



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Instituto Universitario Mixto de Biología Molecular y
Celular de Plantas

Regulación por fosforilación del factor traduccional eIF5A2
y su implicación en el proceso de autofagia.

Trabajo Fin de Máster

Máster Universitario en Biotecnología Molecular y Celular de
Plantas

AUTOR/A: Narvaez Medina, Katherine Shirley

Tutor/a: Mulet Salort, José Miguel

Director/a Experimental: Ferrando Monleón, Alejandro Ramón

CURSO ACADÉMICO: 2024/2025

RESUMEN

La regulación de la proteostasis (homeostasis de proteínas) en plantas es un mecanismo clave de la capacidad de las mismas para la tolerancia a diversos tipos de estrés ambiental. Entre los mecanismos reguladores de la proteostasis, las modificaciones post-traduccionales de las proteínas y su degradación juegan papeles fundamentales. En nuestro laboratorio, hemos estudiado previamente la modificación post-traducciona del factor de traducción eIF5A por hipusinación y su importancia en la biosíntesis de proteínas. Además de la modificación por hipusinación de la K50 en *Arabidopsis* también se ha descrito que la modificación por fosforilación de la S2 tiene importancia sobre la actividad de eIF5A. Esta fosforilación de la S2 está regulada aguas arriba por la luz y por el eje SnRK1/TOR. Para comprender mejor la relevancia biológica de esta modificación post-traducciona, hemos generado plantas transgénicas con versiones fosfomiméticas (S2D) y versiones no fosforilables (S2A) de la proteína eIF5A, cuyos fenotipos estan siendo analizados en la actualidad. Por otro lado, en colaboración con otros grupos extranjeros, hemos identificado una interacción física entre eIF5A y la proteína ATG8, validada por BiFC y Y2H. Los objetivos de este trabajo son profundizar en el estudio de la interacción con los mutantes S2A y S2D, así como comprender el significado biológico de dicha interacción, en especial la posibilidad de que eIF5A2 sea sustrato de degradación por autofagia. Además, proponemos analizar la localización subcelular de dichas versiones mutantes fusionadas a GFP en plantas transgénicas.

Palabras clave: eIF5A, ATG8, fosforilación, autofagia.

ABSTRACT

The regulation of proteostasis (protein homeostasis) in plants is a key mechanism of their ability to tolerate various types of environmental stress. Among the regulatory mechanisms of proteostasis, post-translational modifications of proteins and their degradation play fundamental roles. In our laboratory, we have previously studied the post-translational modification of the translation factor eIF5A by hypusination and its importance in protein biosynthesis. In addition to the modification by hypusination of K50 in *Arabidopsis*, it has also been described that the modification by phosphorylation of S2 is important for the activity of eIF5A. This S2 phosphorylation is regulated upstream by light and by the SnRK1/TOR axis. To better understand the biological relevance of this post-translational modification, we have generated transgenic plants with phosphomimetic versions (S2D) and non-phosphorylatable versions (S2A) of the eIF5A protein, whose phenotypes are currently being analyzed. On the other hand, in collaboration with other foreign groups, we have identified a physical interaction between eIF5A and the ATG8 protein, validated by BiFC and Y2H. The objectives of this work are to deepen the study of the interaction with the S2A and S2D mutants, as well as to understand the biological meaning of said interaction, especially the possibility that eIF5A2 is a substrate for degradation by autophagy. Furthermore, we propose to analyze the subcellular localization of these mutant versions fused to GFP in transgenic plants.

Keywords: eIF5A, ATG8, phosphorylation, autophagy.

Anexo al Trabajo de Fin de Máster: Relación del trabajo con los Objetivos de Desarrollo Sostenible de la agenda 2030.

Grado de relación del trabajo con los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS).

Objetivos de Desarrollo Sostenibles	Alto	Medio	Bajo	No procede
ODS 1. Fin de la pobreza.		X		
ODS 2. Hambre cero.	X			
ODS 3. Salud y bienestar.		X		
ODS 4. Educación de calidad.				X
ODS 5. Igualdad de género.				X
ODS 6. Agua limpia y saneamiento.				X
ODS 7. Energía asequible y no contaminante.				X
ODS 8. Trabajo decente y crecimiento económico.				X
ODS 9. Industria, innovación e infraestructuras.				X
ODS 10. Reducción de las desigualdades.				X
ODS 11. Ciudades y comunidades sostenibles.				X
ODS 12. Producción y consumo responsables.				X
ODS 13. Acción por el clima.	X			
ODS 14. Vida submarina.				X
ODS 15. Vida de ecosistemas terrestres.	X			
ODS 16. Paz, justicia e instituciones sólidas.				X
ODS 17. Alianzas para lograr objetivos.		X		

Descripción de la alineación del TFM con los ODS con un grado de relación más alto.

Dada la problemática del cambio climático, la mejora genética de especies de cultivo es una alternativa de solución ante estos cambios para la mejora en seguridad alimentaria. Es por eso el uso de plantas modelos que nos permiten realizar dichas mejoras biotecnológicas, así como la transferencia de genes responsables de caracteres útiles como alto rendimiento, resistencia a plagas y/o enfermedades o la tolerancia a condiciones de estrés. Haciendo uso de estas herramientas en la biotecnología de plantas mejoramos en su adaptación al cambio climático, optimizando la vida de ecosistemas terrestres. Además la generación de estos proyectos conllevan a la alianza con instituciones, universidades, empresas y otros para lograr un fin común.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a Dios, que me dio la fortaleza, salud, capacidad y paciencia necesaria para llegar hasta este momento y culminar con éxito este sueño.

A mi familia, les expreso mi más profundo agradecimiento. Mis padres, Ana María y Elisban, por su incondicional apoyo, por creer en mí y por impulsarme siempre a perseguir mis sueños. A mis hermanas menores, Lesly y Eliana gracias por su comprensión y su apoyo constante. Su cariño ha sido una fuente constante de fortaleza para mí.

Un agradecimiento especial a mi asesor, Alejandro, por brindarme la oportunidad de formar parte del laboratorio. Su dedicación, paciencia infinita y generosidad al compartir sus conocimientos que han sido fundamentales para mi desarrollo académico y personal. Aprecio profundamente el tiempo y las ganas que ha invertido en guiarme durante este proceso.

También quiero agradecer al profesor Borja y amigos del laboratorio Adela, Yolanda, Jose y Antonio. Sus aportes, experiencias compartidas y su disposición para resolver mis dudas, junto con sus palabras de ánimo, han sido de gran ayuda.

A mis amigas Julieta, Yolanda y Sara gracias por estar siempre presentes, tanto en los momentos difíciles como alegres, su amistad ha sido un regalo invaluable que atesoraré siempre. Además a Kevin, gracias por tu apoyo y colaboración desde Perú; valoro nuestra amistad y tu disposición para ayudarme en los momentos que lo necesité.

Finalmente, agradecida con mi país Perú a través de PRONABEC, porque sin su apoyo este sueño, que en algún momento parecía tan lejano, no habría sido posible. Gracias por abrirme las puertas hacia esta oportunidad única.

El último espacio es para agradecer a mis pequeños de cuatro patas a quienes les digo que cumplí mi promesa. En memoria de Oreó, Chemo y Peque. Además de Matias, Lucy, Yoco, Zeus y Pochito quienes esperan mi regreso.

INDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
AGRADECIMIENTOS	4
ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS	6
ABREVIATURA	7
I. INTRODUCCIÓN	8
II. HIPÓTESIS	14
III. OBJETIVOS	14
IV. RESULTADOS	15
4.1 Interacción entre eIF5A2 y ATG8	15
4.1.1 Yeast Two Hybrid (Y2H)	15
4.1.2 Bimolecular Fluorescent Complementation (BiFC)	17
4.2 eIF5A2 como sustrato de autofagia	24
4.3 Obtención de líneas transgénicas eIF5A2-GFP	25
4.3.1 Caracterización molecular de las líneas transgénicas eIF5A2-GFP	27
V. DISCUSIÓN	30
VI. CONCLUSIONES	34
VII. MATERIALES Y MÉTODOS	35
7.1 Material biológico y condiciones de crecimiento	35
7.1.1 <i>E. coli</i>	35
7.1.2 Levadura	35
7.1.3 <i>Nicotiana benthamiana</i>	36
7.1.4 <i>Arabidopsis thaliana</i>	37
7.2 Técnicas de manipulación y análisis de ADN	38
7.2.1 Técnica de clonación	38
7.2.2 Extracción de ADN plasmídico	39
7.2.3 Análisis de restricción	39
7.2.4 Geles de electroforesis de ADN	39
7.3 Técnicas de manipulación y análisis de proteínas.	39
7.3.1 Extracción de proteínas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	39
7.3.2 Geles de electroforesis SDS-PAGE y transferencia	40
7.3.3 Análisis Western Blot (WB)	40
7.4 Técnicas de microscopía confocal.	41
BIBLIOGRAFIA	42
ANEXO	45

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de los diferentes estreses ambientales a los que están sometidas las plantas.....	8
Figura 2. Esquema del proceso de autofagia.....	9
Figura 3. Regulación de la autofagia por la proteína eIF5A.....	11
Figura 4. Estudio de la interacción entre eIF5A y las diferentes isoformas de ATG8 mediante Y2H.....	11
Figura 5. Estudio de la interacción de eIF5A entre las diferentes isoformas de ATG8 mediante BiFC.....	12
Figura 6. Heatmap del análisis de la dinámica de la fosforilación de proteínas ribosomales y de los factores de traducción eIF5A2 y eIF5A3.....	13
Figura 7. La estabilidad de eIF5A en condiciones de alteración genética y farmacológica.....	13
Figura 8. Clonación para Y2H.....	15
Figura 9. Resultados del estudio de interacciones eIF5A con ATG8e mediante Y2H.....	16
Figura 10. Controles para ensayos BiFC con ATG8e.....	18
Figura 11. Ensayo de BiFC con ATG8e y eIF5A2.....	19
Figura 12. Controles para ensayos BiFC con ATG8i.....	20
Figura 13. Ensayo de BiFC con ATG8e y eIF5A2.....	21
Figura 14. Controles para ensayos BiFC con ATG8h.....	22
Figura 15. Ensayo de BiFC con ATG8e y eIF5A2.....	23
Figura 16. Ensayo de estabilidad de eIF5A en condiciones de oscuridad como inductor de autofagia.....	24
Figura 17. Esquema del T-DNA de los plásmidos utilizados para obtención de plantas transgénica.....	25
Figura 18. Esquema del proceso de obtención de líneas transgénicas.....	26
Figura 19. Identificación fenotípica de plantas transgénicas.....	26
Figura 20. Visualización de fluorescencia en plantas transgénicas.....	28
Figura 21. Detección inmunológica por WB de las proteínas eIF5A y GFP en plantas transgénicas.....	29
Figura 22. Regulación hipotética de eIF5A por el eje regulador SnRK1/TOR y su estado de fosforilación en la S2 en relación al proceso de autofagia.....	33

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Esquema de la combinaciones de ensayos del BiFC en <i>N. benthamiana</i>	17
Tabla 2. Resumen de las líneas transgénicas T2 seleccionadas.....	29
Tabla 3. Plásmidos de entradas y destino utilizados para la clonación de GATEWAY.....	39
Tabla 4. Análisis de segregación de las líneas GFP (T2).....	45
Tabla 5. Análisis de segregación de las líneas eIF5A2 ^{WT} -GFP (T2).....	46
Tabla 6. Análisis de segregación de las líneas eIF5A2 ^{S2A} -GFP (T2).....	46
Tabla 7. Análisis de segregación de las líneas eIF5A2 ^{S2D} -GFP (T2).....	47

ABREVIATURA

A. thaliana – *Arabidopsis thaliana*

A/Ala – Alanina

AIM – motivos de interacción de la familia de *ATG8*

ATG – genes relacionados con la autofagia (*AuTophagy-related*)

BiFC – complementación biomolecular fluorescente

Y2H – sistema del doble híbrido en levadura

CK2 – Caseína quinasa 2 (*Casein kinase 2*)

Col-0 – ecotipo Columbia-0 de *A. thaliana*

DHS – Desoxihipusina sintasa

DOHH – Desoxihipusina hidroxilasa Fe (II)-dependiente

E. coli – *Escherichia coli*

eIF5A – Factor de iniciación traduccional eucariótico 5A (eukaryotic initiation factor)

GFP – proteína verde fluorescente (*Green Fluorescent Protein*)

Hyp - Hipusina

MS – medio *Murashige and Skoog* basal

PTMs – Modificaciones post-traduccionales (Post-Translational Modifications)

S/Ser – Serina

S2A – fosfomutante; mutación de sustitución del residuo S2 por A

S2D – mutante fosfomimético; mutación de sustitución del residuo S2 por D V

SnRK1 – Quinasa relacionada con la sacarosa no fermentadora (*Sucrose non-fermenting related kinase*)

Spd - Espermidina

T2/T3 – generación 2 y 3 de plantas transgénicas

TOR – Diana de rapamicina (*Target of rapamycin*)

WB – Western Blot

GFP – Green Fluorescent Protein

PML – Promyelocytic leukemia

I. INTRODUCCIÓN

Las plantas son organismos de naturaleza sésil que han desarrollado mecanismos con los que adaptarse y sobrevivir, para así responder frente a los diferentes cambios ambientales tanto abióticos como bióticos (Fig. 1), siendo las proteínas las principales moléculas en sufrir su efecto. Estas moléculas participan de forma activa en la regulación del desarrollo y el crecimiento, pero bajo situaciones de estrés experimentan cambios en la conformación, la localización subcelular o la estabilidad que afectan su actividad dando como resultado la formación de proteínas mal plegadas o no funcionales y/o orgánulos celulares dañados o no deseados cuya acumulación es deletérea (Zhang *et al.*, 2020) que deberán ser eliminados para mantener la homeostasis-proteica (proteostasis).

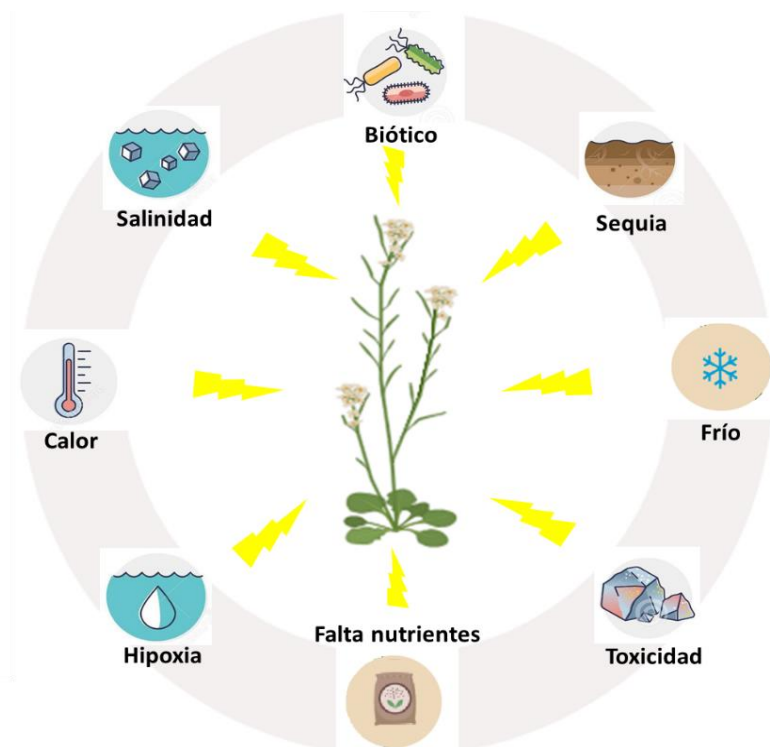


Figura 1. Esquema de los diferentes estreses ambientales a los que están sometidas las plantas. Esquema realizado con software BioRender.

Para mantener una correcta proteostasis, las plantas han desarrollado sistemas de control dinámicos y mecanismos de reciclaje, siendo el sistema ubiquitina-proteosoma (UPS) y la autofagia, los más importantes y ampliamente conservados en los organismos eucariotas (Sharma *et al.*, 2024). El UPS es una vía proteolítica primaria para proteínas de vida corta y altamente reguladas, mientras la autofagia es un mecanismo de degradación y reciclaje que se ocupa de partículas mas grandes como complejos y/o agregados proteicos y los orgánulos dañados (Yang *et al.*, 2021).

La autofagia es un proceso celular altamente conservado en eucariotas. Comienza con la inducción y nucleación de membranas de aislamiento, su expansión conocida como fagoforo, que va envolviendo el componente a degradar, hasta formar una doble membrana cerrada denominada autofagosoma cuyo camino final es unirse a la vacuola

(en plantas y levaduras) o lisosomas (en animales) para la degradación y el reciclaje de su contenido (Lin *et al.*, 2023) (Nieto-Torres *et al.*, 2023).

En las plantas este proceso se mantiene en un nivel basal durante el crecimiento y el desarrollo para garantizar la homeostasis celular, pero se regula positivamente bajo estrés para ayudar en la supervivencia de la misma (Su *et al.*, 2020). Entre los elementos reguladores del proceso de autofagia cabe destacar la actividad de proteínas quinasas cruciales como SnRK1 que es un regulador positivo de la autofagia en respuesta a la deficiencia energética y nutricional (Yang *et al.*, 2021), que inhibe a la quinasa TOR (Soto-Burgos & Bassham, 2017) que actúa como regulador negativo (Fig. 2). Dicha inducción activa la unión de ATG1 y ATG13, formando el complejo ATG1- ATG13- ATG101 iniciando así la autofagia (Qi *et al.*, 2021). Otro regulador que participa de forma directa es la espermidina, que modifica post-traduccionalmente (hipusina) al factor de traducción eIF5A (Zhang *et al.*, 2019), siendo considerado como requisito traducional para la autofagia (Frankel, 2018). La activación del proceso de la autofagia está impulsada por una gran cantidad de genes (genes ATG) conservadas en eucariotas y muchas se encuentran en forma de familias multigénicas (Yang *et al.*, 2021).

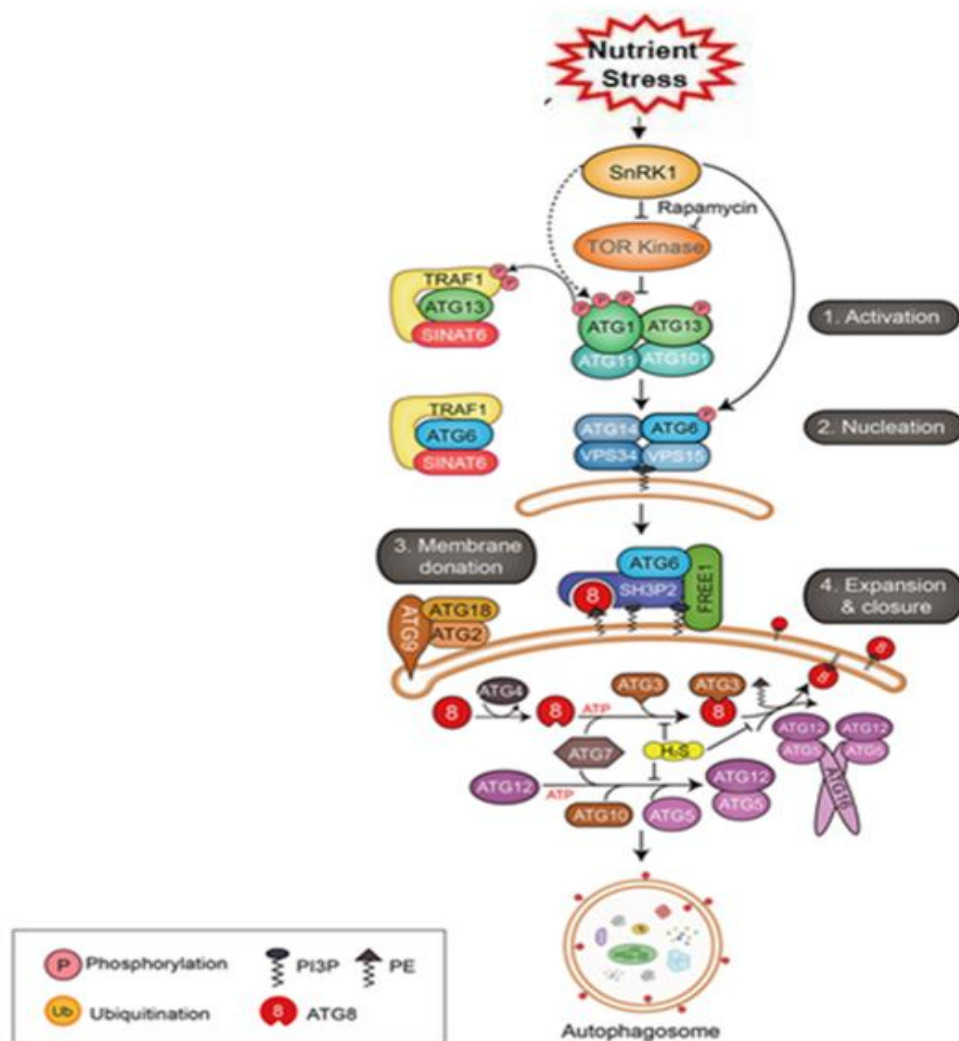


Figura 2. Esquema del proceso de autofagia. Proceso inicia en el citosol en condiciones de estrés. Tomada de (Qi *et al.*, 2021)

Una de las proteínas clave en la formación del autofagosoma es ATG8 (MAP1LC3/LC3 en mamíferos) que a través de un proceso de modificación por conjugación lipídica y anclaje al fagoforo, desempeña un papel central tanto de forma masiva como selectiva (Lin *et al.*, 2023; Yang *et al.*, 2021). ATG8 requiere un paso previo de proteólisis por ATG4, que permite luego el proceso de conjugación covalente con la fosfatidiletanolamina (PE). El proceso de lipidación consiste en varios pasos enzimáticos catalizados por las enzimas de conjugación similares al sistema de conjugación de ubiquitina ATG7 (E1), ATG3 (E2) y el ATG12-ATG5-ATG16L1(E3) (Frankel, 2018). Al estar lipidada ATG8-PE funciona como plataforma de acoplamiento para los adaptadores de autofagia y así facilitar la formación del autofagosoma, o como reconocimiento del receptor para reclutar selectivamente los cargos a la membrana del fagoforo en desarrollo (Sun *et al.*, 2022).

Las proteínas ATG8 están conservadas evolutivamente, pero varían entre especies desde un miembro de la familia en levaduras hasta más de diez variantes en plantas superiores (Rogov *et al.*, 2023). En *Arabidopsis* se identificaron nueve genes ATG8 (ATG8a-i), y hasta el momento se desconocen las posibles funciones específicas de cada isoforma (Rogov *et al.*, 2023).

Se conoce que la autofagia está ampliamente regulada a través de modificaciones post-traduccionales (PTM) que proporcionan regulaciones rápidas de las proteínas implicadas y/o sus interactores. Algunas de las modificaciones relacionadas con el proceso de autofagia son la ubiquitinación, acetilación, lipidación y fosforilación (Nieto-Torres *et al.*, 2023). Otra menos conocida es la hipusinación, exclusiva de eIF5A.

El factor de traducción eIF5A está altamente conservado en eucariotas, y participa en funciones de desarrollo y adaptación a estreses abióticos en plantas (Belda-Palazón *et al.*, 2014, 2016). La modificación post-traducciona por hipusinación se logra mediante la acción secuencial de las enzimas desoxihipusina sintasa (DHS) y desoxihipusina hidroxilasa (DOHH). En la primera reacción limitante, la enzima DHS cataliza la transferencia del aminobutilo de la espermidina (poliamina) al grupo ϵ -amino de una lisina conservada de eIF5A para formar un residuo intermedio denominado desoxihipusina. En la segunda reacción, ese intermediario es hidroxilado por la enzima DOHH dependiente de Fe(II) para producir el residuo de hipusina en la proteoforma eIF5A activa y madura (Belda-Palazón *et al.*, 2014; Guo & Zhou, 2024). En plantas de *Arabidopsis* existen tres isoformas: eIF5A1, eIF5A2 y eIF5A3, siendo la más abundante a nivel de expresión génica eIF5A2 (Belda-Palazón *et al.*, 2014)

En plantas, las funciones de eIF5A no son tan conocidas como en levadura y mamíferos. Su función radica como factor de traducción implicado en el paso de elongación. En su forma hipusinada, en el ribosoma, su actividad está relacionada con el alivio del estancamiento ribosomal que ocurre durante la síntesis de proteínas con dominios ricos en prolinas consecutivas (Guo & Zhou, 2024). Otra función de la forma hipusinada es durante la autofagia celular (Fig. 3). Se ha descrito en células humanas que eIF5A interviene de forma indirecta en la lipidación, anclaje a la membrana del fagoforo y formación del autofagosoma, ya que facilita la traducción de ATG3 (E2) y regula al factor

de transcripción TFEB (Frankel, 2018; Zhang *et al.*, 2019), ambos con motivos que causan estancamiento ribosomal.

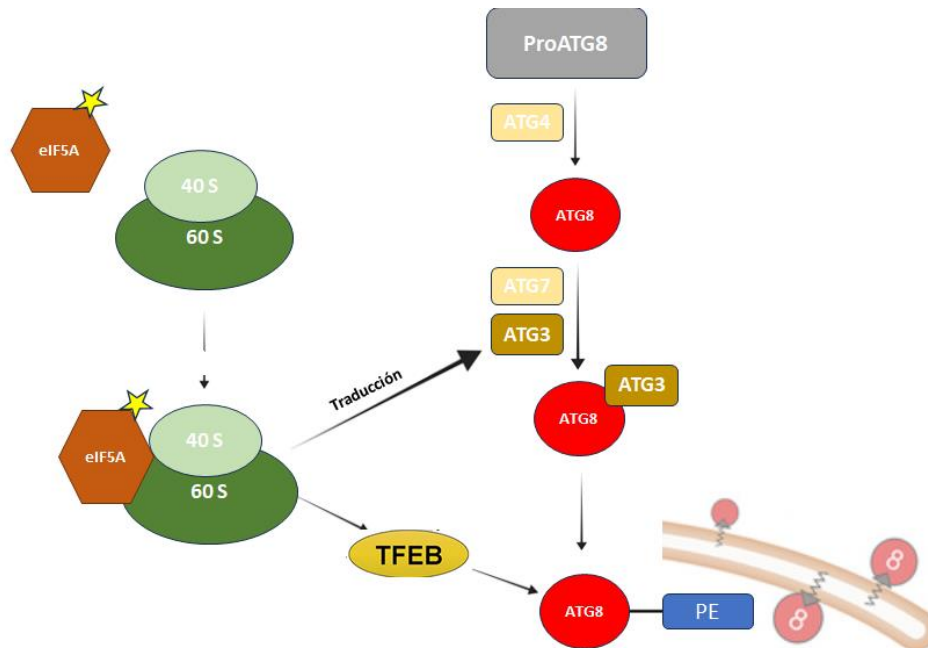


Figura 3. Regulación de la autofagia por la proteína eIF5A.

En el laboratorio de la Prof. Celine Masclaux-Daubresse (INRAE-AgroParis Tech, France), colaboradora del laboratorio del Dr. Alejandro Ferrando, se realizó un rastreo por doble híbrido en levadura (Y2H) para interactores de ATG8, encontrando que eIF5A2 interactiona con diferentes isoformas de ATG8 (Fig. 4). Además el mismo laboratorio ha realizado la predicción de interacción de la proteína eIF5A2 con ATG8i a través de AlphaFold, considerando los dominios consenso de interacción con ATG8 (dominios AIM) presentes en eIF5A2 mostrando que, efectivamente, interactúan también “in silico”

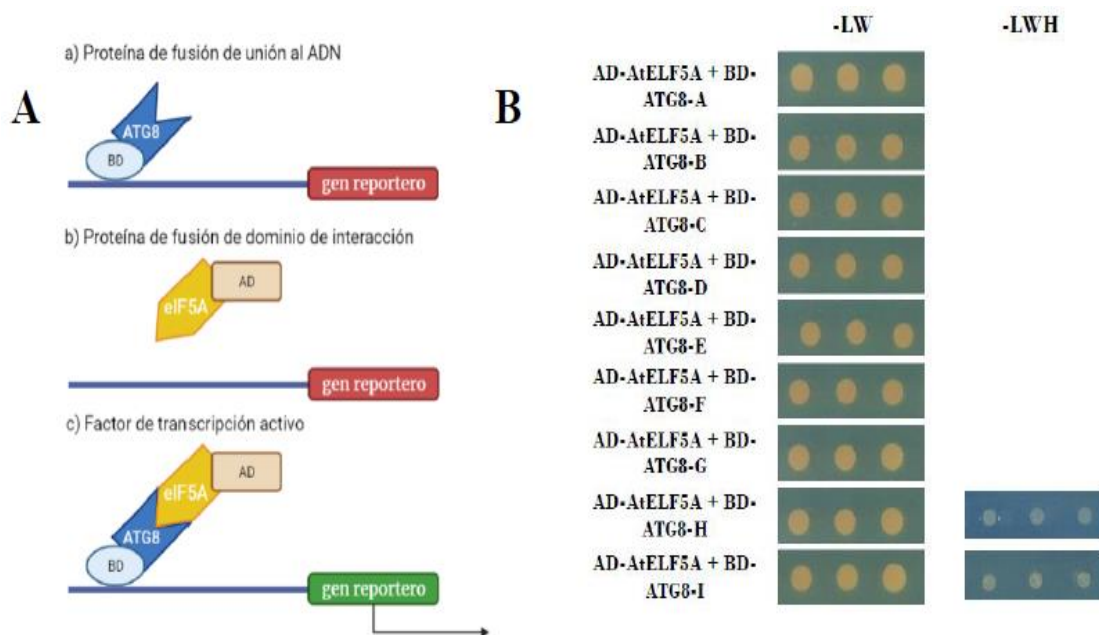


Figura 4. Estudio de la interacción entre eIF5A y las diferentes isoformas de ATG8 mediante Y2H. Imagen a partir de datos de Céline Masclaux-Daubresse.

El trabajo realizado por Aitana de la Cuadra (De la Cuadra, 2022) en el laboratorio también demostró la interacción de eIF5A2 con las isoformas de ATG8 por la técnica BiFC (Bimolecular Fluorescence Complementation) en plantas de *Nicotiana benthamiana* (Fig. 5), si bien en este caso se pudieron identificar interacciones tanto en el núcleo como en el citosol entre eIF5A2 y todas las isoformas de ATG8 excepto ATG8g.

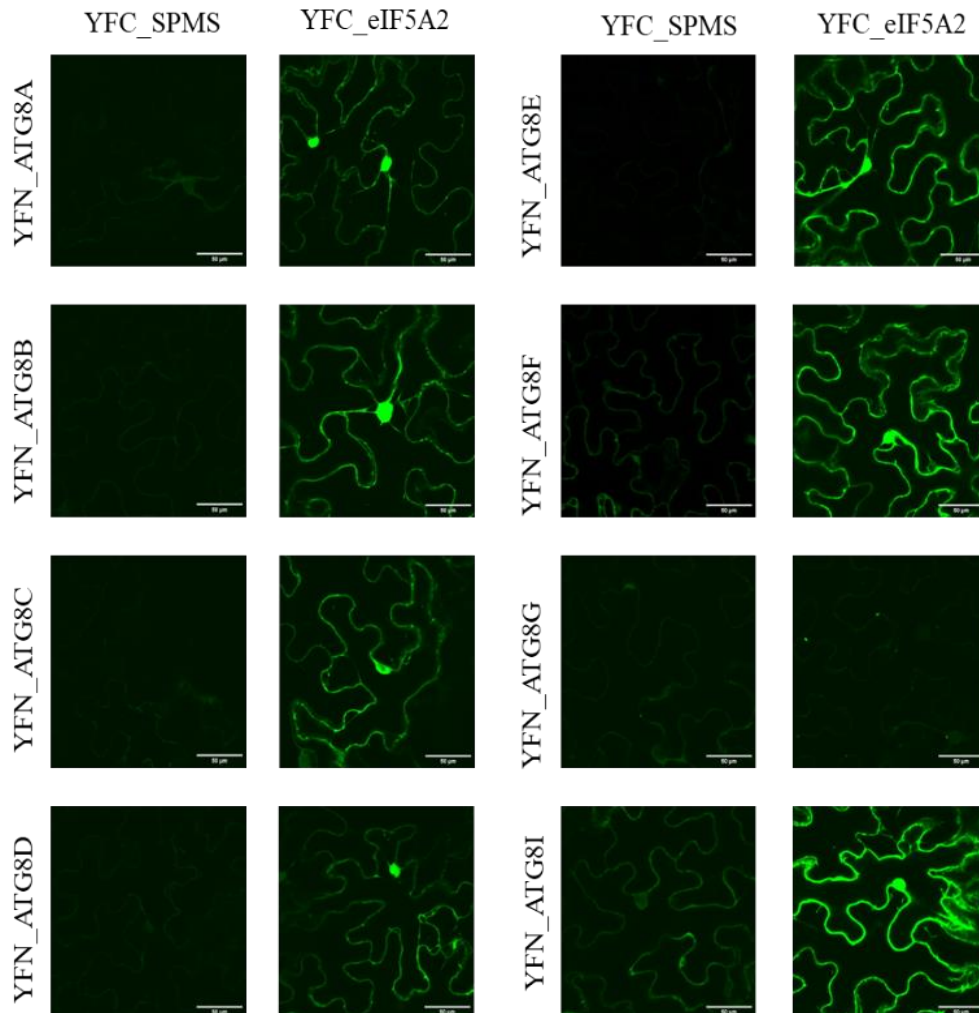


Figura 5. Estudio de la interacción de eIF5A entre las diferentes isoformas de ATG8 mediante BiFC. Imagen tomada De la Cuadra, 2022.

Por otro lado, disponemos también de datos publicados sobre el fosfoproteoma dependiente de SnRK1, regulador positivo de la autofagia, en condiciones de deficiencia energética por oscuridad que induce la autofagia (Nukarinen *et al.*, 2016). En estos trabajos se demostró que eIF5A2 y eIF5A3 muestran un patrón de fosforilación alterado en la Ser2 (S2) en condiciones de luz frente a oscuridad, y que dicha modificación depende indirectamente de la actividad de SnRK1 (Fig.6). Precisamente la fosforilación de la S2 depende de la quinasa CK2 (Łebska *et al.*, 2010) quien a su vez está regulada por

fosforilación por la quinasa TOR (Sanchez-Casalongue *et al.*, 2015) lo que nos permite llegar a la regulación dependiente de SnRK1 en un eje de fosforilación secuencial

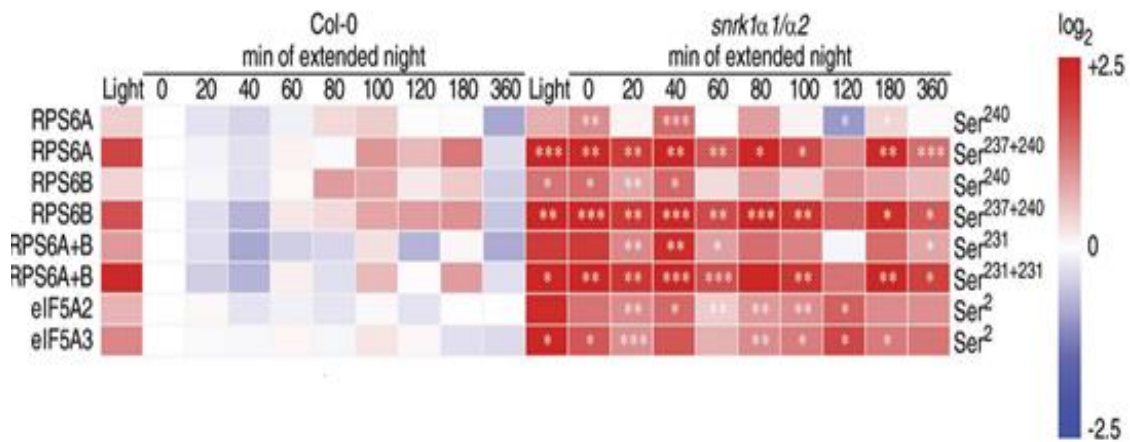


Figura 6. Heatmap del análisis de la dinámica de la fosforilación de proteínas ribosomales y de los factores de traducción eIF5A2 y eIF5A3. Imagen tomada de Nukarinen *et al.*, 2016.

En trabajos previos del laboratorio (Marín, 2024), se estudió la estabilidad de eIF5A en condiciones de alteración genética (mutantes *atg4*, *atg5* y *atg7*) y farmacológica (mediante concanamicina A) del proceso de autofagia. Los resultados obtenidos, mostraron que en condiciones óptimas de nutrientes (medio con sacarosa), la planta silvestre (Col-0) muestra una estabilización de la proteína eIF5A en presencia de concanamicina A (Fig. 7A), mientras que en medios sin sacarosa (condiciones de inducción de autofagia) la proteína ya es muy estable y no muestra diferencias con la adición de concanamicina A. De modo análogo el tratamiento farmacológico para inhibir la autofagia, las perturbaciones genéticas de la ruta con los mutantes *atg4ab*, *atg5.1* y *atg7k* mostraron estabilidad de la proteína eIF5A tanto en presencia como en ausencia de concanamicina A (Fig. 7A y 7B). Estos datos sugieren que la proteína eIF5A podría ser un sustrato de autofagia y que, en condiciones de abundancia nutricional, su tasa de recambio parece estar acelerada.

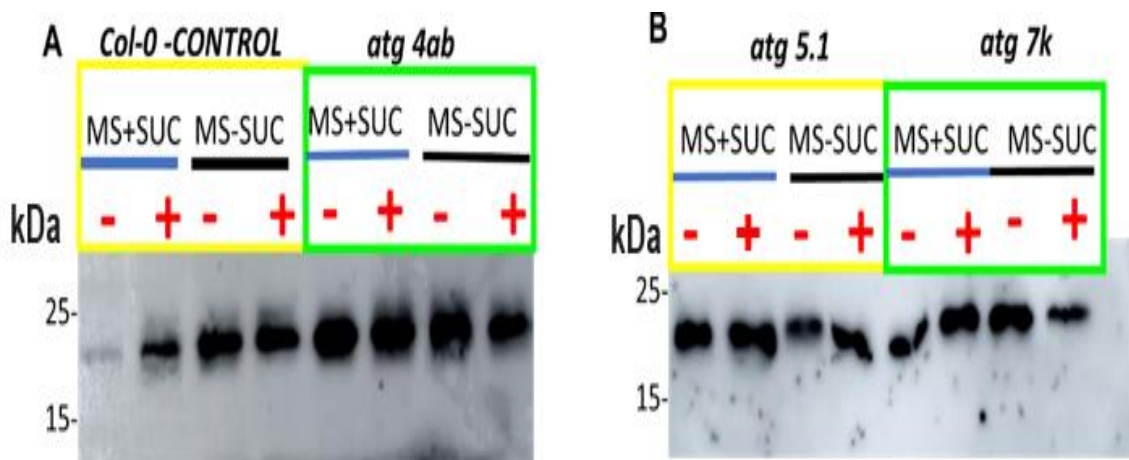


Figura 7. La estabilidad de eIF5A en condiciones de alteración genética y farmacológica. Datos de Marín, 2024

Con el presente trabajo queremos profundizar en el estudio de la posible función de la fosforilación de la Ser2 (S2) de eIF5A2 en su interacción con ATG8 y su estabilidad dependiente del proceso de autofagia.

II. HIPÓTESIS

El factor de traducción eIF5A está implicado en la regulación del proceso de autofagia por su actividad en la síntesis proteica, pero estudios recientes apuntan a que su propia estabilidad depende del estado energético de la planta y de la ruta de autofagia. Su interacción física con ATG8 aporta más evidencias de la relación entre ambos procesos. También sabemos que la fosforilación de la S2 depende de las condiciones nutricionales de la planta y de la actividad del sensor energético SnRK1.

Nuestra hipótesis inicial es que la S2 de eIF5A podría estar implicada en la interacción física con ATG8 y en su degradación por la vía de autofagia. Para profundizar en esta idea proponemos los siguientes objetivos en el presente trabajo.

III. OBJETIVOS

- ✚ Analizar si la fosforilación de la S2 afecta a la interacción de eIF5A2 con ATG8 usando variantes de eIF5A2 fosfomutantes (S2A) y fosfomiméticas (S2D) en ensayos de Y2H y BiFC.
- ✚ Estudiar la estabilidad de eIF5A2 en condiciones de suficiencia e insuficiencia energética inducida por crecimiento en oscuridad.
- ✚ Determinar la localización subcelular de las variantes de eIF5A2 (versión silvestre WT, fosfomutante S2A y fosfomimética S2D) como fusiones traduccionales a GFP en plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana*.

IV. RESULTADOS

4.1 Interacción entre eIF5A2 y ATG8

En base a los datos preliminares mencionados anteriormente en la introducción, se utilizaron dos técnicas para valorar la interacción de ATG8 (isoformas e, h, i) con la proteína eIF5A2 y sus proteoformas fosfomutante (S2A) y fosfomimética (S2D), para ver si estas mutaciones podrían afectar de alguna manera a la interacción. Las dos técnicas escogidas fueron el sistema de doble híbrido (Y2H) como sistema cualitativo y cuantitativo de interacción, y la complementación bimolecular de fluorescencia (BiFC) que permite visualizar *in vivo* en la planta la localización subcelular de la interacción.

4.1.1 Yeast Two Hybrid (Y2H)

Para el uso de esta técnica se expresaron en levaduras las proteínas de interés con los plásmidos pGBKT7 (como fusiones al dominio de unión al ADN) y pGADT7 (como fusiones al dominio de activación transcripcional), para activar el gen reportero lacZ, que inicia su activación transcripcional con la interacción de ambos dominios que permiten reconstruir el factor transcripcional GAL4.

En primer lugar se clonaron las versiones silvestre y mutantes de eIF5A2 (eIF5A2^{WT}, eIF5A2^{S2A}, eIF5A2^{S2D}) así como la secuencia codificante de NBR1 (como interactor conocido de ATG8), mediante la técnica de Gateway, a partir de clones disponibles en el laboratorio en vectores de entrada con sitios *attL*. En este caso el plásmido destino fue pGBKT7 (sitios *attR*). La mezcla de recombinación se transformó en células competentes de *E. coli* (Top10), y a partir de cultivos líquidos de las colonias transformadas se realizó la extracción de los ADN plasmídicos. Posteriormente se llevó a cabo la digestión y la electroforesis en geles de agarosa para su análisis. En la figura 8, se muestran las colonias positivas tras digestión con la enzima *NcoI*.

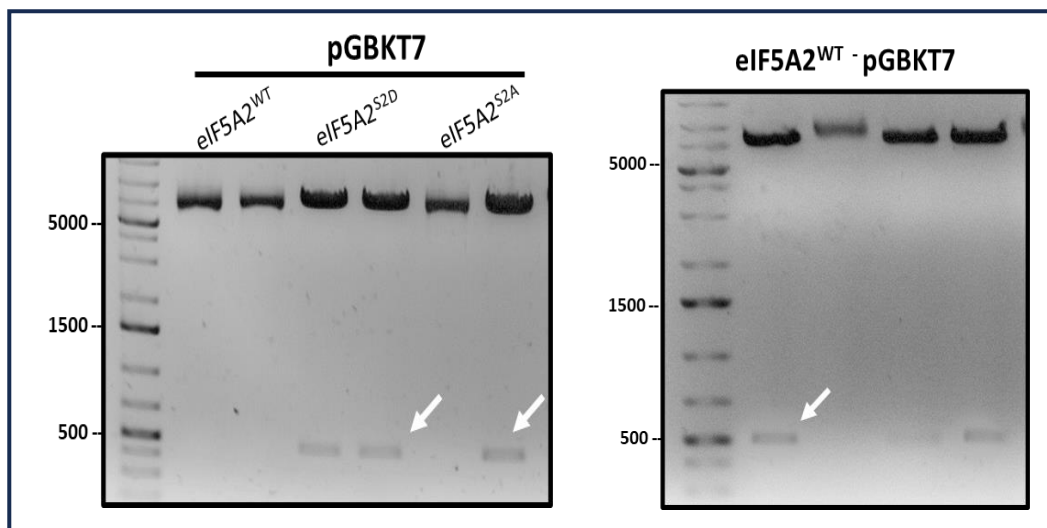


Figura 8. Clonación para Y2H. La imagen muestra electroforesis de agarosa de plásmidos digeridos con *NcoI*. Las flechas indican la presencia del fragmento esperado en los clones positivos.

Al final del proceso de clonaje disponíamos de las siguientes construcciones: eIF5A2^{WT}_pGBKT7, eIF5A2^{S2A}_pGBKT7, eIF5A2^{S2D}_pGBKT7, NBR1_pGBKT7 y ATG8e_pGADT7 (este último facilitado por C. Masclaux-Daubresse).

Posteriormente se realizó la transformación de levaduras, en este caso se usarían las cepas Y190 (con plásmidos derivados del pGBKT7) y la cepa Y187 (con plásmidos derivados del pGADT7) en medios de selección por auxotrofia. Obtenidas las levaduras haploides transformadas con los genes de interés en los plásmidos elegidos, procedimos con el cruce genético o “mating” para obtener las levaduras diploides con ambos plásmidos. Como controles positivos de interacción utilizamos la combinación de pTD1+pVA3 (control positivo del sistema Y2H) y la interacción NBR1-ATG8; y como control negativo, utilizamos las combinaciones de los clones en pGBKT7 pTD1 en Y187. El gen *NBR1* en *Arabidopsis* actúa como receptor de cargos para la autofagia selectiva de proteínas ubiquitinadas y es un interactor descrito para ATG8 (Zhang *et al.*, 2020). Una vez obtenidas las cepas diploides, se procedió con la técnica de goteo donde se crecieron dos colonias transformantes diploides de cada construcción en medio selectivo con el sustrato XGal que produce un depósito insoluble de color azul si hay actividad beta-galactosidasa como consecuencia de la expresión del gen LacZ, reportero de la actividad de GAL4. Se realizaron las interacciones de las construcciones control y variantes de eIF5A2 en Y190, y de los controles y genes ATG8e, ATG8h y ATG8i en Y187.

En la figura 9, se muestran los resultados obtenidos con ATG8e. En todos los casos los controles positivos pTD1+pVA3 y NBR1+ATG8e mostraron interacción positiva; sin embargo no pudimos detectar interacción de ATG8e con ninguna de las versiones silvestre o mutantes de eIF5A2: eIF5A2^{WT}, eIF5A2^{S2A} y eIF5A2^{S2D} no mostraron interacción con ATG8e. De modo similar, en ningún caso pudimos detectar interacción de estas con ATG8h ni con ATG8i.

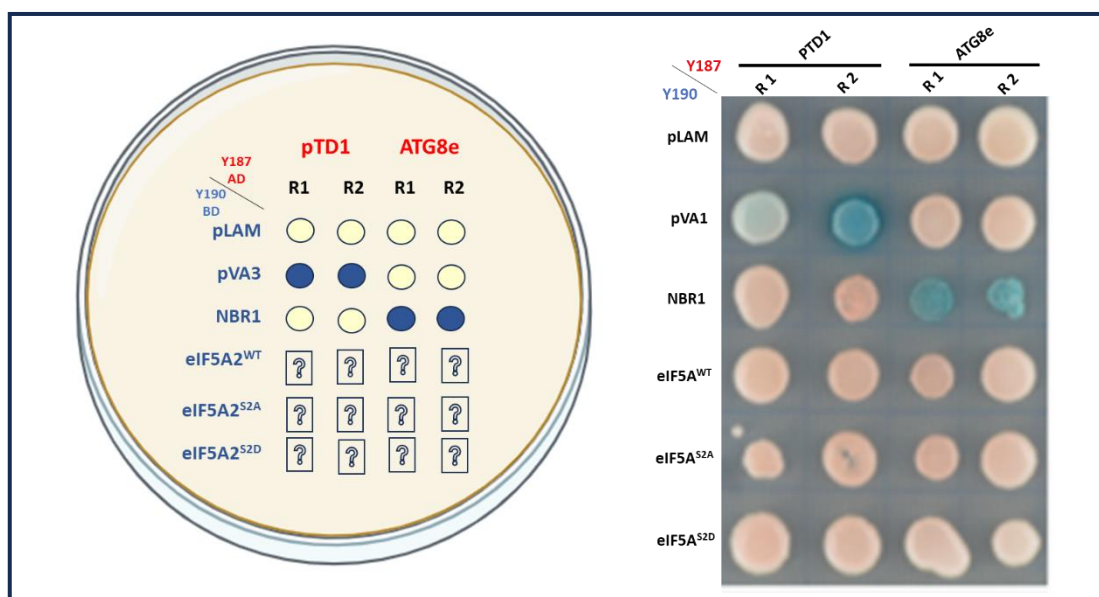


Figura 9. Resultados del estudio de interacciones eIF5A con ATG8e mediante Y2H.

Aunque no se muestran los resultados, tampoco pudimos detectar interacción con otros genes reporteros de la interacción en Y2H como la auxotrofia de His valorada en presencia del inhibidor competitivo 3AT. Estos resultados negativos también han sido reportados ocasionalmente por el laboratorio de C. Masclaux-Daubresse indicando que, por alguna razón desconocida el sistema Y2H no es apropiado para el estudio de estas interacciones. Por ello, decidimos pasar al sistema de BiFC que permite el estudio en planta de interacciones proteicas que es cualitativo pero con la ventaja de que permite visualizar la locación subcelular de la interacción.

4.1.2 Bimolecular Fluorescent Complementation (BiFC)

Esta técnica consiste en la reconstrucción de la proteína fluorescente YFP si se produce interacción entre dos proteínas fusionadas una de ellas al dominio N-terminal de YFP (pYFN43) y la otra fusionada al dominio C-terminal de YFP (pYFC43). Si ocurre interacción de ambas proteínas de fusión, se reconstituye la proteína fluorescente YFP y con ello la producción de fluorescencia detectable en el microscopio confocal (Belda-Palazón *et al.*, 2012).

En el laboratorio disponíamos ya de las distintas versiones silvestre y mutantes de eIF5A2 (eIF5A2^{WT}, eIF5A2^{S2A}, eIF5A2^{S2D}) clonadas en los plásmidos pYFC43 y de los genes ATG8e, ATG8h y ATG8i en los plásmidos pYFN43. La orientación adecuada para los ensayos de BiFC en este caso fue determinada en estudios previos en el laboratorio (De la Cuadra, 2022) donde se determinó que las construcciones de eIF5A debían generarse en YFC43 para evitar fluorescencia basal. Realizamos agroinfiltraciones en hojas de *N. benthamiana*, con las combinaciones correspondientes de los distintos cultivos de *A. tumefaciens* (Tabla 1) plásmidos pYFC43 y pYFN43, vector de silenciamiento (p19) y marcador nuclear viral NM (solo empleado en el caso de las interacciones con ATG8h). Como controles se infiltró pYFC_SPMS que contiene la secuencia codificante de la enzima espermina sintasa (SPMS) como control negativo; y control positivo pYFC_NBR1 junto a pYFN_ATG8.

Tabla 1. Esquema de la combinaciones de ensayos del BiFC en *N. benthamiana*.

Plásmido YFN	Plásmido YFC	Vector silenciamiento	Controles
ATG8e ATG8i ATG8h (adición NM)	SPMS	p19	Control negativo
	NBR1	p19	Control positivo
	eIF5A ^{WT}	p19	-
	eIF5A ^{S2A}	p19	-
	eIF5A ^{S2D}	p19	-

En la figura 10, se muestran los resultados de los controles negativo y positivo con **pYFN_ATG8e**. El control negativo pYFC_SPMS no mostró nada de fluorescencia, sin embargo el control positivo con pYFC_NBR1 mostró interacción de ambas proteínas formando agregados citosólicos. La fluorescencia en color rojo son cloroplastos.

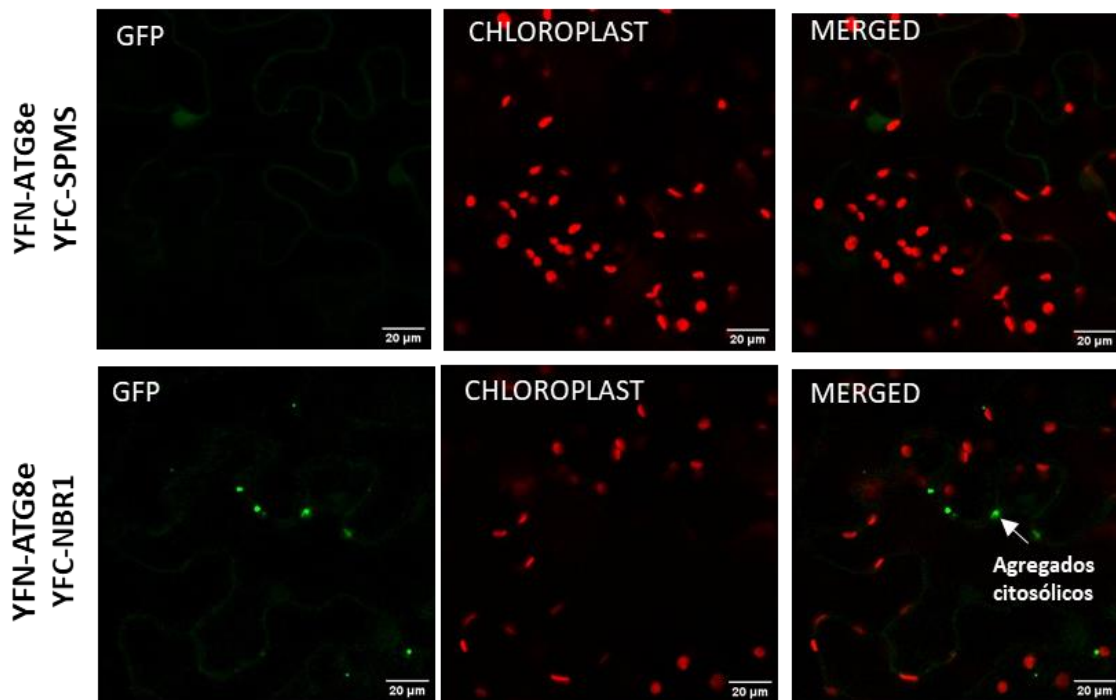


Figura 10. Controles para ensayos BiFC con ATG8e. Visualización de fluorescencia emitida por los controles de pYFN_ATG8e con pYFC_SPMS y pYFC_NBR1. Escala 20 µm.

La figura 11 muestra los resultados de interacción utilizando **pYFN_ATG8e** junto a las versiones silvestre y mutantes de eIF5A2. Pudimos detectar interacción positiva en todos los casos sin diferencias apreciables en la intensidad de la fluorescencia de las distintas proteoformas de eIF5A2, si bien la localización de la interacción mayoritaria fue en agregados nucleares, lo que permite concluir que dicha interacción se esté produciendo mayoritariamente, aunque no exclusivamente, en el núcleo.

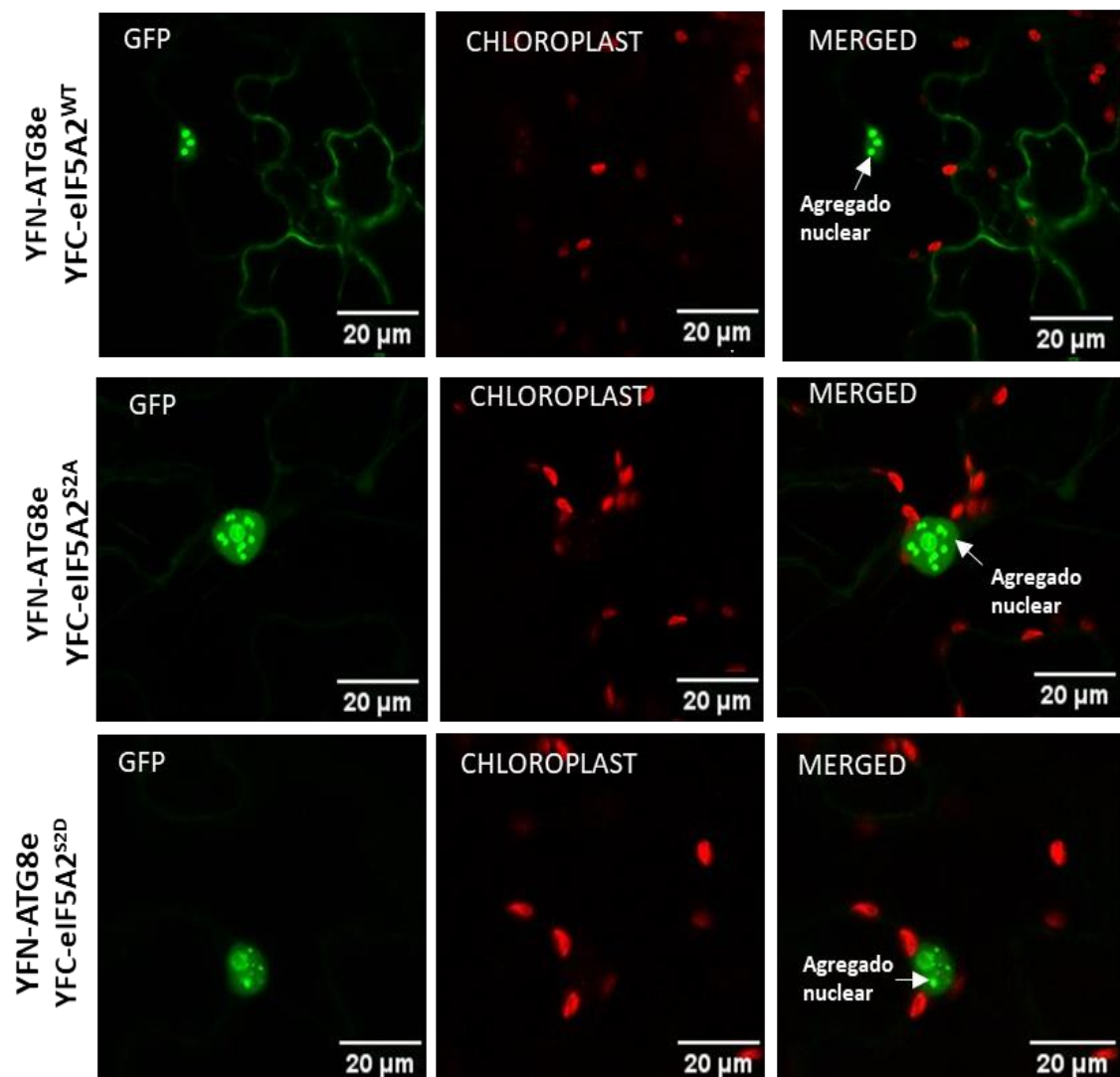


Figura 11. Ensayo de BiFC con ATG8e y eIF5A2. Visualización de fluorescencia emitida en las muestras que contenían la combinación de pYFN_ATG8e y pYFC_eIF5A2wt, pYFC_eIF5A2S2A, pYFC_eIF5A2S2D. Escala 20 µm.

En la figura 12, se muestran los controles negativo y positivo de **pYFN_ATG8i** junto a pYFC_SPMS y pYFC_NBR1. Como en el caso previo, no hay interacción con SPMS pero sí con NBR1 en el mismo tipo de condensados citosólicos. La fluorescencia en color rojo son cloroplastos.

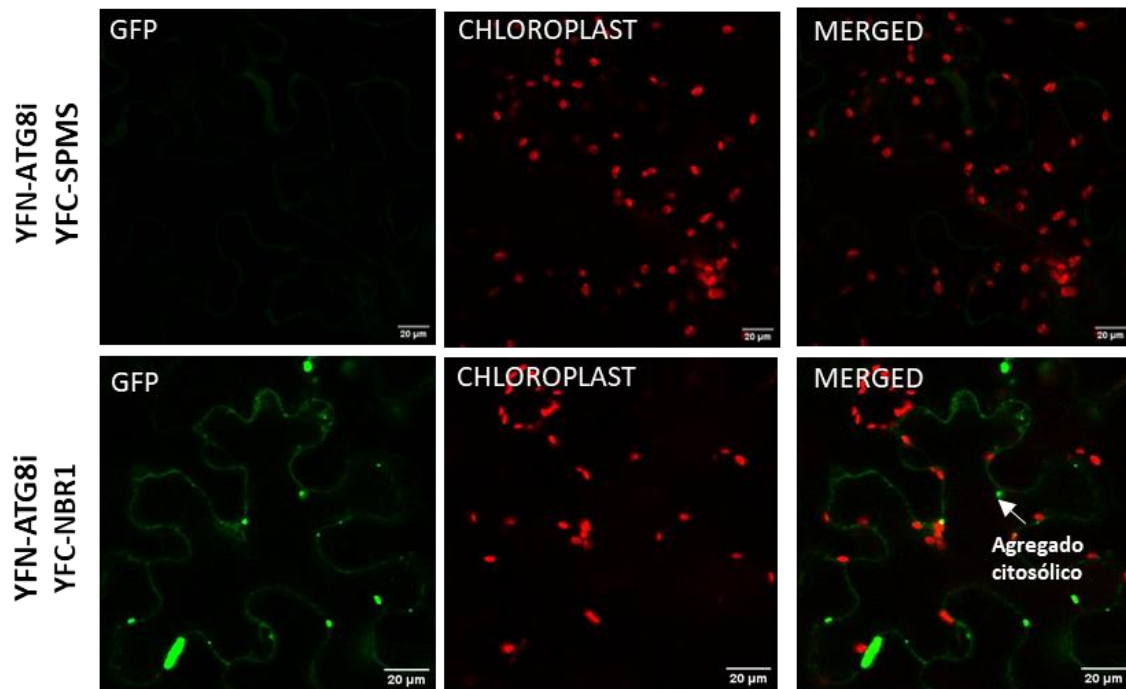


Figura 12. Controles para ensayos BiFC con ATG8i. Visualización de fluorescencia emitida por los controles de pYFN_ATG8i entre pYFC_SPMS y pYFC_NBR1. Escala 20 µm.

En la figura 13 se muestran los resultados utilizando **pYFN_ATG8i** junto a las versiones silvestre y mutantes de eIF5A2. Al igual que para ATG8e, pudimos detectar fluorescencia citosólica pero la intensidad más fuerte se produjo nuevamente en condensados nucleares con similar número y tamaño sin diferencias apreciables en la intensidad entre las diferentes proteoformas de eIF5A2.

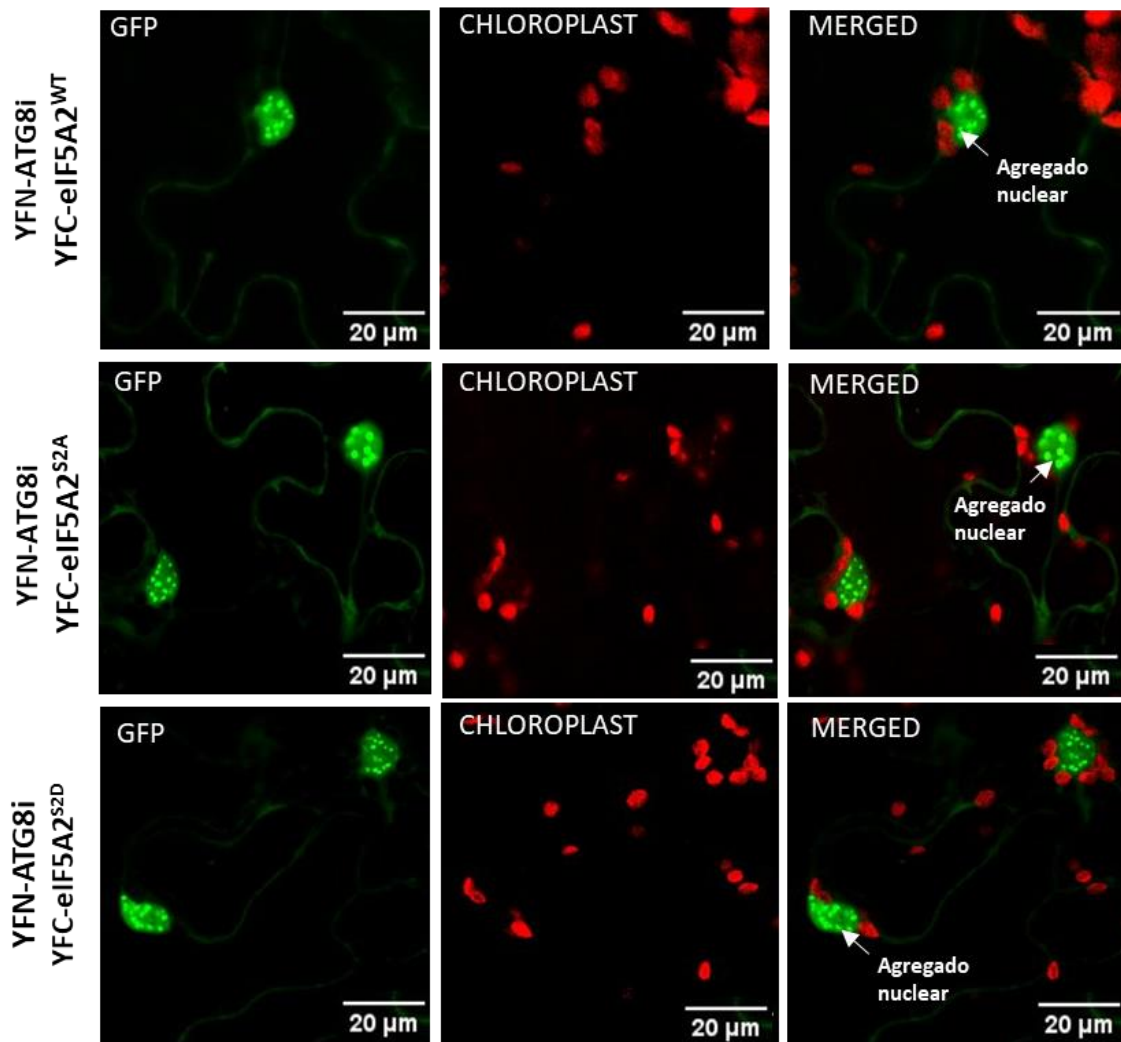


Figura 13. Ensayo de BiFC con ATG8e y eIF5A2. Visualización de fluorescencia emitida en las muestras que contenían la combinación de pYFN_ATG8i con pYFC_eIF5A2^{wt}, pYFC_eIF5A2^{S2A}, pYFC_eIF5A2^{S2D}. Escala 20 μm.

Por último en la figura 14 y 15 se muestran las interacciones de pYFN_ATG8h con los controles (Fig.14) y con las variantes silvestre y mutantes de eIF5A (Fig. 15). En este caso la fluorescencia roja se debe a la proteína de origen vírico nuclear fusionada a la proteína fluorescente RFP que marca el núcleo y con mayor intensidad los nucleolos. Los resultados de la Fig. 14 indica que no se observa interacción con SPMS y sí agregados citosólicos similares con NBR1.

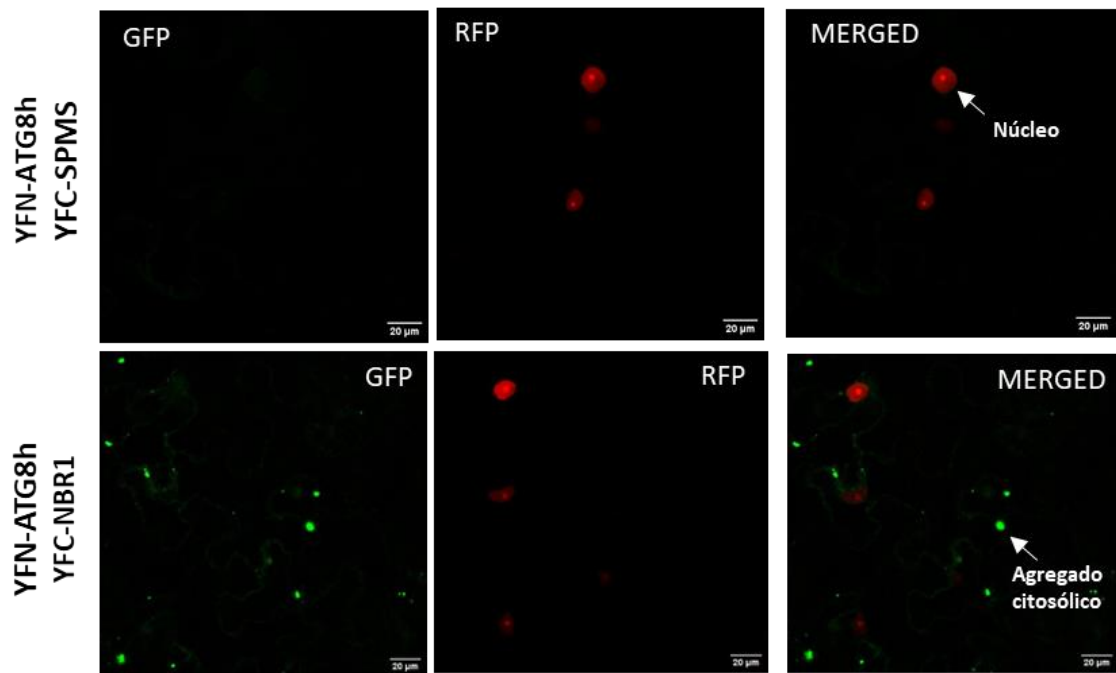


Figura 14. Controles para ensayos BiFC con ATG8h. Visualización de fluorescencia emitida por los controles de pYFN_ATG8h entre pYFC_SPMS y pYFC_NBR1. Escala 20 µm.

En la Fig. 15 muestra los resultados de interacción utilizando **pYFN_ATG8h** con las versiones silvestre y mutantes de eIF5A2 mostrando también la formación de agregados nucleares similares a los dos anteriores isoformas de ATG8 sin diferencias apreciables de intensidad con las distintas proteoformas de eIF5A2. La adición de un marcador nuclear corroboró que efectivamente las interacciones ocurren en condensados dentro del núcleo pero no en el nucléolo.

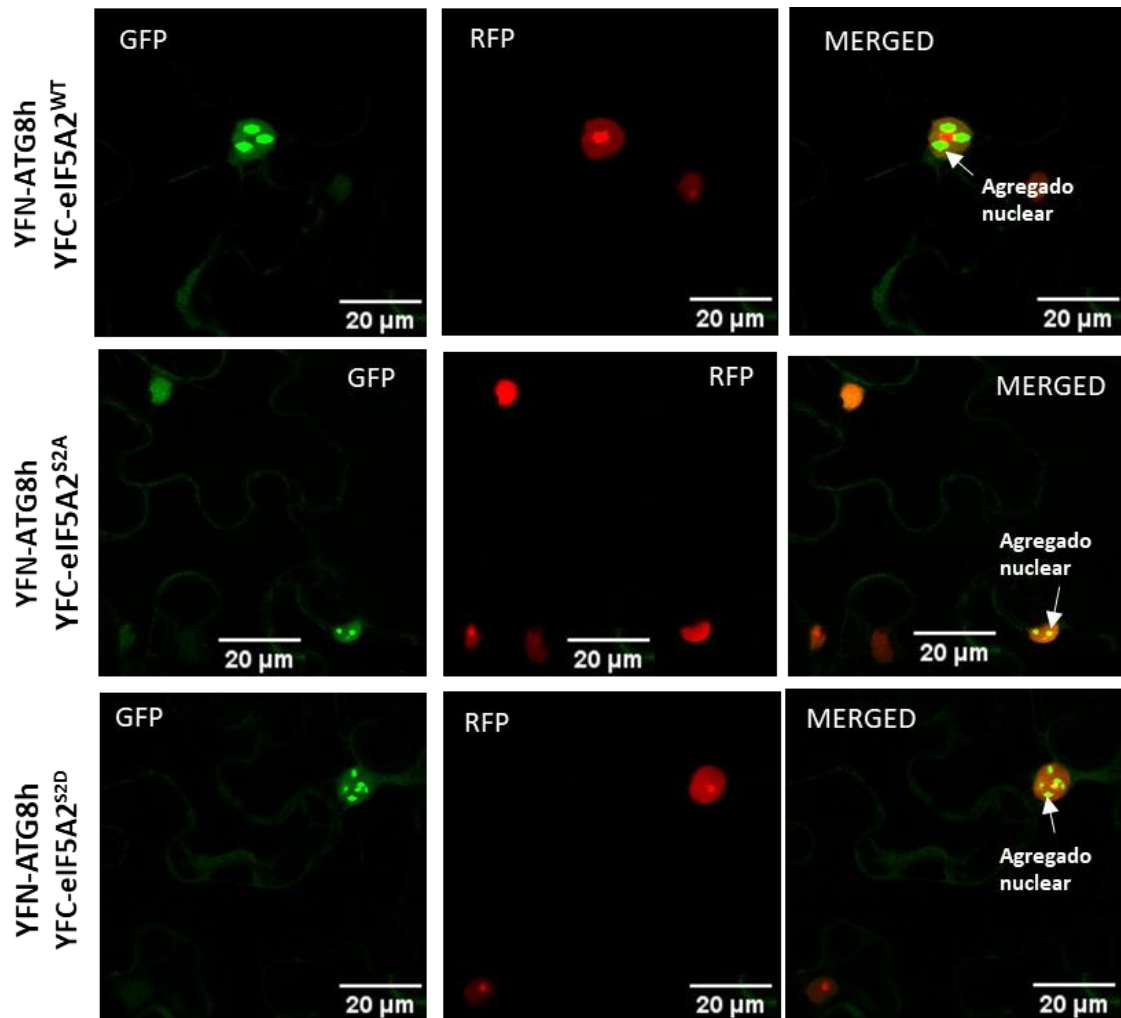


Figura 15. Ensayo de BiFC con ATG8e y eIF5A2. Visualización de fluorescencia emitida en las muestras que contenían la combinación de pYFN_ATG8h y pYFC_eIF5A2^{wt}, pYFC_eIF5A2^{S2A}, pYFC_eIF5A2^{S2D}. En este caso la señal fluorescente roja indica localización nuclear por marcador viral. Escala 20 µm.

Estos resultados nos permiten concluir que las mutaciones S2A y S2D no interfieren positiva ni negativamente en la interacción con ATG8 pero, sorprendentemente, detectamos con cierta intensidad interacciones con las 3 isoformas de ATG8 en agregados nucleares de número y forma similares en todos los casos. Estos datos también sugieren que este tipo de interacciones proteicas en agregados nucleares podría ser causante de las dificultades para detectar interacciones en el sistema de doble híbrido de levadura.

4.2 eIF5A2 como sustrato de autofagia

La ruta de autofagia tiene mucha importancia por su activación frente a los diferentes tipos de estrés, y por la actividad de eIF5A como regulador positivo de la ruta. Sin embargo su fosforilación diferencial en la S2 en condiciones de deficiencia energética (Nukarinen *et al.*, 2016) y su interacción con ATG8 también sugiere que podría ser un sustrato de degradación de autofagia como indican también resultados previos del laboratorio (Marín, 2024).

Para evaluar la estabilidad eIF5A en condiciones de deficiencia energética empleamos unas condiciones extremas de deficiencia nutricional (sin sacarosa) y condiciones de oscuridad prolongada (ayuno de C). Realizamos estos experimentos con plántulas silvestres Col-0.

El experimento consistió en la siembra de las semillas Col-0 (cuatro placas) en medio sólido sin sacarosa (MS-SUC) crecidas con fotoperiodo de día largo 16 horas luz y 8 de oscuridad, durante 10 días. A partir de ese momento, la mitad de las placas se mantuvieron en las mismas condiciones y la otra mitad se mantuvo en oscuridad. Durante los 7 días en oscuridad permanente, se recogieron las plántulas cada día a la misma hora tanto de las plántulas en fotoperiodo de día largo (L) como en oscuridad (D). Posteriormente se realizó la extracción de proteínas para el análisis WB con el anticuerpo anti-eIF5A y tinción Ponceau, tratando de igualar la carga. La carga proteica se indica por la intensidad de Rubisco en la tinción Ponceau, mientras que la de eIF5A en el WB indica la banda inmunogénica de 17 kDa.

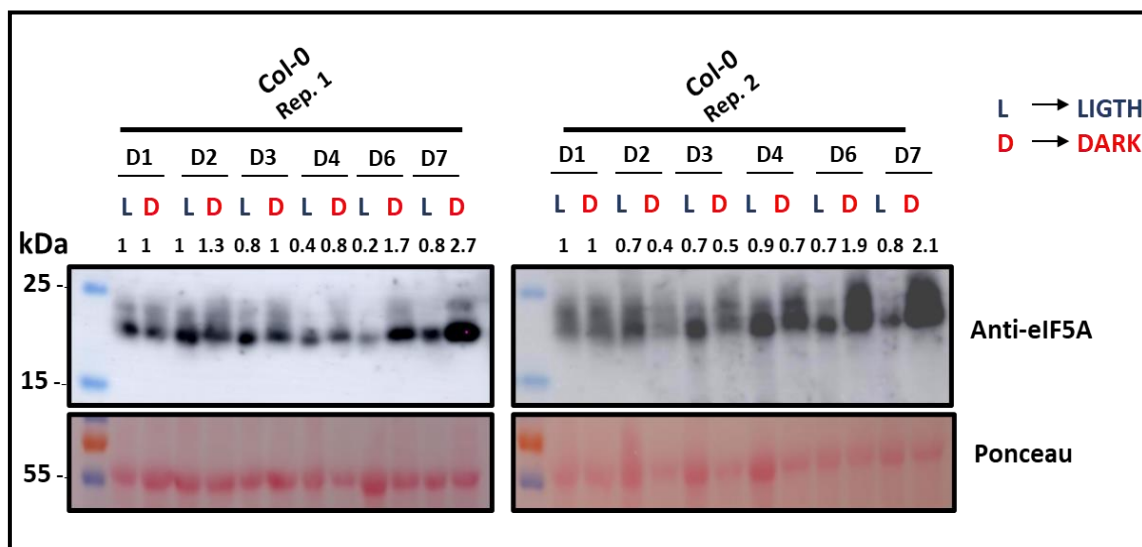


Figura 16. Ensayo de estabilidad de eIF5A en condiciones de oscuridad como inductor de autofagia. Los valores de intensidad fueron normalizados y expresados relativos a la señal de Ponceau y del western blot tomando como referencia D1 en luz y oscuridad respectivamente.

El análisis del WB de la figura 16 muestra que los primeros días tanto en luz como oscuridad, los niveles de eIF5A son similares. Sin embargo a partir del cuarto día en adelante se empieza a notar una estabilización de la proteína en condiciones de oscuridad en ambas réplicas experimentales. Estos resultados corroboran datos previos del laboratorio en los que se detectó una estabilización de eIF5A en

condiciones de ayuno nutricional. En ambos casos, las condiciones de inducción de autofagia conducen a una mayor estabilización de la proteína, si bien es cierto que faltaría demostrar que no hay efectos transcripcionales implicados.

4.3 Obtención de líneas transgénicas eIF5A2-GFP

La obtención de las líneas transgénicas eIF5A-GFP nos permitiría visualizar tanto los niveles de las distintas proteoformas de eIF5A como su localización subcelular si las mutaciones en la S2 ocasionaran algún cambio. Para ello utilizamos construcciones ya disponibles en el laboratorio de eIF5A como fusiones traduccionales a GFP (eIF5A2^{S2A} (fosfomutante), eIF5A2^{S2D} (fosfomimético) y la versión silvestre de la proteína eIF5A2^{WT}) así como el plásmido vacío pMDC43 que expresa GFP sola, que se emplearon para transformar plantas de *Arabidopsis* Col-0, como fondo genético

Para ello, utilizamos las construcciones en el plásmido de expresión pMDC83 con la presencia de la proteína fluorescente GFP en los mutantes (eIF5A2^{WT}, eIF5A2^{S2A} y eIF5A2^{S2D}) y el plásmido pMDC43 vacío (Φ) como control. Ambas construcciones tenían como marcador de selección en planta la resistencia al antibiótico higromicina (Hyg) (Fig. 17)

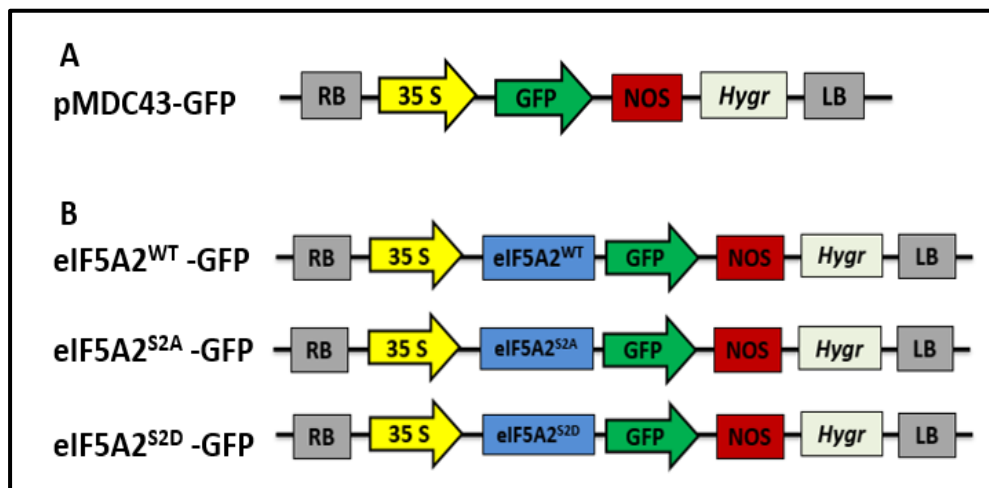


Figura 17. Esquema del T-DNA de los plásmidos utilizados para obtención de plantas transgénica. A) pMDC43 solo expresa GFP. B) pMDC83 con inserto que presenta el promotor constitutivo (35S), la región CDS de eIF5A2^{WT} /eIF5A2^{S2A} /eIF5A2^{S2D} fusionadas traduccionalmente a GFP y el terminador.

El proceso de obtención de las líneas transgénicas siguió el esquema indicado en la figura 18. Iniciamos el proceso , con la transformación de plantas Col-0 (T0) con los cultivos de *A. tumefaciens* que contienen los insertos, usando la técnica de inmersión floral “floral dip”, obteniendo un alto porcentaje de semillas no transformadas y un bajo porcentaje de semillas transformadas (T1).

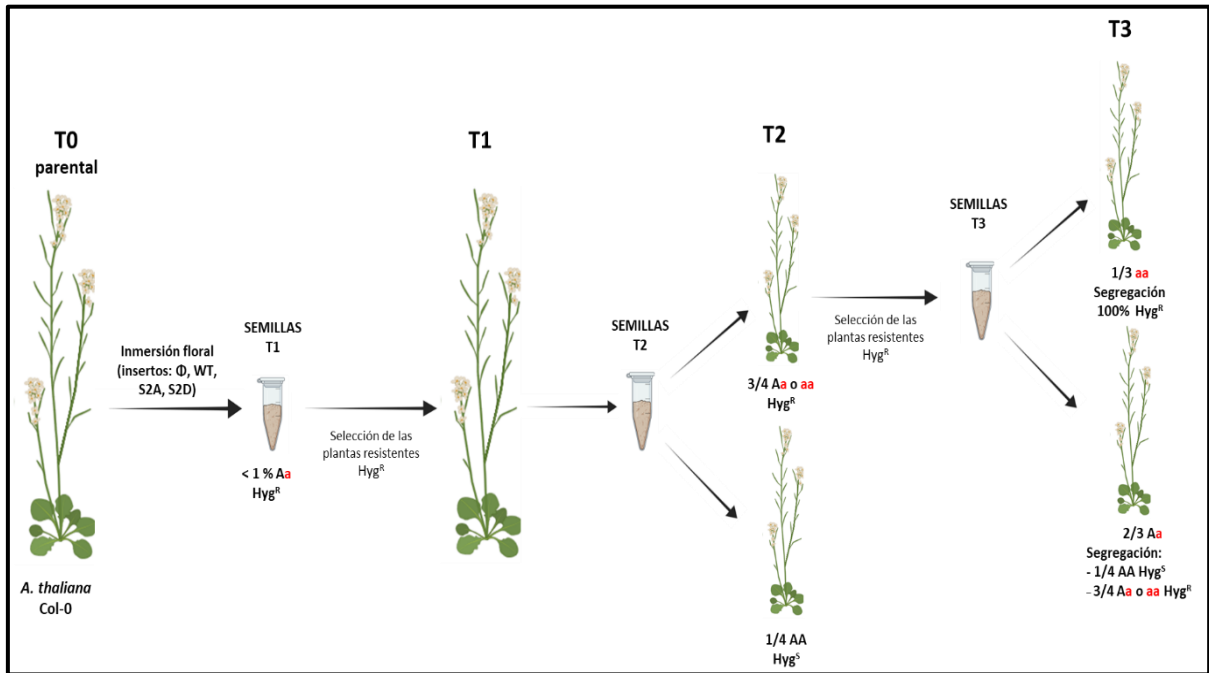


Figura 18. Esquema del proceso de obtención de líneas transgénicas. Se muestra el esquema seguido con los insertos de interés GFP, eIF5A2^{WT}-GFP, eIF5A2^{S2A}-GFP y eIF5A2^{S2D}-GFP.

Las semillas T1 recogidas se seleccionaron en medio con higromicina (Fig. 19), obteniendo plantas T1 resistentes siendo estas heterocigotas. Las plantas T1 resistentes generaron las semillas T2, que nuevamente se seleccionaron en higromicina. La proporción de semillas resistentes en esta generación se espera que sea $\frac{3}{4}$ de semillas resistentes y $\frac{1}{4}$ de semillas sensibles para una inserción del T-DNA.

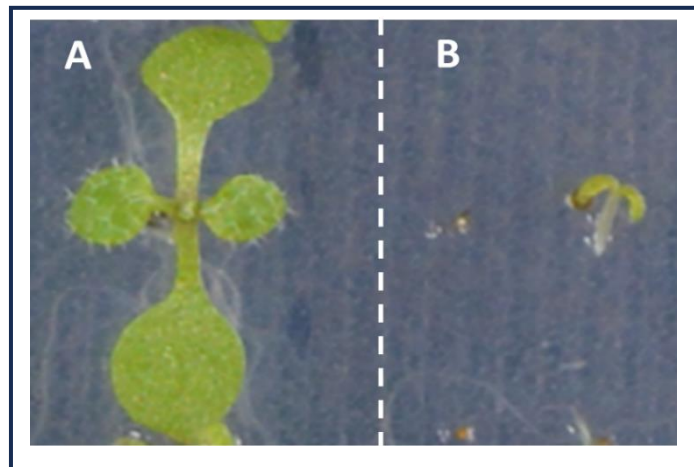


Figura 19. Identificación fenotípica de plantas transgénicas. A) Resistencia y B) sensibilidad en higromicina.

En total se establecieron diecisiete líneas independientes heterocigotas (T2) de GFP, diez de eIF5A2^{WT}-GFP; nueve de eIF5A2^{S2A}-GFP y dieciocho para eIF5A2^{S2D}-GFP cuya segregación de la resistencia a higromicina se contabilizó para el análisis de segregación mendeliana. Para ello, se sembraron en medio con higromicina

aproximadamente 100 semillas de cada línea obtenida y se realizó una contabilización de crecimiento en higromicina 13 días más tarde.

El análisis de segregación test de Chi² (p-valor = 0.05), permite comparar los datos observados con los esperados según las leyes de Mendel, con el fin de establecer qué líneas han segregado de forma estable el inserto de interés como una única copia. Se seleccionaron aquellas semillas (T2) que se ajustaban a la segregación mendeliana $\frac{3}{4}$ de semillas resistentes (Hyg^R) y $\frac{1}{4}$ de semillas sensibles (Hyg^S). En total se eligieron seis de GFP, cinco de eIF5A2^{WT}-GFP; cuatro de eIF5A2^{S2A}-GFP y ocho para eIF5A2^{S2D}-GFP (Anexo).

4.3.1 Caracterización molecular de las líneas transgénicas eIF5A2-GFP

A pesar de los análisis estadísticos que nos ayudan a seleccionar las líneas transgénicas, la inserción de genes por *Agrobacterium*, genera con frecuencia eventos de transformación múltiple que introduce varios insertos en tándem que segregan conjuntamente, pero que conlleva problemas de silenciamiento génico y, por extensión fenotipos que no se deberían a la expresión del transgén.

Por ello, una vez aisladas las líneas transgénicas por su resistencia a higromicina, nos interesaba demostrar la expresión de los transgenes. Con este objetivo, utilizamos dos aproximaciones. Por un lado detectamos la expresión de las proteínas de fusión a GFP por la señal de fluorescencia en el microscopio confocal. Por otro lado, utilizamos la técnica de WB para la detección inmunogénica de las proteínas de fusión.

En base a los resultados de segregación, se llevaron al microscopio confocal las plantas resistentes a higromicina para determinar la emisión de fluorescencia de las líneas transgénicas (35S::eIF5A2^{WT}-GFP, 35S::eIF5A2^{S2A}-GFP, 35S::eIF5A2^{S2D}-GFP) y plásmido vacío (35S::GFP) en células de la raíz. La señal de GFP se detectó tanto en el citoplasma como en el núcleo de las células y se seleccionaron aquellas con mayor señal fluorescente (Fig. 20). En todos los casos pudimos detectar la expresión de las proteínas fluorescentes tanto en citosol como en núcleo, dependiendo del tipo celular.

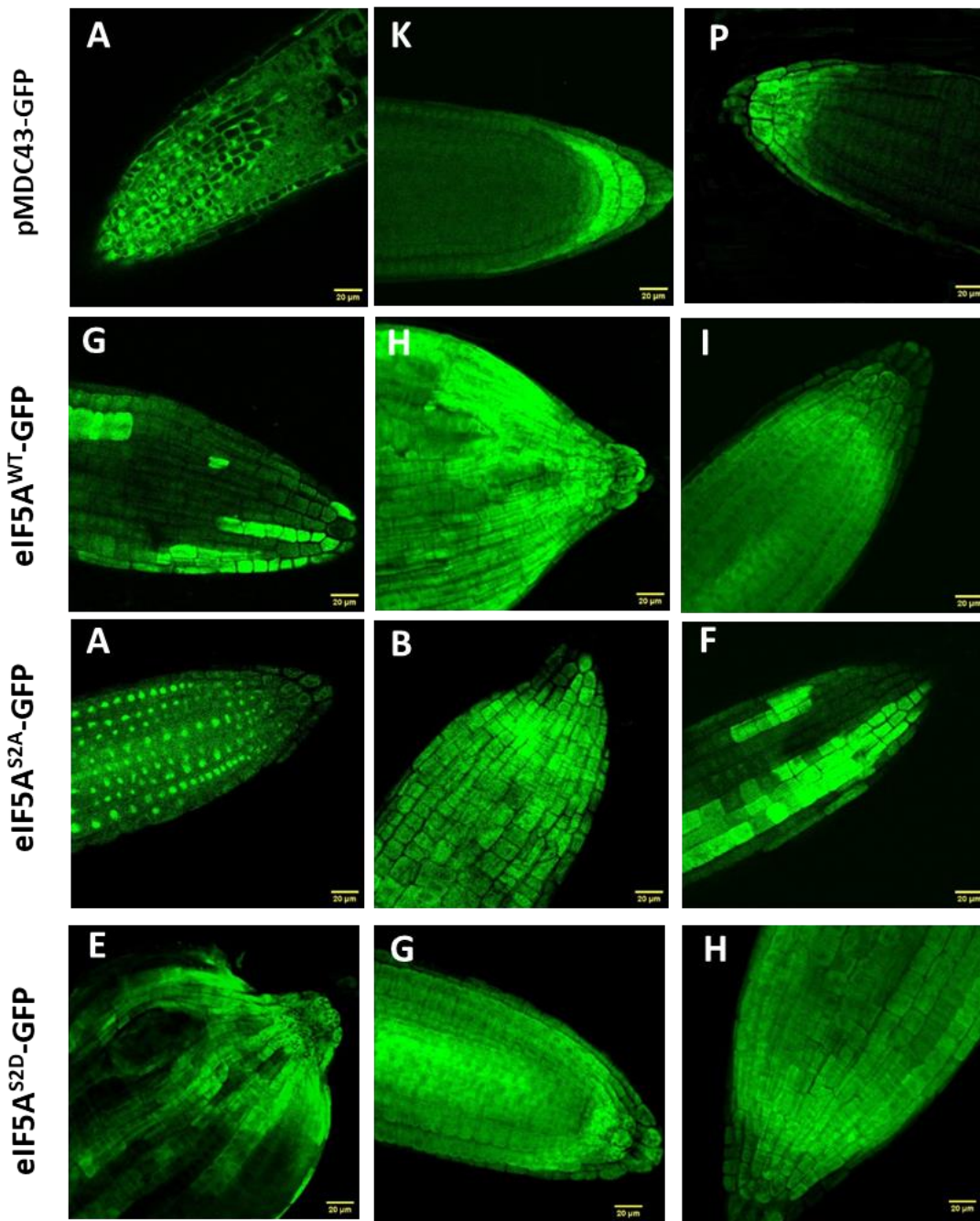


Figura 20. Visualización de fluorescencia en plantas transgénicas. Escala 20 μm .

El siguiente protocolo utilizado para demostrar la expresión de los transgenes fue la técnica de WB. Para ello se recolectaron las plántulas de las tres líneas independientes de cada mutación seleccionada (Tabla 2) después de 13 días de crecimiento y se realizó la extracción proteica.

Tabla 2. Resumen de las líneas transgénicas T2 seleccionadas.

INSERTO	LÍNEAS SELECCIONADAS
T2 GFP	A, K, P
T2 eIF5A2 ^{WT} -GFP	G, H, I
T2 eIF5A2 ^{S2A} -GFP	A, B, F
T2 eIF5A2 ^{S2D} -GFP	E, G, H

En la figura. 21, se muestra el análisis por WB, que se llevó a cabo mediante el anticuerpo policlonal anti-eIF5A que permitía inmuno-detectar tanto la isoforma endógena (≈ 17 kDa) como la fusión a GFP (≈ 52 kDa). También realizamos otro WB con anticuerpo anti-GFP para reconocer la GFP sola, así como las fusiones traduccionales a GFP

Los resultados del WB corroboran los de microscopía confocal mostrando todas las líneas una expresión detectable de las proteínas, salvo la línea G de eIF5A2^{WT}-GFP con bajo nivel de expresión. Estos datos permiten continuar con la selección de plantas transgénicas T3 homocigotas ya en marcha y que permitirán estudiar en el futuro con mayor precisión en condiciones de deficiencia energética, la expresión de estas proteínas de fusión a GFP y los detalles de su localización subcelular en distintas condiciones de crecimiento.

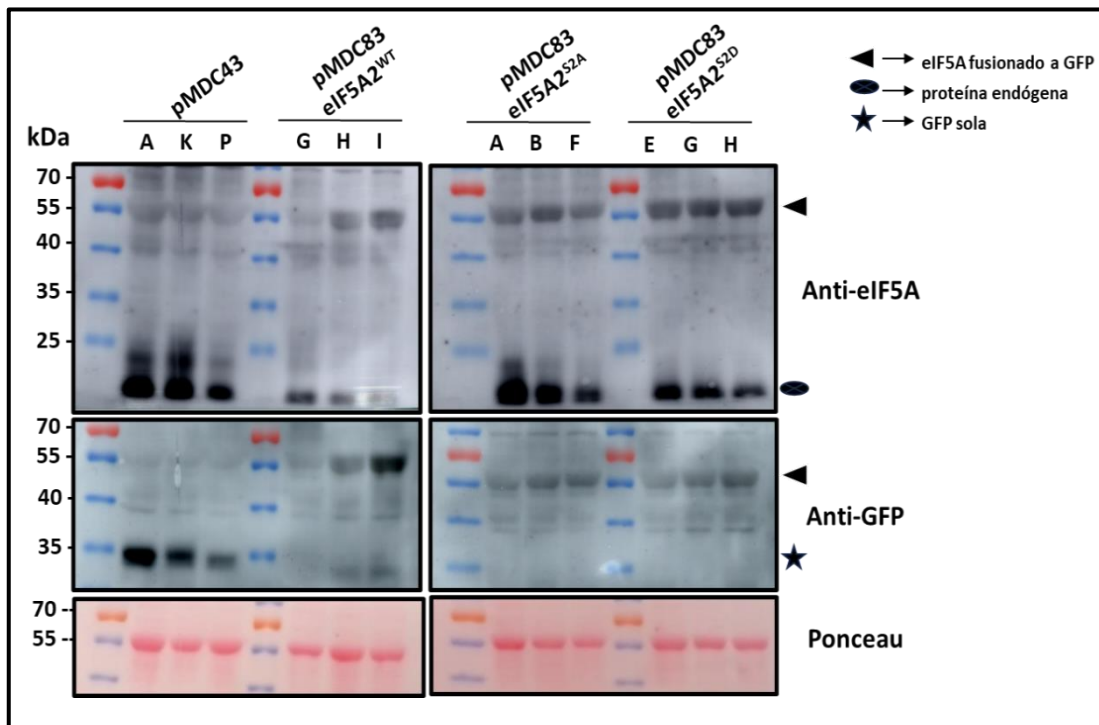


Figura 21. Detección inmunológica por WB de las proteínas eIF5A y GFP en plantas transgénicas.

V. DISCUSIÓN

En este trabajo se ha profundizado en el estudio del factor de traducción eIF5A2, en concreto hemos estudiado el efecto de variantes en la S2 (fosfomutante S2A y fosfomimético S2D), sobre la interacción descrita recientemente con la proteína de autofagia ATG8. También hemos estudiado la estabilidad de eIF5A2 en condiciones de suficiencia e insuficiencia energética en oscuridad teniendo en cuenta su regulación por la quinasa SnRK1 en esas condiciones. Por último, se han obtenido plantas transgénicas de las distintas proteoformas silvestre y mutantes de eIF5A2 (WT, S2A, S2D) fusionadas a GFP para estudios *in vivo* en planta de la estabilidad y la localización subcelular de estas variantes proteicas.

El laboratorio colaborador dirigido por la Prof. Celine Masclaux-Daubresse (INRAE-AgroParis Tech, France) ha identificado recientemente a eIF5A2 como proteína interactora de ATG8 (en experimentos de inmunoprecipitación de GFP-ATG8 y validaciones por Y2H). Estos datos concuerdan con datos publicados sobre la función activa de eIF5A2 en el proceso de autofagia en células animales como regulador traduccional de proteínas implicadas en la ruta de autofagia (ATG3 y TFEB) y con el hecho de que eIF5A2 contiene sitios consenso de unión a ATG8 (motivos AIM). La interacción ATG8-eIF5A plantea la cuestión de la naturaleza de tal proximidad física con la posibilidad de que eIF5A sea un sustrato de autofagia. Estudios previos del laboratorio apuntan a esa idea ya que en condiciones de inactivación genética (mutantes *atg*) o farmacológica (concanamicina A) la proteína eIF5A muestra estabilización (Marín, 2024). Lo que resulta contraintuitivo es que la mayor estabilización de eIF5A parece producirse en condiciones de deficiencia nutricional que inducen la ruta de autofagia. También en tales condiciones, como la incubación de plantas en oscuridad, eIF5A sufre fosforilación diferencial dependiente de SnRK1 en su S2, residuo no conservado en todos los eucariotas, sólo presente en hongos y plantas (Nukarinen *et al.*, 2016). Una posibilidad que queríamos evaluar con este trabajo es si la fosforilación de la S2 de eIF5A pudiera estar implicada en la interacción con ATG8 y por consiguiente en su estabilidad proteica. Para ello, realizamos estudios de interacciones proteicas con las proteoformas de eIF5A fosfomutantes (S2A) y fosfomiméticas (S2D) y 3 isoformas distintas de ATG8: ATG8e, ATG8h y ATG8i.

Iniciamos los ensayos de interacción mediante la técnica de doble híbrido en levadura (Y2H) pero no conseguimos visualizar interacciones proteicas en ningún caso (Fig. 9). Curiosamente en el laboratorio de la Prof. Celine Masclaux – Daubresse solo se encontró interacción por Y2H de eIF5A2 con las isoformas ATG8i, ATG8h. Sin embargo, en estudios previos de nuestro laboratorio por BiFC (De la Cuadra, 2022) pudimos demostrar interacción de eIF5A2 con todas las isoformas de ATG8 excepto ATG8g lo cual sugiere alguna limitación para el estudio de estas interacciones proteicas mediante la técnica de Y2H.

Abordamos por lo tanto los estudios de interacciones proteicas mediante ensayos de interacción BiFC en *N. benthamiana* utilizando NBR1 como interactor conocido de ATG8 y las variantes mutantes de eIF5A2, con las 3 isoformas de ATG8: ATG8e, ATG8h y ATG8i. En estos casos sí pudimos encontrar interacciones de la proteoformas de eIF5A2 con las 3 isoformas de ATG8 si bien la señal más aparente se detectó en los núcleos en forma de agregados de naturaleza desconocida. La interacción ATG8-NBR1 quedo circunscrita a agregados citosólicos (Fig. 11, 13 y 15). Para visualizar con mayor detalle las localizaciones nucleares, en el caso de las interacciones con la isoforma ATG8h incluimos un marcador nuclear que nos sirvió para corroborar dicha localización y, además, pudimos demostrar que la señal se localizaba aparentemente fuera de los nucleolos.

Sin embargo, las mutaciones en la S2 de eIF5A2 nos demuestran que no afectan la interacción con ATG8 ya que no visualizamos diferencias ni en la localización subcelular ni en la intensidad de la interacción. La formación de estos agregados nucleares donde interaccionan eIF5A-ATG8, de naturaleza desconocida son probablemente la razón por la que la técnica de doble híbrido (Y2H) no funciona adecuadamente para el estudio de esta interacción proteica.

Desconocemos la naturaleza de los agregados nucleares observados, pero se sabe que en las plantas existen diferentes tipos de cuerpos nucleares, que son estructuras dinámicas de condensados biomoleculares (Muñoz-Díaz & Sáez-Vásquez, 2022). En células humanas tanto eIF5A como ATG8 sufren modificaciones post-traduccionales, como la acetilación, que parece controlar la localización subcelular y su estabilidad en el núcleo (Guo & Zhou, 2024; Jacomin *et al.*, 2020; Nieto-Torres *et al.*, 2023). Además, en células humanas se ha demostrado que en ciertas condiciones ATG8 se recluta al núcleo en agregados denominados cuerpos PML, y que esta localización varía según el estado del ciclo celular (He *et al.*, 2014). Estos agregados PML se han descrito como centros catalíticos de SUMOilación y de interacción con el sistema de degradación vía ubiquitina -proteasoma (Patra & Müller, 2021). Todavía falta por determinar la relevancia de estos agregados nucleares sobre la función de las proteínas ensambladas y si está relacionada con la estabilidad proteica de eIF5A.

El estudio de la estabilidad de eIF5A2 se inició en estudios previos del laboratorio donde ya se demostró que la estabilidad de la proteína depende de la ruta de autofagia (Marín, 2024) y que en condiciones de deficiencia nutricional la proteína se estabiliza. En este trabajo hemos realizado estudios de expresión proteica en condiciones de deficiencia energética en medio sin sacarosa y oscuridad, para determinar con mayor precisión la cinética de estabilización de la proteína eIF5A. Los resultados obtenidos (Fig. 16) muestra que a partir del cuarto día en oscuridad la proteína eIF5A sufre una estabilización que aumenta en los días siguientes a pesar de las condiciones de probable inducción de autofagia. Cabe recordar que en estas condiciones la S2 de la proteína eIF5A está desfosforilada por lo que de alguna manera esta modificación contribuye a su mayor estabilidad, aunque no parece afectar a la interacción con ATG8 según los datos de BiFC. La correlación entre las

proteoformas desfosforiladas y la mayor estabilidad proteica, fueron corroboradas en estudios previos del laboratorio empleando mutantes de desactivación condicional en la quinasa *CK2* (responsable de la fosforilación de la S2), demostrando que la menor fosforilación de eIF5A en dichos mutantes producía una estabilización de proteoformas más ácidas, probablemente no hipusinadas (Belda-Palazón *et al.*, 2014). Sin embargo, en las líneas transgénicas eIF5A2-GFP generadas (actualmente en generación T2) tampoco pudimos detectar diferencias relevantes en la localización subcelular de las distintas proteoformas (WT, S2A, S2D). Faltaría por determinar los niveles de las variantes de las proteoformas de eIF5A2 por WB para estudiar si afectan a los niveles de proteína y qué ocurre en condiciones de oscuridad. No obstante, hay que tener en cuenta que tanto las construcciones empleadas en el ensayo BiFC como en las plantas transgénicas, las fusiones traduccionales a GFP o YFP pueden interferir en la actividad de eIF5A, casi con seguridad limitando su actividad en el ribosoma, por lo que probablemente estaremos visualizando la localización de la proteoforma fuera del ribosoma.

En base a los resultados de eIF5A2 como sustrato de autofagia se confirma que este responde a las condiciones ambientales, siendo regulado, probablemente por el eje de quinasas SnRK1/TOR/CK2 (Fig. 22). El aumento de la fosforilación de la S2 en mutantes *snrk1* en oscuridad, sugiere una activación indirecta por el eje TOR/CK2. En condiciones de suficiencia energética, con TOR activa, eIF5A2 se encuentra fosforilado y es inestable. Es probable que en estas condiciones en las que sigue funcionando autofagia basal, su estabilidad dependa de la ruta de autofagia. En condiciones de activación de SnRK1 por deficiencia energética, como en oscuridad, eIF5A se encuentra en su forma desfosforilada y su estabilidad aumenta. En estas condiciones debe producirse un incremento de la ruta de autofagia y por tanto la mayor estabilización de eIF5A debe requerir algún sistema de protección. Una posibilidad sería que los agregados nucleares identificados en este trabajo permitan una estabilidad de la proteína. En este sentido, estudios recientes han demostrado que la SUMOilación de eIF5A protege de su degradación por la vía ubiquitina-proteasoma probablemente en el núcleo (Seoane *et al.*, 2024).

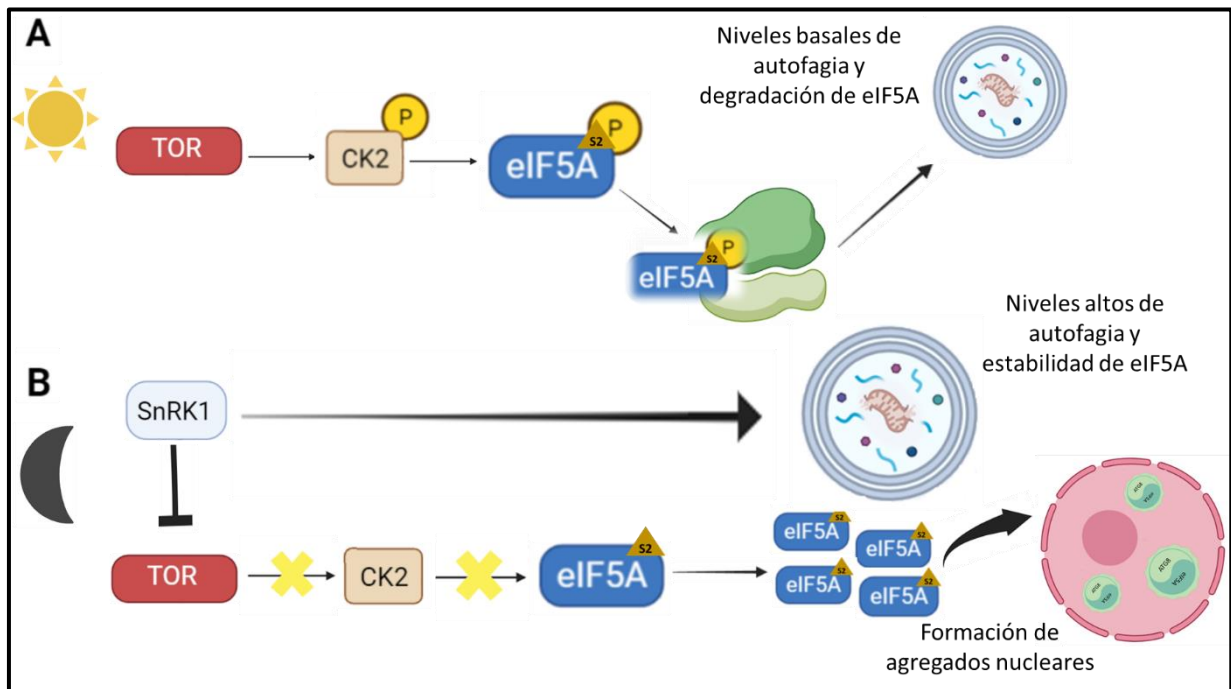


Figura 22. Regulación hipotética de eIF5A por el eje regulador SnRK1/TOR y su estado de fosforilación en la S2 en relación al proceso de autofagia. A) En condiciones de suficiencia energética, la activación de TOR inhibe el proceso de autofagia, que se mantiene en niveles basales, e inicia la cascada de fosforilación de eIF5A a través de la quinasa CK2. La fosforilación de eIF5A conllevaría altos niveles de traducción, y una elevada tasa de recambio vía autofagia. B) En condiciones de deficiencia energética (oscuridad), la activación de SnRK1 activa el proceso de autofagia directamente, e indirectamente inhibiendo a TOR, lo que conlleva una menor fosforilación de eIF5A. La proteoforma desfosforilada de eIF5A sería más estable, quizás por la formación de agregados nucleares junto a ATG8 en el núcleo. Esquema realizado con software BioRender.

Futuros estudios con líneas homocigotas transgénicas eIF5A2-GFP con sus variantes en la S2 permitirán estudios más detallados sobre la localización nuclear y la formación de condensados nucleares para validar la hipótesis de que puedan servir de sistemas de protección de degradación proteolítica.

VI. CONCLUSIONES

- ❖ Se ha demostrado la interacción física de eIF5A2 y ATG8 (ATG8e, ATG8h, ATG8i) mediante la técnica de BiFC en forma de agregados o condensados nucleares cuya naturaleza se desconoce. Los resultados negativos de interacción por Y2H pueden ser debidos a la formación de este tipo de agregados.
- ❖ Las variantes de eIF5A en la S2 (S2A, S2D) no mostraron diferencias de interacción con ATG8 respecto a la proteoforma silvestre en cuanto a localización subcelular e intensidad.
- ❖ En el ensayo de estabilidad de la proteína eIF5A2 se demostró que sus niveles se empiezan a estabilizar al cabo de 3-4 días en oscuridad y que aumentan en los días siguientes, lo que sugiere un sistema especial de protección para evitar su degradación.
- ❖ Se obtuvieron las líneas transgénicas T2, que expresan GFP, eIF5A2^{WT}-GFP, eIF5A2^{S2A}-GFP y eIF5A2^{S2D}-GFP que permitirán estudios de localización subcelular y estabilidad proteica con las líneas homocigotas T3 en proceso de obtención. Los datos preliminares con las líneas T2 sugieren que no hay cambios en la localización subcelular de las proteoformas S2A y S2D de eIF5A2.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Material biológico y condiciones de crecimiento.

7.1.1 *E. coli*

Medios de cultivo y condiciones de crecimiento.

El medio de cultivo utilizado para esta bacteria fue el medio Luria Bertani Lennox (LB), que contiene 1% de triptona, 0.5% de extracto de levadura y 1% de cloruro de sodio (NaCl). Para preparar el medio LB sólido se le añade agar bacteriológico al 2%. El medio se esteriliza a 120°C y 1 atm de presión durante 20 minutos. En los diferentes experimentos donde se requirió el medio LB se le adicionaron antibióticos (ver Tabla 3) y se dejó solidificar a temperatura ambiente. Las condiciones de crecimiento para las colonias fue en la cámara de cultivo a 37°C.

Reacciones de transformación.

La transformación de cepas competentes de *E. coli* (TOP10) se empezó a incubar durante 30 minutos en hielo un volumen de 3 µL de las reacciones de recombinación GATEWAY con 50 µL de células competentes. Seguido se realizó el choque térmico a 42°C durante 2 minutos. Para acondicionar, añadimos 1mL de medio LB y se incubó 60 minutos a 37°C. Tras el tiempo de incubación, se centrifugó 1 minuto para sedimentar las células y se descartó el sobrenadante dejando 100 µL en el tubo, para volver a resuspender el centrifugado, que se plaquea posteriormente en las placas con medio de LB (sólido) y el antibiótico selectivo. Las placas se dejaron creciendo toda la noche en la cámara de cultivo.

7.1.2 Levadura

Medios de cultivo y condiciones de crecimiento

El medio de cultivo no selectivo utilizado para el crecimiento de las levaduras fue el medio YPD, el cual está compuesto por extracto de levadura al 1%, peptona 2% y D-glucosa al 2%. Para preparar el medio YPD sólido se le añade agar bacteriológico al 2%. El medio se esteriliza a 120°C y 1 atm de presión durante 20 minutos. En caso del medio mínimo sintético, empleamos el medio SD (YNB 0.7%, Glu 2% y MES 50mM), y las auxotrofías para las cepas empleadas: 30 mg/L de histidina (H) y adenina (Ade), y 100 mg/L de leucina (L) o triptófano (W). Al plaquear se dejaba a temperatura ambiente para solidificar. Las células crecieron en la cámara de cultivo de 28-30°C por 2- 3 días.

Reacciones de transformación

Las cepas haploides utilizadas para los experimentos de doble híbrido fueron Y187 y Y190. Ambas con auxotrofías para histidina, adenina, leucina y triptófano y como gen reportero lacZ. La cepa Y187 fue utilizada para transformación con plásmidos pGADT7 (con gen marcador para auxotrofia de L) y la cepa Y190 fue utilizada para transformación

con plásmidos pGBKT7 (con gen marcador para auxotrofia de W). Para la preparación de células competentes se usaron células crecidas hasta una OD₆₀₀ (0.8-1) se centrifugan por 5 minutos a 4000 rpm, y se hace un lavado con agua estéril. A continuación se centrifugan nuevamente y se resuspenden con un volumen 1/20 del inicial con Li-TE (0.1M acetato de litio, 10mM Tris-HCl pH7.6 y 1mM EDTA) se incubaron por 60 minutos a 28-30°C. Transcurrido ese tiempo, se centrifugan las células y se resuspenden con un volumen 1/100 del cultivo inicial con G-Li-TE (12% glicerol en Li-TE y distribuimos alícuotas de 100 µL para disponer de células competentes listas para ser transformadas o guardadas a -80°C hasta su uso. La transformación de las cepas competentes de levadura se realizó añadiendo a cada alícuota de competentes 10 µL carrier DNA (DNA esperma salmón 1%), 0.1-10 µg del DNA plasmídico y 700 µL de PEG-Li-TE (40% PEG-4000 en Li-TE), se mezcla y se deja incubar por 40 minutos a temperatura ambiente. Luego se realizó el choque térmico a 42°C durante 20 minutos, y tras centrifugar las células se resuspenden con 100 µL de Sorbitol 1M y se plaquean en placas con medio selectivo SD+H+Ade+L para Y190 y SD+H+Ade+W para Y187. Las placas se dejaron crecer en la cámara de cultivo a 28-30°C durante 2- 3 días.

Obtención de cepas diploides por “mating”

Obtenidas las levaduras haploides transformadas con los plásmidos de interés de Y2H (cepa Y187 con plásmidos derivados de pGADT7 y cepa Y190 con plásmidos derivados de pGBKT7), se realiza el cruce genético “mating” para la obtención de las levaduras diploides que lleven los dos plásmidos. Crecemos ambas levaduras haploides en medio selectivo líquido y una vez crecidas se toman 100 µL de los cultivos, se centrifugan 1 minuto, se resuspenden con 200 µL YPD y posteriormente se juntan ambos para el mating. La mezcla de cultivos se incuba toda la noche a 28°C con agitación. Al día siguiente se centrifugan y se resuspenden en 100 µL de agua destilada autoclavada y se plaquean en el medio selectivo (SD+H+Ade) durante 2-3 días para obtener colonias diploides. Una vez obtenida la levadura diploide con los plásmidos, se crecen en medio líquido. A partir de estos cultivos se realiza la técnica de crecimiento por goteo, para lo que se depositan 3 µL de los cultivos saturados en placas de medio selectivo preparadas con Xgal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido a 80 µg/mL en medio mínimo tamponado con fosfato potásico 0.1M pH 7). Las placas se dejaron crecer en la cámara de cultivo a 28-30°C por 2- 3 días.

7.1.3 *Nicotiana benthamiana*

Condiciones de crecimiento de la planta.

Se usaron plantas crecidas en condiciones de día largo (16 horas luz/8 horas oscuridad) a 23°C durante 4 semanas. Con las condiciones óptimas las plantas son agroinfiltradas en la parte abaxial de la hoja, y se analiza el área infectada después de 2 días.

Agroinfiltración

Las construcciones ya disponibles en el laboratorio, se encontraban en la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* GV3101pMP90 (resistentes a rifampicina y gentamicina) con los genes de interés en los plásmidos YFN43 y YFC43 (Belda-Palazón *et al.*, 2012). Además se usó la construcción anti-silenciamiento p19 (Voinnet *et al.*, 2003). Las cepas de *Agrobacterium tumefaciens* se crecieron toda la noche a 28-30°C. Al día siguiente se recogen las bacterias con una OD₆₆₀ (entre 1 y 2 unidades), se centrifugan y se resuspenden en el medio de inducción (10mM MES pH5.6, 10mM Cl₂Mg y 200 μM acetosiringona). A continuación se mezclaron las cepas de *Agrobacterium* de interés junto con p19 a una OD₆₆₀ aproximada de 1 y se incubaron 2-3 horas en la cámara de cultivo a 28-30°C. Posteriormente se infiltraron hojas de plantas de *Nicotiana benthamiana* de unas 4 semanas de edad mediante jeringuilla sin aguja por la cara abaxial de las hojas a ambos lados del nervio principal. Las hojas se recogieron entre 2 y 3 días tras la infiltración para su observación en el microscopio confocal.

7.1.4 Arabidopsis thaliana

Cultivo en invernadero y transformación por floral-dip

El genotipo silvestre con el que se trabajó es el ecotipo Col-0 que es el fondo genético utilizado para generar las plantas transgénicas. Para el cultivo de las plantas en el invernadero se utilizaron alveolos de poliestireno con sustrato compuesto por turba, vermiculita y perlita. Las condiciones de la cámara de cultivo son fotoperiodo de día largo (16 horas luz y 6 horas oscuridad) a 22°C. Una vez llegaron las plantas a floración se realizó la técnica de floral-dip. Para ello se crecieron las cepas de *Agrobacterium* toda la noche (200 mL cultivo) y al día siguiente se centrifugaron y resuspendieron con la solución de infiltración (5% sacarosa con 0.05% Silwet L77) a una OD₆₆₀ aproximada de 1, y se utilizaron para sumergir las plantas con flores dos veces seguidas durante 10-15 segundos. Después se colocaron las plantas en posición lateral y cubiertas con plástico transparente para mantener la humedad durante 24 horas. Posteriormente se continuó el proceso de regado durante unos días y se procedió al secado de las semillas.

Medios de cultivo y condiciones de crecimiento *in vitro*.

El medio de cultivo utilizado para el crecimiento *in vitro* de las semillas es el medio Murashige & Skoog (MS) cuya composición es 2.45 gr/L de sales MS (Duchefa Biochemie); 1.03 gr/L de MES. El pH de los medios se ajustó a 5.7 con KOH 2M. Además se agrega 1% de Phyto agar (Duchefa Biochemie) para su solidificación. Los medios preparados se autoclavaron a 120°C a 1 atm de presión durante 20 minutos. Para la selección de plántulas transgénicas se adicionó antibiótico higromicina (50mg/L). Los cultivos se realizaron en placas Petri de 100 mm x 15 mm, además de placas cuadradas de 245 mm x 245 mm. Para realizar los ensayos *in vitro* de forma estéril se usaron cabinas de flujo laminar.

Las condiciones de crecimiento *in vitro* para las semillas y plántulas son en el fitotrón con fotoperiodo de día largo 16 horas luz (22°C) y 8 de oscuridad (19°C). Para aquellos experimentos que se sometieron a oscuridad las semillas o plántulas en las placas se envolvieron en papel de aluminio dentro de la cámara de cultivo en las mismas condiciones de temperatura.

Esterilización y siembra de las semillas

Para la esterilización de las semillas se utilizaron dos metodologías diferentes: a) esterilización con gas cloro para la identificación de plantas transgénicas T1, y b) esterilización con etanol para el resto de experimentos. La esterilización con gas cloro, se realizó en tubos eppendorf de 1.5 mL que contenían aproximadamente 100-150 semillas. Los tubos se colocaron abiertos en una gradilla en el interior de un recipiente hermético de 10 L de capacidad cuyo interior colocamos en vaso de precipitados una solución de 200 mL de hipoclorito de sodio (lejía comercial) al que se le adiciono con mucho cuidado 6 mL de HCl y se cerró el recipiente de forma hermética. Transcurrida una hora recogemos las semillas esterilizadas. En el caso de la esterilización con etanol, las semillas (aproximadamente 40 µL en tubo eppendorf) fueron lavadas por inmersión continua durante 2-3 minutos con la solución I (etanol 70% + Tritón X-100 0.005%) que se retira y a continuación con 1 mL solución II (etanol 96%) nuevamente durante 2-3 minutos para finalmente, colocar las semillas en papel de filtro estéril para su secado.

Una vez esterilizadas las semillas se procede a la siembra de forma manual con palillos de madera estériles. Una vez sembradas las placas son selladas con Micropore 3M y llevadas a estratificación a 4°C en oscuridad durante 2 días antes de colocarlas en el fitotrón para su crecimiento.

7.2 Técnicas de manipulación y análisis de ADN

7.2.1 Técnica de clonación

Utilizamos la técnica de clonaje por recombinación GATEWAY. Para la reacción LR en un tubo de 1,5 mL se añadieron 2 µL del vector de entrada (aproximadamente 100ng) que contiene el fragmento de interés con sitios *attL*, 2 µL del vector destino (aproximadamente 100ng) con sitios *attR* y 1 µL de LR Clonasa y se deja incubar toda la noche a 25°C. Posteriormente se añadió 1 µL de proteinasa K se incubó 10 minutos a 37°C. La mezcla de reacción la guardamos a -20°C hasta el momento de ser utilizada para la transformación de células competentes de *E. coli*.

Tabla 3. Plásmidos de entradas y destino utilizados para la clonación de GATEWAY.

Genes	Plásmido entrada (<i>attL</i>)	Plásmido destino (<i>attR</i>)	Selección	Fuente
eIF5A2 ^{WT}	pDONRZeo	pGBKT7	Kan ^R	
eIF5A2 ^{S2A}	pDONRZeo	pGBKT7	Kan ^R	
eIF5A2 ^{S2D}	pDONRZeo	pGBKT7	Kan ^R	
NBR1	pDONRZeo	pGBKT7	Kan ^R	
ATG8 (E)		pGADT7	Carbe ^R	INRAE, Paris

7.2.2 Extracción de ADN plasmídico

Para la extracción de plásmidos de *E. coli* transformadas crecimos las colonias en 3 mL de medio LB con el antibiótico de interés. Para la extracción de los plásmidos se utilizó el kit NZY Miniprep (NZYTECH) siguiendo las instrucciones del fabricante. Por último medimos con el nanodrop la concentración del plásmido extraído.

7.2.3 Análisis de restricción

Para la digestión de los plásmidos se utilizó un tubo de 1,5 mL con 100 µg ADN plasmídico, 1 µL del tampón de restricción x10 apropiado, 5U/µg ADN de la enzima de restricción y agua estéril en un volumen final de 10 µL. Tras la incubación a la temperatura adecuada según la enzima de restricción utilizada, se procede a su análisis por electroforesis de agarosa.

7.2.4 Geles de electroforesis de ADN

Los geles de electroforesis de ADN se prepararon con 1% de agarosa en 1x TAE (0.1M Tris, 0.05M ácido acético y 5mM EDTA). La solución se disolvió por calor y una vez atemperado se añadió 1x Real Safe y se esperó a que se solidifique. El marcador de peso molecular usado fue GeneRular 1Kb (Thermofisher) y el tampón de carga con el que se cargaron las muestras fue 6x Loading Dye comercial. Los geles se corrieron y se visualizaron bajo luz UV en el fotodocumentador para su lectura.

7.3 Técnicas de manipulación y análisis de proteínas.

7.3.1 Extracción de proteínas de *Arabidopsis thaliana*.

El material vegetal previamente almacenado a -80°C, se pulveriza con nitrógeno líquido haciendo uso de un mortero previamente esterilizado. Cada muestra se coloca en un tubo de 1.5 mL al que le añadimos 1 µL del tampón de de extracción (50 mM Tris- HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 1% Tritón X-100, 3 mM DTT y PIC (Protein Inhibitor Coctail, Sigma-Aldrich) una pastilla por cada 10 mL de buffer) por cada miligramo de peso fresco de la muestra. Una vez resuspendido el material pulverizado en el tampón, se agito con vortex y se incubó en hielo durante al menos 20 minutos. Las muestras se centrifugan luego a 1200 xg 15 minutos a 4°C y se recupera el sobrenadante en nuevos tubos. A continuación

se toman 40 μ L de cada muestra que se congelaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ previa cuantificación mediante el método de Bradford y se separan también 60 μ L del extracto para procesarla directamente con tampón 4x Laemmli, calentando a $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 5 minutos y se almacenaron a -20 para su posterior análisis.

7.3.2 Geles de electroforesis SDS-PAGE y transferencia

Los genes de SDS-PAGE se preparan habitualmente entre el 10 y el 12% de acrilamida/bisacrilamida con el gel separador 375mM Tris-HCl pH 8.8, 0.1% SDS, 0.2% Temed y 0.08% persulfatoamónico (APS). El gel de empaquetamiento contiene 4% acrilamida/bisacrilamida, 125mM Tris-HCl pH 6.8, 0.1% SDS, 0.8% Temed y 0.1% persulfatoamónico (APS). Una vez se polimerizado el gel, se carga el volumen calculado de las muestras junto al marcador molecular (PageRuler prestained protein ladder, ThermoScientific) con 5 μ L, y se corre el gel con el sistema de BioRad.

Una vez finalizada la electroforesis, se continúa con la transferencia de los geles a las membranas PVDF (Inmmuno-Blot PVDF Membrane), con el tampón de transferencia que contenía 6 gr/L de Tris base y 3.1 gr/L de ácido bórico. Las membranas de PVDF (8 cm de ancho por 6 cm de alto) se activaron previamente con etanol 96% . El sistema de transferencia (Mini Trans-Blot de Bio-Rad) se deja toda la noche a un voltaje de 12 V y en agitación. Terminada la transferencia con las membranas se procedieron a teñirlas con la solución Ponceau S solution (Sigma-Aldrich) durante 5 minutos. Luego se procede a desteñir con ácido acético al 1% para tomar la foto y posteriormente se realizan tres lavados con 1x TBS-T (150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7.6 y 0.05% Tween 20) para eliminar por completo la tinción.

7.3.3 Análisis Western Blot (WB)

Se inicia el protocolo incubando la membrana con la solución de bloqueo (5% leche desnatada en 1x TBS-T) durante 60 minutos. Finalizando este tiempo, se incuba con la solución del anticuerpo primario en 1x TBS-T toda la noche a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Los anticuerpos primarios utilizados fueron el policlonal anti-eIF5A (dilución 1:5000) (Belda-Palazón *et al.*, 2014) y el anti-GFP (Rockland, dilución 1:5000). Después de la incubación se realizaron tres lavados con 1x TBS-T duración de 10 minutos, y luego se incuba la membrana con el anticuerpo secundario policlonal conjugado a HRP (Peroxidase Affinipure goat anti-rabbit IgG, Jacksons, dil. 1:15000) durante 60 minutos y nuevamente se realizan tres lavados con 1x TBS-T antes de proceder a la detección por quimioluminiscencia.

Para la detección se utilizó el kit de soluciones quimioluminiscentes Supersignal West PICO PLUS Chemiluminiscent Substrate (Thermofisher) y ECL Western Blotting Deteccion Reagent (Amesham) y en membranas en las que se necesitó mayor señal , se utilizó el Kit ECL Select (Amesham). La señal quimioluminiscente se detectó con el equipo Image Quant 800 (Amersham, GE).

7.4 Técnicas de microscopía confocal.

Las plantas agroinfiltradas con las construcciones para BiFC se observaron por la cara abaxial mediante el microscopio confocal. Para ello, se tomaron secciones circulares del área infectada de la hoja que se montaron sobre portaobjetos con agua. Se utilizó el microscopio AxioObserver 780 confocal microscope (Zeiss). Las condiciones de visualización fueron las siguientes: objetivo 40X; excitación láser argón (488 nm) con ventana de emisión entre 516-560 nm para YFP y 648-709 nm para la fluorescencia de clorofila y láser helio/neón (594nm) para la excitación de la mRFP de localización nuclear con ventana de emisión entre 598-652 nm. Las imágenes obtenidas se procesaron con el software FIJI.

BIBLIOGRAFIA

- Belda-Palazón, B., Almendáriz, C., Martí, E., Carbonell, J. & Ferrando, A. (2016). Relevance of the axis spermidine/eIF5A for plant growth and development. *Frontiers in Plant Science*, 7(MAR2016). <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00245>
- Belda-Palazón, B., Nohales, M. A., Rambla, J. L., Aceña, J. L., Delgado, O., Fustero, S., Martínez, M. C., Granell, A., Carbonell, J. & Ferrando, A. (2014). Biochemical quantitation of the eIF5A hypusination in *Arabidopsis thaliana* uncovers ABA-dependent regulation. *Frontiers in Plant Science*, 5(MAY). <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00202>
- Belda-Palazón, B., Ruiz, L., Martí, E., Tárraga, S., Tiburcio, A. F., Culiáñez, F., Farràs, R., Carrasco, P. & Ferrando, A. (2012). Aminopropyltransferases Involved in Polyamine Biosynthesis Localize Preferentially in the Nucleus of Plant Cells. *PLoS ONE*, 7(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046907>
- De la Cuadra B., A. (2022). Estudio de interacciones proteicas entre el factor de traducción eIF5A2 y proteínas de autofagia. Universidad Politécnica de Valencia.
- Frankel, L. B. (2018). EIF5A mediates autophagy via translation of ATG3. *Autophagy*, 14(7), 1288–1289. <https://doi.org/10.1080/15548627.2018.1491213>
- Guo, K. & Zhou, J. (2024). Insights into eukaryotic translation initiation factor 5A: Its role and mechanisms in protein synthesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1871(8), 119849. <https://doi.org/10.1016/J.BBAMCR.2024.119849>
- He, W., Hu, C. X., Hou, J. K., Fan, L., Xu, Y. W., Liu, M. H., Yan, S. Y., Chen, G. Q. & Huang, Y. (2014). Microtubule-associated protein 1 light chain 3 interacts with and contributes to growth inhibiting effect of PML. *PLoS ONE*, 9(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113089>
- Jacomin, A. C., Petridi, S., Di Monaco, M. & Nezis, I. P. (2020). A nuclear role for Atg8-family proteins. *Autophagy*, 1721–1723. <https://doi.org/10.1080/15548627.2020.1794356>
- Łebaska, M., Ciesielski, A., Szymona, L., Godecka, L., Lewandowska-Gnatowska, E., Szczegieliński, J. & Muszyńska, G. (2010). Phosphorylation of maize eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF5A) by casein kinase 2: Identification of phosphorylated residue and influence on intracellular localization of eIF5A. *Journal of Biological Chemistry*, 285(9), 6217–6226. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.018770>
- Lin, L. Y., Chow, H. X., Chen, C. H., Mitsuda, N., Chou, W. C. & Liu, T. Y. (2023). Role of autophagy-related proteins ATG8f and ATG8h in the maintenance of autophagic activity in *Arabidopsis* roots under phosphate starvation. *Frontiers in Plant Science*, 14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1018984>
- Marín, A. (2024). Modificaciones post-traduccionales y estabilidad del factor de traducción eIF5A2 en respuesta a estrés. Universidad Politécnica de Valencia.
- Muñoz-Díaz, E. & Sáez-Vásquez, J. (2022). Nuclear dynamics: Formation of bodies and trafficking in plant nuclei. *Frontiers in Plant Science*, 13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.984163>

- Nieto-Torres, J. L., Zaretski, S., Liu, T., Adams, P. D. & Hansen, M. (2023). Post-translational modifications of ATG8 proteins – an emerging mechanism of autophagy control. In *Journal of Cell Science* (Vol. 136, Issue 16). Company of Biologists Ltd. <https://doi.org/10.1242/jcs.259725>
- Nukarinen, E., Ngele, T., Pedrotti, L., Wurzinger, B., Mair, A., Landgraf, R., Börnke, F., Hanson, J., Teige, M., Baena-Gonzalez, E., Dröge-Laser, W. & Weckwerth, W. (2016). Quantitative phosphoproteomics reveals the role of the AMPK plant ortholog SnRK1 as a metabolic master regulator under energy deprivation. *Scientific Reports*, 6. <https://doi.org/10.1038/srep31697>
- Patra, U. & Müller, S. (2021). A Tale of Usurpation and Subversion: SUMO-Dependent Integrity of Promyelocytic Leukemia Nuclear Bodies at the Crossroad of Infection and Immunity. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.696234>
- Qi, H., Xia, F. N. & Xiao, S. (2021). Autophagy in plants: Physiological roles and post-translational regulation. *Journal of Integrative Plant Biology*, 63(1), 161–179. <https://doi.org/10.1111/jipb.12941>
- Rogov, V. V., Nezis, I. P., Tsapras, P., Zhang, H., Dagdas, Y., Noda, N. N., Nakatogawa, H., Wirth, M., Mouilleron, S., McEwan, D. G., Behrends, C., Deretic, V., Elazar, Z., Tooze, S. A., Dikic, I., Lamark, T. & Johansen, T. (2023). Atg8 family proteins, LIR/AIM motifs and other interaction modes. *Autophagy Reports*, 2(1). <https://doi.org/10.1080/27694127.2023.2188523>
- Sanchez-Casalongue, M. E., Lee, J., Diamond, A., Shuldiner, S., Moir, R. D. & Willis, I. M. (2015). Differential phosphorylation of a regulatory subunit of protein kinase CK2 by target of rapamycin complex 1 signaling and the Cdc-like kinase Kns. *Journal of Biological Chemistry*, 290(11), 7221–7233. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.626523>
- Seoane, R., Lama-Díaz, T., Romero, A. M., Motiam, A. El, Martínez-Férriz, A., Vidal, S., Bouzaher, Y. H., Blanquer, M., Tolosa, R. M., Castillo Mewa, J. & Martínez, A. (2024). SUMOylation modulates eIF5A activities in both yeast and pancreatic ductal adenocarcinoma cells. *Cellular and Molecular Biology Letters*, 2024(1). <https://doi.org/10.1186/s11658-024>
- Sharma, I., Talakayala, A., Tiwari, M., Asinti, S. & Kirti, P. B. (2024). A synchronized symphony: Intersecting roles of ubiquitin proteasome system and autophagy in cellular degradation. *Plant Physiology and Biochemistry*, 212. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2024.108700>
- Soto-Burgos, J. & Bassham, D. C. (2017). SnRK1 activates autophagy via the TOR signaling pathway in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS ONE*, 12(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182591>
- Su, T., Li, X., Yang, M., Shao, Q., Zhao, Y., Ma, C. & Wang, P. (2020). Autophagy: An Intracellular Degradation Pathway Regulating Plant Survival and Stress Response. *Frontiers in Plant Science*, 11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00164>
- Sun, S., Feng, L., Chung, K. P., Lee, K. M., Cheung, H. H. Y., Luo, M., Ren, K., Law, K. C., Jiang, L., Wong, K. B. & Zhuang, X. (2022). Mechanistic insights into an atypical interaction

- between ATG8 and SH3P2 in *Arabidopsis thaliana*. *Autophagy*, *18*(6), 1350–1366. <https://doi.org/10.1080/15548627.2021.1976965>
- Voinnet, O., Rivas, S., Mestre, P. & Baulcombe, D. (2003). An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *Plant Journal*, *33*(5), 949–956. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2003.01676.x>
- Yang, Y., Xiang, Y. & Niu, Y. (2021). An Overview of the Molecular Mechanisms and Functions of Autophagic Pathways in Plants. *Plant Signaling and Behavior*, *16*(12). <https://doi.org/10.1080/15592324.2021.1977527>
- Zhang, H., Alsaleh, G., Feltham, J., Sun, Y., Napolitano, G., Riffelmacher, T., Charles, P., Frau, L., Hublitz, P., Yu, Z., Mohammed, S., Ballabio, A., Balabanov, S., Mellor, J. & Simon, A. K. (2019). Polyamines Control eIF5A Hypusination, TFE3 Translation, and Autophagy to Reverse B Cell Senescence. *Molecular Cell*, *76*(1), 110-125.e9. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.08.005>
- Zhang, Y. & Chen, Z. (2020). Broad and Complex Roles of NBR1-Mediated Selective Autophagy in Plant Stress Responses. *Cells*, *9*(12). <https://doi.org/10.3390/cells9122562>

ANEXO

Tabla 4. Análisis de segregación de las líneas GFP (T2). Se sembraron 100 semillas para cada línea (17) en medio con higromicina. Las líneas marcadas con verde son las que tuvieron un buen χ^2 ($\chi^2 < 3,84$ con $p\text{-value}=0,05$) y señal en el microscopio confocal

T2 LINE	OBSERVED		TOTAL	EXPECTED		Chi ² Yates	Chi ²	CONFOCAL signal
	HYG+	HGY-		HYG+	HGY-			
T2GFPA	72	26	98	73.5	24.5	0.095	0.122	+
T2GFPB	49	44	93	69.75	23.25	24.111	24.692	
T2GFPC	71	27	98	73.5	24.5	0.286	0.340	+
T2GFPD	65	34	99	74.25	24.75	4.374	4.609	
T2GFPE	66	33	99	74.25	24.75	3.458	3.667	
T2GFPF	77	23	100	75	25	0.280	0.213	+
T2GFPG	84	15	99	74.25	24.75	5.397	5.121	
T2GFPH	55	45	100	75	25	20.813	21.333	
T2GFPI	61	38	99	74.25	24.75	9.114	9.458	
T2GFPJ	82	17	99	74.25	24.75	3.458	3.236	
T2GFPK	71	28	99	74.25	24.75	0.495	0.569	+
T2GFPL	64	33	100	75	25	4.013	4.173	
T2GFPM	76	29	93	69.75	23.25	1.659	1.982	<
T2GFPN	39	45	84	63	21	35.825	36.571	
T2GFPO	31	42	73	54.75	18.25	40.361	41.210	
T2GFPP	75	25	100	75	25	0.013	0.000	+
T2GFPQ	64	36	100	95	25	14.855	14.956	

Tabla 5. Análisis de segregación de las líneas eIF5A2^{WT}-GFP (T2). Se sembraron 100 semillas para cada línea (10) en medio con higromicina. Las líneas marcadas con verde son las que tuvieron un buen chi2 (Chi2 < 3,84 con p-value=0,05) y señal en el microscopio confocal

T2 LINE	OBSERVED		TOTAL	EXPECTED		Chi ² Yates	Chi ²	CONFOCAL signal
	HYG+	HGY-		HYG+	HYG-			
T2WTA	71	29	100	75	25	0.760	0.853	<
T2WTB	46	43	89	66.75	22.25	25.195	25.801	
T2WTC	63	35	98	73.5	24.5	5.728	6.000	
T2WTD	80	20	100	75	25	1.480	1.333	+
T2WTE	50	49	99	74.25	24.75	31.040	31.680	
T2WTF	63	37	100	75	25	7.373	7.680	
T2WTG	68	27	95	71.25	23.75	0.516	0.593	+
T2WTH	72	28	100	75	25	0.413	0.480	++
T2WTI	74	26	100	75	25	0.040	0.053	++
T2WTJ	6	82	88	66	22	216.379	218.182	

Tabla 6 Análisis de segregación de las líneas eIF5A2^{S2A}-GFP (T2). Se sembraron 100 semillas para cada línea (9) en medio con higromicina. Las líneas marcadas con verde son las que tuvieron un buen chi2 (Chi2 < 3,84 con p-value=0,05) y señal en el microscopio confocal

T2 LINE	OBSERVED		TOTAL	EXPECTED		Chi ² Yates	Chi ²	CONFOCAL signal
	HYG+	HGY-		HYG+	HYG-			
T2S2AA	74	25	99	74.25	24.75	0.010	0.003	<
T2S2AB	69	29	98	73.5	24.5	0.993	1.102	+
T2S2AC	61	33	94	70.5	23.5	4.865	5.121	
T2S2AD	60	32	92	69	23	4.449	4.696	
T2S2AE	59	28	87	65.25	21.75	2.218	2.395	
T2S2AF	66	26	92	69	23	0.449	0.522	+
T2S2AG	35	54	89	66.75	22.25	59.472	60.408	
T2S2AH	43	46	89	66.75	22.25	33.105	33.801	
T2S2AI	16	62	78	58.5	19.5	122.068	123.504	

Tabla 7. Análisis de segregación de las líneas eIF5A2^{S2D}-GFP (T2). Se sembraron 100 semillas para cada línea (18) en medio con higromicina. Las líneas marcadas con verde son las que tuvieron un buen chi2 (Chi2 < 3,84 con p-value=0,05) y señal en el microscopio confocal

T2 LINE	OBSERVED		TOTAL	EXPECTED		Chi ² Yates	Chi ²	CONFOCAL signal
	HYG+	HGY-		HYG+	HYG-			
T2S2DA	50	46	96	72	24	26.292	26.889	
T2S2DB	73	27	100	75	25	0.173	0.213	+
T2S2DC	62	37	99	74.25	24.75	7.768	8.084	
T2S2DD	88	22	100	75	25	2.573	2.613	
T2S2DE	68	30	98	73.5	24.5	1.510	1.646	++
T2S2DF	72	22	94	70.5	23.5	0.184	0.128	+
T2S2DG	76	23	99	74.25	24.75	0.226	0.165	++
T2S2DH	79	20	99	74.25	24.75	1.357	1.215	++
T2S2DI	51	39	90	67.5	22.5	15.659	16.133	
T2S2DJ	36	51	87	65.25	21.75	51.567	52.448	
T2S2DK	38	47	85	63.75	21.25	40.812	41.604	
T2S2DL	32	52	84	63	21	60.048	61.016	
T2S2DM	46	44	90	67.5	22.5	26.770	27.393	
T2S2DN	57	41	98	73.5	24.5	14.381	14.816	
T2S2DO	73	25	98	73.5	24.5	0.014	0.014	+
T2S2DP	57	37	94	70.5	23.5	9.972	10.340	
T2S2DQ	0	0	100	75	25	102.013	100.000	
T2S2DR	80	20	100	75	25	1.480	1.333	+