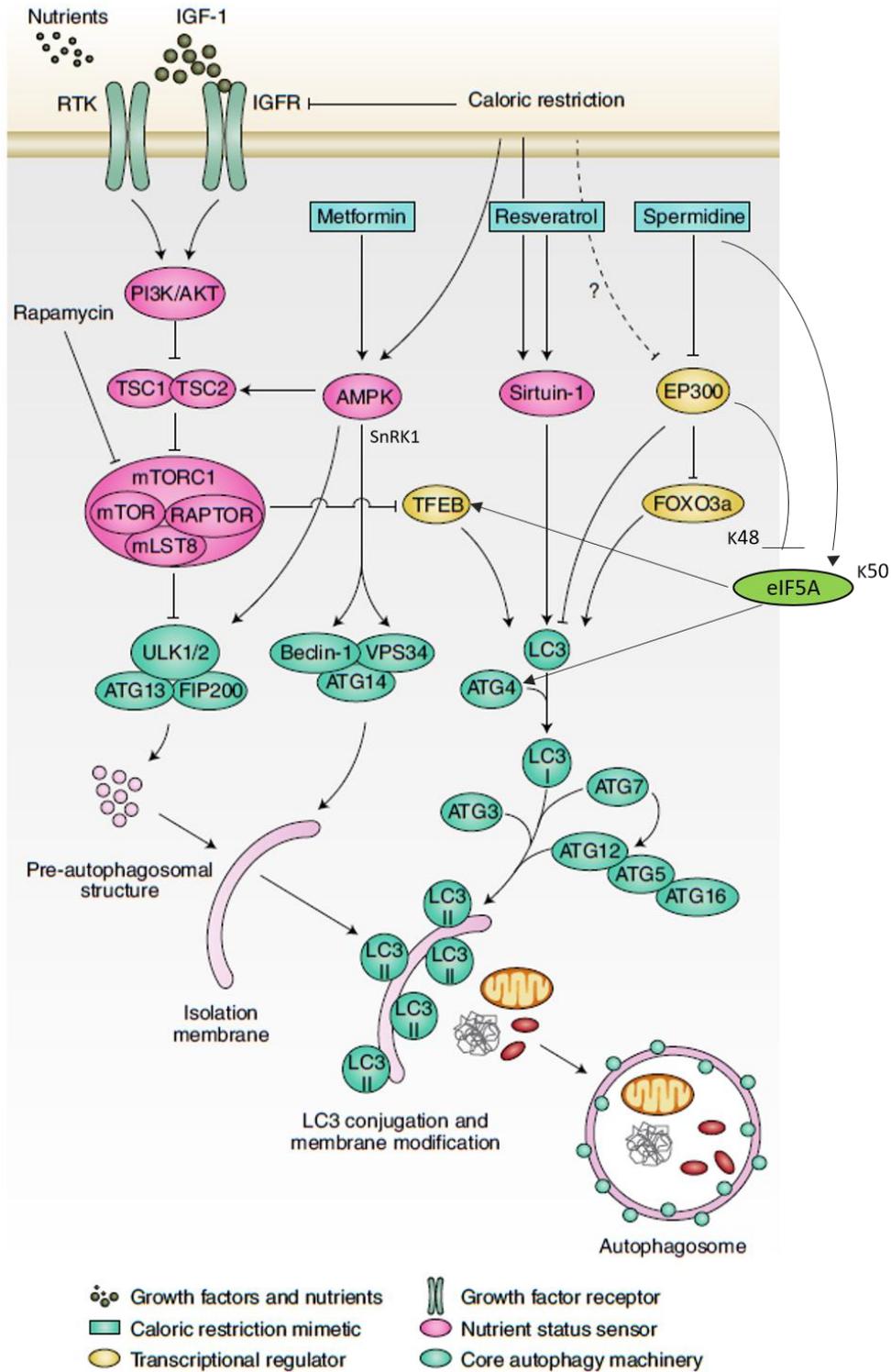


Figura 2. Vías de señalización que regulan la autofagia (Modificada de Leidal et al. 2018).

Estudios recientes han demostrado una relación directa entre enzimas metabólicas y autofagia. La gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) es una enzima clave en la vía glucolítica y, en animales, participa en procesos de reparación del ADN y la fusión y transporte de membranas. En *Arabidopsis*, se demostró que los mutantes *knockout* de GAPDH presentan niveles elevados de especies reactivas de oxígeno (ROS), pero una mayor resistencia a la enfermedad y autofagia constitutiva, lo que sugirió a sus autores que GAPDH inhibe de alguna

forma la autofagia. De hecho, un estudio paralelo en tabaco (*Nicotiana benthamiana*) reveló que GAPDH interactúa directamente con la proteína ATG3 para regular negativamente su actividad [14].

Por otro lado, en diversos organismos el envejecimiento se correlaciona con la pérdida o reducción de la autofagia, mientras que la inducción de la autofagia promueve la homeostasis celular y funciona para prolongar la vida útil y mejorar la salud. Por ejemplo, en ratas envejecidas y células humanas primarias se ha detectado una reducción de la proteólisis lisosómica acompañada de una menor presencia de autofagosomas y una expresión reducida de genes ATG. En humanos, ATG5, ATG7 y BECN-1 (que codifica Beclin-1, también llamado ATG6) están regulados negativamente durante el envejecimiento, pero en enfermedades asociadas a la edad como la neurodegeneración, la osteoartritis y la cardiomiopatía también se muestra una reducción de la autofagia. Este vínculo entre la autofagia deteriorada y el envejecimiento ha despertado el interés por encontrar compuestos que mejoren la función autofágica para tratar enfermedades relacionadas con la edad. Es decir, estas estrategias se centran en inducir la autofagia a través de agentes que imitan los efectos bioquímicos y fisiológicos de la restricción calórica (llamados CR *mimetics*, CRM) o compuestos que estimulan la autofagia a través de vías alternativas. El resveratrol y la espermidina son suplementos nutricionales que pueden actuar como CRM geroprotectores, ya que extienden la vida de diversos organismos y mejoran la neurodegeneración, la disfunción metabólica y la inflamación en ratones. La restricción calórica, la espermidina y el resveratrol causan la desacetilación de numerosas proteínas, incluidas las moléculas que regulan la autofagia. Se ha demostrado que la espermidina inhibe la acetiltransferasa EP300, que acetila e inhibe varias proteínas de autofagia [Figura 2]. Parece claro que las funciones promotoras de longevidad del resveratrol y la espermidina requieren autofagia debido a que su capacidad para extender la vida útil se elimina tras la caída de los ATG esenciales [12].

Además, se conoce que el contenido de poliaminas, como la espermidina, aumenta significativamente en condiciones de estrés, lo que desencadena la activación de mecanismos de defensa y promueve la supervivencia celular. Las poliaminas exhiben propiedades protectoras con respecto a los compuestos de alto peso molecular de la célula, como proteínas y ácidos nucleicos. Existen evidencias de que la exposición a la espermina de forma exógena aumentó la vida útil de levadura, nemátodos y moscas, debido a la inducción de autofagia en sus células. En cambio, en plantas se sabe que las poliaminas juegan un papel importante en defensa frente a situaciones de estrés biótico y abiótico, pero hay pocos datos sobre la inducción de autofagia por poliaminas en células vegetales. No obstante, se ha visto que el proceso de inducción de autofagia mediante poliaminas va acompañado de una mayor generación de ROS y óxido de nitrógeno (NO) [15].

También cabe mencionar que la espermidina modifica a nivel post-traducciona el factor eIF5A (factor de elongación de traducción eucariota 5A), mediante la modificación por hipusinación de un residuo de lisina específico (K⁵⁰ en humanos). Para la formación de la hipusina se requieren dos pasos enzimáticos secuenciales. En la primera reacción limitante, la enzima desoxihipusina sintasa (DHS) cataliza de forma reversible y dependiente del cofactor NAD (nicotinamida adenina dinucleótido) la deshidrogenación de la espermidina y el consecuente corte y transferencia del grupo 4-aminobutilo al residuo conservado de lisina del factor eIF5A, generando el intermediario desoxihipusina. En la segunda reacción, el residuo intermediario es hidroxilado de manera irreversible, por acción de la enzima desoxihipusina hidroxilasa (DOHH), generando el residuo de hipusina, para completar la maduración y la activación del factor eIF5A

[Figura 3] [16]. Esta modificación mediada por el metabolito espermidina es esencial para que el factor sea funcionalmente activo.

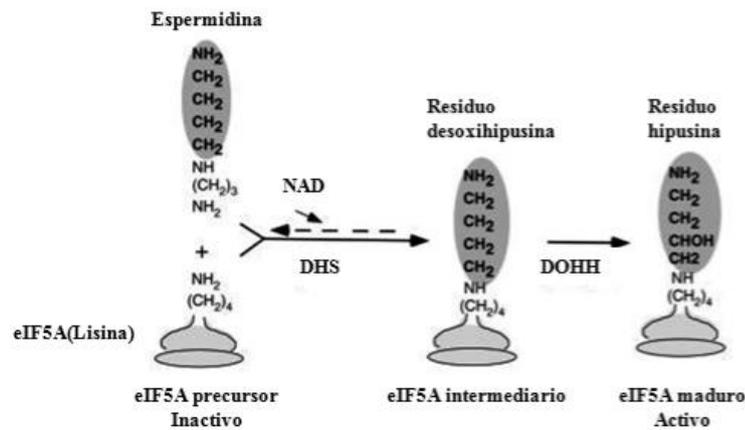


Figura 3. Modificación del factor eIF5A. Figura modificada de Park et al. (2010).

Previamente se había demostrado que eIF5A se une a los ribosomas y evita su estancamiento durante la traducción de ciertos aminoácidos con impedimentos estéricos debido a su geometría, como ocurre con los motivos poli-prolina. En un estudio reciente con animales, se ha descrito el papel conservado evolutivamente para eIF5A en el proceso de autofagia, concretamente que eIF5A media la lipidación de proteínas de la familia ATG8 y la formación de autofagosomas a través de la traducción de la proteína ATG3. La interacción del factor de traducción se da mediante un motivo particular en ATG3 y es necesaria para su traducción eficiente. Estos datos indican un requisito funcional para la hipusinación de eIF5A en autofagia y sugieren un mecanismo atribuido a la espermidina para la traducción de ATG3 [17].

Por otro lado, se ha visto que en ratones y humanos el factor de transcripción TFEB es uno de los principales reguladores de la autofagia. Este factor es una proteína de vida corta, contiene un motivo de poli-prolina en ratón y dos en humanos y requiere de la participación del factor eIF5A para su correcta traducción [18]. Por tanto, la disminución de los niveles de poliaminas da como resultado una pérdida de eIF5A funcional por lo que TFEB no se traduce de manera eficiente y como consecuencia los genes de autofagia no se transcriben correctamente [Figura 4, [19]].

Como se ha dicho anteriormente la autofagia es un proceso biológico que permite la adaptación al estrés, y las plantas como organismos sésiles están expuestas a muchas condiciones ambientales desfavorables. Cabe destacar que muchos autores han descrito que ATG8 juega un papel importante en la sensibilidad de las plantas al estrés abiótico. Particularmente, en *Arabidopsis* se conocen nueve isoformas de ATG8 (ATG8a a ATG8i). Otras proteínas ATG también están implicadas en la respuesta al estrés, especialmente en condiciones de déficit de nutrientes, como la falta de carbono y nitrógeno. Por ejemplo, dos de los mutantes clásicos relacionados con la autofagia, *atg5* y *atg7*, muestran hipersensibilidad al déficit de carbono y nitrógeno, al igual que el mutante doble *atg13* (*atg13a atg13b*) y el mutante *atg11* [7].

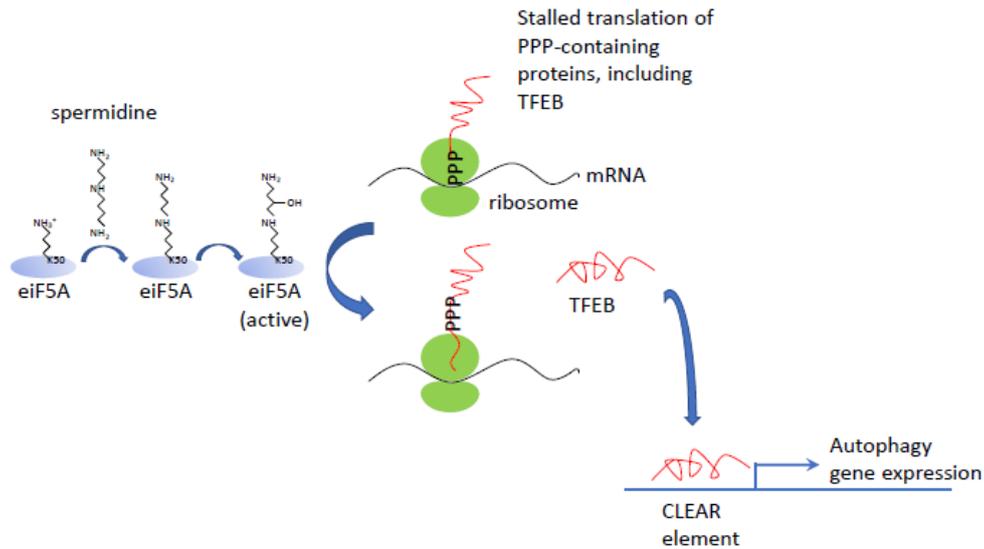


Figura 4. Modelo del papel del eje espermidina-elf5A en la autofagia (Douglas R. Green).

OBJETIVOS

Debido a la poca información descrita sobre el papel de las poliaminas en la regulación de la autofagia en plantas, en nuestro grupo hemos decidido utilizar plantas transgénicas de *Arabidopsis*, que expresan la fusión traduccional GFP-ATG8 como marcador *in vivo* para autofagia, con la finalidad de observar si la aplicación exógena del metabolito espermidina induce este proceso de reciclaje como ocurre en animales. También hemos utilizado para estos estudios el análisis de estabilidad de la proteína sustrato de autofagia NBR1 mediante técnicas de *Western blot*. Por tanto, nuestro objetivo es aclarar el papel de la espermidina en la autofagia de las plantas y sus posibles aplicaciones biotecnológicas en la agricultura, ya que la ingeniería de la autofagia mediada por espermidina podría mejorar la eficiencia del uso de nutrientes y así contribuir a la reducción del uso de fertilizantes y en consecuencia de las emisiones de gases de efecto invernadero.

RESULTADOS

1. Validación de la construcción mRFP-ATG8e

Para poder obtener plantas transgénicas que nos sirvan de marcadores *in vivo* de autofagia, previamente en nuestro laboratorio se diseñó la construcción de la fusión de la proteína RFP a una de las isoformas de la proteína ATG8 (ATG8e), mediante el sistema *Gateway* de clonación y ensamblaje dirigido [Figura 5].

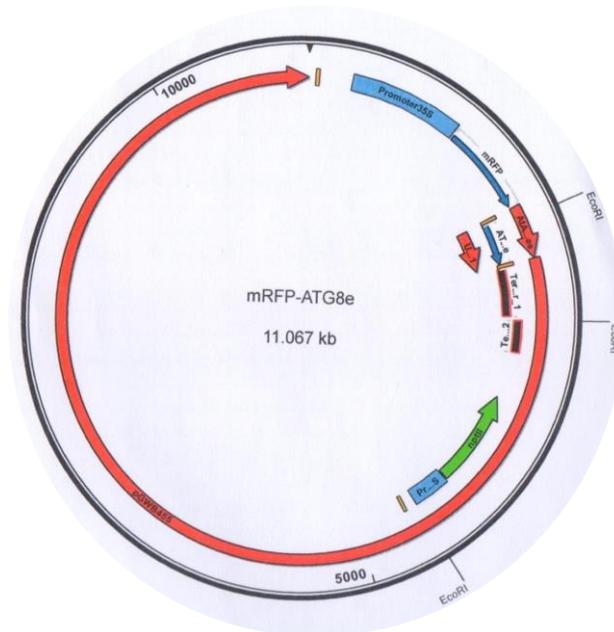


Figura 3. Esquema del vector de clonación de la fusión traduccional mRFP-ATG8e.

Mediante un ensayo de expresión transitoria en hojas de *Nicotiana benthamiana* [Materiales y métodos 1.2.2] se consiguió validar la construcción diseñada en el laboratorio del Dr. A.Ferrando. Es decir, como se observa en la figura 6 la fusión traduccional diseñada se expresa en células vegetales. De manera que la construcción se puede utilizar para la transformación de plantas y tras varias generaciones obtener plantas transgénicas homocigotas.

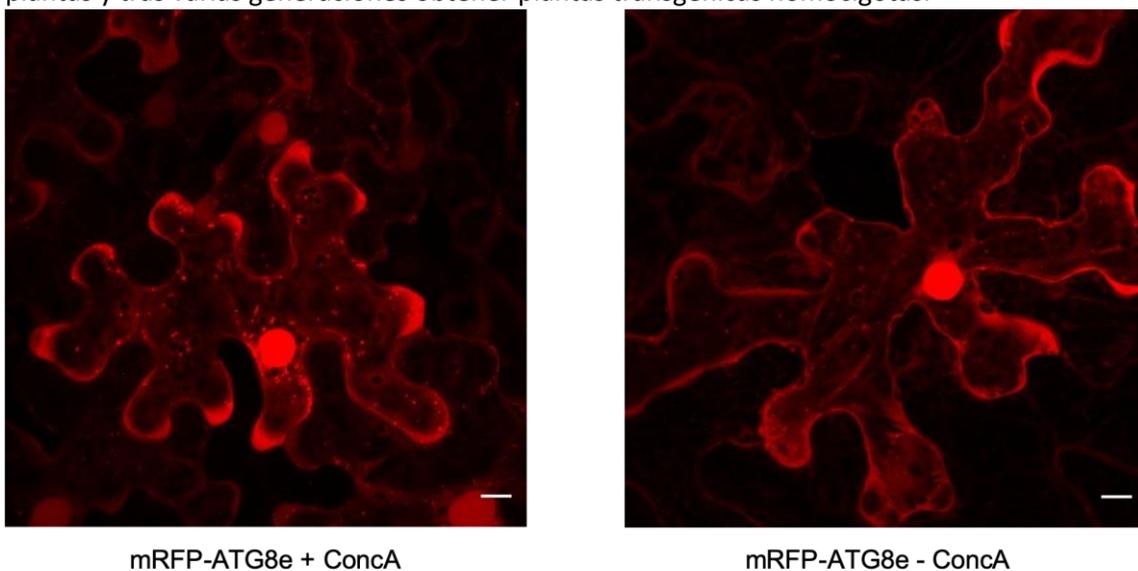


Figura 6. Validación de la construcción mRFP-ATG8e mediante su infiltración en células de hoja de tabaco (*N.benthamiana*). Escala = 20 μ m.

2. Caracterización de líneas transgénicas GFP-ATG8

Por otro lado, el Dr. Yasin Dagdas (Gregor Mendel Institute, Vienna) cedió amablemente a nuestro laboratorio semillas de diferentes líneas transgénicas GFP-ATG8 de *Arabidopsis thaliana*, útiles también para el seguimiento de la autofagia *in vivo*, ya que nos permite observar la presencia de autofagosomas en células vegetales gracias a la fusión de la proteína fluorescente verde (GFP) a la proteína ATG8 (y sus diferentes isoformas) presente en la membrana de los autofagosomas.

En primer lugar, se caracterizaron todas las líneas, y así pudimos decidir con cuál de ellas seguir trabajando en los futuros ensayos para el estudio de la autofagia. Como se observa en la figura 7 todas las líneas expresan la proteína fluorescente GFP, es decir, todas ellas son válidas para el seguimiento y estudio de la autofagia en plantas. Ahora bien, tras varias observaciones en el microscopio confocal, las líneas GFP-ATG8f y GFP-ATG8e presentaban una señal más intensa, y además su tasa de germinación era mayor. Por ello, a partir de este resultado, se decidió seguir estudiando la autofagia con ambas líneas.

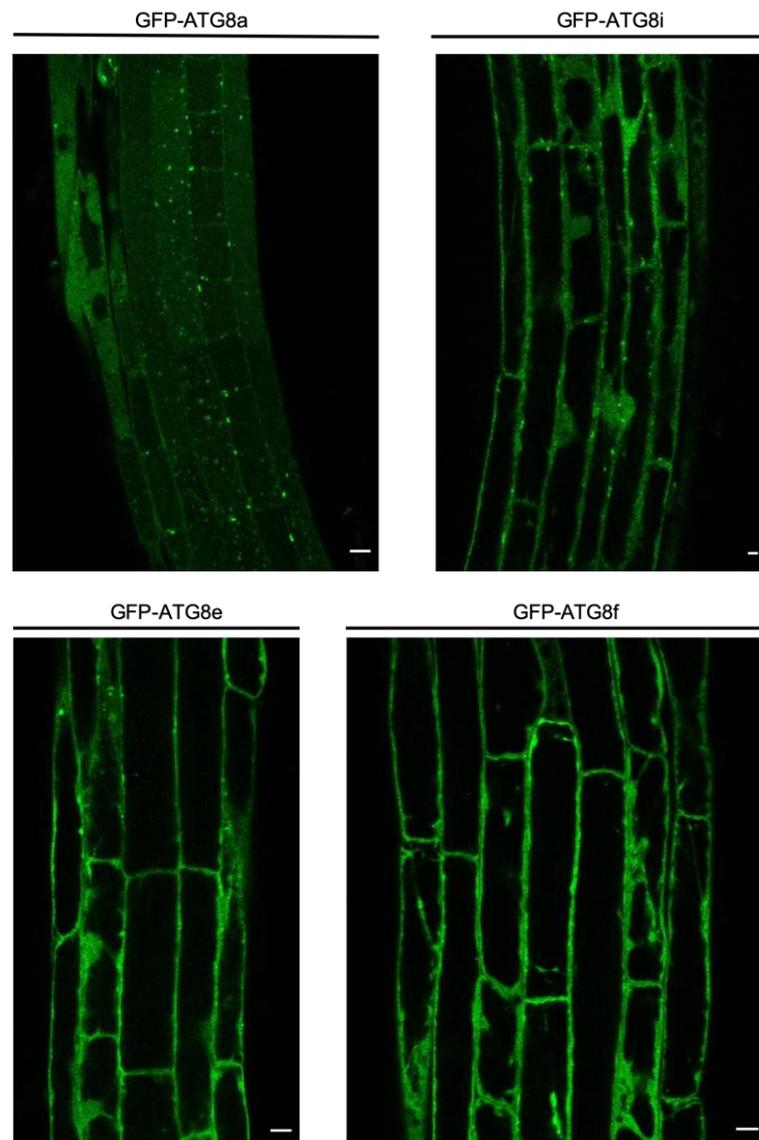


Figura 7. Caracterización de todas las líneas transgénicas GFP-ATG8 mediante la observación en el microscopio confocal de células de la raíz en medio MS con sacarosa. Escala = 20 μ m.

3. Inducción de autofagia en condiciones de estrés

Como ya se ha dicho, la autofagia es un proceso esencial para la homeostasis celular y la adaptación al estrés [7][10]. Con la finalidad de comprobar si las líneas GFP-ATG8 se comportan de igual forma, es decir, si el proceso de autofagia se activa en condiciones de estrés, las plántulas transgénicas se sometieron a condiciones desfavorables y posteriormente se observaron sus raíces mediante el microscopio confocal. Concretamente, las plántulas GFP-ATG8 de *Arabidopsis* se sometieron a una restricción de nutrientes, de nitrógeno y carbono (sacarosa) [Materiales y métodos 1.3.1.4 y 1.3.1.5].

Como se observa en la figura 8, las plántulas de la línea GFP-ATG8e presentan un número mayor de autofagosomas en ausencia de sacarosa en las células radiculares, en comparación con su control. Por otro lado, con la línea GFP-ATG8f ocurre exactamente lo mismo en ausencia de sacarosa. También estudiamos el efecto de ayuno de nitrógeno en la línea GFP-ATG8f, mostrando inducción de autofagia en esas condiciones [Figura 9].

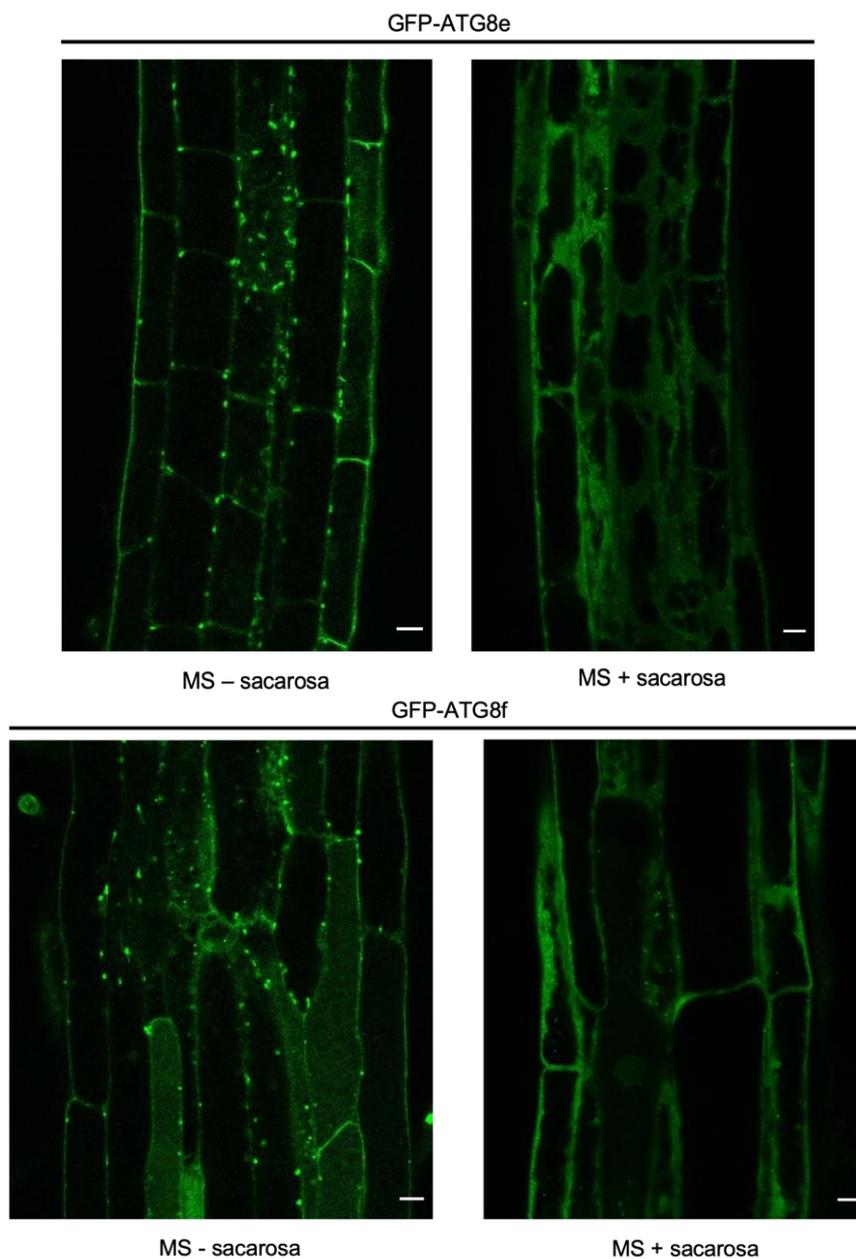


Figura 8. Tratamiento ayuno sacarosa de la línea GFP-ATG8e y GFP-ATG8f. Escala = 20 μ m.

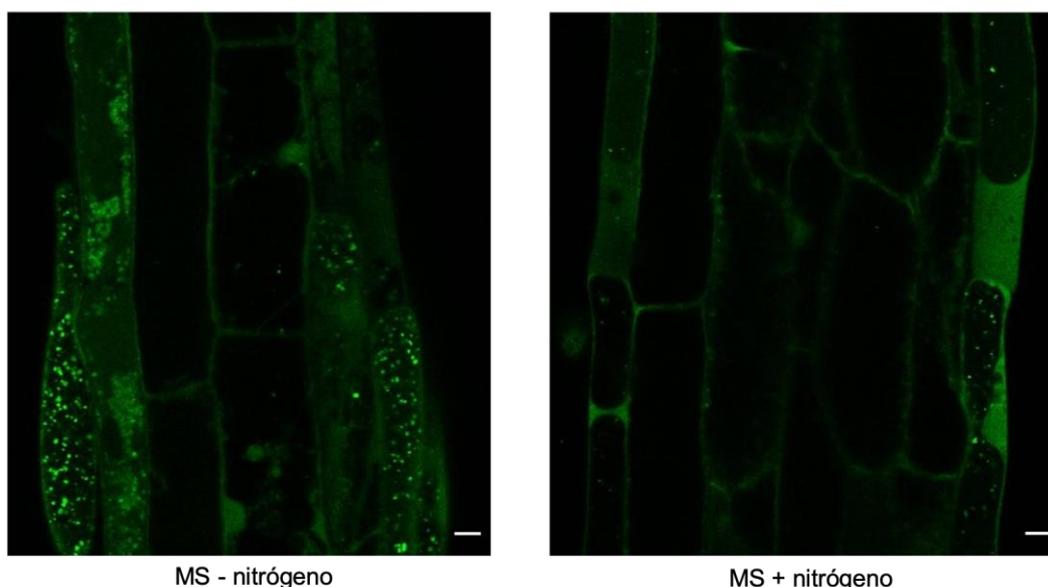


Figura 9. Tratamiento ayuno de nitrógeno de la línea GFP-ATG8f. Escala = 20 μ m.

4. Tratamiento con espermidina de plantas transgénicas GFP-ATG8f

El principal objetivo de este proyecto es determinar el papel de la espermidina en el proceso de reciclaje interno de las plantas. Para poder observar el efecto de esta poliamina sobre la autofagia, se aplicó de forma exógena en el medio de crecimiento de plántulas de la línea GFP-ATG8f sin condiciones de estrés.

Para determinar la concentración de espermidina con un mayor efecto de inducción de la autofagia, pero que no sea perjudicial para el desarrollo correcto de las plántulas, se realizó un ensayo preliminar aplicando diferentes concentraciones al medio de crecimiento. A partir de este ensayo se determinó que la concentración óptima de aplicación exógena de espermidina era de 1mM [Materiales y métodos 1.3.1.6], ya que a una concentración de 2mM no se detecta un mayor efecto de inducción, y además podría estar perjudicando a la plántula desde otro punto de vista del desarrollo.

Como se observa en la figura 10 la aplicación de espermidina de forma exógena induce la autofagia, ya que en un medio sin ningún tipo de restricción nutritiva se observa un mayor número de autofagosomas en las células de la raíz de las plántulas tratadas en comparación con las plántulas no tratadas con espermidina y con sacarosa en el medio (control). Por otro lado, el ayuno de sacarosa supone un aumento en la autofagia, pero si además las plántulas son tratadas con espermidina el número de autofagosomas aumenta notablemente.

Por tanto, podemos confirmar: (i) la aplicación exógena de espermidina aumenta la autofagia en condiciones control, y (ii) se produce un efecto aditivo en el aumento de la autofagia cuando se aplica de forma exógena espermidina a plántulas GFP-ATG8f que crecen en ausencia de nutrientes.

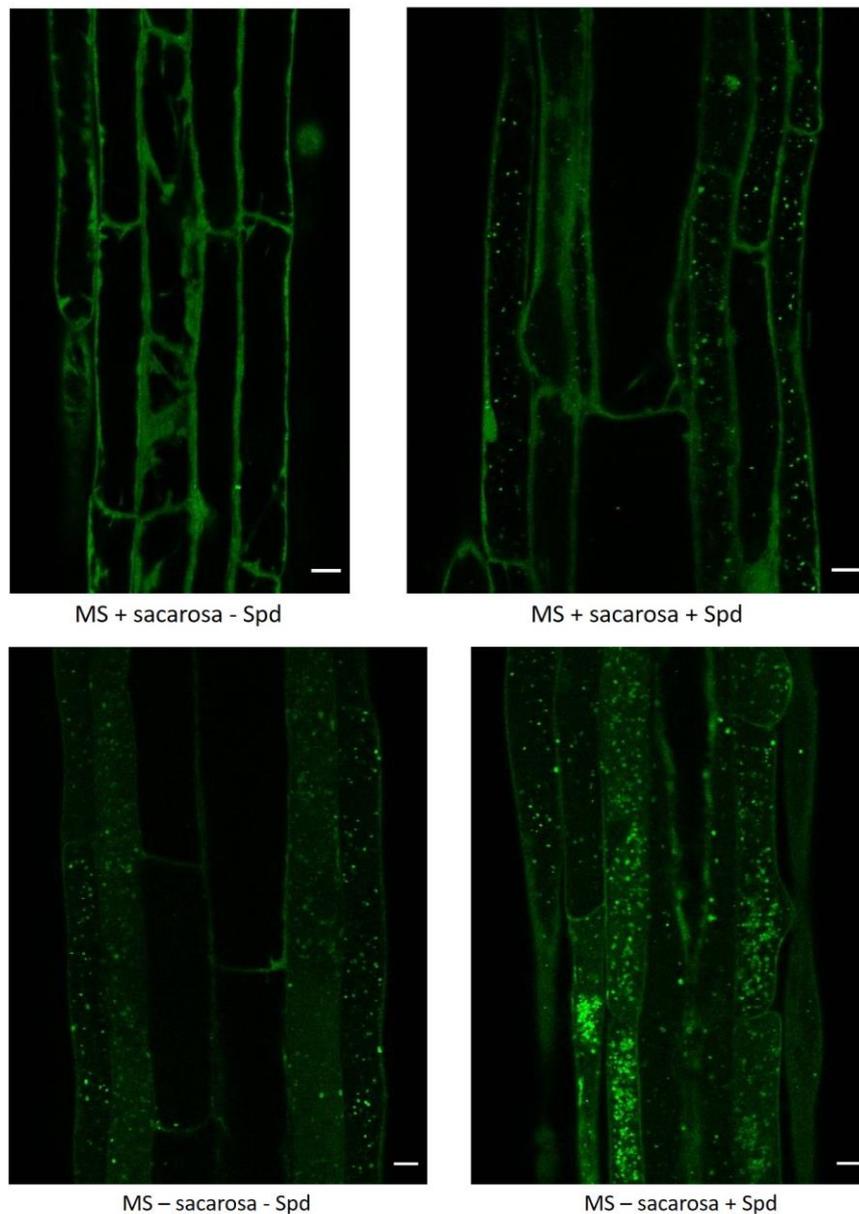


Figura 10. Tratamiento con espermidina de la línea GFP-ATG8f. Escala = 20 μm .

5. Estudios bioquímicos de la autofagia con la proteína NBR1

La autofagia puede ser tanto masiva de los contenidos citoplasmáticos como selectiva de orgánulos dañados, microbios intracelulares, agregados de proteínas, estructuras celulares y proteínas solubles específicas. Cabe destacar que la autofagia selectiva está mediada por adaptadores autofágicos como p62/SQSTM1 y NBR1. Por tanto, p62 y NBR1, además de ser elementos adaptadores en el proceso de autofagia, ellos mismos son sustratos selectivos de este proceso. Además, se conoce que los homólogos de NBR1 se distribuyen por todo el reino eucariota, mientras que p62 se limita al reino animal. Concretamente, la proteína NBR1 de *Arabidopsis thaliana* (AtNBR1) es más similar, en cuanto a la arquitectura de dominios y secuencia de aminoácidos, a NBR1 de mamíferos que a p62, sin embargo, se homopolimeriza a través del dominio PB1 como p62. Por tanto, AtNBR1 tiene propiedades híbridas de NBR1 y p62

de mamíferos. AtNBR1 tiene dos dominios UBA, pero sólo el que se encuentra en el extremo C-terminal es el que se une a la ubiquitina y permite su degradación. También se conoce que AtNBR1 se une a AtATG8 mediante un dominio LIR conservador y que requiere de la coexpresión de AtATG7. De manera que, AtNBR1 es un sustrato autofágico degradado en la vacuola dependiente de la polimerización del dominio PB1 y de la expresión de AtATG7 [20].

Con la finalidad de corroborar que el metabolito espermidina está implicado directamente en el proceso de autofagia y la induce mediante la interacción con sustratos de la vía de autofagia, y no de forma indirecta mediante otros procesos biológicos, se ha realizado un ensayo *Western blot* [Materiales y métodos 3.4] con un anticuerpo anti-NBR1 [Figuras 11 y 12].

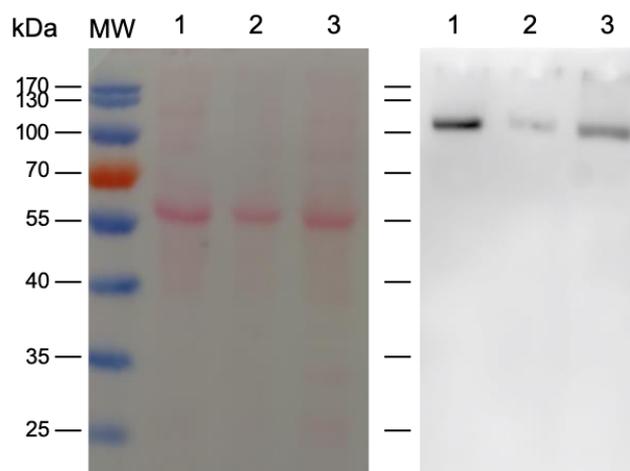


Figura 11. Análisis de autofagia por *Western blot* de muestras de plántulas de *Arabidopsis thaliana* Col0. El carril 1 corresponde a un extracto de plántulas Col0 crecidas en medio MS más sacarosa. El carril 2 corresponde a un extracto de plántulas Col0 crecidas en medio MS con sacarosa con adición exógena de 1mM de espermidina y el carril 3 corresponde a un extracto de plántulas Col0 en medio MS sin sacarosa. Panel izquierdo tinción Ponceau-S mostrando la banda correspondiente a Rubisco. Panel derecho *Western blot* de la misma membrana con anti-NBR1.

Como era de esperar en el control (carril 1) la cantidad de proteína NBR1 detectada es superior en comparación con las otras dos muestras, porque la autofagia no se ha activado, solo se da la autofagia basal para mantener la homeostasis de las células vegetales. En cambio, después de un tratamiento de restricción nutritiva la autofagia se induce y la intensidad de la banda correspondiente a la NBR1 en el gel del *Western blot* es menor que la del control indicando la activación de la autofagia. Por otro lado, cuando se aplica de forma exógena espermidina en el medio de crecimiento, la autofagia aún es mayor, ya que la cantidad de proteína NBR1 es mucho menor [Figura 11].

También se realizó este mismo ensayo *Western blot* con el mutante *atg5-1* de autofagia, el cual no puede formar autofagosomas, por tanto, no realiza autofagia. Estas semillas mutantes cedidas amablemente por el Dr. Yasin Dagdas se sometieron a las mismas condiciones que las plántulas Col0, con la finalidad de demostrar la especificidad de la actividad de espermidina en el proceso de autofagia que determina la estabilidad de NBR1. Como se observa en la figura 12 en todas las condiciones la cantidad de proteína NBR1 es igual o muy parecida, ya que estas plántulas no son capaces de realizar autofagia y la proteína se acumula, lo que sugiere que la degradación de NBR1 inducida por espermidina tiene lugar mediante la activación de autofagia.

No obstante, cabe mencionar que se necesitarían más réplicas del ensayo para poder confirmar los resultados obtenidos.

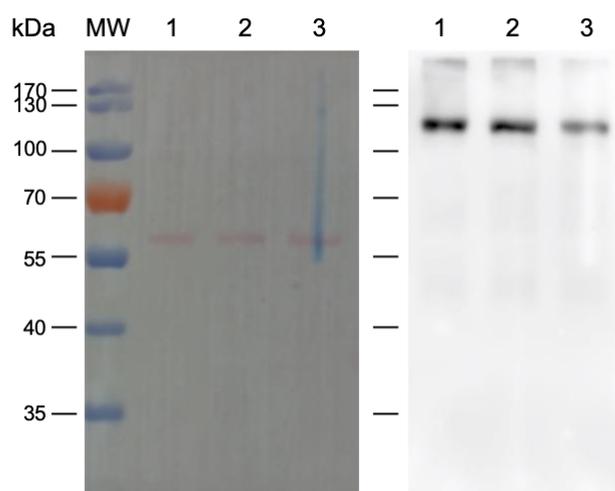


Figura 12. Análisis de autofagia por Western blot de muestras de plántulas de *Arabidopsis thaliana atg5-1*. El carril 1 corresponde a un extracto de plántulas mutantes crecidas en medio MS más sacarosa. El carril 2 corresponde a un extracto de plántulas mutantes crecidas en medio MS con sacarosa con adición exógena de 1mM de espermidina y el carril 3 corresponde a un extracto de plántulas *atg5-1* crecidas en medio MS sin sacarosa. Panel izquierdo tinción Ponceau-S mostrando la banda correspondiente a Rubisco. Panel derecho Western blot de la misma membrana con anti-NBR1.

6. Abordajes genéticos para el estudio de eIF5A en autofagia

En animales se dispone de mucha información sobre la maquinaria y los reguladores de la vía de la autofagia, sin embargo, en plantas no es así. Como se ha dicho anteriormente, uno de los reguladores de este proceso de reciclaje en animales es el factor de traducción eIF5A, que a su vez está regulado por el metabolito espermidina mediante la activación post-traduccional por hipusinación.

En nuestro laboratorio ya disponíamos de diferentes líneas mutantes de silenciamiento de la enzima DHS (siDHS) de *Arabidopsis thaliana* [16], de manera que se realizó el cruce con la línea transgénica GFP-ATG8f para obtener una herramienta genética interesante para el estudio del papel del factor eIF5A en la vía de la autofagia en plantas. [Materiales y métodos 1.3.2.3].

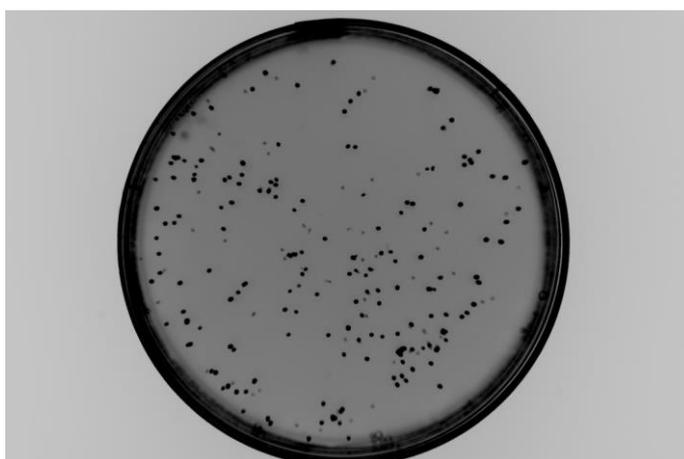


Figura 13. Selección de semillas fluorescentes (GFP). Imagen realizada con el equipo LAS3000 del servicio del IBMCP.

El cruzamiento se realizó mediante la aplicación manual de polen de dos líneas de silenciamiento de la enzima DHS (siDHS H6 y M11) a partir de estambres aislados de plantas donantes sobre ovarios de flores emasculadas en estadio previo a la fecundación (pre-antesis) de la planta

receptora GFP-ATG8f con la finalidad de obtener una línea doble transgénica homocigota. La línea de silenciamiento siDHS presenta como marcador genético la resistencia a higromicina [Hyg^R], mientras que la línea transgénica GFP-ATG8f presenta un marcador de transformación vegetal mediante la fusión transcripcional de la proteína GFP a un promotor específico de semilla. Por tanto, una vez obtenidas semillas del cruce se ponían a crecer en un medio MS con higromicina, pero antes de ponerlas a germinar, se observaban con la lupa y se marcaba qué semillas eran fluorescentes. De esta manera se consigue seleccionar las semillas dobles transgénicas de interés [Figura 13].

Siguiendo el esquema de la figura 14, a partir de la segunda generación se seleccionaron las semillas que presentaban fluorescencia GFP y además eran resistentes a higromicina, pero tan solo 1/16 serán homocigotas. Se cultivaron esas semillas seleccionadas para al final conseguir que todas las semillas recogidas sean homocigotas, pero este trabajo sigue en proceso.

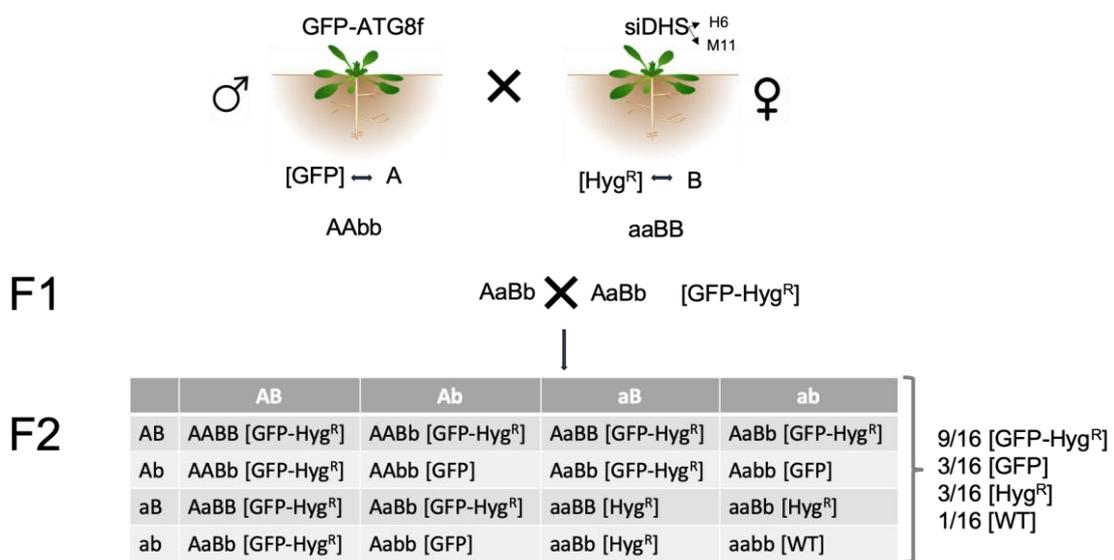


Figura 14. Esquema genético y fenotípico del cruzamiento entre siDHS y GFP-ATG8f.

Por otro lado, en paralelo también se ha realizado la transformación de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Col0 con la construcción generada en nuestro laboratorio mRFP-ATG8e [Materiales y métodos 1.3.2.2], para tener más herramientas para el estudio de la autofagia en plantas. Hay que tener en cuenta que durante el proceso de transformación se pueden insertar más de una copia de la fusión traduccional diseñada y además no sabemos qué genes puede estar afectando, ya que la inserción puede causar el *knock-out* o silenciamiento de un gen. En este caso, la selección solo se hará con el uso del antibiótico kanamicina (Kan^R, resistencia del plásmido Ti utilizado). Cabe mencionar que este trabajo también sigue en marcha.

DISCUSIÓN

En este trabajo hemos profundizado en el estudio de la autofagia en células vegetales, concretamente para determinar si la poliamina espermidina también participa en la regulación de esta vía de reciclaje interno como se ha descrito en animales [12]. Nuestros esfuerzos se han centrado en la caracterización de las líneas transgénicas GFP-ATG8 de *Arabidopsis thaliana* cedidas, en inducir este proceso fisiológico mediante el ayuno de nutrientes como la sacarosa y el nitrógeno, y determinar el papel regulador de la espermidina en la autofagia.

En primer lugar, la caracterización de las líneas transgénicas fluorescentes era necesaria para comprobar que realmente eran útiles como biomarcadores de la autofagia, ya que previamente en nuestro laboratorio se hicieron ensayos preliminares con el uso del colorante MDC (monodansilcadaverina) para el seguimiento de la autofagia *in vivo* en plantas como se había descrito en muchos estudios de mamíferos, pero los resultados obtenidos en nuestro laboratorio no eran reproducibles e incluso a veces no se observaba nada en el microscopio confocal. Esto es así, debido a que los colorantes isotrópicos como el MDC no son específicos en la tinción de estructuras relacionadas con la autofagia en plantas. Además, algunos autores afirman que los colorantes LTR (Lysotracker Red) y MDC no son capaces de teñir los autofagosomas en plantas [21]. Por otro lado, la expresión de la proteína ATG8 fusionada a la proteína verde fluorescente (GFP) parece ser una herramienta más fiable que las tinciones fluorescentes a la hora de investigar la dinámica de los autofagosomas en las células vegetales vivas [5] como se puede observar en las figuras 8 y 9. La proteína ATG8 es un buen marcador para monitorizar cualquier etapa de la autofagia, ya que es detectable desde el inicio hasta la degradación del autofagosoma en la vacuola. Sin embargo, es importante tener en cuenta que sólo se pueden diseñar las fusiones N-terminales de ATG8 debido a su procesamiento en el extremo C-terminal, la lipidación y el anclaje a la membrana del fagóforo. También hay que tener en cuenta, que al visualizar dicha construcción la forma modificada de ATG8 se asocia a la membrana autofagosomal, mientras que la forma no lipidada permanece en el citosol y genera una señal de fondo.

Una vez caracterizadas las líneas transgénicas de *A. thaliana*, se realizaron estudios de inducción de autofagia en condiciones de estrés, concretamente la restricción de nutrientes en el medio de crecimiento. Tanto en animales como en plantas, ya se había descrito que en condiciones de ayuno de nutrientes como la sacarosa y el nitrógeno, se produce un aumento de la autofagia, pero era necesario comprobar que las líneas GFP-ATG8 utilizadas también se comportaban como marcadores fiables. Como se puede observar en las figuras 8 y 9 las líneas GFP-ATG8e y GFP-ATG8f muestran una inducción de la autofagia bajo condiciones de ayuno de sacarosa y nitrógeno, ya que se observa un mayor número de autofagosomas fuera y dentro de las vacuolas vegetales.

Por otro lado, como se ha dicho anteriormente, el contenido de poliaminas aumenta notablemente en condiciones de estrés y en consecuencia se activan vías de defensa y supervivencia celular, entre ellas la vía de la autofagia. En animales, se ha descrito la participación del metabolito espermidina en la vía de la autofagia como regulador del factor de transcripción TFEB así como de la proteína ATG3 [Figura 2][17][19]. Este trabajo es, hasta la fecha, el primer estudio sobre la implicación de la espermidina en la autofagia de plantas. Hemos demostrado, por primera vez, que la espermidina induce la autofagia vegetal tanto en condiciones control como en condiciones de déficit de nutrientes y parece ser que lo hace participando de forma directa con sustratos de esta vía de reciclaje interno [Figuras 10, 11 y 12]. La posible participación del factor traduccional eIF5A en el proceso de autofagia vegetal será

abordado mediante el uso de las herramientas genéticas generadas en este trabajo con las plantas dobles mutantes (siDHS x GFP-ATG8f) homocigotas [Figuras 13 y 14].

La finalidad de este proyecto es poder generar, en el futuro, una herramienta biotecnológica que nos permita reducir el uso de fertilizantes y en consecuencia las emisiones de gases de efecto invernadero a la atmósfera y la contaminación de aguas y suelos. Esto se podría llegar a conseguir gracias al cultivo de plantas que potencien su método de reciclaje interno, es decir, la autofagia y la movilización de nutrientes mediante la sobreexpresión de la ruta de biosíntesis y señalización de la espermidina.

Este proyecto contribuye con al menos 2 de los 17 Objetivos de Desarrollo Sostenible de las Naciones Unidas: (i) poner fin al hambre, lograr la seguridad alimentaria y la mejora de la nutrición y promover la agricultura sostenible y (ii) adoptar medidas urgentes para combatir el cambio climático y sus efectos (tomando nota de los acuerdos celebrados en el foro de la Convención Marco de las Naciones Unidas sobre el Cambio Climático).

CONCLUSIONES

Con los resultados de este trabajo, podemos concluir:

- La aplicación exógena de espermidina en el medio de crecimiento en plantas de *Arabidopsis*, aumenta la autofagia en condiciones normales, visualizada mediante el marcador fluorescente GFP-ATG8.
- Se produce un efecto aditivo en el aumento de la autofagia cuando se aplica de forma exógena espermidina a plántulas que crecen en ausencia de sacarosa.
- La aplicación exógena del metabolito espermidina induce autofagia de forma directa sobre los sustratos de dicho proceso, como el caso de NBR1.
- La generación de plantas transgénicas dobles homocigotas (siDHS x GFP-ATG8f) permitirá en un futuro estudiar el papel del eje espermidina/eIF5A en la regulación del proceso de autofagia en *Arabidopsis*.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Material biológico, manipulación y condiciones de crecimiento

1.1. *Agrobacterium tumefaciens*

Se ha utilizado esta bacteria para la agro-transformación de *Arabidopsis thaliana* y los experimentos de expresión transitoria en *Nicotiana benthamiana*. Se utilizaron células químicamente competentes de la cepa de *A. tumefaciens* GV3101/pMP90. Para crecer *A. tumefaciens* se ha utilizado medio LB (16mg/ml de triptona, 10mg/ml de extracto de levadura y 10mg/ml de NaCl, esterilizado mediante autoclave a 120°C y 1 atmósfera de presión durante 20 minutos) a temperatura estándar de 28°C.

1.1.1. Transformación de *A. tumefaciens*

Las células químicamente competentes de la cepa GV3101/pM90 se prepararon según el protocolo de Chen *et al.* (1994) [22]. Se realizó la transformación de dichas células con la construcción mRFP-ATG8E (generada en el laboratorio del Dr. A.Ferrando) en un vector de clonación de 11.1kb [Figura 4], concretamente con 1µg de dicha construcción. La mezcla se incubó 10 minutos en hielo. Después, se congeló en nitrógeno líquido durante 5 minutos y se dejó descongelar durante 25 minutos a 37°C. Seguidamente, se añadió 1ml de LB que contenía 1µg/ml de los antibióticos de selección (gentamicina, rifampicina y espectinomicina) y se dejaron recuperar las células a 28°C durante 2-3 horas en agitación. Finalmente se sembraron las bacterias transformantes en el medio de selección compuesto por 40µg/ml de gentamicina, 100µg/ml de rifampicina y 50µg/ml de espectinomicina.

1.2. *Nicotiana benthamiana*

1.2.1. Cultivo y condiciones de crecimiento

Las plantas de *N. benthamiana* se cultivaron en el invernadero en una cámara de crecimiento bajo condiciones de día largo (16 horas de luz y 8 horas de oscuridad con una intensidad lumínica de 100-110µmol·m⁻²·s⁻¹) y una temperatura de 22°C.

1.2.2. Expresión transitoria en *N. benthamiana*

Para la expresión transitoria de la fusión traduccional mRFP-ATG8E se utilizó la técnica de agroinfiltración en plantas de *N. benthamiana* de entre tres y seis semanas de edad, como indica el protocolo de Belda *et al.* (2012) [23]. Lo ideal es trabajar con plantas de tres-cuatro semanas, cuando las hojas tienen un diámetro de entre 3 y 5cm desde la base de la hoja hasta la punta.

1.3. *Arabidopsis thaliana*

Como genotipo silvestre se utilizaron plantas de *A. thaliana* ecotipo *Col-0*, pero también se ha trabajado con mutantes de silenciamiento *siDHS* (Belda-Palazón *et al.* (2016)[24]) y diferentes líneas transgénicas GFP-ATG8: GFP-ATG8a, GFP-ATG8i, GFP-ATG8e y GFP-ATG8f, así como la línea mutante *atg5-1*, todas ellas cedidas amablemente por el Dr. Yasin Dagdas (Gregor Mendel Institute, Vienna).

1.3.1. Cultivo *in vitro*

1.3.1.1. Medios de cultivo

Para el crecimiento *in vitro* de *A. thaliana* se utilizó el medio *Murashige & Skoog* (MS) de composición 2.45g/l de sales MS (Duchefa Biochemie), 1.03g/l de MES y 1% de sacarosa ajustándose el pH a 5.7 con KOH. Para la solidificación del medio se añadió 1% de *Phyto agar* (Duchefa Biochemie). El medio se esterilizó mediante autoclave a 120°C y 1 atmósfera de presión durante 20 minutos. Cuando fue necesario (plantas *siDHS*), una vez atemperado el medio por

debajo de 50°C, se añadió el antibiótico adecuado (higromicina). Para el cultivo *in vitro* de *A. thaliana* se utilizaron placas de Petri de 14cm de diámetro.

1.3.1.2. Esterilización y siembra de las semillas

Se han seguido diferentes protocolos para la esterilización de semillas de *A. thaliana*:

- Esterilización mediante etanol

Se utilizó la solución de esterilización I (etanol 70%, Tritón X-100 0.005%) y la solución de esterilización II (etanol absoluto, en su defecto al 96%). En primer lugar, se añadió 1ml de solución I por cada 30-40µl de semillas en un tubo de 1.5ml, y se incubó durante 3-4 minutos mezclándose por inversión continua. Las semillas se decantaron hacia el fondo del tubo (manualmente o mediante un pulso de centrifuga a 12000g durante 30 segundos) y se eliminó el sobrenadante. Posteriormente se añadió 1ml de solución II y se volvió a mezclar por inversión durante 3-4 minutos más. Las semillas se decantaron hacia el fondo como se describe anteriormente y se recogieron mediante la pipeta para depositarlas sobre papel de filtro previamente autoclavado (120°C, 1atm de presión, 20 min), donde se dejaron secar durante 15 minutos en la cabina de flujo laminar.

- Esterilización mediante hipoclorito sódico

Se utilizó una solución de esterilización compuesta por el 30% de hipoclorito sódico (NaClO) y 0.02% de *Tween20*. En primer lugar, se añadió 1ml de la solución de esterilización por cada 30-40µl de semillas en un tubo de 1.5ml y se incubó durante 10 minutos en agitación o mezclándose por inversión continua. A continuación, se realizó un pulso de centrifuga (máximo 5000 revoluciones por minuto). Seguidamente y en la cabina de flujo laminar se realizaron 5 lavados con 1ml de agua miliQ estéril.

La siembra en placa de las semillas se realizó con ayuda de varillas de vidrio o puntas de pipeta estériles. Las placas se sellaron con cinta y se dejaron estratificar durante 48 horas a 4°C en oscuridad, tras los cuales se llevaron a la cámara de cultivo *in vitro*.

1.3.1.3. Condiciones de crecimiento *in vitro*

El crecimiento estándar *in vitro* de *A. thaliana* se realizó en una cámara de cultivo a temperatura de 24°C en condiciones de día largo, es decir, 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad con una intensidad lumínica de 100-110µmol·m⁻²·s⁻¹.

Para los tratamientos realizados y en posterior observación de las raíces en el microscopio confocal las plántulas *A. thaliana* de 4 días de edad germinadas en medio MS se transfirieron a medio MS líquido de la misma composición sin añadir el 1% de *Phyto agar*. A continuación, las plántulas se dejaron dos días a 24°C para la adaptación al nuevo medio líquido y después se hicieron los tratamientos pertinentes.

1.3.1.4. Tratamiento sin sacarosa en líneas transgénicas GFP-ATG8

Una vez las plántulas se han adaptado al medio MS líquido, se cambia el medio de nuevo a medio MS sin sacarosa líquido. Con un día de tratamiento es suficiente para poder observar el efecto de déficit de carbono en el microscopio confocal.

1.3.1.5. Tratamiento sin nitrógeno en líneas transgénicas GFP-ATG8

Una vez las plántulas se han adaptado al medio MS líquido, se cambia a medio MS + N (305mg/l de MS-P-K-N, 825mg/l de NH₄NO₃, 950mg/l de KNO₃, 46.55mg/l de KCl, 85mg/l de KH₂PO₄, 10g/l de sacarosa y 1.3g/l de MES ajustándose el pH a 5.7 con KOH) para el control. Para las plántulas

sometidas a estrés se cambia a medio MS – N compuesto por 305mg/l de MS-P-K-N, 46.55mg/l de KCl, 85mg/l de KH₂PO₄, 10g/l de sacarosa y 1.3g/l de MES ajustándose el pH a 5.7 con KOH. Para poder observar las plántulas al microscopio confocal se requiere de mínimo 3 días de tratamiento.

1.3.1.6. Tratamiento con espermidina en líneas transgénicas GFP-ATG8

Una vez las plántulas se han adaptado al medio MS líquido y han sido estresadas por déficit de carbono y/o nitrógeno, se añade 1mM de espermidina unas 16h aproximadamente antes de la observación en el microscopio confocal.

1.3.2. Cultivo en invernadero

1.3.2.1. Sustrato, siembra y condiciones de crecimiento

El cultivo de *A. thaliana* en el invernadero se realizó en alveolos de poliestireno rellenos con una mezcla de 50% turba, 25% vermiculita y 25% perlita. Tras la siembra directa sobre el sustrato, los alveolos se cubrieron de plástico transparente durante 2-4 días para mantener condiciones de humedad adecuadas. Una vez germinadas, las plantas crecieron en la cámara de día largo con las mismas condiciones de crecimiento que en cultivo *in vitro*.

Cuando la intención era la propagación de semillas, las plantas que habían crecido durante 1 semana en condiciones de cultivo *in vitro* se trasplantaron a alveolos de plástico para el crecimiento para el crecimiento en invernadero en las condiciones detalladas anteriormente.

1.3.2.2. Transformación por agro-infección

La transformación de *A. thaliana* Col0 y mutante *siDHS*, se realizó mediante *A. tumefaciens* por el método “floral dip” según el protocolo de Clough *et al* (1998) [25].

1.3.2.3. Cruzamiento la línea transgénica GFP-ATG8f con el mutante *siDHS*

El cruzamiento se realizó mediante la aplicación manual de polen de dos líneas de silenciamiento de la enzima DHS (*siDHS* H6 y M11) a partir de estambres aislados de plantas donantes sobre ovarios de flores emasculadas en estadio previo a la fecundación (pre-antesis) de la planta receptora GFP-ATG8f.

2. Técnicas de microscopía

La observación de la expresión transitoria de la construcción mRFP-ATG8E en hojas de *N. benthamiana* y la detección de autofagosomas en raíces de las líneas transgénicas GFP-ATG8 de *A. thaliana* (cedidas por el Dr. Y. Dagdas) se realizó mediante microscopía confocal con el equipo LSM 780 (Carl Zeiss, Jena, Germany). Las condiciones de visualización fueron las siguientes: objetivo C-Apochromat 40X en agua; laser de argón a 488nm; filtro tipo MBS 488/561; longitud de onda entre 536 y 490nm. Las imágenes se capturaron y se procesaron mediante el programa ZEN *Imaging Software* (Carl Zeiss) y posteriormente con el programa de libre distribución FIJI (ImageJ).

Por otro lado, para la observación del marcador YFP en las semillas obtenidas del cruce entre plantas de *A. thaliana siDHS* y transgénicas GFP-ATG8 se utilizó la lupa Leica MZZ16F (Objetivo PLAN 0.5X con filtro GFP2).

3. Técnicas de análisis y manipulación de proteínas

3.1. Extracción de proteínas de *A. thaliana*

El material vegetal se pulverizó con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino con la ayuda de un mortero previamente autoclavado (120°C, 1 atm, 20 minutos). Las muestras recogidas en tubos de 1.5-2 ml se mezclaron con 1 ml de tampón extracción por cada gramo de peso fresco

pulverizado anteriormente. El tampón de extracción se compuso de 50 mM Tris-HCl pH 7.6, 10% glicerol, 1 mM DTT, 1 mM EDTA, 0.5% NP-40 (Igepal® CA-630, Sigma-Aldrich) y PIC para plantas (Protein Inhibitor Cocktail, Sigma-Aldrich) 30 µl por cada gramo de peso fresco. La mezcla se incubó en hielo durante 30 minutos, mezclando ocasionalmente por inversión. Para eliminar los restos vegetales se centrifugó 2-3 veces a 3000 g 10 minutos a 4°C, quedándonos con el sobrenadante en cada uno de los pasos, y manteniendo la muestra en frío todo el tiempo. La cantidad de proteínas en cada uno de los extractos obtenidos se cuantificó mediante el método Bradford (Bio-Rad) de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Sigma-Aldrich). La cantidad deseada del extracto (aproximadamente 60 µg de proteína total en el caso de las muestras Col-0 y unos 30 µg de proteína total para las muestras extraídas de las líneas mutante *atg5-1*) se mezcló con tampón de carga LB 5x (7.5% SDS, 0.1% ditioeritritol y 0.3M Tris llevado a pH 6.8 con ClH) para realizar la electroforesis SDS-PAGE.

3.2. Electroforesis SDS-PAGE

Las muestras mezcladas con el tampón de carga adecuado se hirvieron durante 5-10 minutos a 95°C, se dejaron enfriar en hielo 2-3 minutos, y se centrifugaron durante 30 segundos a 12000g.

Se utilizó el sistema “*Mini-Protean® Tetra handcast systems*” de Bio-Rad. El gel separador se compuso de 10% *acrylamide-bis-acrylamide* (Sigma-Aldrich); 375 mM Tris-HCl pH 8.8, 0.1% SDS, 0.2% TEMED y 0.08% persulfato amónico. El gel empaquetador se compuso de 4% *acrylamide-bis-acrylamide*, 125 mM Tris-HCl pH 6.8, 0.1% SDS, 0.8% TEMED y 0.1% persulfato amónico.

Tras la electroforesis los geles se utilizaron para tinción Coomassie o para realizar ensayos *Western Blot*.

3.3. Tinción Coomassie

El gel de electroforesis se incubó durante al menos 1 hora con “*Brilliant Blue R concentrate*” (Sigma-Aldrich), compuesto por 0.25% (w/v) *Brilliant Blue R*, 40% metanol y 7% ácido acético. Posteriormente se procedió al desteñido del gel mediante una solución compuesta por 10% metanol y 10% ácido acético, con la que se incubó el gel hasta visualizar las bandas de la forma deseada.

3.4. Análisis *Western Blot* (WB)

Tras la realización de la 1D-E se procedió a la transferencia en condiciones húmedas de las proteínas del gel a una membrana (de PVDF “*Immun-Blot® PVDF Membrane*”), utilizando el sistema “*Mini Trans-Blot® Cell*” (Bio-Rad). El tampón de transferencia empleado se compuso de 5g/l Tris base y 3.1g/l de ácido bórico. Previamente a la transferencia, la membrana de PVDF se activó con metanol 100% siguiendo las instrucciones del fabricante. La transferencia se realizó durante toda la noche a temperatura ambiente a baja intensidad con un voltaje fijo de 12 V. El tampón de transferencia se agitó suavemente durante toda la transferencia con ayuda de un agitador magnético.

Tras la transferencia, la membrana se tiñó con “*Ponceau S solution*” de Sigma-Aldrich durante 10 minutos, y se destiñó con ácido acético 1%. Se comprobó que las proteínas se habían transferido correctamente, y se realizaron lavados sucesivos con TBS 1x (150mM ClNa y 20mM Tris-ClH a pH 7.6) hasta la completa eliminación del colorante.

Posteriormente se continuó con la detección inmunológica de las proteínas de interés. Todas las incubaciones posteriores se realizaron a temperatura ambiente con ayuda de una plataforma agitadora. Se realizó un primer paso de bloqueo de la membrana, incubando 1-2 horas con

tampón TBSTL (TBS 1x, 5% leche desnatada, 0.05% *Tween20*). Seguidamente se incubó como mínimo 1 hora con la disolución adecuada del anticuerpo primario de interés (policlonal NBR1 1:4000, Agrisera) en TBSTL. Se realizaron 3 lavados de 10 minutos con TBSTL, y se procedió a la incubación durante al menos 1 hora con una disolución del anticuerpo secundario adecuado (mouse anti-*rabbit* IgG-HRP 1:15000, Santa Cruz Biotechnology) en TBSTL. Posteriormente se realizaron 3 lavados con TBSTL y un último lavado con TBS. Finalmente, se procedió al revelado del WB.

El revelado se realizó utilizando el kit de detección quimioluminiscente “*Amersham™ ECL Western Blotting analysis system*” (GE Healthcare) o, para detecciones que requirieron una mayor sensibilidad, el sistema “*Select*” (GE Healthcare), siguiendo las instrucciones del fabricante. La detección de la señal por quimioluminiscencia se realizó mediante el sistema de imagen digital LAS3000 del servicio del IBMCP (Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas) siguiendo las instrucciones y recomendaciones del fabricante.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] "UNITED NATIONS Climate Change Summit."
- [2] "UNITED NATIONS UN Climate Change Summit 2019." [Online]. Available: <https://www.un.org/en/climatechange/un-climate-summit-2019.shtml>. [Accessed: 21-Nov-2019].
- [3] "Goal 2: Zero Hunger - United Nations Sustainable Development." [Online]. Available: <https://www.un.org/sustainabledevelopment/hunger/>. [Accessed: 21-Nov-2019].
- [4] M. Havé, A. Marmagne, F. Chardon, and C. Masclaux-Daubresse, "Nitrogen remobilization during leaf senescence: Lessons from Arabidopsis to crops," *J. Exp. Bot.*, vol. 68, no. 10, pp. 2513–2529, 2017, doi: 10.1093/jxb/erw365.
- [5] J. Marion, R. Le Bars, L. Besse, H. Batoko, and B. Satiat-Jeunemaitre, "Multiscale and Multimodal Approaches to Study Autophagy in Model Plants," *Cells*, vol. 7, no. 1, p. 5, Jan. 2018, doi: 10.3390/cells7010005.
- [6] Z. Xie and D. J. Klionsky, "Autophagosome formation: Core machinery and adaptations," *Nature Cell Biology*, vol. 9, no. 10, pp. 1102–1109, Oct-2007, doi: 10.1038/ncb1007-1102.
- [7] W. Wang, M. Xu, G. Wang, and G. Galili, "Autophagy: An Important Biological Process That Protects Plants from Stressful Environments," *Front. Plant Sci.*, vol. 7, Jan. 2017, doi: 10.3389/fpls.2016.02030.
- [8] D. Hofius *et al.*, "Autophagic Components Contribute to Hypersensitive Cell Death in Arabidopsis," *Cell*, vol. 137, no. 4, pp. 773–783, May 2009, doi: 10.1016/j.cell.2009.02.036.
- [9] K. Yoshimoto *et al.*, "Autophagy negatively regulates cell death by controlling NPR1-dependent salicylic acid signaling during senescence and the innate immune response in arabidopsis," *Plant Cell*, vol. 21, no. 9, pp. 2914–2927, 2009, doi: 10.1105/tpc.109.068635.
- [10] H. Hanaoka *et al.*, "Leaf senescence and starvation-induced chlorosis are accelerated by the disruption of an Arabidopsis autophagy gene," *Plant Physiol.*, vol. 129, no. 3, pp. 1181–1193, 2002, doi: 10.1104/pp.011024.
- [11] S. Michaeli, G. Galili, P. Genschik, A. R. Fernie, and T. Avin-Wittenberg, "Autophagy in Plants - What's New on the Menu?," *Trends in Plant Science*, vol. 21, no. 2. Elsevier Ltd, pp. 134–144, 01-Feb-2016, doi: 10.1016/j.tplants.2015.10.008.
- [12] A. M. Leidal, B. Levine, and J. Debnath, "Autophagy and the cell biology of age-related disease," *Nature Cell Biology*, vol. 20, no. 12. Nature Publishing Group, pp. 1338–1348, 01-Dec-2018, doi: 10.1038/s41556-018-0235-8.
- [13] J. Soto-Burgos and D. C. Bassham, "SnRK1 activates autophagy via the TOR signaling pathway in Arabidopsis thaliana," *PLoS One*, vol. 12, no. 8, p. e0182591, Aug. 2017, doi: 10.1371/journal.pone.0182591.
- [14] E. Henry, N. Fung, J. Liu, G. Drakakaki, and G. Coaker, "Beyond Glycolysis: GAPDHs Are Multi-functional Enzymes Involved in Regulation of ROS, Autophagy, and Plant Immune Responses," *PLOS Genet.*, vol. 11, no. 4, p. e1005199, Apr. 2015, doi: 10.1371/journal.pgen.1005199.

- [15] S. A. Dmitrieva *et al.*, "Spermine Induces Autophagy in Plants: Possible Role of NO and Reactive Oxygen Species," *Dokl. Biochem. Biophys.*, vol. 483, no. 1, pp. 341–343, Nov. 2018, doi: 10.1134/S1607672918060121.
- [16] B. Belda Palazón, "Hipusinación del factor de traducción eIF5A dependiente de poliaminas," Universitat Politècnica de València, Valencia (Spain), 2014.
- [17] L. B. Frankel, "EIF5A mediates autophagy via translation of ATG3," *Autophagy*, vol. 14, no. 7. Taylor and Francis Inc., pp. 1288–1289, 03-Jul-2018, doi: 10.1080/15548627.2018.1491213.
- [18] H. Zhang *et al.*, "Polyamines Control eIF5A Hypusination, TFEB Translation, and Autophagy to Reverse B Cell Senescence," *Mol. Cell*, vol. 76, no. 1, pp. 110-125.e9, Oct. 2019, doi: 10.1016/j.molcel.2019.08.005.
- [19] D. R. Green, "Polyamines and Aging: A CLEAR Connection?," *Molecular Cell*, vol. 76, no. 1. Cell Press, pp. 5–7, 03-Oct-2019, doi: 10.1016/j.molcel.2019.09.003.
- [20] S. Svenning, T. Lamark, K. Krause, and T. Johansen, "Plant NBR1 is a selective autophagy substrate and a functional hybrid of the mammalian autophagic adapters NBR1 and p62/SQSTM1," *Autophagy*, vol. 7, no. 9, pp. 993–1010, Sep. 2011, doi: 10.4161/auto.7.9.16389.
- [21] E. A. Merkulova, A. Guiboileau, L. Naya, C. Masclaux-Daubresse, and K. Yoshimoto, "Assessment and Optimization of Autophagy Monitoring Methods in Arabidopsis Roots Indicate Direct Fusion of Autophagosomes with Vacuoles," *Plant Cell Physiol.*, vol. 55, no. 4, pp. 715–726, Apr. 2014, doi: 10.1093/pcp/pcu041.
- [22] H. Chen, R. S. Nelson, and J. L. Sherwood, "Enhanced recovery of transformants of *Agrobacterium tumefaciens* after freeze-thaw transformation and drug selection.," England, Apr. 1994.
- [23] B. Belda-Palazón *et al.*, "Aminopropyltransferases Involved in Polyamine Biosynthesis Localize Preferentially in the Nucleus of Plant Cells," *PLoS One*, vol. 7, no. 10, p. e46907, Oct. 2012, doi: 10.1371/journal.pone.0046907.
- [24] B. Belda-Palazón, C. Almendáriz, E. Martí, J. Carbonell, and A. Ferrando, "Relevance of the Axis Spermidine/eIF5A for Plant Growth and Development," *Front. Plant Sci.*, vol. 7, Mar. 2016, doi: 10.3389/fpls.2016.00245.
- [25] S. J. Clough and A. F. Bent, "Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*," *Plant J.*, vol. 16, no. 6, pp. 735–743, Dec. 1998, doi: 10.1046/j.1365-3113x.1998.00343.x.