



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

Hipusinación del factor de traducción eIF5A dependiente de poliaminas

Tesis doctoral realizada por

Borja Belda Palazón

Y dirigida por

Dr. Alejandro Ferrando Monleón

Prof. Ramón Serrano Salom

Octubre, 2014

RESUMEN

La hipusinación es una modificación post-traducciona dependiente de espermidina que activa al factor de traducción eIF5A, y que es esencial en todos los eucariotas. En los últimos años se ha sugerido un importante papel para eIF5A en los procesos de senescencia y respuesta a estrés ambiental en plantas, en el establecimiento de la polaridad celular en levadura y su implicación en enfermedades tales como diabetes, VIH-1 o cáncer en humanos. Con el objetivo de caracterizar a nivel molecular la actividad biológica de eIF5A en plantas, hemos establecido una metodología basada en técnicas bioquímicas e inmunológicas para determinar el patrón de hipusinación de eIF5A en *A. thaliana*. La puesta a punto de esta metodología nos ha permitido demostrar que el tratamiento con ácido abscísico inhibe la activación por hipusinación de la isoforma eIF5A1. Además, para tratar de estudiar la función de eIF5A durante el desarrollo de *A. thaliana*, hemos realizado estudios funcionales basados en la caracterización de plantas transgénicas capaces de desactivar genéticamente la ruta dependiente de eIF5A mediante ARN de interferencia, condicionado a la aplicación de dexametasona. La desactivación condicional de la enzima de hipusinación desoxihipusina sintasa, produjo alteraciones durante el desarrollo y en respuesta a condiciones adversas de crecimiento, tales como floración temprana, inhibición del crecimiento de la raíz, alteraciones en los pelos radiculares, ramificación exacerbada del tallo, presencia de elementos traqueales completamente lignificados en hipocotilos, niveles reducidos de óxido nítrico e hipersensibilidad al ácido abscísico, sal y glucosa. Recientemente se ha demostrado que eIF5A es necesario para la traducción de proteínas con más de 3 prolinas sucesivas en su secuencia. El análisis de ontología realizado reveló un enriquecimiento de proteínas con poli-prolinas entre las implicadas en la organización del citoesqueleto de actina. La alteración de la actividad de eIF5A provocó defectos en la estructuración de los filamentos de actina en *A. thaliana*, *S. cerevisiae* y *H. sapiens*. El estudio de mutantes termosensibles de levadura demostró el requerimiento de eIF5A durante el proceso

de reproducción sexual a través de la traducción de la formina Bni1. Los experimentos de regulación traduccional en células HeLa demostraron que el silenciamiento vía ARN de interferencia de eIF5A1 provocaba un defecto en la tasa de traducción de la formina FMNL1 y la proteína ezrina. Estos resultados confirman que la actividad esencial de eIF5A en el ribosoma parece conservada en organismos eucariotas, y afecta fundamentalmente a proteínas con poli-prolinas implicadas en la organización del citoesqueleto de actina.

RESUM

L'hipusinació és una modificació post-traducciona dependent d'espermidina que activa al factor de traducció eIF5A, i que és essencial en tots els eucariotes. En els últims anys s'ha suggerit un important paper per a eIF5A en els processos de senescència i resposta a estrés ambiental en plantes, en l'establiment de la polaritat cel·lular en llevat i la seua implicació en malalties com ara diabetis, VIH-1 o càncer en humans. Amb l'objectiu de caracteritzar a nivell molecular l'activitat biològica d'eIF5A en plantes, hem establert una metodologia basada en tècniques bioquímiques i immunològiques per a determinar el patró d'hipusinació d'eIF5A en *A. thaliana*. La posada a punt d'esta metodologia ens ha permés demostrar que el tractament amb àcid abscísic inhibeix l'activació per hipusinació de la isoforma eIF5A1. A més, per a tractar d'estudiar la funció d'eIF5A durant el desenvolupament de *A. thaliana*, hem realitzat estudis funcionals basats en la caracterització de plantes transgèniques capaces de desactivar genèticament la ruta dependent d'eIF5A per mitjà d'ARN d'interferència, condicionat a l'aplicació de dexametasona. La desactivació condicional de l'enzim de hipusinació desoxihipusina sintasa, va produir alteracions durant el desenvolupament i en resposta a condicions adverses de creixement, com ara floració primerenca, inhibició del creixement de l'arrel, alteracions en els pèls radiculars, ramificació exacerbada de la tija, presència d'elements traqueals completament lignificats en hipocotils, nivells reduïts d'òxid nítric i hipersensibilitat a l'àcid abscísic, sal i glucosa. Recentment s'ha demostrat que eIF5A és necessari per a la traducció de proteïnes amb més de 3 prolines successives en la seua seqüència. L'anàlisi d'ontologia realitzat va revelar un enriquiment de proteïnes amb poli-prolines entre les implicades en l'organització del citosquelet d'actina. L'alteració de l'activitat d'eIF5A va provocar defectes en l'estructuració dels filaments d'actina en *A. thaliana*, *S. cerevisiae* i *H. sapiens*. L'estudi de mutants termosensibles de llevat va demostrar el requeriment d'eIF5A durant el procés de reproducció sexual a través de la traducció de la forma Bni1. Els experiments de regulació traducciona en

cèl·lules HeLa van demostrar que el silenciament via ARN d'interferència d'eIF5A1 provocava un defecte en la taxa de traducció de la formina FMNL1 i la proteïna ezrina. Aquests resultats confirmen que l'activitat essencial d'eIF5A en el ribosoma sembla conservada en organismes eucariotes, i afecta fonamentalment a proteïnes amb poli-prolines implicades en l'organització del citosquelet d'actina.

ABSTRACT

The hypusination is a spermidine dependent post-translational modification required to activate the translation factor eIF5A and it is essential in all eukaryotes. Recent experimental evidences suggest an important role for eIF5A in the processes of senescence and response to environmental stress in plants, in the establishment of cell polarity in yeast and it has been also involved in human diseases such as diabetes, HIV-1 and cancer. In order to characterize at the molecular level the biological activity of eIF5A in plants, we have established a methodology based on biochemical and immunological techniques to determine the hypusination pattern of eIF5A in *A. thaliana*. The implementation of this methodology allowed us to demonstrate that treatment with abscisic acid inhibits the activation by hypusination of the eIF5A1 isoform. In addition, with the aim to understand the functions of eIF5A during the development of *A. thaliana*, we have carried out functional studies based on the characterization of transgenic plants for genetic inactivation of the eIF5A pathway by means of RNA interference conditional to dexamethasone application. Conditional genetic inactivation of the hypusination enzyme deoxyhypusine synthase, produced alterations during development and in response to adverse growing conditions, such as early flowering, root growth inhibition, alterations in root hairs, exacerbated stem branching, completely lignified tracheal elements in hypocotyls, reduced levels of nitric oxide and hypersensitivity to glucose, salt, and abscisic acid. Recently it has been shown that eIF5A is necessary for the translation of proteins with more than 3 successive prolines in their sequence. The ontology analysis revealed an enrichment of proteins with poly-prolines between those involved in the organization of the actin cytoskeleton. Alteration of the eIF5A activity caused defects in the structure of the actin filaments in *A. thaliana*, *S. cerevisiae* and *H. sapiens*. The study of temperature-sensitive mutants of yeast showed eIF5A requirement during the process of sexual mating through the translation of the formin Bni1. Translational regulation experiments in HeLa cells showed that

silencing via RNA interference of eIF5A1 caused a defect in the translation rate of the formin FMNL1 and protein ezrin. These results confirm that the essential eIF5A ribosome activity seems to be conserved in eukaryotes, and affects essentially to proteins with poly-prolines involved in the organization of the actin cytoskeleton.

Índice

• INTRODUCCIÓN.....	1
1. Las plantas y su respuesta frente a cambios ambientales.....	3
2. Las poliaminas como metabolitos reguladores de crecimiento, división y muerte celular.....	4
2.1. Metabolismo de PAs.....	5
2.2. Funciones de las PAs en plantas.....	7
2.3. PAs en otros organismos y su importancia biomédica.....	9
3. De la espermidina a la hipusinación del factor eIF5A.....	10
3.1. La ruta de hipusinación.....	11
3.2. Estructura del factor eIF5A.....	13
3.3. Proteoformas del factor eIF5A.....	14
3.4. Localización subcelular de eIF5A.....	15
3.5. Otras modificaciones: fosforilación y ubiquitilación.....	16
3.6. Dimerización del factor eIF5A.....	17
4. El factor EF-P: ortólogo de eIF5A en eubacterias.....	18
4.1. Estructura del factor EF-P.....	18
4.2. Función del factor EF-P: traducción de secuencias con prolinas consecutivas.....	19
5. Funciones moleculares del factor eIF5A.....	20
5.1. Papel de eIF5A en la elongación de la traducción.....	20
5.2. Papel de eIF5A en la degradación de los ARNm.....	22

Índice

5.3. Implicación de eIF5A en la formación de complejos de ribonucleoproteínas: cuerpos P y gránulos de estrés.....	22
5.4. Implicación de eIF5A en el transporte de ARNm.....	23
5.5. eIF5A y la traducción de proteínas con prolinas sucesivas.....	24
6. Aspectos funcionales del factor eIF5A en organismos eucariotas.....	25
6.1. eIF5A en levadura.....	25
6.2. eIF5A en mamíferos.....	27
6.3. eIF5A en plantas.....	30
7. Hipusinación del factor eIF5A, una caracterización complicada.....	37
• OBJETIVOS.....	39
• RESULTADOS.....	43
1. Patrón de hipusinación del factor eIF5A en <i>A. thaliana</i>.....	45
1.1. Expresión heteróloga de las proteoformas recombinantes no modificadas de eIF5A de <i>A. thaliana</i>	45
1.2. Expresión heteróloga de las proteoformas recombinantes hipusinadas de eIF5A de <i>A. thaliana</i>	47
1.3. Caracterización del perfil 2D-E de eIF5A de <i>A. thaliana</i>	55
1.4. El ABA reduce la hipusinación de eIF5A1 sin afectar a los niveles de transcrito de <i>DHS</i>	60
1.5. Localización subcelular de las proteínas eIF5A.....	63
1.6. Estudios de interacción entre las isoformas de eIF5A de <i>A. thaliana in vivo</i>	66

Índice

2. Función del factor eIF5A en <i>A. thaliana</i>.....	68
2.1. Generación de un sistema inducible de desactivación de eIF5A en <i>A. thaliana</i>	68
2.1.1. Validación del silenciamiento por ARNi de DHS, eIF5A1, eIF5A2 y eIF5A3.....	72
2.1.2. Generación de plantas transgénicas <i>siDHS</i> , <i>sieIF5A1</i> , <i>sieIF5A2</i> y <i>sieIF5A3</i> y comprobación del silenciamiento.....	74
2.2. Caracterización de las líneas de desactivación condicional a lo largo del desarrollo.....	78
2.2.1. Implicación del factor eIF5A en el control del tiempo de floración.....	79
2.2.2. Implicación del factor eIF5A en el desarrollo de la arquitectura del tallo.....	99
2.2.3. Implicación del factor eIF5A en el desarrollo del xilema.....	101
2.2.4. Implicación del factor eIF5A en el desarrollo de la raíz.....	109
2.3. Caracterización de las líneas <i>siDHS</i> en respuesta a diferentes estímulos externos, e interacción con otros procesos de señalización.....	111
2.3.1. Implicación del factor eIF5A en la señalización por ABA.....	112
2.3.2. Implicación del factor eIF5A en el control de los niveles de NO.....	116
2.3.3. Implicación del factor eIF5A en respuesta a factores externos.....	117
3. Dianas moleculares de eIF5A.....	121
3.1. Estudio bioinformático de las proteínas con 3 o más prolinas sucesivas en eucariotas.....	121
3.2. Estudio de los ARNm diana del factor eIF5A, implicados en la organización del citoesqueleto.....	124
3.2.1. Estudio de la implicación del factor eIF5A en el control de la organización del citoesqueleto en <i>A. thaliana</i>	125

Índice

3.2.2. Estudio de los ARNm diana del factor eIF5A, implicados en la organización del citoesqueleto en <i>S. cerevisiae</i>	133
3.2.3. Estudio de los ARNm diana del factor eIF5A, implicados en la organización del citoesqueleto en <i>H. sapiens</i>	138
3.3. Estudio de los ARNm diana del factor eIF5A, implicados en el control del tiempo de floración en <i>A. thaliana</i>	154
3.4. Detección de los ARNm que interaccionan físicamente con eIF5A <i>in vivo</i>	158
• DISCUSIÓN.....	165
1. Necesidad de un sistema de monitorización de la hipusinación.....	167
2. Funciones de eIF5A en el desarrollo de <i>A. thaliana</i>	169
3. Implicación de eIF5A en la organización del citoesqueleto de actina....	174
4. EF-P y eIF5A como mecanismos de control de calidad de la traducción.....	179
• CONCLUSIONES.....	183
• MATERIALES Y MÉTODOS.....	187
1. Material biológico, manipulación y condiciones de crecimiento.....	189
1.1. <i>Escherichia coli</i>	189
1.1.1. Medios de cultivo y temperatura de crecimiento.....	189
1.1.2. Transformación de <i>E. coli</i>	189
1.1.2.1. Electroporación.....	189

Índice

1.1.2.2. Choque térmico.....	190
1.2. <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	191
1.2.1. Medios de cultivo y temperatura de crecimiento.....	191
1.2.2. Transformación de <i>A. tumefaciens</i>	191
1.3. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	191
1.3.1. Cepas.....	191
1.3.2. Medios y condiciones de crecimiento.....	192
1.3.3. Tratamiento con factor α	192
1.4. <i>Arabidopsis thaliana</i>	192
1.4.1. Cultivo <i>in vitro</i>	192
1.4.1.1. Medios de cultivo.....	192
1.4.1.2. Esterilización y siembra de las semillas.....	193
1.4.1.3. Condiciones de crecimiento <i>in vitro</i>	193
1.4.1.4. Tratamiento con dexametasona.....	194
1.4.1.5. Tratamientos con ABA.....	194
1.4.1.6. Tratamientos con sal (NaCl) y glucosa.....	195
1.4.1.7. Tratamiento con 4-EGI-1.....	195
1.4.2. Cultivo en el invernadero.....	195
1.4.2.1. Sustrato, siembra y condiciones de crecimiento.....	196
1.4.2.2. Tratamiento con dexametasona.....	196
1.4.3. Transformación por agro-infección.....	196
1.5. <i>Nicotiana benthamiana</i>	196
1.5.1. Cultivo y condiciones de crecimiento.....	196
1.5.2. Agro-transformación, expresión transitoria y BiFC.....	197

Índice

1.5.3. Tratamiento con dexametasona.....	197
1.6. <i>Homo sapiens</i>	197
1.6.1. Línea celular, medios de cultivo y condiciones de crecimiento.....	197
1.6.2. Tratamiento con GC7.....	198
1.6.3. Transfección con <i>siEF5A1</i>	198
2. Técnicas de análisis y manipulación de ácidos nucleicos.....	198
2.1. Extracción del ADN plasmídico (ADN _p) de <i>E. coli</i>	198
2.2. Reacciones de PCR.....	199
2.3. Técnicas de clonación.....	203
2.3.1. Clonación <i>GATEWAY</i> TM	203
2.3.1.1. Reacción BP.....	203
2.3.1.2. Reacción LR.....	203
2.3.2. Clonación LIC.....	204
2.4. Extracción del ARN total de <i>A. thaliana</i>	205
2.5. Electroforesis de ácidos nucleicos (ADN y ARN).....	206
2.6. Reacciones de transcripción reversa.....	207
2.7. PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR).....	207
3. Técnicas de análisis y manipulación de proteínas.....	210
3.1. Expresión heteróloga en <i>E. coli</i> y purificación de las proteínas recombinantes.....	210
3.2. Extracción de proteínas de <i>S. cerevisiae</i>	212
3.3. Extracción de proteínas de <i>A. thaliana</i>	212
3.4. Extracción de proteínas en <i>H. sapiens</i>	213

Índice

3.5. Electroforesis SDS-PAGE.....	213
3.5.1. 1D-E.....	213
3.5.2. 2D-E.....	214
3.6. Marcaje con fluoróforos y escaneado de la fluorescencia.....	215
3.7. Tinción Coomassie.....	215
3.8. Tinción con nitrato de plata.....	216
3.9. Análisis WB.....	216
3.10. Digestión con tripsina, MALDI-TOF-MS y GCxGC/TOF-MS.....	218
4. Análisis de polisomas.....	218
4.1. <i>A. thaliana</i>	218
4.2. <i>H. Sapiens</i>	219
4.3. Procesado y análisis de las fracciones.....	221
5. Inmunoprecipitación de ARN (RIP).....	222
5.1. Fraccionamiento núcleo-citosol.....	222
5.2. Inmunoprecipitación.....	224
5.3. Extracción del ARN inmunoprecipitado.....	224
5.4. Síntesis de ADNc SMART™ y amplificación por PCR.....	225
5.5. Clonación en <i>pENTR1A-SfiI</i>	226
6. Inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP).....	228
7. Análisis de la tasa de traducción in vivo mediante “Click chemistry”.....	228
7.1. Incorporación del AHA.....	228

Índice

7.2. Reacción de “Click”.....	229
7.3. Purificación de las proteínas biotinizadas.....	229
7.4. Análisis WB y cálculo de la tasa de incremento.....	230
8. Técnicas de microscopía.....	230
8.1. <i>A. thaliana</i>	231
8.1.1. Recuento de tipos celulares del xilema en hipocotilos.....	231
8.1.2. Cortes de hipocotilo para tinción histoquímica.....	231
8.1.3. Tinción con yoduro de propidio.....	232
8.1.4. Detección de NO.....	233
8.1.5. Visualización del citoesqueleto de actina.....	233
8.2. <i>N. benthamiana</i> : experimentos de expresión transitoria y BiFC.....	233
8.3. <i>H. sapiens</i>	234
8.3.1. Tinción con rodamina-faloidina y DAPI.....	234
8.3.2. Inmunofluorescencia indirecta.....	235
• BIBLIOGRAFÍA.....	237
• ANEXO.....	265
1. Figuras suplementarias.....	267
2. Listado de acrónimos y abreviaturas.....	270

INTRODUCCIÓN

1. Las plantas y su respuesta frente a cambios ambientales.

Para sobrevivir, las plantas tienen que soportar constantemente numerosas situaciones de cambio ambiental, como por ejemplo elevadas o muy bajas temperaturas, sequía, elevados niveles de CO₂, salinidad etc. Teniendo en cuenta su naturaleza sésil, las plantas han desarrollado a lo largo de la evolución un amplio y complejo espectro de programas moleculares con los que adaptarse y sobrevivir a dichas condiciones adversas. La comprensión de las estrategias moleculares con las que las plantas ajustan finamente su crecimiento, desarrollo y actividades celulares, acorde a las condiciones ambientales cambiantes, constituye un enorme desafío y ha sido de gran interés para los biólogos y biotecnólogos moleculares en las últimas décadas [1].

Una alta variabilidad genética dentro de una población natural significa una mejora del potencial adaptativo frente a nuevos cambios ambientales, tanto bióticos como abióticos. Parte de esta plasticidad genética dota de una gran capacidad a las plantas para percibir y responder ante un estímulo externo, a través de una compleja red de señalización y cambios moleculares que definen una respuesta controlada. De esta manera, las plantas consiguen un ajuste coordinado entre su crecimiento y desarrollo en relación a la percepción de este estímulo [2] (Figura 1). Las fitohormonas cumplen un papel central en este ajuste, y por ello la elucidación de cada uno de los intervinientes en estas redes de señalización y el conocimiento detallado de los mecanismos de acción hormonal, son de gran interés en la investigación en plantas y, por tanto, de gran valor para la biotecnología vegetal y la agricultura moderna [3].

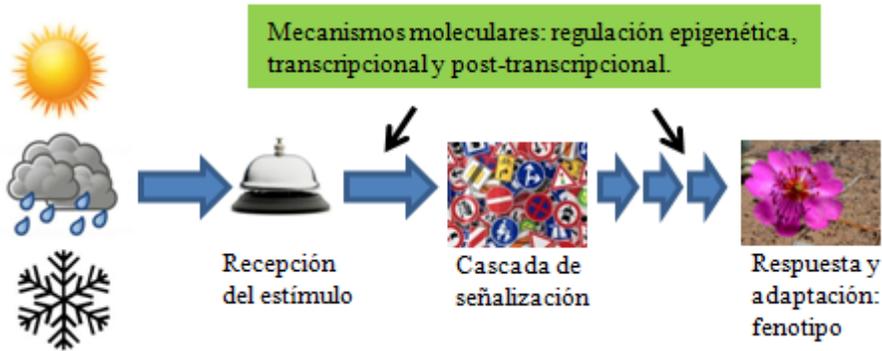


Figura 1. Debido su naturaleza sésil, las plantas han desarrollado una compleja red de mecanismos moleculares mediante los cuales son capaces de responder a factores ambientales.

2. Las poliaminas como metabolitos reguladores de crecimiento, división y muerte celular.

Además de las fitohormonas, estudios genéticos, transcriptómicos y metabolómicos llevados a cabo durante los últimos años, han implicado a otro tipo de factores de crecimiento, las poliaminas (PAs), en los procesos de respuesta a estreses bióticos y abióticos. En estos estudios [4], se ha observado una acumulación de PAs bajo condiciones de estrés biótico y abiótico. Sin embargo, tanto el significado fisiológico de esta acumulación como los mecanismos e implicaciones moleculares que conlleva, son todavía desconocidos. Los avances en la elucidación de sus funciones moleculares, están llevando a la idea de que las PAs podrían actuar como moléculas moduladoras del crecimiento, o de interconexión entre los distintos procesos de respuesta hormonal en situaciones de estrés ambiental. El progreso en la comprensión del papel de las PAs en plantas, está permitiendo el desarrollo de estrategias biotecnológicas para obtener plantas resistentes a estrés, de elevado interés biotecnológico [5].

2.1. Metabolismo de PAs.

Las PAs son policationes alifáticas de bajo peso molecular, presentes en las células de todos los organismos vivos y esenciales para la proliferación celular en eucariotas. En plantas, las PAs más abundantes son la diamina putrescina, la triamina espermidina y las tetraaminas espermina y termoespermina, cada una con su función biológica específica en la adaptación de las plantas al estrés (Figura 2). Estas PAs, pueden encontrarse en su forma libre (PAs solubles), conjugadas con compuestos de bajo peso molecular (PAs ácido solubles), normalmente con moléculas de carácter fenólico como los ácidos hidroxicinámicos, o unidas a macromoléculas (PAs ácido insolubles) como proteínas [6].

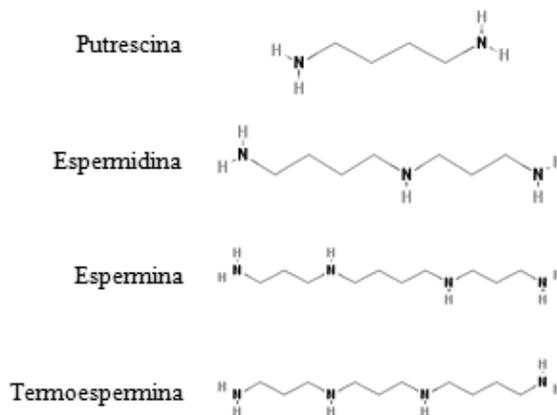


Figura 2. Nombre y estructura de las PAs más abundantes en plantas.

En plantas, la biosíntesis de la putrescina se produce a través de dos vías alternativas. En la primera, proceso que tiene lugar principalmente en el cloroplasto y únicamente en plantas y algunas bacterias, la putrescina se produce indirectamente a partir de la arginina a través de la arginina descarboxilasa (ADC) y la acción de otras dos actividades enzimáticas, N-carbamoilputrescina aminohidrolasa (CPA) y agmatina iminohidrolasa (AIH). En la segunda, presente en el resto de eucariotas, la putrescina se sintetiza directamente en el citosol a partir

Introducción

de la ornitina, por acción de la ornitina descarboxilasa (ODC). Curiosamente, la planta modelo *Arabidopsis thaliana* no posee actividad ODC detectable indicando que la putrescina se produce exclusivamente por la vía ADC [7]. Así pues, la putrescina puede dar lugar a la espermidina, por la actividad enzimática de la espermidina sintasa (SPDS), que cataliza la transferencia de un grupo aminopropilo a la putrescina a partir de la S-adenosilmetionina descarboxilada (SAMdc) generada por la actividad de la S-adenosilmetionina descarboxilasa (SAMDC). La espermidina puede servir como aceptor de otro grupo aminopropilo procedente de la SAMdc, para generar espermina o su isómero termoespermina, por acción de la espermina sintasa (SPMS), o de la termoespermina sintasa (TSPMS), respectivamente [8]. (Figura 3).

En *A. thaliana* existen dos genes que codifican la actividad ADC, *ADC1* y *ADC2*, un único gen para cada una de las enzimas AIH y CPA (*AIH* y *CPA*, respectivamente), dos genes, *SPDS1* y *SPDS2*, que codifican la actividad SPDS, y cuatro genes, *SAMDC1-4*, para la enzima SAMDC. Las actividades SPMS y TSPMS están codificadas por un único gen, *SPMS* y *ACAULIS5 (ACL5)*, respectivamente. Recientes estudios realizados en nuestro laboratorio en los que se explora la localización subcelular, y la capacidad de interacción entre las aminopropiltransferasas, *SPDS1*, *SPDS2* y *SPMS*, mediante complementación bimolecular de la fluorescencia (BiFC) y la realización de ensayos de filtración en gel, han demostrado la capacidad de estas enzimas de interaccionar formando tanto homo como heterodímeros, y que estos complejos se localizan preferentemente en el núcleo celular de las plantas [9].

La degradación de las PAs ocurre a través de una desaminación oxidativa que tiene lugar por medio de amino oxidasas: diamino oxidasa (DAO) y poliamino oxidasa (PAO). La DAO se encarga de la degradación de la putrescina, y la PAO interviene sobre la espermidina, la espermina y la termoespermina [10] (Figura 3). Así pues, los niveles de las PAs libres presentes en la planta, son el resultado neto de su

Introducción

biosíntesis, conjugación con ácidos fenólicos, unión con macromoléculas, transporte a otros tejidos y su degradación [11].

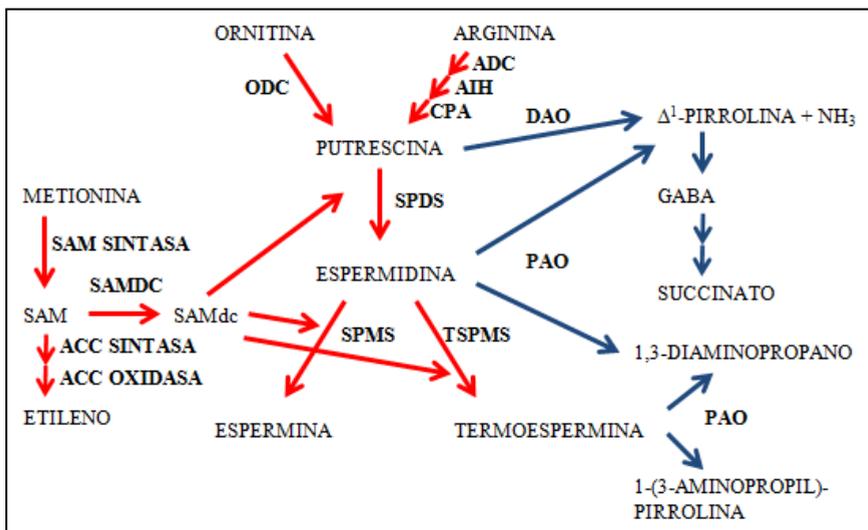


Figura 3. Procesos de biosíntesis y degradación de las PAs en plantas. Las vías anabólicas y catabólicas se señalizan mediante flechas de color rojo y azul, respectivamente. ADC, arginina descarboxilasa; ODC, ornitina descarboxilasa; AIH, agmatina iminohidrolasa; CPA, N-carbamoilputrescina aminohidrolasa; SAM, S-adenosilmetionina; ACC, ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico; SAMDC, S-adenosilmetionina descarboxilasa; SAMdc, S-adenosilmetionina descarboxilada; SPDS, espermidina sintasa; SPMS, espermina sintasa; TSPMS, termoespermina sintasa; GABA, ácido gamma-aminobutírico; DAO, diamino oxidasa; PAO, poliamino oxidasa

2.2. Funciones de las PAs en plantas.

Debido a su naturaleza policatiónica, estos compuestos poseen la capacidad de interactuar mediante uniones electrostáticas con diversas macromoléculas celulares que presentan cargas negativas a pH fisiológico, tales como el ADN, el ARN, la cromatina, fosfolípidos y proteínas. En consecuencia, las PAs han sido implicadas en numerosos procesos celulares fundamentales como, regulación de la expresión génica, traducción, proliferación celular, modulación de la señalización celular, estabilización de membranas y muerte celular programada [12-13]. En

Introducción

plantas, se ha sugerido un importante papel de las PAs en eventos fisiológicos tales como morfogénesis, crecimiento, embriogénesis, senescencia de la hoja, desarrollo y maduración del fruto, y resistencia a estrés biótico y abiótico [4, 14]. Por ejemplo, se ha demostrado que la acumulación de putrescina en condiciones de estrés por frío es esencial para la aclimatación y supervivencia de *A. thaliana* ante bajas temperaturas, observando que mutantes *adc1* y *adc2* mostraban una menor tolerancia al frío en comparación con plantas silvestres [15]. Se comprobó que la putrescina es necesaria para el aumento de los niveles de ácido abscísico (ABA) que ocurre en respuesta a bajas temperaturas [16]. También se ha demostrado el papel protector de la espermina y la termoespermina en condiciones de estrés salino, observando una mayor acumulación de Na^+ y una peor tolerancia a elevada salinidad en mutantes en la síntesis de estas PAs [17]. La espermina y la espermidina también ha sido relacionadas con la resistencia a estrés biótico [4]. Por ejemplo, líneas transgénicas de *A. thaliana* sobre-expresoras de espermina exhiben un incremento en la expresión de genes de defensa, lo que correlaciona con una mayor resistencia [18].

Además de las implicaciones mencionadas anteriormente, se ha demostrado que las PAs, en concreto la espermidina y la espermina, inducen la rápida biosíntesis de óxido nítrico (NO) en tejidos específicos de plántulas de *A. thaliana* [19]. El NO es un gas con una alta capacidad de difusión que juega un papel fundamental en los procesos de regulación hormonal, actuando como mensajero en la señalización intra e intercelular para inducir numerosos procesos en plantas como, la expresión de genes de defensa y muerte celular programada, el cierre de los estomas, la germinación de semillas o el desarrollo de la raíz [20]. Por otro lado, también se ha descrito la implicación de las PAs en el proceso de maduración y diferenciación del xilema. Se ha postulado que la termoespermina es un protector de la muerte celular prematura del xilema, permitiendo la correcta maduración del metaxilema. Mutantes *ac15*, deficientes en la síntesis de esta PA, presentan un engrosamiento incorrecto de la pared secundaria de los elementos traqueales e hiperproliferación

de células inmaduras del xilema, además de la expresión temprana de genes marcadores de muerte celular y, consecuentemente, una aceleración prematura de este proceso [21-22].

2.3. PAs en otros organismos y su importancia biomédica.

En bacterias, las PAs más abundantes son la putrescina y la espermidina, y en menor cantidad, la cadaverina. También se ha detectado termoespermina en bacterias termófilas [23]. Las PAs son componentes de la membrana externa de las bacterias gram negativas y han sido implicadas en la biosíntesis de sideróforos, resistencia a la acidez, protección frente a la toxicidad del oxígeno, y en la señalización necesaria para la diferenciación celular [24]. En bacterias, además de la participación en los procesos metabólicos descritos en plantas, la putrescina puede ser sintetizada directamente a partir de la agmatina por acción de la agmatinasa. En estos organismos, la espermina no se sintetiza ya que su genoma no codifica la actividad SPMS [25]. Además, las bacterias termófilas presentan dos categorías de PAs adicionales únicas, las PAs con cadenas largas, la caldopentamina y la caldohexamina, y las PAs con cadenas ramificadas tris(3-aminopropil)amina (o mitsubisina) y la tetrakis(3-aminopropil) amonio. Ambas categorías son sintetizadas a partir de la arginina [26].

La investigación llevada a cabo sobre las PAs presentes en mamíferos y levadura, putrescina, espermidina y espermina, revela que son factores esenciales en la regulación del crecimiento, transcripción y traducción [27]. Además, las PAs y su metabolismo tienen una gran importancia médica y farmacológica, ya que están presentes en alta concentración en el cerebro, pudiendo estar implicadas en procesos fisiopatológicos como la isquemia cerebral [14]. También se ha observado un alto requerimiento en PAs en las células de la mucosa intestinal, para el correcto mantenimiento, maduración y reparación celular después del daño sufrido durante una lesión o enfermedad [28]. La acumulación excesiva de PAs está asociada a la transformación celular o apoptosis, mientras que su reducción

Introducción

lleva a una inhibición del crecimiento celular, migración y desarrollo embrionario. En general, las PAs y los procesos metabólicos que las implican, están reconocidos como potenciales dianas en la lucha contra el cáncer, ya que se ha observado una fuerte correlación positiva entre el contenido en PAs y la proliferación celular descontrolada [29].

En resumen, las PAs están consideradas como esenciales para la vida y la inhibición de su biosíntesis da lugar a un bloqueo del crecimiento celular. Mientras que se ha demostrado que la espermina no es esencial tanto para la viabilidad procariota [25] como eucariota [30-32], la espermidina es totalmente esencial para la viabilidad eucariota. Por ejemplo, la generación del mutante nulo del ortólogo de *SPDS* en levadura (*spe3A*) demostró el requerimiento indispensable de la espermidina para el crecimiento y viabilidad celular [33]. Mutantes de delección de los genes *ODC* y *SAMDC* que bloquean la síntesis de espermidina, son letales en etapas muy tempranas del desarrollo embrionario en ratón [34]. De la misma manera, la pérdida de función de *ADC1* y *ADC2*, y los dobles mutantes *samdc1* y *samdc4*, y *spds1* y *spds2* causan efectos letales en el desarrollo embrionario de *A. thaliana* [35-37].

3. De la espermidina a la hipusinación del factor eIF5A.

Un aspecto molecular fundamental de la esencialidad de la espermidina para la viabilidad celular, es que esta PA actúa como precursor de un aminoácido inusual llamado hipusina (N^ε-(4-amino-2-hidroxibutil)-lisina). La hipusina se produce con la modificación post-traducciona sobre el grupo ξ-amino de un residuo de lisina (K) conservado del factor de traducción 5A (eIF5A), única proteína que se conoce que sufre la modificación de hipusinación [38]. El requerimiento estructural de la reacción de hipusinación hace que tan solo la espermidina y unos pocos análogos muy semejantes, puedan participar en esta modificación, lo que determina la esencialidad de esta PA para la viabilidad de la célula eucariota, puesto que el factor eIF5A es esencial en eucariotas [39-40].

3.1. La ruta de hipusinación.

La hipusina fue descubierta a partir de extractos de cerebro bovino en 1971 por Shiba y colaboradores, con el interés de detectar nuevos aminoácidos básicos no comunes. Se nombró hipusina en base a su estructura que consiste en dos motivos, hidroxiputrescina y lisina [41]. 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 de 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 Fe(II)-dependiente, desoxihipusina hidroxilasa (DOHH), generando el residuo de hipusina, para completar la maduración y la activación del factor eIF5A [42-44] (Figura 4). El hecho de que se haya mantenido a lo largo de la evolución una única modificación post-traducciona, implicando la acción de dos enzimas para modificar de manera particular a una única proteína celular, pone de manifiesto la gran importancia de este proceso dentro de la naturaleza. Tanto eIF5A como las enzimas responsables de la reacción de hipusinación son esenciales para la viabilidad y el crecimiento celular eucariota, y su investigación está abriendo nuevas fronteras en el descubrimiento de drogas contra enfermedades hiperproliferativas, y un interesante campo de aplicación en biotecnología.

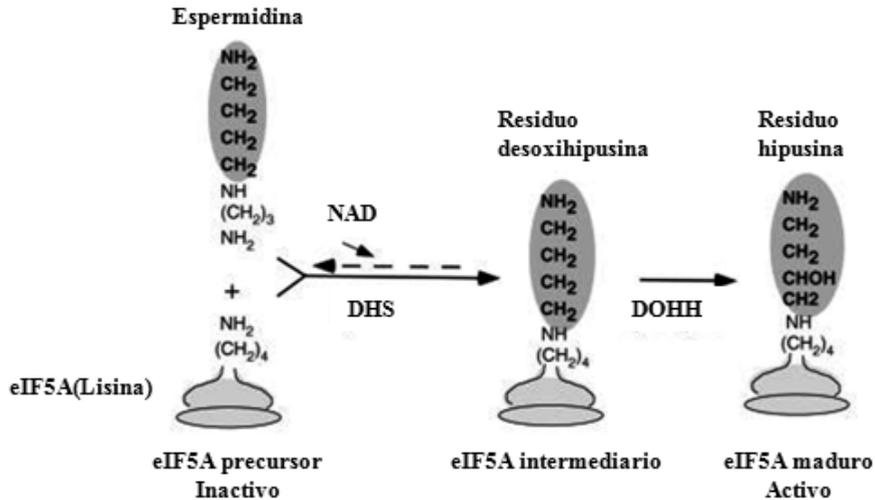


Figura 4. Modificación del factor eIF5A. La biosíntesis de hipusina en el factor eIF5A se produce a través de dos pasos enzimáticos secuenciales que implican en primer lugar a la enzima DHS, que cataliza la transferencia reversible del grupo aminobutílo desde la espermidina a un residuo de lisina específico del factor eIF5A. En la segunda reacción, la enzima DOHH hidroxila irreversiblemente al factor, activándolo. Figura modificada de Park *et al.* (2010) [44].

Tanto el sistema enzimático de modificación de eIF5A como el propio factor de traducción, están conservados en todos los eucariotas. En arqueas se ha observado un homólogo del factor eIF5A, llamado factor de iniciación de la traducción de arqueas (aIF5A), y de la enzima DHS, pero no se ha descubierto un homólogo para la DOHH, aunque sí que ha sido reportada la presencia tanto de desoxihipusina como de hipusina en estos organismos. Mientras que en eucariotas superiores, la pérdida de función del factor eIF5A y de las enzimas responsables de la modificación es letal para la viabilidad celular, en levadura, la enzima DOHH no es esencial para su supervivencia. De manera contraria a lo que ocurre en eucariotas y arqueas, en eubacterias no se ha descubierto homólogo de eIF5A y no se ha detectado hipusina ni desoxihipusina [42]. Sin embargo, las eubacterias presentan un ortólogo lejano llamado factor de elongación P (EF-P), con una gran similitud estructural con el factor eIF5A [45] (Figura 5b).

3.2. Estructura del factor eIF5A.

Los estudios del factor eIF5A procedente de levadura, humanos y arqueas entre otros, han permitido determinar la estructura tridimensional de esta proteína y observar que hay pocas diferencias entre estos organismos [46]. eIF5A es una proteína pequeña de 18 kDa aproximadamente y consta de dos dominios, un dominio básico amino terminal (N-terminal) que contiene el sitio de hipusinación en un bucle expuesto, y un dominio ácido carboxilo terminal (C-terminal) que forma un plegamiento de unión a oligonucleótidos similar a los que se pueden encontrar en proteínas de unión a ARN (Figura 5a). La secuencia de aminoácidos del lazo expuesto que contiene la lisina concreta que se hipusina (K50 en humanos y K51 en levadura) está estrictamente conservada a lo largo de la escala evolutiva eucariota [43]. Estudios realizados mediante la técnica SELEX (del inglés “*Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment*”) con el factor eIF5A humano, lograron establecer la identidad de la secuencia consenso de unión a ARN, a la que eIF5A sería capaz de unirse *in vitro* [47].

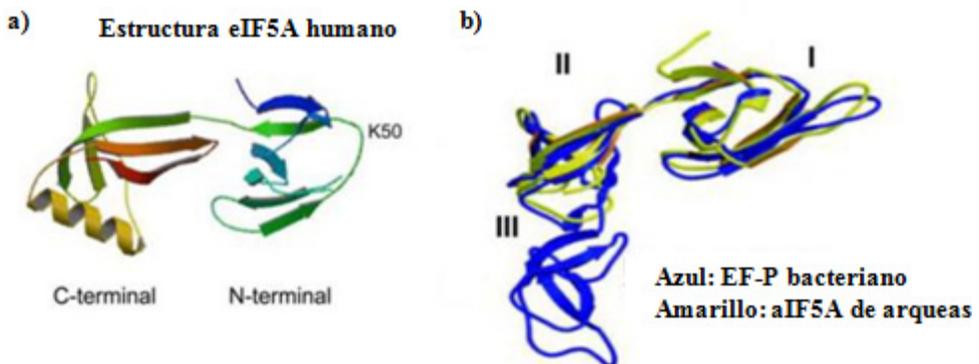


Figura 5. a) Estructura terciaria del factor eIF5A humano. La lisina conservada (K50) está situada en el lazo expuesto del dominio N-terminal. b) Comparación de la estructura terciaria del factor EF-P de bacterias (azul) y el factor aIF5A de arqueas. Figura modificada de Park *et al.* (2010).

3.3. Proteoformas del factor eIF5A.

La purificación del factor eIF5A procedente de células HeLa mediante la combinación de diversas técnicas de cromatografía de intercambio aniónico y catiónico, y el análisis de la composición de aminoácidos y espectrometría de masas tras ionización por electroespray (ESI-MS), llevó a la caracterización de las diferentes formas en las que aparece eIF5A. La proteoforma mayoritaria de eIF5A correspondía a un 95% del total de la proteína, tratándose de la forma con un punto isoelectrico (pI) más alto (5.2) con el residuo K50 hipusinado y el extremo N-terminal acetilado. Es decir, la forma madura y activa del factor de eIF5A era la más abundante. Todas las proteoformas minoritarias del factor (5%) con puntos isoelectricos más ácidos (5.1 y 5.0), presentaban la incorporación de un grupo acetilo adicional en una lisina específica (posición K47), diferenciándose entre ellas por presentar el residuo K50 hipusinado, desoxihipusinado o sin modificar (Tabla 1). La proteoforma mayoritaria del factor eIF5A podía identificarse tanto en fracciones nucleares como en citoplasmáticas mientras que las minoritarias, solo se detectaban en preparaciones nucleares, lo que empezaba a poner de manifiesto la importancia de las modificaciones por hipusinación y acetilación en la localización subcelular de eIF5A [48].

Introducción

	Abundancia relativa	Secuencia	Carga neta	Variación masa (Da)	Modificación	
	Muy minoritaria	${}_{47}\text{KTGK}_{50}$	+2	0		
5%	Minoritaria (A)	${}_{47}\text{KAcTGK}_{50}$	+1	+40		Acetilación (+40 Da)
	Minoritaria (B)	${}_{47}\text{KAcTGX}_{50}$	+1/+2	+140		Aminobutilación (+100 Da)
	Minoritaria (C)	${}_{47}\text{KAcTGZ}_{50}$	+1/+2	+156		Hidroxilación (+16 Da)
95%	Mayoritaria (D)	${}_{47}\text{KTGZ}_{50}$	+2/+3	+116		Desacetilación (-40 Da)

Tabla 1. Caracterización bioquímica del factor eIF5A basada en los resultados de Klier *et al.* (1995) en células HeLa [48]. El residuo de lisina (K) 47 puede estar acetilado (K_{Ac}) o desacetilado (K). El residuo K50 puede estar aminobutilado, formándose desoxihipusina (X), y puede además hidroxilarse, produciéndose hipusina (Z). Según la abundancia relativa de las variantes bioquímicas del factor eIF5A, existen proteoformas minoritarias (A, B y C) y mayoritarias (D), que se pueden diferenciar en cuanto a su masa ($\text{C} > \text{B} > \text{D} > \text{A}$) y en cuanto a su pI ($\text{D} > \text{C} = \text{B} > \text{A}$).

3.4. Localización subcelular de eIF5A.

Lee *et al.* (2009) estudiaron el patrón de localización de eIF5A en el interior de la célula, y analizaron mediante ensayos inmunocitoquímicos en células HeLa la distribución subcelular de la proteoforma precursora no hipusinada y de la proteoforma activada por hipusinación de eIF5A. Mediante estos experimentos, observaron que la forma hipusinada del factor se localizaba principalmente en el citoplasma, mientras que el precursor de eIF5A lo hacía tanto en núcleo como en citosol. Además, la proteoforma no modificada era rápidamente acetilada. Estos resultados indicaban que la adición de la hipusina dictaba una localización citoplasmática para eIF5A, donde sería requerido para su función celular en la síntesis proteica [49]. Además, la observación de que la adición de hipusina en el residuo K50 provocara una fuerte desacetilación del residuo K47 ponía en evidencia un posible mecanismo de interacción entre ambas modificaciones. Más tarde, Ishfaq *et al.* (2012) descubrieron las principales enzimas responsables

Introducción

de la acetilación (PCAF) y desacetilación (HDAC6 y SIRT2) de eIF5A en mamíferos, demostrando que tanto la inhibición de la hipusina como de las desacetilasas provocaba un aumento de la acetilación y la acumulación de eIF5A en el núcleo celular [50].

El factor eIF5A carece de una señal de localización nuclear (NLS) convencional, aunque se ha postulado que los últimos 19 aminoácidos de la región N-terminal son los que marcarían el direccionamiento nuclear de eIF5A [51]. Existen varias ideas de que la exportación de eIF5A podría tener lugar a través de la exportina 4, cuya interacción depende de la hipusinación [52-53], o a través de su unión a la exportina 1 (o CRM1, del inglés “*Chromosome Region Maintenance 1*”) del complejo del poro nuclear [54].

3.5. Otras modificaciones: fosforilación y ubicuitilación.

Además de la hipusinación y acetilación del factor eIF5A, se ha demostrado que esta proteína también sufre otra modificación post-traduccional, la fosforilación. Ensayos de inmunoprecipitación del factor eIF5A con lisados celulares de levadura marcados con ^{32}P , tratamiento con fosfoproteína fosfatasa y análisis de fosfoaminoácidos, identificaron que el factor eIF5A de *Saccharomyces cerevisiae* se fosforila en una serina [55]. Posteriormente, mediante estudios realizados en plantas, se descubrió que el factor eIF5A de maíz (*Zea mays*) co-purificaba con la subunidad catalítica α de la proteína caseína quinasa 2 (CK2), una serina/treonina fosfotransferasa tetramérica altamente conservada y esencial para la viabilidad celular eucariota, con expresión ubicua y con una amplia variedad de sustratos, principalmente proteínas que intervienen en el control de la proliferación y expresión génica [56]. Mediante experimentos de mutagénesis dirigida se identificó el residuo que sufre la fosforilación por acción de CK2, la serina 2 (Ser2). La fosforilación de la Ser2 podría jugar un importante papel en el transporte núcleo-citosol, e incluso en la función celular de eIF5A, hechos que requieren confirmación [57-59].

Introducción

A parte de la fosforilación del factor eIF5A, se ha descrito que la enzima DHS también sufre este tipo de modificación post-traducciona. En concreto, se demostró que la DHS de levadura se fosforilaba *in vitro* por acción de la proteína quinasa C (PKC) [60]. Estudios adicionales con varias líneas celulares, como por ejemplo con células de ovario de hámster chino (CHO), confirmaron que esta asociación y fosforilación también ocurre *in vivo* [61]. Más tarde y de la misma manera que le sucede al factor eIF5A, estudios realizados en células HeLa demostraron que la proteína quinasa CK2 también era capaz de fosforilar tanto *in vitro* como *in vivo* a DHS. La fosforilación de DHS no tiene ningún efecto sobre su actividad *in vitro* en cuanto a la hipusinación del factor eIF5A, sin embargo podría tener otras implicaciones moleculares no descritas [62].

Además de las mencionadas anteriormente, existe otra modificación post-traducciona que regula la propia estabilidad del factor eIF5A y ésta es la ubiquitilación. Recientemente se ha descrito en humanos que eIF5A es diana de la proteína de unión C-terminal de la Hsc70 (CHIP), también denominada Stub1 (proteína 1 con homología a STIP1 y con un dominio “U-box”). Stub1 es una E3 ligasa que interacciona con eIF5A a través de su dominio “U-box”, induciendo su ubiquitilación y degradación [63].

3.6. Dimerización del factor eIF5A.

Gentz *et al.* (2009) caracterizaron el factor eIF5A hipusinado de levadura mediante experimentos de cromatografía de exclusión molecular y la realización de geles de electroforesis de poliacrilamida (PAGE) en condiciones nativas, demostrando que la proteína eIF5A existe en forma de homodímero *in vitro*. Además, observaron que la inhibición de la hipusinación en mutantes de sustitución (K51R) de eIF5A, provocaba la desactivación y la aparición del monómero del factor, indicando que la hipusinación era necesaria para la formación del dímero que constituiría la forma activa. De la misma manera, el tratamiento con ARNasa A suprimía la formación del dímero, concluyendo que su establecimiento también era ARN dependiente

Introducción

[64]. Sin embargo, Dias *et al.* (2013) comprobaron también por técnicas de exclusión molecular, y experimentos de purificación por afinidad del factor eIF5A fusionado a una etiqueta de glutatión S-transferasa (GST) y análisis por espectrometría de masas, que eIF5A era capaz de dimerizar en presencia de ARN tanto *in vivo* como *in vitro*, pero que no era necesaria su hipusinación para que se produjera esta dimerización. Además, estudios de dispersión de rayos X de ángulo pequeño (SAXS), confirmaron que el homodímero de eIF5A se comporta de manera estable en solución. Los datos obtenidos de SAXS mostraron que el dímero de eIF5A tiene forma de “L” y que se superpone con la estructura terciaria de un ARNt^{Phe}, de manera análoga a lo que ocurre con el monómero de EF-P [65].

4. El factor EF-P: ortólogo de eIF5A en eubacterias.

Como se ha descrito anteriormente en el punto 3.1., las eubacterias no presentan homólogo de eIF5A, ni tampoco se ha detectado la presencia de hipusina ni desoxihipusina en estos organismos [42]. Sin embargo, las eubacterias presentan el ortólogo lejano EF-P, de gran similitud a nivel estructural con el factor eIF5A [45].

4.1. Estructura del factor EF-P.

El factor EF-P también está altamente conservado en procariotas y consta de tres dominios, el dominio N-terminal I y dos dominios C-terminales repetitivos, II y III, pareciéndose en tamaño y forma a un ARN de transferencia (ARNt) [45]. Además, como también le ocurre al factor eIF5A, EF-P puede ser modificado post-traduccionamente por un parálogo de una lisil-ARNt sintetasa, PoxA. En una reacción análoga a la aminoacilación de un ARNt, PoxA activa a una (R)- β -lisina y la transfiere a un residuo de lisina conservado (K34) del dominio N-terminal del factor EF-P. La modificación de β -lisilación es necesaria para la funcionalidad del factor EF-P. Recientes análisis de espectrometría de masas han identificado una segunda modificación post-traducciona del factor EF-P, la hidroxilación del C4(γ)

Introducción

o C5(δ) de la β -lisil-lisina, realizada por la enzima YfcM, aunque su papel en la función de EF-P todavía no está claro [66-68].

Como se muestra en la figura 5b, la proteína eIF5A de arqueas se superpone con los dos primeros dominios (I y II) del factor EF-P [45]. Además, la modificación por lisilación de EF-P produce una alteración química equivalente en masa y carga a la hipusinación de eIF5A [68]. Estas grandes similitudes estructurales podrían indicar una conservación funcional entre el factor EF-P de eubacterias, y el factor eIF5A y aIF5A de eucariotas y arqueas, respectivamente.

4.2. Función del factor EF-P: traducción de secuencias con prolinas consecutivas.

A nivel funcional, se ha comprobado que el factor EF-P estimula la actividad peptidil transferasa incrementando la eficiencia de traducción *in vitro*. Sin embargo, EF-P no es requerido para la actividad ribosomal y, por lo tanto, no es esencial para la viabilidad de la célula procariota, si bien su ausencia incrementa la sensibilidad a antibióticos y condiciones de estrés celular [69]. Análisis estructurales han demostrado que EF-P se une al ribosoma entre los sitios peptidil (P) y de salida (E), estableciendo varias interacciones con el brazo 3'aceptor del ARNt iniciador unido al sitio P [70-71]. Basado en estos datos funcionales y estructurales, se propuso que EF-P específicamente promovería la formación del primer enlace peptídico durante la síntesis proteica. Sin embargo, estudios recientes indican que el factor EF-P no actuaría específicamente en la formación del primer enlace peptídico, pero intervendría en la elongación de la traducción, facilitando la síntesis de proteínas conteniendo tramos de residuos de prolina consecutivos [72]. El factor EF-P previene del estancamiento del ribosoma cuando se encuentra al menos 3 prolinas sucesivas. La presencia de un peptidil-ARNt acabando en 2 prolinas en el sitio P, y de un ARNt transportando a otra prolina en el sitio aminoacil (A) del ribosoma, con cadenas laterales voluminosas que forman un anillo pirrolidínico de gran rigidez, dificultarían de gran manera el establecimiento

Introducción

del enlace peptídico entre ambos residuos, y causarían el impedimento en el avance del ribosoma durante la elongación de la síntesis proteica. El factor EF-P promovería la formación del enlace peptídico y estabilizaría el peptidil-ARNt en el centro catalítico del ribosoma. A su vez, se ha demostrado que la hidroxilación de la β -lisil-lisina podría potenciar la eficiencia catalítica del factor EF-P, principalmente incrementando su afinidad por el ribosoma. Dadas estas evidencias, se ha planteado que EF-P, y por su gran homología estructural, el factor eIF5A (como se detalla más abajo), serían esenciales para la síntesis de un conjunto de proteínas con tramos de prolinas sucesivas en todas las células [73-74].

5. Funciones moleculares del factor eIF5A.

El factor eIF5A fue originalmente purificado de ribosomas de reticulocitos de conejo, y fue inicialmente identificado como un factor de iniciación de la traducción al estimular la síntesis de metionil-puromicina *in vitro* [75]. Sin embargo, ensayos posteriores realizados en levadura, demostraron que eIF5A no tenía un papel esencial en el inicio de la traducción [76-77].

5.1. Papel de eIF5A en la elongación de la traducción.

Estudios de doble híbrido y experimentos de co-purificación con eIF5A marcado con una etiqueta, realizados también en levadura, identificaron proteínas con capacidad de unirse al factor, tales como componentes de la maquinaria traduccional, proteínas de las subunidades pequeña y grande del ribosoma, y factores de elongación. La especificidad de la interacción física de eIF5A con la maquinaria de traducción fue confirmada por ensayos de co-sedimentación y co-purificación bajo diferentes condiciones. Estos ensayos demostraron la capacidad de unión de eIF5A tan solo a ribosomas activos de manera dependiente de la hipusinación [78]. Estudios más recientes han permitido elucidar con gran detalle el mapa de interacciones proteicas de la maquinaria de hipusinación de eIF5A en mamíferos, corroborando en gran medida estudios previos y aportando más

Introducción

información sobre las funciones de eIF5A que se derivan del estudio de su interactoma [79].

Estudios funcionales en levadura mostraron una rápida disminución de la síntesis proteica ante la reducción funcional de eIF5A. Esta inhibición de la síntesis de proteínas precedía a la parada del crecimiento, lo que sugería un efecto directo del defecto en la traducción sobre la inhibición del crecimiento celular [80-81]. La dependencia de la actividad eIF5A hipusinado en la síntesis proteica fue re-confirmada mediante ensayos *in vitro* utilizando extractos de mutantes nulos de eIF5A de levadura, en los que únicamente la adición de la forma hipusinada del factor estimulaba la traducción de un ARN mensajero (ARNm) chivato [82].

En concordancia con estos hechos, la utilización y observación de perfiles de polisomas procedentes de cepas mutantes de levadura, descartaban el papel de eIF5A en el inicio de la traducción [76-77]. Nuevos análisis comparativos de los perfiles de polisomas en levadura, con el uso de mutantes termosensibles de eIF5A, y de mutantes de delección del factor de elongación 2 (eEF2), y la utilización de sordarina que causa la inhibición de eEF2, implicaban fuertemente a eIF5A en la elongación de la traducción [82-83]. En los mutantes termosensibles de eIF5A se producía un incremento del cociente polisomas/monosoma a temperaturas restrictivas, patrón esperado si se producía un bloqueo en la elongación de la traducción, hecho que también se podía observar en el mutante de eEF2. Además del incremento en el cociente polisomas/monosoma, en los mutantes termosensibles de eIF5A, el tiempo de tránsito ribosomal (el tiempo que una cadena polipeptídica naciente permanece unida a un ribosoma activo) estaba seriamente aumentado a temperaturas restrictivas, hecho que re-confirmaba el papel del factor eIF5A en la elongación de la traducción [82-83].

5.2. Papel de eIF5A en la degradación de los ARNm.

El factor eIF5A también ha sido implicado en el control de la estabilidad de los ARNm, en estudios con mutantes termosensibles de eIF5A de levadura en los que se trataba de identificar mutantes defectivos en la degradación de ARNm [77]. En estos mutantes se pudo observar una acumulación de transcritos que no presentaban caperuza en el extremo 5', indicando una posible función de eIF5A en la degradación del ARNm. Sin embargo, estudios adicionales demostraron que el arresto del crecimiento y la acumulación de estos ARNm no se correlacionaban temporalmente, indicando un efecto indirecto de la mutación de eIF5A sobre la estabilidad de los transcritos [84]. Otros trabajos en los que estudiaron la complementación funcional de los mutantes condicionales de levadura mediante la expresión heteróloga del factor eIF5A de humanos, relacionaron de nuevo al factor eIF5A en procesos de regulación de la degradación de ARNm [85]. Estos mutantes condicionales, presentaban una acumulación de transcritos que debían ser degradados por la vía “*Nonsense-Mediated Decay*” (NMD), sugiriendo un papel de eIF5A en la degradación del ARNm. Sin embargo, como se describió anteriormente, la implicación funcional de eIF5A en la elongación de la traducción rechazaría un efecto directo del factor sobre la estabilidad de los mensajeros, siendo probablemente una causa secundaria del defecto en la elongación de la traducción [44, 86].

5.3. Implicación de eIF5A en la formación de complejos de ribonucleoproteínas: cuerpos P y gránulos de estrés.

En el citoplasma de las células eucariotas existen unos agregados llamados cuerpos P o en inglés “*P-bodies*”. Estos agregados están formados por ARNm que han parado su traducción pero que permanecen asociados a proteínas, generalmente proteínas implicadas en represión traduccional y en las rutas de degradación del ARNm, formando partículas ribonucleoproteicas (RNPM). Los ARNm que se encuentran en estos agregados dispuestos en determinados lugares del citoplasma,

Introducción

pueden degradarse o volver a traducirse activamente [87]. Estudios recientes han demostrado un posible papel del factor eIF5A en la formación de estos cuerpos P, y que concuerda con la participación de este factor en la elongación de la traducción. Mutantes de eIF5A de levadura presentan una inhibición en la formación de los cuerpos P, de manera semejante a lo que ocurre con el tratamiento con cicloheximida, inhibidor de la elongación de la traducción [83].

Los gránulos de estrés son diferentes tipos de agregados citoplasmáticos de RNPM que se forman como respuesta a situaciones de estrés ambiental. A diferencia de los cuerpos P, los gránulos de estrés contienen ARNm asociados a factores de iniciación, la subunidad ribosomal 40S, proteínas de unión a la cola poli(A) (PABP) y proteínas de unión a ARN con capacidad de agregarse [88-89]. En 2010 se describió en mamíferos, la implicación del factor eIF5A en la formación de estos gránulos bajo condiciones de estrés oxidativo, ya que la reducción de PAs, el silenciamiento de DHS o la inhibición de esta enzima mediante el inhibidor GC7 (N1-Guanil-1,7-Diaminoheptano) que previene la hipusinación [90], causaba una disminución en el desmantelamiento de polisomas y una reducción de la formación de los gránulos de estrés en tratamientos con arsénico [91].

5.4. Implicación de eIF5A en el transporte de ARNm.

El factor eIF5A también podría estar implicado en el transporte núcleo-citosol de ARNm [86]. Se ha visto que eIF5A puede interactuar con la proteína Rev del virus de la inmunodeficiencia humana 1 (VIH-1), proteína necesaria para la exportación al citosol de transcritos retrovirales [76]. El bloqueo de la hipusinación a través de la inhibición de la enzima DHS causa un potente efecto antirretroviral [92]. Además, se ha podido comprobar que eIF5A es necesario para el movimiento núcleo-citosol del complejo Rev-ARNm, a través de la interacción directa con la proteína CRM1 [54, 93]. Sin embargo, muchos son los trabajos en los que se pone en entredicho el papel de eIF5A en la exportación de mensajeros del núcleo al citosol [78], teniendo en cuenta además que, la conservación del factor conllevaría

Introducción

una conservación funcional desde arqueas hasta mamíferos, y que en arqueas no tiene lugar este proceso de transporte.

5.5. eIF5A y la traducción de proteínas con prolinas sucesivas.

En los trabajos descritos anteriormente, quedaba claro el papel del factor eIF5A en el proceso de elongación de la traducción. Sin embargo, el requerimiento específico de su actividad en el ribosoma todavía no se había descubierto. Recientemente Gutierrez *et al.* (2013) demostraron tanto *in vitro* como *in vivo* que eIF5A, de la misma manera que su ortólogo EF-P, es necesario para la traducción de proteínas con motivos de prolinas consecutivas en su secuencia de aminoácidos. La presencia de al menos 3 prolinas consecutivas en la secuencia primaria provoca el estancamiento del ribosoma. La presencia de un peptidil-ARNt^{Pro} en el sitio P en combinación con un Pro-ARNt^{Pro} en el sitio A del ribosoma, dificulta de gran manera el establecimiento del enlace peptídico, lo que marcaría la dependencia de EF-P o eIF5A para la síntesis proteica [73-74, 94]. El factor eIF5A se situaría entre el sitio E y P del ribosoma, con el residuo de hipusina cercano al brazo aceptor del ARNt del sitio P, favoreciendo la actividad peptidil transferasa y facilitando la traducción de sustratos que por su naturaleza bioquímica son difíciles de sintetizar, como las homopoliprolinas, con cadenas laterales rígidas de geometría cíclica y con grandes restricciones estéricas [94] (Figura 6). Por lo tanto, quedan por definir las proteínas que por las características químicas de sus motivos o secuencias de aminoácidos, como en el caso descrito de las homopoliprolinas, necesiten la actividad del factor eIF5A para su traducción eficiente.

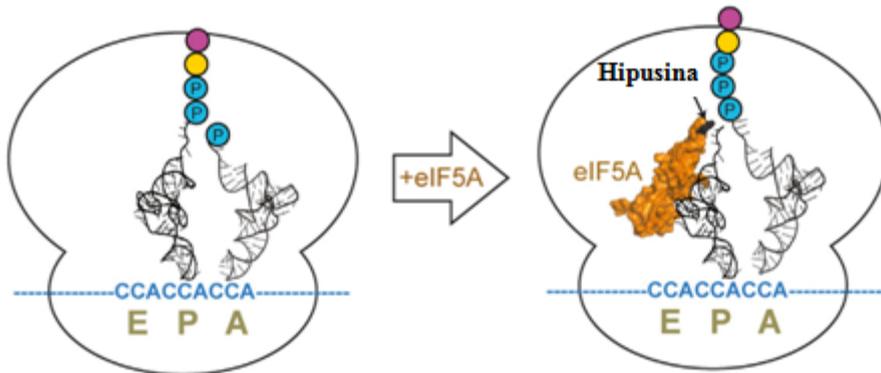


Figura 6. Modelo que representa el estancamiento del ribosoma ante secuencias que codifican al menos tres prolinas consecutivas, donde las di-prolinas del péptido en síntesis se encuentran en el ARNt del sitio P y el Pro-ARNt^{Pro} en el sitio A del ribosoma. La entrada de eIF5A en el sitio E del ribosoma dejaría al residuo de hipusina adyacente al peptidil-ARNt del sitio P, promoviendo el establecimiento del enlace peptídico con la prolina situada en el sitio A. Figura modificada de Gutierrez *et al.* (2013) [94].

6. Aspectos funcionales del factor eIF5A en organismos eucariotas.

6.1. eIF5A en levadura.

En *S. cerevisiae* se han identificado dos genes que codifican el factor eIF5A, *TIF51A* y *TIF51B*, compartiendo un 90% de la secuencia de aminoácidos. La isoforma Tif51A (eIF5A1) se expresa principalmente en condiciones aeróbicas mientras que Tif51B (eIF5A2) lo hace únicamente en anaerobiosis [95]. La disrupción del gen *TIF51B* no provoca efecto en el crecimiento de la levadura tanto en presencia como en ausencia de oxígeno. Sin embargo, la disrupción de *TIF51A* es letal, lo que indica que esta isoforma es esencial para la supervivencia celular [96]. Se ha demostrado que ambas isoformas una vez transcritas pueden sustituirse mutuamente tanto en aerobiosis como en anaerobiosis, lo que demuestra la similitud funcional entre ellas [97]. La expresión heteróloga de eIF5A de otros eucariotas, como alfalfa o humanos también puede suplir la actividad del homólogo

Introducción

de eIF5A de *S. cerevisiae in vivo*, confirmando la conservación funcional de esta proteína a lo largo de la evolución [98-99].

Como se ha mencionado anteriormente, la reducción del factor eIF5A en levadura provoca una parada en el crecimiento, ocasionando la acumulación de las células en la fase G1 [76]. Mutantes termosensibles de este factor muestran defectos en la polarización del citoesqueleto de actina. Estos fenotipos pueden ser rescatados con un alto número de copias de varios genes implicados en la integridad de la pared celular, componentes de la ruta proteína quinasa C1 (PKC1), y genes necesarios para la correcta organización de la actina durante la transición G1/S [100]. Se ha demostrado que la falta de espermidina, y consecuentemente de la hipusinación de eIF5A, provoca defectos en la organización de la actina [101], lo que sugiere un importante papel de eIF5A en la polarización del citoesqueleto durante la progresión del ciclo celular [102].

Además de los experimentos en los que se demuestra el papel de la espermidina en la organización del citoesqueleto, se ha comprobado que esta PA es indispensable para la fertilización en eucariotas, desde levadura a humanos [103]. Durante el proceso de reproducción sexual en *S. cerevisiae*, dos células haploides de sexo opuesto (“*MATa*” y “*MAT α* ”) se combinan para formar un cigoto diploide. Un prerrequisito indispensable para que se dé este apareamiento es la formación de una protrusión llamada “shmoo”, proyección que se produce hacia el gradiente de feromonas que libera el tipo celular de sexo opuesto [104]. La respuesta de la levadura a la feromona implica a la proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK), Fus3, que una vez activada modula la expresión de genes específicos para el apareamiento, promoviendo la parada del ciclo celular y controlando la morfogénesis polarizada [105]. La proteína Fus3 activada fosforila a la formina Bni1, proteína necesaria para la polimerización de los filamentos de actina [106], ocasionando que se dirija al extremo del “shmoo”, donde se encarga de formar los filamentos de actina [107-108]. Recientemente Bauer *et al.*(2013) han demostrado

Introducción

que la espermidina es necesaria para el apareamiento en *S. cerevisiae*, promoviendo una fertilización eficiente a través de la formación del “shmoo”. Mutantes de delección *Aspe2* para la enzima SAMDC, presentaban una disminución drástica en la formación de los “shmoo” y de la eficiencia en el apareamiento [109]. Sin embargo, la conexión entre la espermidina y el crecimiento polarizado durante la formación del “shmoo” en el proceso de apareamiento de *S. cerevisiae* todavía tiene que ser esclarecida.

6.2. eIF5A en mamíferos.

En mamíferos, eIF5A y la ruta de hipusinación son esenciales para la fisiología celular. La mutación en alguno de los componentes de la ruta causa una disminución drástica del crecimiento celular, y de manera similar a lo que ocurre en levadura, provoca una parada de la proliferación celular en la transición G1/S [110]. En mamíferos se han identificado dos genes *EIF5A1* y *EIF5A2*, que codifican dos isoformas, eIF5A1 y eIF5A2, respectivamente [44]. En *Homo sapiens* los genes *EIF5A1* y *EIF5A2* comparten un 84% de identidad de secuencia mientras que son diferencialmente transcritos entre distintos tejidos y líneas tumorales. eIF5A1 es la forma que se expresa de forma predominante en todos los tejidos. En cambio, eIF5A2 muestra una expresión dependiente de tejido, sintetizándose en lugares como cerebro o testículos y ciertos tipos de líneas celulares cancerosas, siendo sobre-expresada durante metástasis en varios tejidos tumorales [42, 111]. Parece ser que las diferencias en cuanto a la expresión de ambas isoformas vendrían dadas por variaciones en la eficiencia traduccional, mediante mecanismos reguladores que implicarían a las regiones no traducibles (UTR) de los ARNm, 5'-UTR y 3'-UTR [112]. Las diferencias funcionales entre ambas isoformas son desconocidas, pero experimentos realizados en ratón han demostrado que la isoforma eIF5A1 es vital para el desarrollo embrionario, y que su función no es intercambiable por la isoforma eIF5A2 [113].

Introducción

Actualmente varias líneas de investigación están implicando al factor eIF5A como factor clave en la patogenicidad de enfermedades como diabetes [114], infecciones de VIH-1 [92] y varios tipos de cáncer [111]. En el trabajo de Maier *et al.* (2010) realizado en ratón, se identificó a eIF5A como potencial diana terapéutica contra la disfunción de los islotes β pancreáticos ante condiciones inflamatorias, ya que este factor regula la expresión del gen *Nos2* que codifica la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS). Ante una respuesta inflamatoria las citoquinas, a través de la expresión de iNOS, estimulan la síntesis de óxido nítrico, que es capaz de inhibir proteínas implicadas en la glicolisis y la cadena de transporte electrónico, disminuyendo la producción del ATP celular, y produciendo un desacoplamiento entre el proceso glicolítico y la liberación de insulina, provocando finalmente la muerte de las células β del páncreas. La merma del factor eIF5A o la inhibición de la hipusinación, provocaban una disminución de la traducción de la proteína iNOS y, además, se demostró que la hipusinación era necesaria para la exportación del ARNm de *Nos2* a través de la exportina 1. De este modo, la disminución de la traducción de iNOS causaría un efecto protector contra la respuesta inflamatoria por intolerancia a la glucosa [114].

Además de su papel en la enfermedad de la diabetes, la hipusinación del factor eIF5A se ha descrito como diana terapéutica contra la infección del virus VIH-1. La inhibición de la enzima DHS por acción de la guanilhidrazona (CN-1493), o el uso de inhibidores de la DOHH (ciclopirox y deferiprona) provocan un fuerte efecto antirretroviral, suprimiendo eficientemente el ciclo replicativo del VIH-1 [92, 115].

Además del papel de eIF5A en enfermedades como diabetes o el VIH-1, las diferentes isoformas de este factor han sido relacionadas con cáncer. Aunque los niveles de eIF5A2 son demasiado bajos como para ser detectados en casi todos los tejidos de mamíferos, esta isoforma se sobre-expresa en cáncer de ovario y en cáncer colorrectal. Además, se ha demostrado que la sobre-expresión de eIF5A2

Introducción

provoca la transformación cancerosa de las células de mamífero, y se ha asociado con la capacidad invasiva y el desarrollo de la metástasis en cáncer de ovario, colon, hígado y pulmón, apoyando el papel como candidato oncogénico de esta isoforma en terapia contra el cáncer [98, 111, 116]. También, se ha descrito a la forma mayoritaria eIF5A1 como biomarcador de proliferación anormal en neoplasia intra-epitelial de vulva (VIN), con la utilización de un anticuerpo capaz de distinguir específicamente a la isoforma eIF5A1 hipusinada [117].

A parte de la esencialidad de eIF5A para la proliferación y supervivencia celular descrita anteriormente, la actividad de este factor, concretamente de la isoforma eIF5A1, ha sido implicada en la regulación del proceso de muerte celular programada o apoptosis. Aunque la conexión entre eIF5A y apoptosis es bastante compleja, la supresión de la actividad de eIF5A1 ya sea por la sobre-expresión de la forma no modificada o por la inhibición de la hipusinación, generalmente causa una inducción de la apoptosis en células de mamífero [111]. Se ha demostrado que el tratamiento con interferón- α (IFN α) provoca una inhibición del crecimiento, una fuerte inhibición de la hipusinación y un incremento de la síntesis de eIF5A1, produciendo la acumulación de la forma no activa sin modificar, conduciendo a la apoptosis celular. Además, el tratamiento con GC7, inhibidor de la enzima DHS con un gran efecto anti-proliferativo en células de mamífero y que también lleva a la acumulación de la forma precursora de eIF5A [118-119], tiene un efecto sinérgico al tratamiento con IFN α , inhibiendo el crecimiento celular e induciendo el proceso apoptótico, sugiriendo un importante papel de eIF5A1 en la modulación de la proliferación celular y la regulación del proceso de muerte celular inducida por IFN α [120].

Por otro lado, también se ha descrito que la supresión de la expresión eIF5A1 por ARN de interferencia (ARNi) en células primarias de la lamina cribosa del nervio óptico, protege de la apoptosis inducida por el factor de necrosis tumoral α (TNF α) [121]. Además, en los estudios de Maier *et al.* (2010) en islotes β pancreáticos de

Introducción

ratón descritos con anterioridad, los tratamientos con GC7 o ARNi contra eIF5A1, también fueron capaces de prevenir el efecto apoptótico procedente de las citoquinas inflamatorias [114]. Estos resultados sugieren que eIF5A1 podría tener un efecto pro o anti-apoptótico dependiendo del contexto biológico [111].

Todos estos resultados apoyan el papel de las isoformas eIF5A1 y eIF5A2 como dianas moleculares contra el cáncer, ya sea como modulador de la apoptosis o como protector frente a la formación tumoral y la capacidad de inducir metástasis en células de mamífero.

6.3. eIF5A en plantas

En el reino vegetal, el factor eIF5A tiene un papel esencial a lo largo del crecimiento y desarrollo, participando como factor clave en el control de los procesos de proliferación y senescencia celular [122]. En plantas, se ha podido aislar un número diverso de isoformas del factor eIF5A, destacándose una gran conservación entre ellas (80-97% de identidad a nivel de secuencia de aminoácidos), y en menor grado entre el reino vegetal y animal (50-60% de identidad de secuencia). Sin embargo, el residuo de lisina que se hipusina, está flanqueado por una región altamente conservada en la naturaleza (Figura 7a). De hecho, el factor eIF5A de la arquea *Methanococcus jannaschii* con tan solo un 31% de identidad con respecto a su homólogo de humanos, puede ser hipusinado por la enzima DHS humana y de levadura, sugiriendo un ancestro común [123]. Se piensa que, el hecho de la existencia de varias isoformas de eIF5A puede deberse a una especialización funcional de cada una de ellas, facilitando la traducción de ARNm específicos en respuesta a condiciones ambientales o situaciones fisiológicas determinadas. En este sentido, isoformas diferentes podrían actuar facilitando la expresión de ARNm implicados en división, o por el contrario, en muerte celular [122, 124]. Por otro lado, en plantas como en la mayoría de los eucariotas, sólo se ha podido detectar una isoforma para la enzima DHS, también altamente

Introducción

(*Cucurbita máxima*), se detectaron cuatro genes (*CmeIF5A1-4*) que codifican tres isoformas de eIF5A, todas ellas aisladas a partir de extractos de floema. Además, técnicas bioquímicas confirmaron la interacción de *CmeIF5A* con la proteína eucariótica implicada en la elongación de la traducción, eEF2. Estos hechos, sugerían la participación del factor eIF5A de calabaza en la síntesis de proteínas a lo largo del floema [126].

Los estudios realizados en tomate (*Solanum lycopersicum*), llevaron a la identificación de cuatro isoformas de eIF5A (*SleIF5A1-4*). En estos estudios, se logró aislar a la enzima DHS y comprobar que la expresión heteróloga de esta proteína en *Escherichia coli* era capaz de desoxihipusinar al factor eIF5A. Además, se demostró que en tomate, la expresión de DHS y de eIF5A se incrementa en paralelo durante la senescencia natural de hojas y frutos, y en respuesta a estrés ambiental por escasez de agua o bajas temperaturas, lo que podría sugerir la participación del factor eIF5A hipusinado en la traducción de ARNm específicos requeridos para el proceso de muerte celular programada [127]. Los efectos de la supresión antisentido de la enzima DHS han sido evaluados en tomate, produciendo un retraso del envejecimiento y senescencia natural post-cosecha del fruto. Además, la reducción severa de los niveles de la proteína DHS provocaba efectos pleiotrópicos tanto en el crecimiento como en el desarrollo del tomate: eran incapaces de formar frutos (polen estéril) y, además, generaban hojas más grandes y gruesas con niveles aumentados de clorofila, y mayor deposición de almidón en el tallo [128]. Estudios proteómicos de la interacción planta-patógeno en tomates infectados con el viroide *Citrus exocortis* (CEVd), revelaron alteraciones a nivel post-transcripcional de las isoformas del factor *SleIF5A* [129].

En *A. thaliana*, se expresan tres isoformas de eIF5A, de nuevo altamente conservadas en el dominio N-terminal, especialmente en la zona que flanquea al sitio de hipusinación, y en menor medida en la región C-terminal que contiene el dominio de unión a ARN, que podría otorgar especificidad de unión a cada una de

Introducción

las isoformas del factor (Figura 7b). Inicialmente, por estudios de detección inmunológica se identificó que la isoforma *AteIF5A1* se expresaba tan solo en tejido senescente, que la isoforma *AteIF5A2* lo hacía en tejidos que habían sufrido daño mecánico, y que *AteIF5A3* se expresaba en semillas en imbibición, donde tiene lugar una división celular activa [122].

De la misma forma que sucede en tomate, en *A. thaliana* se demostró que tanto los niveles de la enzima DHS como del factor eIF5A (concretamente de la isoforma *AteIF5A1*) se incrementan en paralelo durante la senescencia natural de las hojas. También se observó que la supresión antisentido de *DHS* provoca efectos pleiotrópicos en la planta. En dependencia del nivel de supresión de DHS conseguido, las plantas de *A. thaliana* presentaban un mayor retraso en la senescencia natural de las hojas y de la transición floral, mayor número de hojas en la roseta, y un incremento más alto de la biomasa radicular y de la producción de semillas. Además, la supresión de DHS daba lugar a un retraso de la senescencia prematura inducida por estrés, a causa de la escasez de agua, resultando en un incremento de la supervivencia en comparación con plantas silvestres [130]. Más tarde, Duguay *et al.* (2007) observaron que el patrón de expresión de la enzima DHS, varía espacial y temporalmente con el avance del desarrollo de la planta, demostrando que la proteína se expresa tanto en hojas de roseta como en las anteras de las flores. En ese trabajo, se logró la supresión antisentido selectiva de la expresión de DHS procedente únicamente de las hojas de la roseta, observando de nuevo un aumento del crecimiento vegetativo de la planta y un retraso en la senescencia. Sin embargo, se anularon los efectos pleiotrópicos negativos producidos sobre el desarrollo reproductivo de la planta, observados en trabajos anteriores con la supresión severa de los niveles de DHS [124, 130-131].

Además de los estudios de supresión antisentido de la enzima DHS realizados en *S. lycopersicum* y *A. thaliana*, varios trabajos han tratado de caracterizar funcionalmente cada una de las isoformas de eIF5A en plantas. Rastros genéticos

Introducción

realizados sobre una población de mutantes insercionales de ADN-T de *A.thaliana*, llevaron a la identificación del mutante resistente a la micotoxina fumonisina B₁ (FB₁), *frb12*, y tras análisis genéticos y moleculares se comprobó que el gen *FRB12* codificaba la isoforma *AteIF5A2*. La pérdida de función de la isoforma *AteIF5A2* en los mutantes *frb12* ocasionaba un fenotipo anti-apoptótico ante el tratamiento con FB₁, y una reducción de la senescencia de las hojas inducida por oscuridad. Las plantas *frb12* mostraban defectos en la proliferación, crecimiento y diferenciación celular de los tejidos y órganos tanto vegetativos como reproductivos, causando un fenotipo enano, un mayor número y menor tamaño de células xilemáticas y parenquimáticas, una reducción en la cantidad de células floemáticas y corticales, que eran también más pequeñas, y un desarrollo anormal de los órganos florales con una esporogénesis defectuosa, llevando a la formación de células germinales femeninas y masculinas estériles y, por lo tanto, incapaces de producir semillas [132].

La isoforma *eIF5A2* de *A. thaliana* también se ha implicado en el proceso de muerte celular programada inducida por patógenos y en el desarrollo sintomático de la enfermedad, concretamente por la infección del necrotrofo facultativo *Pseudomonas syringae* pv *tomato* DC3000 (*Pst* DC3000) [133]. Así pues, se demostró que *AteIF5A2* se sobre-expresa selectivamente tras la infección de *Pst* DC3000, y que la supresión antisentido de esta isoforma provoca resistencia a la muerte celular programada inducida por el necrotrofo, con una reducción del crecimiento del patógeno y del desarrollo sintomático de la enfermedad. Sin embargo, las líneas transgénicas supresoras antisentido de *eIF5A2* de *A. thaliana* fueron morfológicamente indistinguibles de líneas silvestres a lo largo de su crecimiento y desarrollo, probablemente a causa de la supresión tan solo parcial de la expresión de la isoforma, en comparación al mutante insercional *frb12* descrito anteriormente en el trabajo de Feng *et al.* (2007) [132]. En cambio, la sobre-expresión constitutiva de *AteIF5A2* no incrementó la susceptibilidad a la infección de *Pst* DC3000, pero sí que produjo alteraciones fenotípicas en el desarrollo de la

Introducción

planta consistentes con una muerte celular prematura, como la reducción de la producción de semillas, una mayor esterilidad, disminución del tamaño de la planta, transición floral prematura, aparición de lesiones necróticas espontáneas y una mayor ramificación basal, que se veían agravadas con el aumento en el grado de sobre-expresión de la isoforma [133]. Todos estos resultados sugerían que *AteIF5A2* podría cumplir un papel fundamental en el proceso de muerte celular programada.

Recientemente se ha descrito por primera vez el papel del factor *AteIF5A2* (FRB12), en la modulación de la señalización hormonal mediada por citoquininas en el desarrollo de la vasculatura de la raíz [134]. Las citoquininas junto a las auxinas actuando de modo de inhibición recíproca, son las fitohormonas clave implicadas en el control y desarrollo del patrón vascular del xilema de la raíz [135-136]. Aunque los mecanismos moleculares para el desarrollo xilemático en la raíz no están totalmente establecidos, se ha descrito que las citoquininas cumplen un papel fundamental en la especificación de la diferenciación de las células del protoxilema. Mutaciones en alguno de los componentes de la ruta de señalización de citoquininas provoca una diferenciación inespecífica de las células del protoxilema. Es decir, en ausencia de la señalización de citoquininas, la única identidad predeterminada es la de protoxilema. En cambio, las auxinas actúan como antagonistas de la señalización establecida por las citoquininas, a través de la inducción del regulador negativo AHP6 (del inglés “*Arabidopsis Phosphotransfer Protein 6*”) [137-139]. En el trabajo de Ren *et al.* (2013) se observó que mutantes *frb12* presentaban una sensibilidad reducida hacia las citoquininas, con raíces primarias más cortas, y un desarrollo alterado del protoxilema, con un aumento en la aparición de vasos protoxilemáticos. Además, la mutación combinada de FBR12 y de componentes de la cascada de señalización por citoquininas, como el receptor CRE1 (del inglés “*Cytokinin Response 1*”) u otras proteínas efectoras fosfotransferasa AHP, en este caso activadoras durante la cascada de señalización de las citoquininas, ocasionaban el agravamiento de los fenotipos observados en el

Introducción

desarrollo del protoxilema en mutantes *frb12*. Por el contrario, la mutación en el gen regulador negativo de citoquininas *AHP6* provocaba la supresión del fenotipo mutante de *frb12*. Por otro lado, se demostró que *AteIF5A2* era capaz de interactuar no solo genéticamente con CRE1 y AHP1, sino también físicamente formando un complejo proteico cuya formación era regulada por las propias citoquininas. Estos resultados implicaban al factor eIF5A2 de *A. thaliana* en la formación del protoxilema a través de la señalización por citoquininas [134].

En los últimos años también se ha tratado de caracterizar el papel de la isoforma eIF5A1 de *A. thaliana*. Se ha podido comprobar que podría estar implicada en la formación del xilema [140]. En estos trabajos se pudo detectar mediante ensayos con el gen reportero de la β -glucuronidasa (GUS), que *AteIF5A1* se expresaba en la vasculatura de las hojas y en tallos en desarrollo, específicamente en los elementos traqueales del xilema primario, pero no en los vasos xilemáticos maduros ni tampoco en floema. Para demostrar si el factor eIF5A1 de *A. thaliana* estaba implicado en xilogénesis, se produjeron plantas transgénicas sobre-expresoras y antisentido para esta isoforma. Mientras que en los tallos de plantas silvestres de *A. thaliana*, el xilema primario y secundario está normalmente compuesto por seis capas de células (105 μ m y 70 μ m de grosor respectivamente), las plantas sobre-expresoras de *AteIF5A1* presentaban el xilema primario y secundario engrosado, 9-11 capas (140-155 μ m de grosor) y 9 capas (95-105 μ m de grosor) respectivamente. En cambio, la supresión antisentido constitutiva de *AteIF5A1* provocaba una formación del xilema muy limitada, acompañado de un desarrollo atrofiado de la planta [140].

Otros trabajos han intentado investigar la función de la tercera isoforma de eIF5A de *A. thaliana*, implicándola en crecimiento y en respuesta a estrés osmótico y nutricional [141]. En estos estudios, se consiguió determinar la localización espacial de *AteIF5A3* mediante la generación de líneas transgénicas capaces de expresar a esta isoforma bajo el control de su propio promotor, fusionada a la

Introducción

proteína fluorescente verde (GFP). Mediante visualización de la fluorescencia se detectó que *AteIF5A3* se localizaba en floema, concretamente en las células acompañantes de raíces, tallos y hojas, en células epidérmicas y de la columela del extremo de la raíz, y en la chalaza de óvulos fertilizados, todos ellos, lugares fundamentales para el transporte nutricional y hormonal, indispensables para el crecimiento de la planta. Además, la sobre-expresión constitutiva de *AteIF5A3*, o la sobre-expresión heteróloga de *eIF5A3* procedente de *S. lycopersicum* (*SleIF5A3*) o *Populus deltoides*, el álamo negro de Norteamérica (*PdeIF5A3*), en líneas transgénicas de *A. thaliana*, generaba plantas más vigorosas, con un crecimiento vegetativo y reproductivo aumentado, con incremento de la producción de semillas de hasta un 300% para el caso de la sobre-expresión de *PdeIF5A3*, en comparación con las plantas control. La sobre-expresión de *PdeIF5A3* en *A. thaliana*, ocasionaba plantas con un crecimiento aumentado incluso ante condiciones subletales de estrés osmótico y nutricional [141].

7. Hipusinación del factor eIF5A, una caracterización complicada.

A pesar de los intentos de los investigadores para caracterizar la función del factor eIF5A tanto a nivel fisiológico como molecular, todavía existen numerosas hipótesis que tienen que ser analizadas y correctamente contrastadas. El hecho de la conservación funcional del factor eIF5A y de la modificación de hipusinación en eucariotas y arqueas, y la existencia del homólogo estructural y funcional EF-P en eubacterias, pone de manifiesto la gran importancia de la ruta de hipusinación en la naturaleza [142].

La caracterización bioquímica de la hipusinación así como del resto de modificaciones post-traduccionales que sufren las distintas isoformas de eIF5A, que permita el establecimiento de un patrón o perfil bioquímico claro de este factor, es de gran importancia para poder analizar los cambios de actividad de eIF5A, como también la respuesta de los diferentes organismos en cuanto a la ruta de hipusinación, que se produce a lo largo del crecimiento y desarrollo de los

Introducción

organismos ante determinadas condiciones patológicas o de estrés ambiental. Los estudios de Klier *et al.* (1995) en células HeLa en los que se comenzó a caracterizar bioquímicamente al factor eIF5A son un buen ejemplo [48]. Sin embargo en el reino vegetal, como en la planta modelo *A. thaliana*, donde existen tres isoformas de eIF5A, todavía existe una gran carencia de información en cuanto al patrón bioquímico de este factor.

En los últimos años, varios trabajos han tratado de determinar el papel fisiológico del factor eIF5A en diferentes organismos como levadura, mamíferos y plantas. En estos estudios ha quedado clara la importancia funcional de este factor durante los procesos de proliferación y desarrollo celular [111]. Sin embargo, todavía está por esclarecer la función a nivel molecular específica en cada uno de estos organismos. En el caso de las plantas, los trabajos para esclarecer esta función se basan en la generación de mutantes constitutivos de supresión parcial de la actividad de eIF5A [132, 134, 140-141]. Sin embargo, los resultados no establecen claramente el papel concreto que ejerce este factor durante el desarrollo vegetal.

El descubrimiento de que eIF5A y EF-P cumplen una importante función en la traducción especializada de secuencias peptídicas que por su naturaleza bioquímica son difíciles de traducir, como las homoprolinas que causan el estancamiento de los ribosomas durante la elongación de la traducción [94, 142], da luz al descubrimiento de las primeras dianas moleculares claras de eIF5A, que requerirían la actividad de este factor para traducirse correctamente y cumplir su función celular [142].

OBJETIVOS

Objetivos

El objetivo general de esta tesis es la caracterización funcional del factor de traducción eIF5A y de sus dianas a nivel de ARNm.

Los objetivos específicos son:

1. Establecer una metodología bioquímica para determinar el **patrón de hipusinación del factor eIF5A en *A. thaliana*** y de aplicación ante diferentes condiciones de crecimiento de la planta.
2. Estudiar la **función del factor eIF5A en *A. thaliana***, en plantas transgénicas capaces de producir la desactivación genética condicional de este factor.
3. Identificar los ARNm **dianas moleculares de eIF5A** regulados a nivel post-transcripcional en los organismos modelo *S. cerevisiae*, *H. sapiens* y *A. thaliana*.

RESULTADOS

1. Patrón de hipusinación del factor eIF5A en *A. thaliana*.

1.1. Expresión heteróloga de las proteoformas recombinantes no modificadas de eIF5A de *A. thaliana*.

Con el objetivo de establecer un mapa bioquímico del factor eIF5A de *A. thaliana*, se comenzó con la obtención de las proteoformas no modificadas de eIF5A mediante expresión heteróloga en *E. coli*. Para ello, los marcos de lectura abierta (ORF, del inglés “*Open Reading Frame*”) de *eIF5A1*, *eIF5A2* y *eIF5A3* fueron amplificados por PCR (del inglés “*Polymerase Chain Reaction*”) y clonados mediante tecnología *GATEWAY*TM en el vector de expresión inducible por IPTG (isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido), *pDest15*. A través de esta estrategia, se consiguió fusionar la región N-terminal de cada una de las isoformas de eIF5A a la etiqueta GST y, de este modo, facilitar su purificación mediante el uso de una resina de glutatión agarosa. Además, para conseguir la liberación de eIF5A en su forma soluble, ambas proteínas quedaron separadas por el sitio de corte de la proteasa PreScission 3C (GE Healthcare). Las construcciones recombinantes fueron introducidas en *E. coli* y se procedió a la purificación de las proteoformas no modificadas de eIF5A. Una alícuota de cada una de las isoformas purificadas, tanto fusionadas a GST como en su forma libre tras el corte con la proteasa PreScission 3C, fueron separadas en electroforesis PAGE con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE) monodimensional (1D-E) y teñidas con Coomassie Blue R-250 (Coomassie) para su visualización (Figura 8a). Posteriormente, cada una de las isoformas purificadas se marcaron con distintos fluoróforos (eIF5A1-Cy2 (azul), eIF5A2-Cy3 (verde) y eIF5A3-Cy5 (rojo)), para averiguar su posición después de su separación en una electroforesis SDS-PAGE bidimensional (2D-E). De esta forma, las isoformas marcadas se mezclaron en un mismo volumen y se separaron en una 2D-E. La señal fluorescente fue escaneada y seguidamente el gel fue teñido con Coomassie. Como muestra la figura 8b, la isoforma eIF5A1 es más ácida que eIF5A2 y eIF5A3, lo que corresponde con los puntos isoeléctricos (pI) teóricos,

5.532 para eIF5A1, 5.813 para eIF5A2 y 5.816 para eIF5A3. Mediante esta técnica se consiguió observar la movilidad electroforética 2D de las 3 isoformas no modificadas de eIF5A de *A. thaliana*, permitiendo separar efectivamente la isoforma eIF5A1 de eIF5A2 y eIF5A3. Dada la similitud de sus pI, las isoformas eIF5A2 y eIF5A3 sólo se pudieron separar ligeramente.

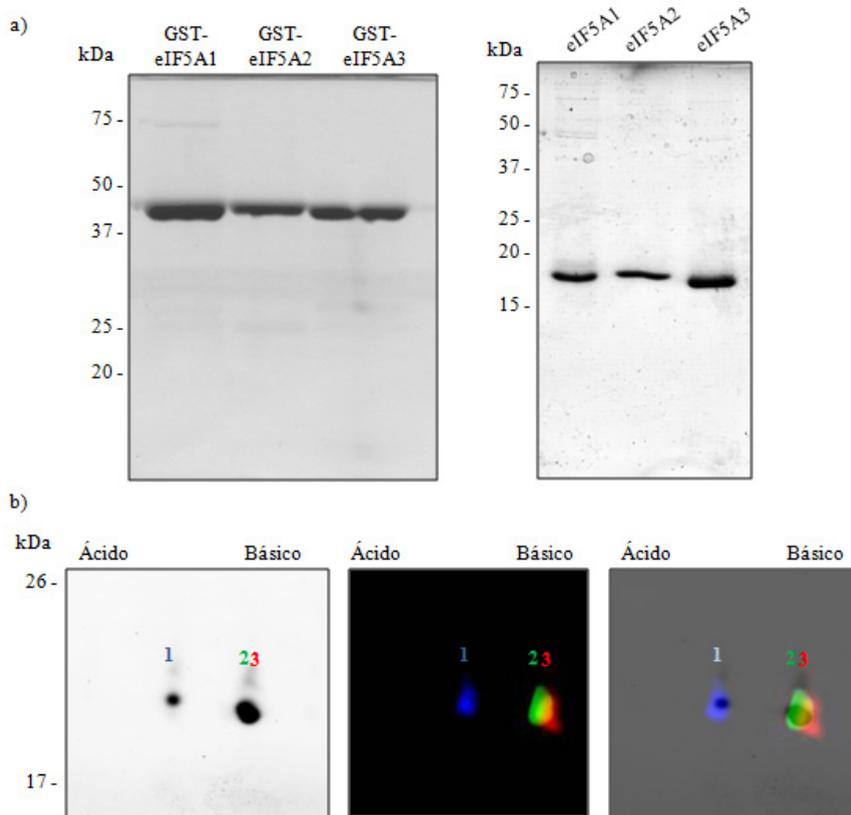


Figura 8. Purificación de las isoformas no modificadas de eIF5A obtenidas mediante expresión heteróloga, y su separación en 2D-E tras marcaje con fluróforos. a) Las isoformas fusionadas a GST (izquierda) y los eIF5A libres tras el corte de la proteasa PreScission 3C (derecha), fueron separados por 1D-E y teñidos con Coomassie. b) Las isoformas recombinates se marcaron (eIF5A1 azul, eIF5A2 verde, eIF5A2 rojo), y se separaron conjuntamente por 2D-E, que fue teñido posteriormente con Coomassie (izquierda), y cuya fluorescencia se escaneó (panel central), para obtener el solapamiento de las imágenes (derecha).

1.2. Expresión heteróloga de las proteoformas recombinantes hipusinadas de eIF5A de *A. thaliana*.

El siguiente paso para obtener un patrón bioquímico del factor eIF5A de *A. thaliana*, fue obtener las distintas proteoformas hipusinadas, y estudiar el cambio que ocasiona dicha modificación, en cuanto a la movilidad electroforética 2D de las 3 isoformas de eIF5A. La primera aproximación que se llevó a cabo para conseguir la hipusinación de eIF5A, fue la clonación, expresión en *E. coli* y la purificación, por separado, de cada una de las isoformas de eIF5A y de las dos enzimas participantes en el proceso de hipusinación, DHS y DOHH, para posteriormente proceder a la reacción de modificación *in vitro*. Sin embargo, este intento no resultó exitoso ya que la enzima DHS presentó una gran tendencia a la agregación, apareciendo en cuerpos de inclusión durante la inducción de su expresión en *E. coli* (datos no mostrados). Por esta razón se recurrió a una estrategia alternativa.

La producción de las isoformas activas de eIF5A se consiguió mediante la co-expresión simultánea heteróloga en *E. coli*, de las distintas proteínas de eIF5A junto a las enzimas DHS y DOHH clonadas en un único vector de expresión. La utilización de esta aproximación para producir el factor eIF5A hipusinado ya se había demostrado en otros trabajos [143]. Las ORFs de *eIF5A1*, *eIF5A2*, *eIF5A3*, *DHS* y *DOHH* fueron amplificadas por PCR y clonadas por separado en los vectores de expresión *pQLinkGD* o *pQLinkHD* mediante tecnología *GATEWAYTM*. De esta forma, las distintas isoformas de eIF5A quedaron fusionadas a GST y separadas por el sitio de corte de la proteasa PreScission 3C, mientras que las enzimas DHS y DOHH quedaron fusionadas a una cola de histidinas. Además, el uso de los vectores *pQLink* permitió la posterior subclonación en un mismo vector de expresión de cada una de las isoformas de eIF5A fusionadas a GST, junto a las enzimas DHS y DOHH fusionadas a la cola de histidinas, mediante la técnica de

clonación independiente de ligasa (LIC, del inglés “*Ligation-Independent Cloning*”) [144] (Figura 9).

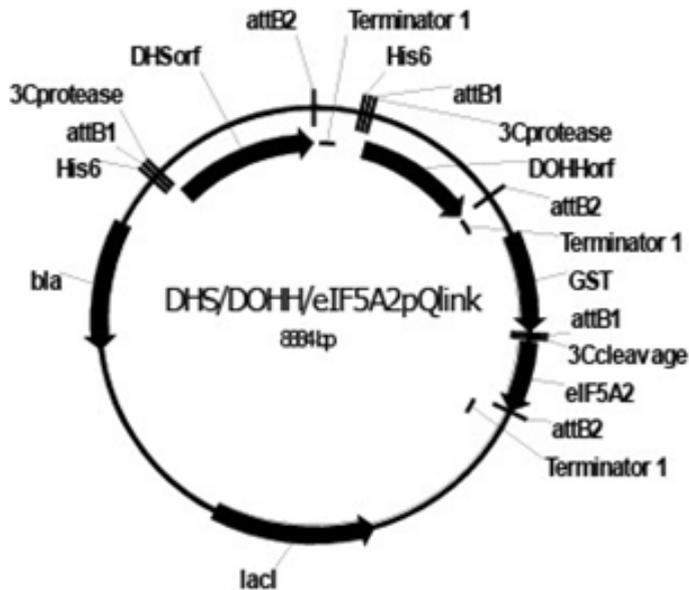


Figura 9. Diagrama esquemático del plásmido resultante tras la clonación LIC en el vector *pQLink* de *GST-eIF5A2* junto a *His-DHS* y *His-DOHH*.

La transformación en *E. coli* de los vectores de co-expresión recombinantes generados, permitió la purificación de las 3 isoformas de eIF5A fusionadas a GST. En la figura 10a, se muestra el análisis SDS-PAGE del proceso de purificación de GST-eIF5A2, co-expresada junto a las enzimas de hipusinación DHS y DOHH etiquetadas con una cola de histidinas. Las isoformas de eIF5A solubles libres de GST se obtuvieron tras el corte de la proteasa PreScission 3C (Figura 10b).

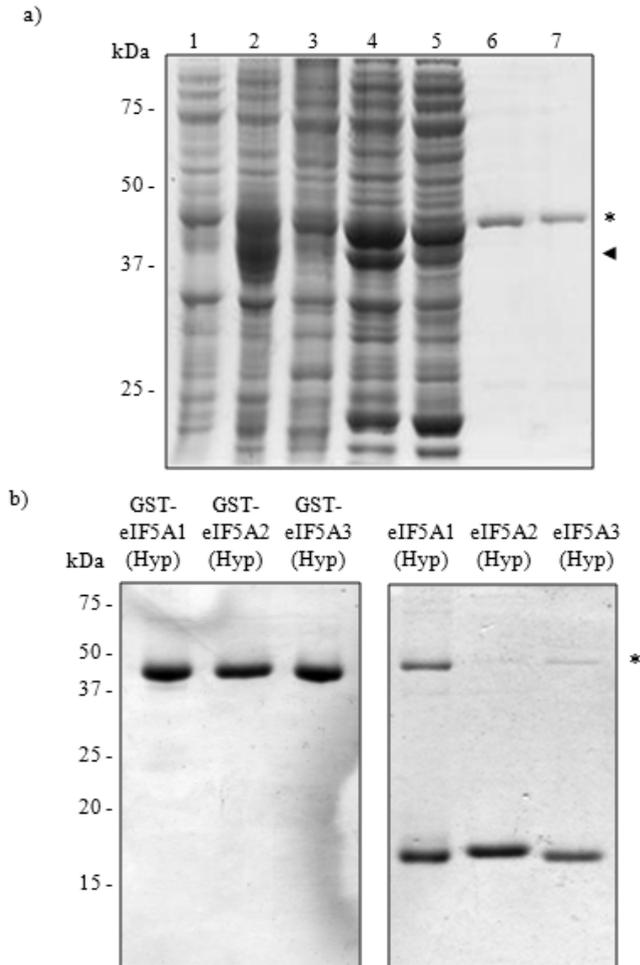


Figura 10. a) Tinción Coomassie del análisis SDS-PAGE del proceso de purificación de GST-eIF5A2 co-expresada junto a las enzimas His-DHS y His-DOHH. 1, extracto total de proteínas sin inducir; 2, extracto total de proteínas inducido por IPTG; 3, extracto de proteínas solubles no inducido; 4, extracto de proteínas solubles inducido por IPTG; 5, extracto de proteínas no unidas a la matriz de glutatión agarosa; 6 y 7, extracto de proteínas obtenido tras la elución por competición con el glutatión. El asterisco indica la presencia de GST-eIF5A2 (45 kDa) solapando parcialmente con His-DHS (44 kDa). La cabeza de flecha indica la presencia de His-DOHH (37 kDa). b) Purificación de las 3 isoformas modificadas de eIF5A. Las isoformas fusionadas a GST (izquierda) y los eIF5A libres tras el corte de la proteasa PreScission 3C (derecha), fueron separados en un SDS-PAGE y teñidos con Coomassie. El asterisco indica la presencia de GST-eIF5A residual.

Para evaluar si la co-expresión de eIF5A junto a las enzimas de hipusinación había ocasionado su modificación por hipusinación, se llevaron a cabo diferentes estrategias. La primera de ellas se basó en la digestión diferencial con tripsina que ocasiona la presencia de la lisina hipusinada dentro del péptido totalmente conservado en la secuencia primaria de eIF5A en todos los eucariotas (TGK^{Hyp}HGHAK). Se ha demostrado que la ausencia de hipusinación ocasiona que la K interna de este péptido sea susceptible al corte de la tripsina, mientras que la presencia de la K hipusinada impide la acción de la proteasa, dando lugar a la aparición de un péptido tríptico diferencial con una relación masa/carga (m/z) de 922.5 [145]. De esta manera, las proteínas eIF5A purificadas, co-expresadas o no, junto a las enzimas de hipusinación, fueron digeridas con tripsina para la detección del péptido tríptico hipusinado mediante análisis MALDI-TOF-MS (del inglés “*Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometer*”) en el laboratorio de proteómica del Servicio Central de Soporte a la Investigación Experimental (SCSIE) de la Universidad de Valencia (UV). Como muestra la figura 11, el péptido tríptico de m/z 922.5 sólo se detectó en las muestras de proteínas de eIF5A que se habían co-expresado junto a las enzimas de hipusinación, mientras que no se identificó en las muestras que habían expresado únicamente eIF5A.

Para confirmar que se había logrado la hipusinación de eIF5A se realizó en colaboración con el laboratorio del Dr. Antonio Granell del IBMCP, un estudio adicional sobre la composición de aminoácidos de la proteína GST-eIF5A2 co-expresada o no, junto a las enzimas responsables de la hipusinación. Este estudio se llevó a cabo mediante la hidrólisis total de los aminoácidos y su análisis a través de GCxGC/TOF-MS (del inglés “*Two-Dimensional Gas Chromatography with Time-of-Flight Mass Spectrometer*”), con la utilización de un estándar de hipusina químicamente sintetizada por el laboratorio del Dr. Santos Fustero del Centro de Investigación Príncipe Felipe (CIPF, Valencia). Como muestra la figura 12, únicamente en el análisis de aminoácidos procedente de la proteína GST-eIF5A2

co-expresada junto a las enzimas DHS y a DOHH, se pudo detectar el aminoácido hipusina, confirmando la validez del sistema de hipusinación generado en nuestro laboratorio.

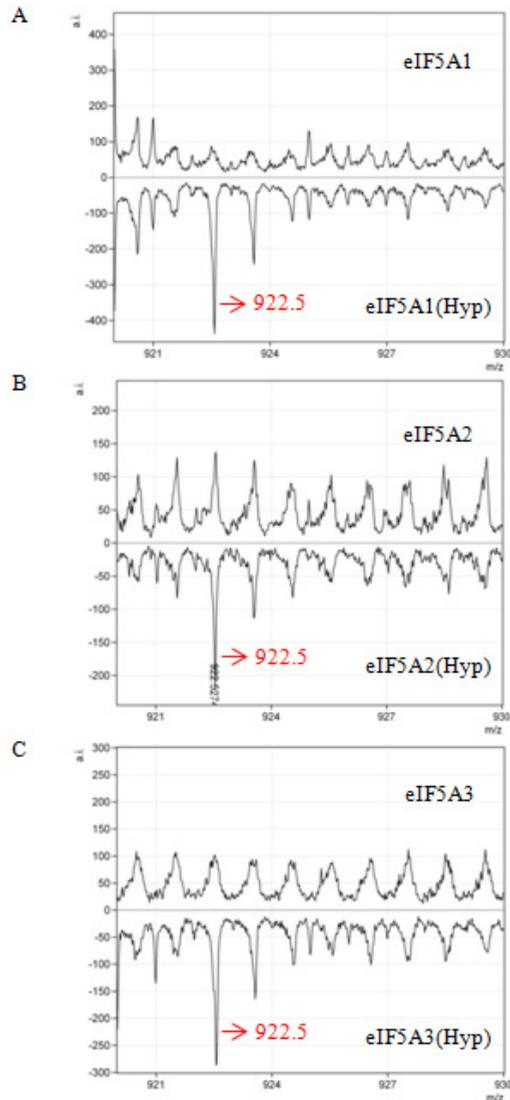


Figura 11. Análisis cualitativo de la hipusinación de eIF5A. Las proteínas recombinantes supuestamente hipusinadas (Hyp) o sin modificar, eIF5A1 (A), eIF5A2 (B) y eIF5A3 (C), fueron digeridas con tripsina y analizadas mediante MALDI-TOF-MS para la detección del péptido tríptico diferencial con una m/z de 922.5.

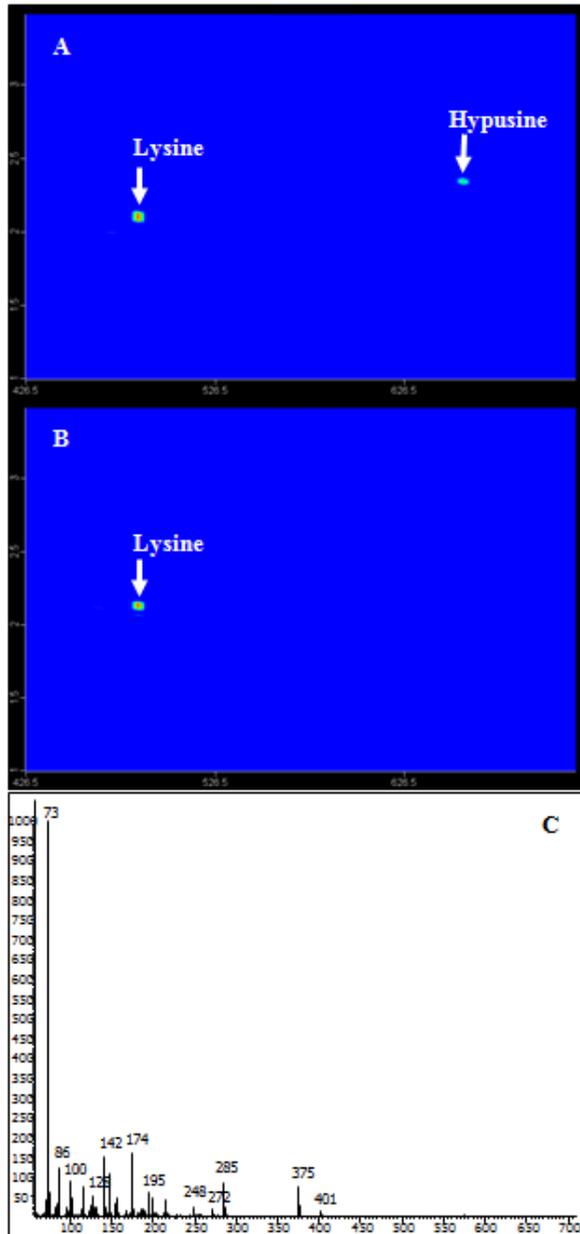


Figura 12. Determinación de la presencia de hipusina por GCMS. Se representa un fragmento del cromatograma iónico obtenido (m/z 375 + 174), tras el análisis GCxGC/TOF-MS de la hidrólisis de GST-eIF5A2, co-expresado junto a las enzimas de hipusinación (A) o sin co-expresar (B). Se representa el espectro de masas de la hipusina obtenido por TOF-MS (C).

Una vez confirmada la presencia de hipusina en las proteínas co-expresadas junto a DHS y DOHH, se continuó con el estudio de la movilidad de las isoformas de eIF5A hipusinadas con respecto a las proteoformas no modificadas, tras su separación en 2D-E. Para ello, se marcaron diferencialmente con fluoróforos cada una de las 3 isoformas co-expresadas (Cy5, rojo) y las no co-expresadas (Cy3, verde). Se realizaron mezclas de cada isoforma de eIF5A co-expresada con su respectiva proteoforma no modificada, y las 3 combinaciones resultantes fueron separadas en 2D-E independientes. Posteriormente, se escaneó la fluorescencia de los geles, y se realizaron tinciones con Coomassie. Como muestran los resultados de la figura 13, las 3 isoformas co-expresadas dieron lugar a 2 señales de diferente pI cada una de ellas. En cambio, las proteínas recombinantes no co-expresadas se separaron en una sola señal que solapaba perfectamente con la señal más ácida de las muestras de proteínas co-expresadas. Este resultado, sugería que las señales menos ácidas de las proteínas co-expresadas junto a DHS y DOHH, pertenecerían a las proteoformas hipusinadas de eIF5A como cabría esperar de la modificación química por hipusinación. Para confirmar este resultado, tras la tinción Coomassie se extrajeron los fragmentos del gel pertenecientes a la señal más ácida y a la menos ácida de la isoforma eIF5A2, y se enviaron al laboratorio de proteómica del SCSIE de la UV para digerirlos con tripsina y analizar de nuevo la presencia del péptido tríptico diferencial de m/z 992.5 mediante MALDI-TOF-MS. Los resultados obtenidos (datos no mostrados) fueron equivalentes a los de la figura 12, confirmando la presencia de hipusina únicamente en la muestra de la señal menos ácida, y por lo tanto corroborando su asignación como la señal perteneciente a la proteoforma hipusinada de eIF5A. Los resultados reflejados en la figura 13, demostraron que la co-expresión de eIF5A junto a DHS y DOHH no produjo la hipusinación completa de este factor. Si bien, al analizar la aparición de la señal menos ácida se pudo cuantificar el porcentaje de hipusinación obtenido, que en todos los casos se situó entre un 20% y un 45% para cada una de las isoformas de eIF5A. La utilización de protocolos alternativos, como por ejemplo el cambio en la

composición del medio o la temperatura de crecimiento bacteriano, no logró mejorar el nivel de hipusinación conseguido (datos no mostrados).

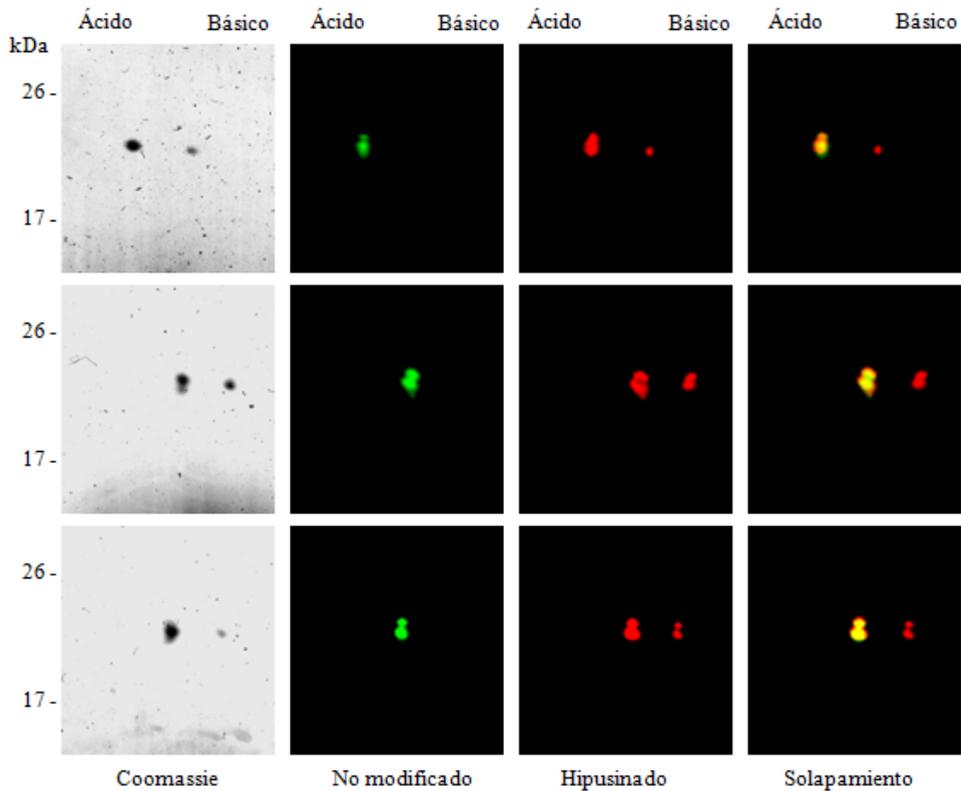


Figura 13. Separación de las proteoformas hipusinadas y las no modificadas de eIF5A mediante 2D-E. Las muestras no modificadas se marcaron con el fluoróforo Cy3 (verde) y las parcialmente hipusinadas con Cy5 (rojo). Ambas muestras de cada isoforma se mezclaron y se separaron por 2D-E. El escaneado de la fluorescencia dio lugar a la aparición de una única señal en las muestras no modificadas y a 2 señales en las parcialmente hipusinadas. El solapamiento de las imágenes mostró la co-migración de la proteoforma no modificada con la señal más ácida de la muestra co-expresada junto a DHS y DOHH. Los paneles de arriba corresponden a eIF5A1, los centrales a eIF5A2 y los de abajo a eIF5A3.

1.3. Caracterización del perfil 2D-E de eIF5A de *A. thaliana*.

La obtención de las isoformas de eIF5A parcialmente hipusinadas, permitió continuar con la caracterización del perfil proteómico de eIF5A en *A. thaliana* mediante la separación de un extracto total de proteínas de la planta en una 2D-E, y el análisis “*Western Blot*” (WB) de eIF5A. Para conseguir este objetivo, se hizo necesaria la obtención de anticuerpos contra las proteínas eIF5A. Para ello, se realizó una purificación a gran escala de la proteína eIF5A1 no modificada mediante su expresión heteróloga en *E. coli*. La proteína eIF5A1 pura se utilizó para producir anticuerpos policlonales contra eIF5A1 (anti-eIF5A1). Para analizar la inmunoreactividad del anticuerpo anti-eIF5A1 generado, se realizaron ensayos WB con diferentes cantidades de las isoformas de eIF5A fusionadas a GST. Los resultados del análisis WB demostraron que el anticuerpo anti-eIF5A1 reconocía óptimamente a la isoforma eIF5A1, y que presentaba un nivel más bajo de reactividad hacia la isoforma eIF5A3 y en menor medida frente a eIF5A2. Además, el análisis WB con cantidades diluidas de las proteínas recombinantes, permitió observar diferencias en cuanto a los límites de detección del anticuerpo entre las diferentes isoformas de eIF5A, siendo éste mucho mayor para el caso de eIF5A1. En cambio, no se pudo detectar el reconocimiento de eIF5A2 y eIF5A3 por debajo de 50 ng (Figura 14a).

Mediante otro ensayo WB, se comprobó la capacidad del anticuerpo generado de reconocer específicamente a eIF5A1 en un extracto total de proteínas procedente de plántulas de *A. thaliana*. El resultado mostrado en la figura 14b, reflejó la aparición de una banda específica del tamaño esperado de eIF5A1. La separación del extracto de proteínas en un 1D-E no permitió la detección diferencial de las 3 isoformas de eIF5A, teniendo en cuenta la similitud entre los tamaños moleculares de las isoformas de eIF5A. De la misma manera, la separación 1D-E tampoco permitió distinguir las distintas proteoformas del factor eIF5A.

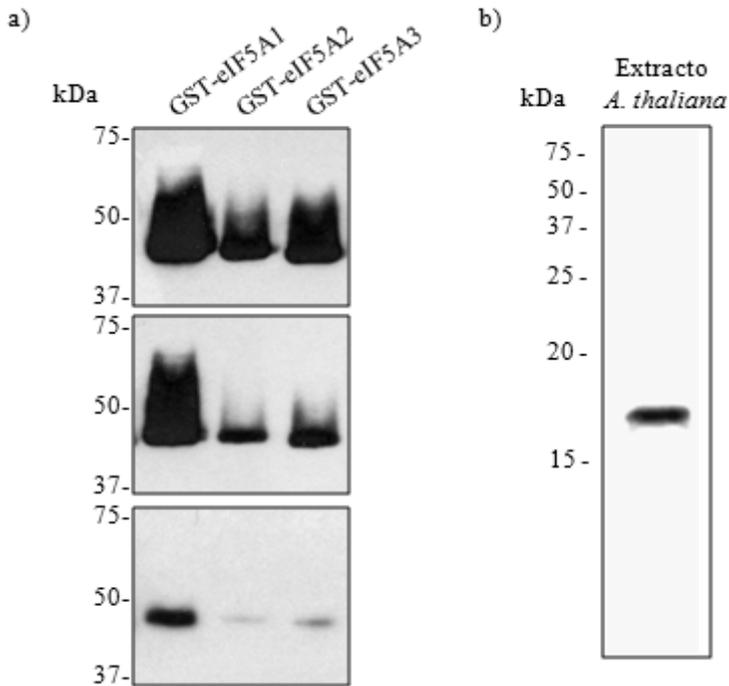


Figura 14. a) Ensayos WB para analizar la inmunoreactividad del anticuerpo anti-eIF5A1 generado hacia diferentes cantidades de las proteínas recombinantes GST-eIF5A purificadas (1 μ g, 500 ng y 50 ng, en el panel de arriba, central y de abajo, respectivamente). b) Detección inmunológica de eIF5A1 mediante WB en un extracto total de proteínas (15 μ g) de plántulas de *A. thaliana* crecidas *in vitro* durante 10 días.

Una vez validado el anticuerpo anti-eIF5A1, se procedió al estudio de la movilidad 2D-E de eIF5A de un extracto total de proteínas de plántulas de *A. thaliana* crecidas *in vitro* durante 10 días. Este extracto se separó mediante 2D-E y se analizó por WB con la utilización del anticuerpo anti-eIF5A1. Las señales inmunológicas obtenidas, fueron comparadas con la señal fluorescente procedente de una mezcla de las proteínas recombinantes parcialmente hipusinadas marcadas con distintos fluoróforos (eIF5A1-Cy2 (azul), eIF5A2-Cy3 (verde) y eIF5A3-Cy5 (rojo)), y separadas en una segunda 2D-E realizada en paralelo. De este modo, se realizaron estudios comparativos de las movilidades electroforéticas 2D obtenidas en ambos gels (Figura 15a). Además, a partir del material vegetal utilizado para

la elaboración de los extractos de proteínas, se realizaron preparaciones de RNA total y se analizó mediante PCR cuantitativa tras transcripción reversa (RT-qPCR, del inglés “*Reverse Transcriptase quantitative PCR*”), el nivel de expresión de cada una de las isoformas de eIF5A (Figura 15b). En los resultados del WB se detectó una señal inmunológica mayoritaria que co-migraba con las señales fluorescentes pertenecientes a eIF5A1 hipusinado, y a eIF5A2 y eIF5A3 sin modificar. Al teñir con nitrato de plata el gel de electroforesis obtenido tras la separación 2D del extracto total de proteínas de *A. thaliana*, no se pudieron detectar las señales de tamaño y pI esperados para las isoformas de eIF5A (datos no mostrados). El límite de detección de la tinción con nitrato de plata se sitúa en el rango bajo de nanogramos o de sub-nanogramos [146]. Por lo tanto, esta señal mayoritaria debía corresponder únicamente a la proteoforma hipusinada de eIF5A1. Aunque los niveles de expresión endógena de las isoformas eIF5A2 y eIF5A3 son mayores que los de eIF5A1, como muestran los datos de RT-qPCR obtenidos, el ensayo WB permitió principalmente la detección de la isoforma eIF5A1. Estos resultados se explican teniendo en cuenta la baja cantidad de proteína total utilizada, y los resultados en cuanto al límite de detección del anticuerpo anti-eIF5A1 reflejados en la figura 14. La señal inmunológica más ácida correspondió con la proteoforma sin hipusinar de eIF5A1, mientras que la más básica co-migró con las señales fluorescentes pertenecientes a las isoformas eIF5A2 y eIF5A3 hipusinadas.

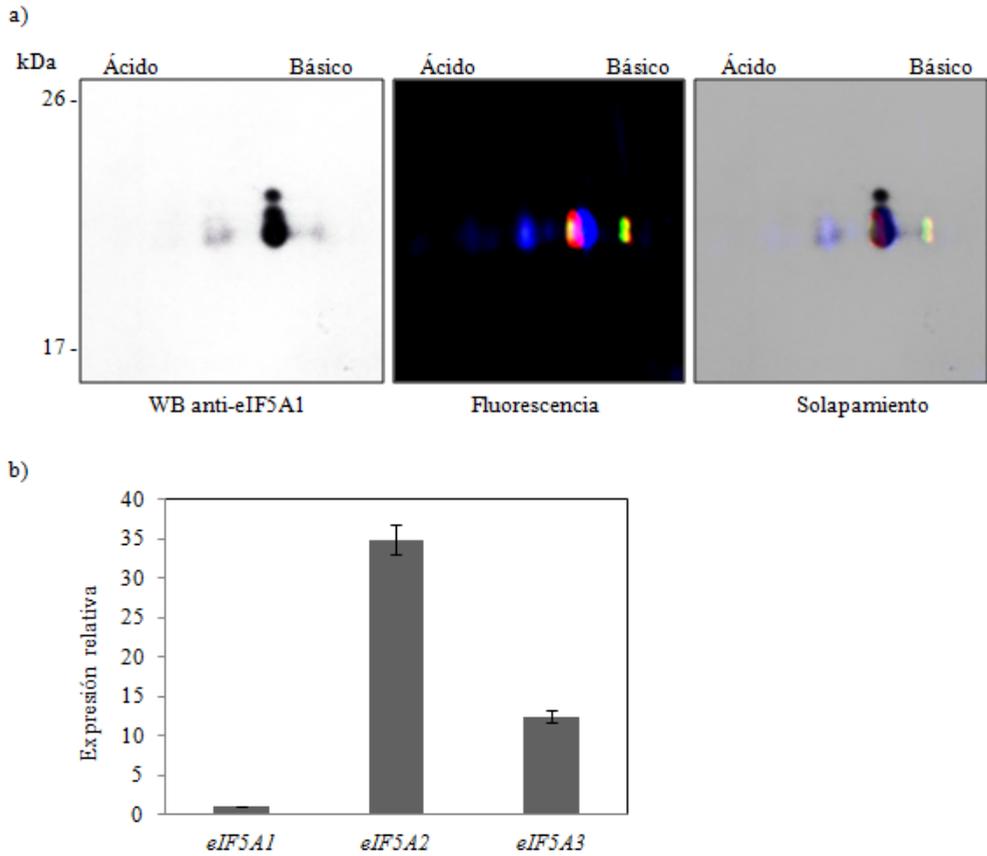


Figura 15. a) Comparación de la detección inmunológica de eIF5A en un extracto total de proteínas (15 µg) tras su separación en una 2D-E (panel de la izquierda), con el escaneado de las señales fluorescentes de una mezcla de las proteínas eIF5A recombinantes parcialmente hipusinadas marcadas diferencialmente con fluoróforos (eIF5A1 azul, eIF5A2 verde, eIF5A3 rojo) separadas en un segundo gel 2D (panel central). En el panel de la derecha se muestra el solapamiento entre ambas imágenes. b) Análisis RT-qPCR de los niveles de expresión relativa en plántulas de *A. thaliana* de *eIF5A1*, *eIF5A2* y *eIF5A3*, referenciados con respecto al nivel de *eIF5A1*. Las barras de error representan la desviación estándar procedente de 3 réplicas técnicas.

Como se ha descrito en la introducción, el factor eIF5A está sujeto a otras modificaciones post-traduccionales en eucariotas, como la fosforilación, acetilación y ubiquitilación [48, 57, 63], que podrían estar implicadas en la movilidad electroforética 2D diferencial de eIF5A. Para estudiar posibles alteraciones por acetilación, se llevó a cabo un ensayo WB con la utilización de un anticuerpo anti-lisina acetilada en un extracto total de proteínas de plántulas de *A. thaliana* separado en 2D-E. Los resultados obtenidos no reflejaron ninguna señal inmunológica del tamaño molecular y pI esperados para las proteínas eIF5A (datos no mostrados).

Por otro lado, se ha demostrado que la quinasa CK2 es capaz de fosforilar a eIF5A en plantas [57-58]. Para estudiar posibles alteraciones en cuanto a la movilidad electroforética 2D de eIF5A por la fosforilación de CK2, se realizaron experimentos con extractos proteicos de plantas transgénicas del mutante dominante negativo condicional de esta quinasa, *CKA3^{mut}* [56], en colaboración con la Dra. Carmen Martínez de la Universidad Autónoma de Barcelona. Para ello, la misma cantidad de un extracto total de proteínas de plántulas mutantes *CKA3^{mut}* tratadas o sin tratar con dexametasona, se separaron por 2D-E, y se realizaron ensayos WB con el anticuerpo anti-eIF5A1. Como muestra la figura 16, la desactivación condicional por el tratamiento con dexametasona de CK2 provocó un aumento de la señal más ácida de eIF5A1. El aumento de la señal correspondiente a la proteoforma eIF5A1 sin hipusinar, sugiere que CK2 podría alterar la actividad de la enzima DHS *in vivo*. De hecho, se ha demostrado que CK2 es capaz de interaccionar y fosforilar a la enzima DHS en células HeLa [62]. Estos resultados, indicaban que la combinación de 2D-E y el análisis WB con el anticuerpo anti-eIF5A1 generado podría utilizarse para detectar alteraciones en los niveles de hipusinación de las proteínas eIF5A de *A. thaliana*, en concreto de eIF5A1.

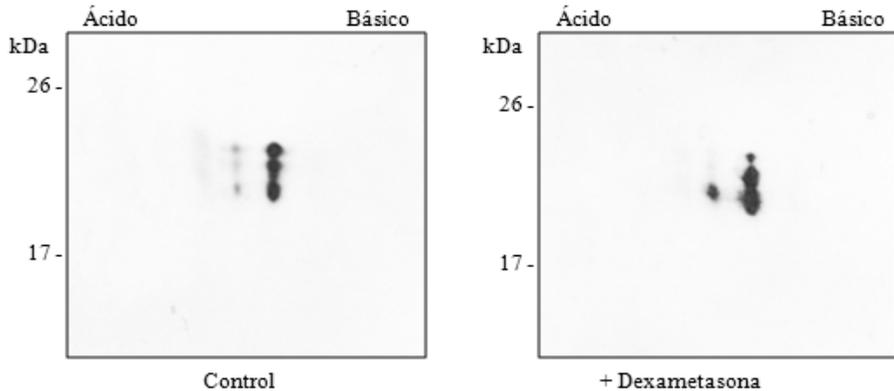


Figura 16. La misma cantidad de proteína total (20 μg), de plántulas *CK43^{mut}* crecidas *in vitro* durante 10 días en un medio normal, seguidos de 3 días en ausencia (control) o en presencia de 10 μM dexametasona, se separaron en electroforesis 2D, y se realizaron ensayos WB con el anticuerpo anti-eIF5A1.

1.4. El ABA reduce la hipusinación de eIF5A1 sin afectar a los niveles de transcrito de *DHS*.

Para validar la herramienta generada se decidió caracterizar posibles alteraciones en el perfil 2D-E de eIF5A, mediante tratamiento con ABA. Se eligió esta fitohormona porque se ha demostrado que es capaz de inhibir la traducción [147], y se pensó en la hipótesis de que la actividad del factor eIF5A podría estar alterada en estas condiciones. Para contrastar esta hipótesis, se obtuvieron extractos proteicos totales de plántulas de *A. thaliana* crecidas durante 9 días *in vitro*, y posteriormente tratadas o no con 10 μM ABA durante 3 horas. Los extractos fueron separados en 2D-E y analizados mediante WB con la utilización del anticuerpo anti-eIF5A1. En paralelo, se realizó otra electroforesis 2D para separar de nuevo una mezcla de las isoformas recombinantes parcialmente hipusinadas, que se marcaron diferencialmente con fluoróforos (eIF5A1-Cy2 (azul), eIF5A2-Cy3 (verde) y eIF5A3-Cy5 (rojo)). Además, a partir del material vegetal utilizado para la elaboración de los extractos de proteínas, se realizaron preparaciones de RNA total y se analizó mediante RT-qPCR el nivel de expresión de cada una de las

isoformas de eIF5A y de la enzima de hipusinación DHS. Para comprobar que el tratamiento con ABA había ocurrido correctamente, también se analizó el nivel de los transcritos de los genes inducibles por ABA, *RAB18* y *RD29B* [148]. Como muestran los resultados de la figura 17a, el tratamiento con ABA produjo un incremento del “spot” más ácido que corresponde con la proteoforma no hipusinada de eIF5A1. Al comparar las señales inmunológicas obtenidas tras el ensayo WB con el extracto tratado con ABA, y la fluorescencia diferencial de las isoformas recombinantes parcialmente hipusinadas, se observó que solapaban perfectamente, confirmando que la señal más ácida pertenece a la isoforma eIF5A1 no hipusinada. Los resultados de las RT-qPCR (Figura 17b) no revelaron diferencias transcripcionales en el nivel de *eIF5A1*, *eIF5A2*, *eIF5A3* y de *DHS*, mientras que *RAB18* y *RD29B* estaban claramente inducidos. Estos resultados indicaban que, las alteraciones post-transcripcionales que se producen ante un incremento de ABA podrían afectar a la actividad de eIF5A al reducirse su hipusinación y, por lo tanto, alterar la eficiencia traduccional de los ARNm regulados por este factor.

Estos resultados se han publicado recientemente: Belda-Palazón, B., M.A. Nohales, J.L. Rambla, J.L. Aceña, O. Delgado, S. Fustero, M.C. Martínez, A. Granell, J. Carbonell, and A. Ferrando, *Biochemical quantitation of the eIF5A hypusination in Arabidopsis thaliana uncovers ABA-dependent regulation*. *Frontiers in Plant Science*, 2014. **5**.

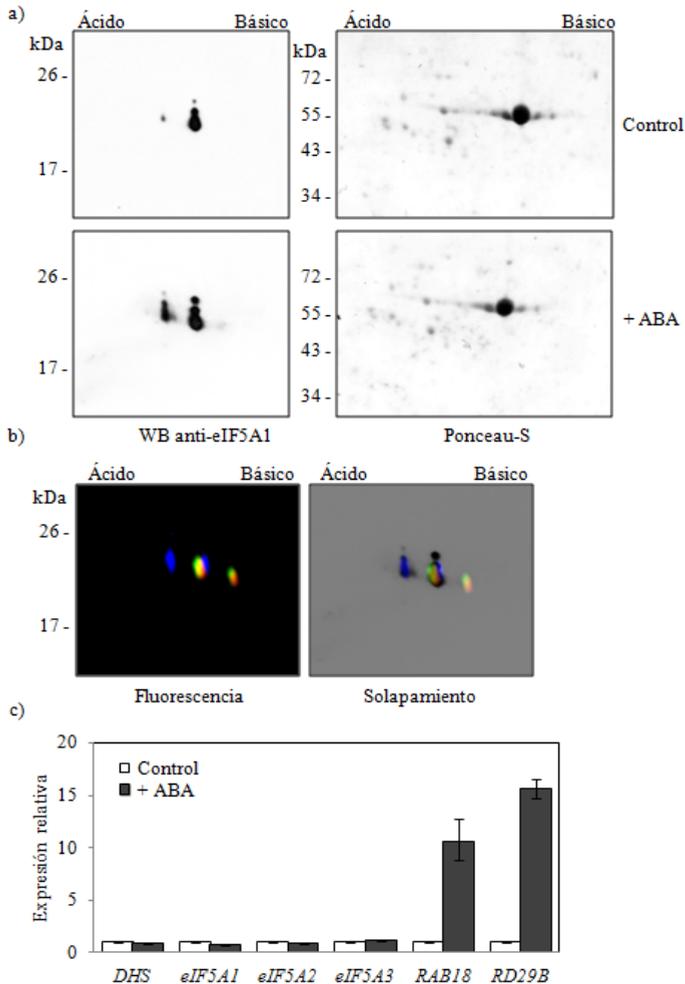


Figura 17. a) Análisis WB con la utilización del anticuerpo anti-eIF5A1, de extractos totales de proteínas (15 μ g) de plántulas de *A. thaliana* tratadas o no (control) con 10 μ M ABA durante 3 horas. El experimento se repitió con 3 réplicas biológicas independientes obteniendo el mismo resultado. b) Comparación de la movilidad electroforética 2D de las isoformas recombinantes parcialmente hipusinadas marcadas con fluoróforos (eIF5A1 azul, eIF5A2 verde, eIF5A3 rojo) y las señales inmunológicas anti-eIF5A1 del extracto proteico total tratado con ABA en a). c) Expresión relativa a nivel transcripcional de *eIF5A1*, *eIF5A2*, *eIF5A3*, de la enzima de hipusinación *DHS*, y de los genes inducibles por ABA *RAB18* y *RD29B*, en muestras de RNA total de plántulas de *A. thaliana* tratadas con ABA en referencia a su control sin tratar. Las barras de error representan la desviación estándar procedente de 3 réplicas técnicas.

1.5. Localización subcelular de las proteínas eIF5A.

Como se ha mencionado en la introducción, se ha demostrado que la modificación por hipusinación provoca un cambio en el patrón de localización subcelular de eIF5A en células humanas [49]. En concreto, la hipusinación de eIF5A dictaría una localización citoplasmática, mientras que el precursor inactivo se localizaría entre el núcleo y el citosol. Para confirmar la localización dual núcleo-citosol de las proteoformas no hipusinadas de eIF5A de *A. thaliana*, se plantearon estudios de localización mediante la fusión de las diferentes isoformas de eIF5A a la proteína GFP. También se decidió estudiar la localización subcelular de las enzimas responsables de la hipusinación DHS y DOHH. Para ello, las ORFs de *eIF5A1*, *eIF5A2*, *eIF5A3*, *DHS* y *DOHH*, se clonaron mediante tecnología *GATEWAY*TM de manera independiente en los vectores binarios *pMDC43* y *pMDC83* [149], produciendo su fusión N-terminal y C-terminal con la GFP, respectivamente. Las construcciones generadas se transformaron en *Agrobacterium tumefaciens* para realizar ensayos de expresión transitoria en *Nicotiana benthamina*. Como control de localización nuclear, se utilizó una cepa de *A. tumefaciens* conteniendo la secuencia de localización nuclear del virus SV40 fusionada a la proteína fluorescente roja (mRFP, del inglés “*monomeric Red Fluorescence Protein*”), que fue co-infiltrada junto a cada una de las construcciones generadas. La visualización de la fluorescencia se realizó mediante el microscopio confocal (Figura 18). Los resultados de estos experimentos confirmaron que todas las isoformas de eIF5A de *A. thaliana*, probablemente no hipusinadas, presentan una localización combinada entre el núcleo y el citosol, de manera equivalente a la distribución observada para la enzima DOHH. En cambio, la enzima DHS presentó una localización únicamente citosólica. La proteína DHS es una enzima tetramérica formada por 4 subunidades idénticas de más de 40 kDa cada una [150]. La fusión de DHS a la proteína GFP, y la formación del tetrámero daría lugar a un complejo de gran tamaño que podría impedir la difusión pasiva de DHS hacia el núcleo celular.

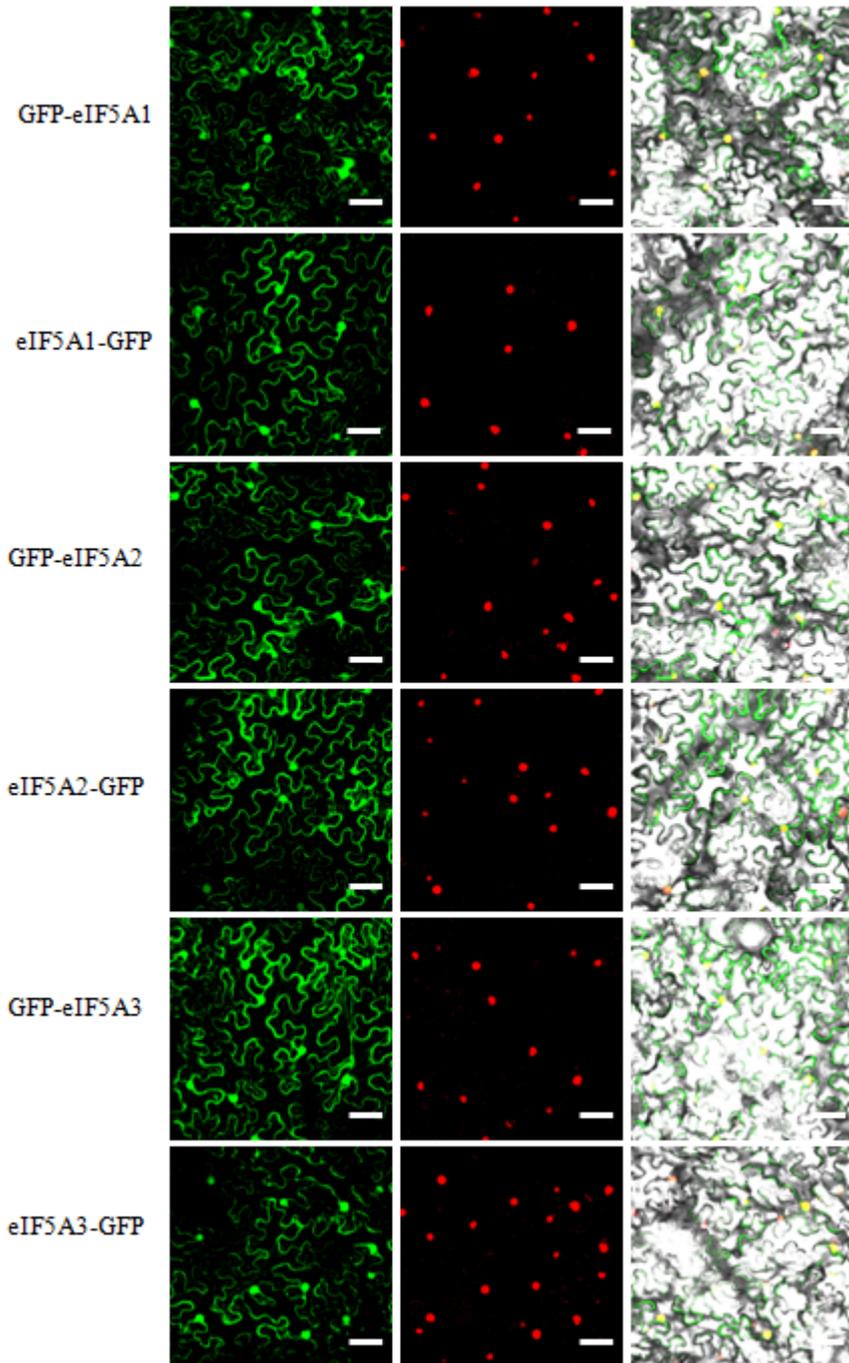


Figura 18. Continúa en la página siguiente.

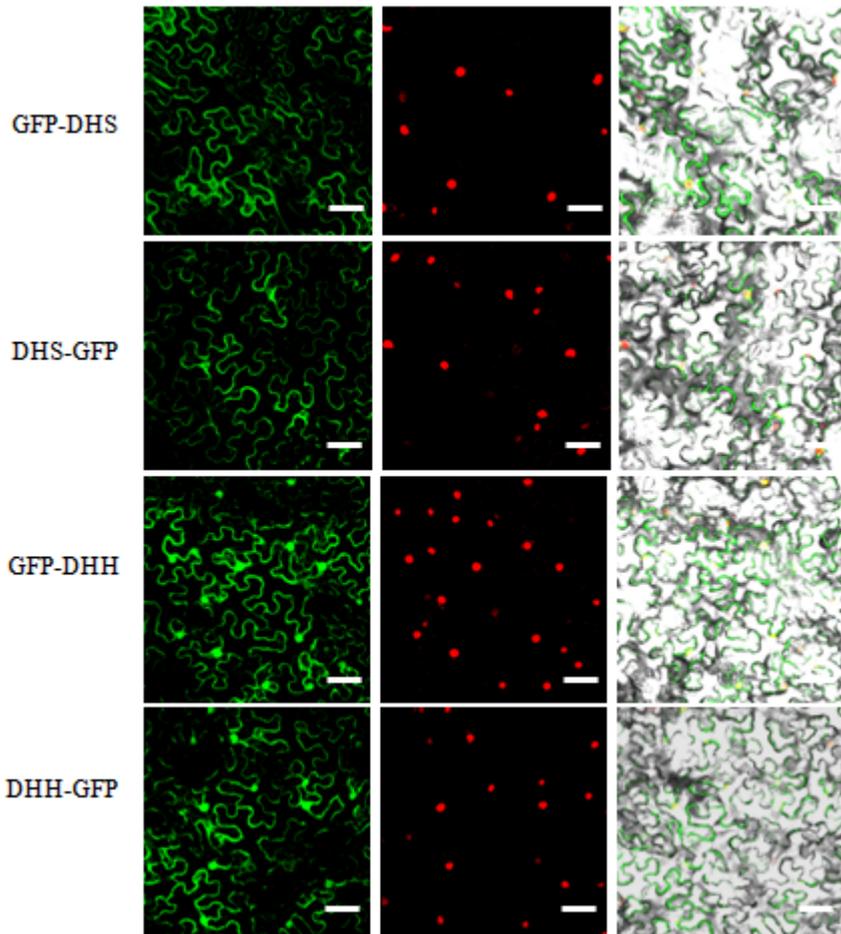


Figura 18. Localización subcelular en *N. benthamiana* de eIF5A1, eIF5A2, eIF5A3, DHS y DOHH, mediante su fusión N-terminal o C-terminal a GFP. Cada una de las construcciones fueron expresadas transitoriamente mediante agroinfiltración, junto a un marcador de localización nuclear vírico fusionado a mRFP. La fluorescencia verde procedente de la GFP (panel de la derecha) y la fluorescencia roja de la mRFP (panel central) fueron observadas mediante el microscopio confocal. El panel de la izquierda muestra el solapamiento de las señales fluorescentes con la imagen de luz transmitida. Barra de escala 40 μm .

1.6. Estudios de interacción entre las isoformas de eIF5A de *A. thaliana* *in vivo*.

Se ha demostrado que el factor eIF5A de levadura existe en forma de homodímero tanto *in vivo* como *in vitro* [64-65]. En el laboratorio decidimos evaluar la formación de homodímeros y heterodímeros de eIF5A de *A. thaliana* mediante experimentos de BiFC [151] en *N. benthamiana*. Para ello, las ORFs de *eIF5A1*, *eIF5A2* y *eIF5A3*, se clonaron mediante tecnología *GATEWAY*TM en los vectores binarios *pYFN43* y *pYFC43* [9], consiguiendo la fusión N-terminal de cada una de las isoformas con el fragmento YFN y el fragmento YFC, respectivamente. Estos fragmentos pertenecen a la proteína YFP (del inglés “*Yellow Fluorescence Protein*”). Como controles, se utilizaron dos subunidades de una proteína quinasa de la familia SnRK (del inglés “*Snf1-Related-Kinase*”), AKIN10 y AKINb, capaces de formar heterodímeros [152], previamente clonadas en *pYFN43* y *pYFC43*. Las construcciones se transformaron en *A. tumefaciens*, para realizar ensayos de expresión transitoria mediante la co-agroinfiltración en *N. benthamiana* de las cepas obtenidas en todas sus combinaciones. La interacción entre las isoformas de eIF5A se comprobó mediante la visualización de la fluorescencia en el microscopio confocal. Como muestran los resultados de la figura 19, los experimentos de BiFC no sólo confirmaron la formación de homodímeros sino que también demostraron la capacidad de interacción entre las diferentes isoformas de eIF5A de *A. thaliana*. Estos resultados sugerían la existencia del heterodímero de eIF5A, además del homodímero, *in vivo* en células vegetales.

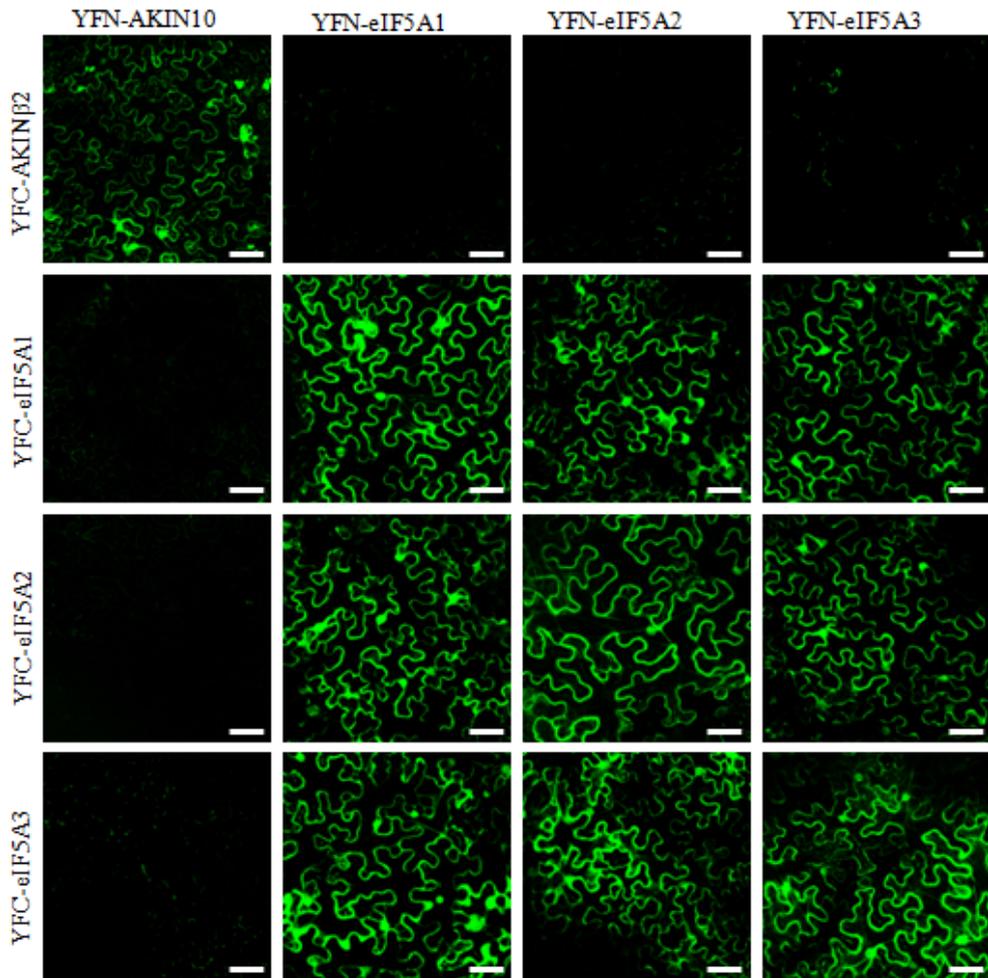


Figura 19. Ensayo BiFC entre las isoformas de eIF5A. Las secuencias codificantes de eIF5A1, eIF5A2 y eIF5A3 fusionadas a YFN o YFC se utilizaron para co-agroinfiltrar *N. benthamiana*. Como controles también se utilizaron las proteínas heterodiméricas AKINβ2 y AKIN10. La complementación de la fluorescencia se comprobó en el microscopio confocal. Barra de escala 40 μm.

2. Función del factor eIF5A en *A. thaliana*.

2.1. Generación de un sistema inducible de desactivación de eIF5A en *A. thaliana*.

Dado que la ruta de hipusinación es esencial para la viabilidad celular en la mayoría de los eucariotas incluidas las plantas [44, 153], se utilizó un sistema de desactivación genética condicional a la aplicación del glucocorticoide sintético dexametasona. Este sistema emplea los vectores binarios *pOpOff2*, basados en la tecnología de clonación por recombinación *GATEWAYTM*, con los que se consigue la desactivación genética condicional por la aplicación de dexametasona que promueve la generación de una horquilla de ARN que ocasiona una respuesta de interferencia de ARN [154], y el consecuente silenciamiento específico del gen diana de interés [155-156].

En el laboratorio se diseñaron construcciones que ocasionaran el silenciamiento independiente vía ARNi de cada una de las isoformas de eIF5A de *A. thaliana* (*AteIF5A1*, AT1G13950; *AteIF5A2*, AT1G26630; *AteIF5A3*, AT1G69410), así como también la desactivación simultánea de todas ellas mediante el silenciamiento de la primera enzima responsable de la hipusinación, la enzima DHS (*AtDHS*, AT5G05920). Para ello, se realizó un rastreo de potenciales secuencias diana en la base de datos CATMA (del inglés “*a Complete Arabidopsis Transcriptome Microarray*”; www.catma.org), que identifica secuencias únicas para cada uno de los ARNm de interés (Figura 20). Es frecuente que dichas secuencias se encuentren en zonas 5'UTR o 3' UTR de los ARNm.

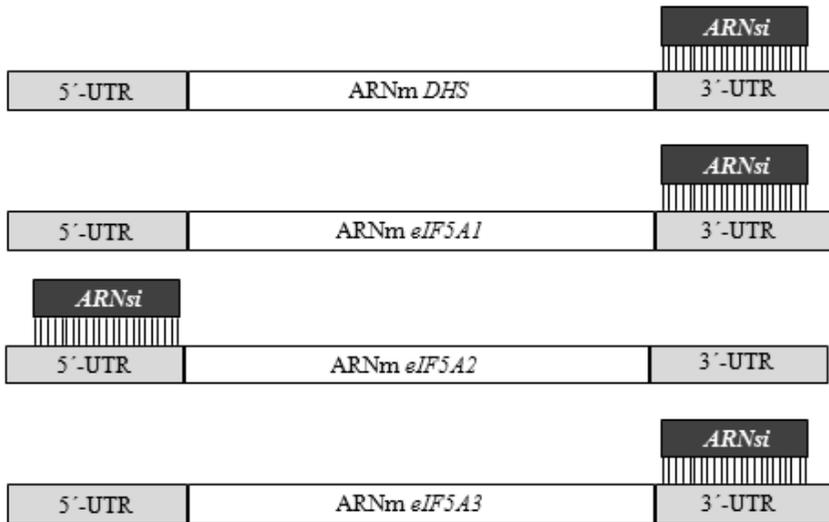


Figura 20. La búsqueda de secuencias específicas diana de cada uno de los transcritos a silenciar, contra las que generar una respuesta de ARNi se realizó utilizando la base de datos CATMA.

Estas secuencias fueron amplificadas por PCR, clonadas mediante tecnología *GATEWAY*TM en los vectores *pOpOff2* e introducidas en *A. tumefaciens* para su transformación en *A. thaliana*. El proceso de clonación y el sistema de inducción por dexametasona se describen en las figuras 21 y 22, respectivamente.

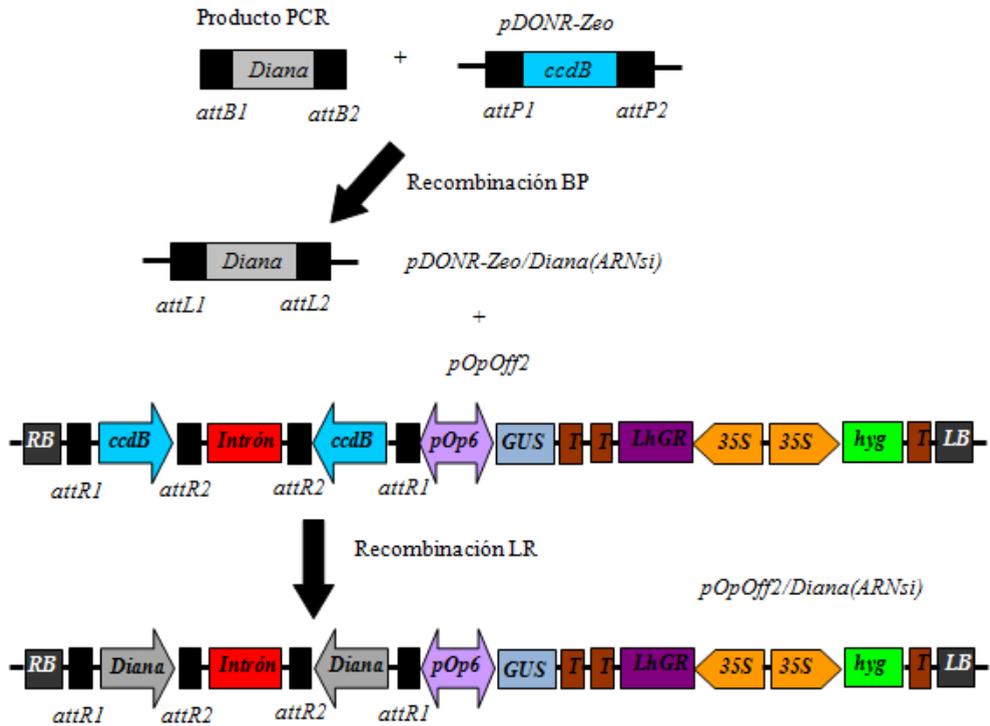
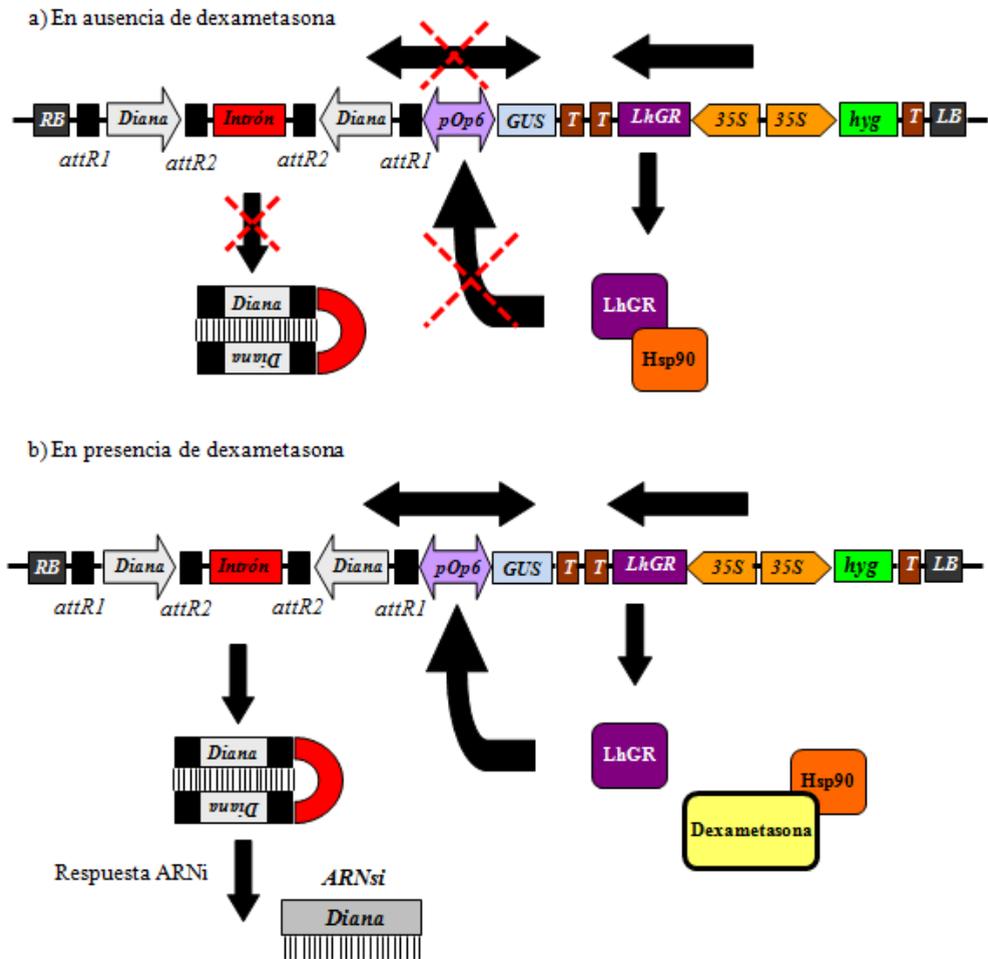


Figura 21. Proceso de clonaje de las secuencias diana en vectores *pOpOff2* mediante el sistema de clonación *GATEWAY™*. Las secuencias diana flanqueadas por los sitios *attB* se amplificaron mediante PCR, de manera que fuera posible la recombinación BP con los sitios *attP* del vector de entrada *pDONR-Zeo*. La construcción generada, con las secuencias diana flanqueadas por sitios *attL*, sirvió para producir la recombinación LR con el vector destino *pOpOff2* con sitios *attR*, ocasionando la inserción doble de las secuencias diana en orientaciones opuestas separadas por un intrón. *RB*, del inglés "Right Border"; *ccdB*, gen letal que codifica una proteína citotóxica; *pOp6*, 6 copias del promotor quimérico bi-direccional *pOp*; *GUS*, gen reportero GUS; *LhGR*, gen del factor de transcripción sintético LhGR; *35S*, promotor constitutivo 35S; *hyg*, gen de resistencia a higromicina; *T*, secuencia terminadora; *LB*, del inglés "Left Border".



2.1.1. Validación del silenciamiento por ARNi de DHS, eIF5A1, eIF5A2 y eIF5A3.

Para comprobar que las construcciones generadas ocasionaban la supresión de los ARNm diana de interés, se diseñó un sistema para su validación *in vivo* basado en experimentos de expresión transitoria en *N. bethamiana*. Para esta validación, se utilizaron las fusiones traduccionales a GFP de las proteínas DHS, eIF5A1, eIF5A2 y eIF5A3, descritas en el apartado anterior de resultados. Alternativamente, se generaron otras construcciones a partir de los vectores *pMDC43* o *pMDC83*, en las que se fusionaron a GFP las ORFs de cada una de ellas, pero esta vez junto a la región UTR diana específica, 3'-UTR en los casos de DHS, eIF5A1 y eIF5A3, y 5'-UTR para eIF5A2, a la cual se une el ARNsi (ARN pequeño de interferencia, del inglés "*small interference RNA*") producido en la respuesta de ARNi. Todas estas construcciones fueron transformadas en *A. tumefaciens*, y utilizadas para realizar ensayos de expresión transitoria y visualización de la fluorescencia mediante el microscopio confocal, junto a la co-infiltración de las cepas de *A. tumefaciens* capaces de desencadenar el silenciamiento de la enzima DHS (cepa *siDHS*), y de las distintas isoformas del factor eIF5A (cepas *sieIF5A1*, *sieIF5A2* y *sieIF5A3*) en presencia o ausencia de dexametasona. Como muestran los resultados de la figura 23, la co-infección de cepas de *A. tumefaciens* que expresaban las proteínas DHS, eIF5A1, eIF5A2 o eIF5A3, fusionadas a GFP e incluyendo las regiones diana 3' o 5' UTRs, junto a sus respectivas cepas de silenciamiento *siDHS*, *sieIF5A1*, *sieIF5A2* o *sieIF5A3*, produjo la supresión de la señal fluorescente verde sólo en presencia de dexametasona. En cambio, si las fusiones traduccionales no incluían las secuencias específicas para el silenciamiento vía ARNi, el apagado de la señal procedente de la GFP no se producía, por la ausencia de la secuencia diana en el ARNm, hecho que ocurrió tanto en presencia como en ausencia de dexametasona. Estos resultados confirmaron que las construcciones para el silenciamiento condicional dependiente de dexametasona de los genes diana de interés, eran válidas para ser introducidas en *A. thaliana* y ocasionar la

desactivación genética de la enzima de modificación (*siDHS*) o, independientemente (*sieIF5A1-3*), de cada una de las isoformas de eIF5A.

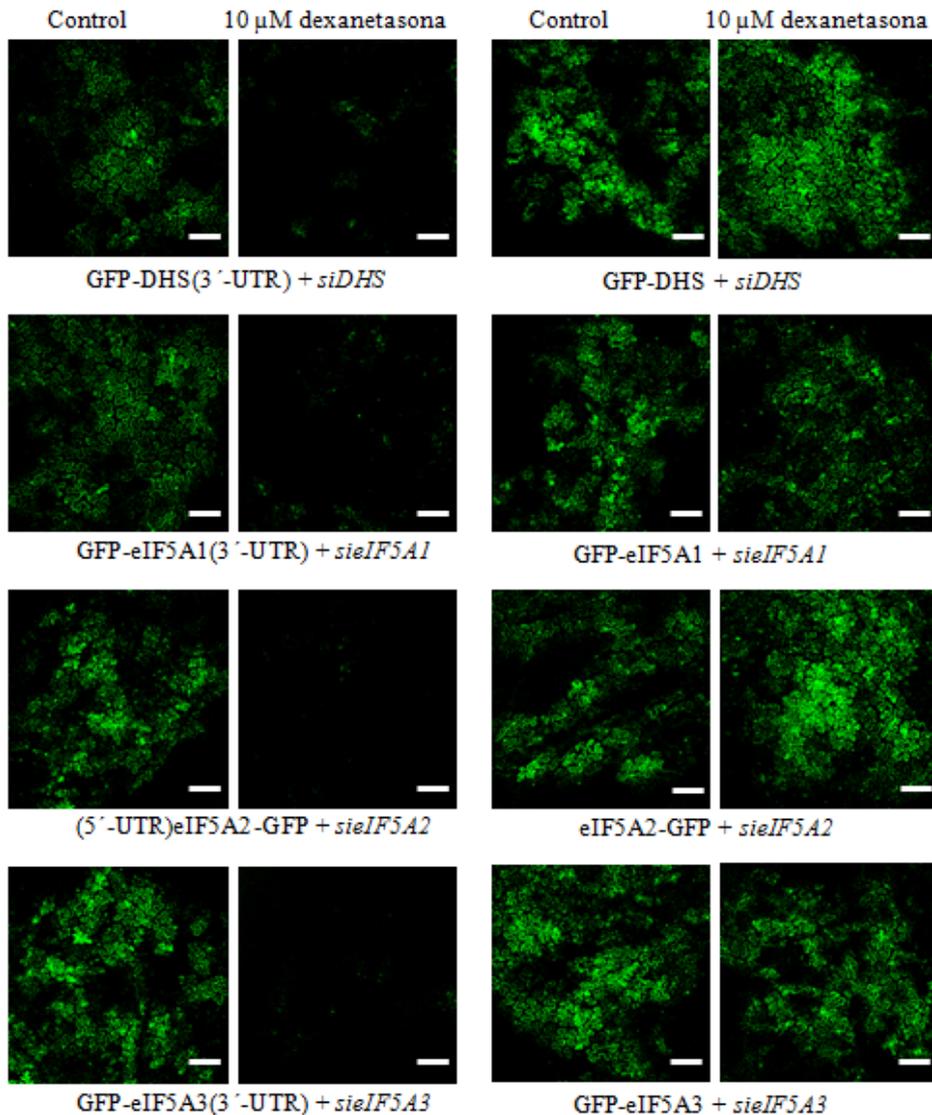


Figura 23. Comprobación del silenciamiento de los ARNm de interés mediante ensayos de co-infiltración y expresión transitoria en *N. benthamiana*, y visualización de la fluorescencia en el confocal. Las ORFs se fusionaron a GFP, con o sin las secuencias diana únicas de las regiones UTRs responsables de la especificidad de la cascada de ARNi. Barra de escala 200 μm .

2.1.2. Generación de plantas transgénicas *siDHS*, *sieIF5A1*, *sieIF5A2* y *sieIF5A3* y comprobación del silenciamiento.

Las cepas de *A. tumefaciens* conteniendo las construcciones capaces de suprimir la expresión de DHS y de las 3 isoformas de eIF5A, se utilizaron para transformar plantas silvestres de *A. thaliana* ecotipo *Columbia-0* (*Col-0*), y la selección de las semillas de la primera progenie (T1), se realizó mediante cultivo *in vitro* en medio MS (Murashige & Skoog) [157] con el antibiótico higromicina. Este sistema de selección permitió conseguir al menos 10 líneas independientes de plantas transgénicas T1 para cada una de las construcciones, a partir de las cuales se obtuvieron semillas T2. Aproximadamente 60 semillas T2 de cada línea transgénica se cultivaron en medio MS con higromicina para identificar líneas transgénicas segregantes 3:1 (resistentes:sensibles) para poder aislar plantas transgénicas homocigotas. Al menos 15 plantas transgénicas T2 resistentes a higromicina se crecieron para obtener semillas T3 que fueran 100% resistentes a la higromicina, y de esta manera obtener líneas homocigotas para cada una de las construcciones de silenciamiento (*siDHS*, *sieIF5A1*, *sieIF5A2* y *sieIF5A3*), proceso que se esquematiza en la figura 24. De esta manera, se aislaron entre 5 y 6 líneas transgénicas homocigotas para cada una de las construcciones de silenciamiento, que fueron utilizadas para comprobar el grado de silenciamiento genético por aplicación de dexametasona. Para comprobar la supresión de los diferentes transcritos, plantas silvestres (control) y de cada una de las líneas transgénicas generadas, se crecieron *in vitro* en medio MS durante 7 días y seguidamente traspasadas a medio en presencia o ausencia de dexametasona 10 μM , donde crecieron durante otros 3 días. Tras la inducción de las distintas respuestas de ARNi, se realizaron extracciones de ARN y se analizó el nivel de los transcritos a silenciar mediante RT-qPCR. Finalmente se seleccionaron las 3 mejores líneas transgénicas homocigotas de silenciamiento (*siDHS* H, K y M; *sieIF5A1* B, H, y J; *sieIF5A2* H, K y T; *sieIF5A3* C, F y L), en base a los datos de RT-qPCR con y sin dexametasona. Como muestra la figura 25, el tratamiento con dexametasona

produjo una disminución de los niveles de transcrito a silenciar de entre 5 y 10 veces con respecto a las líneas sin tratar, mientras que las plantas silvestres utilizadas como control, no presentaron reducción del nivel de los ARNm diana tanto en presencia como en ausencia de dexametasona.

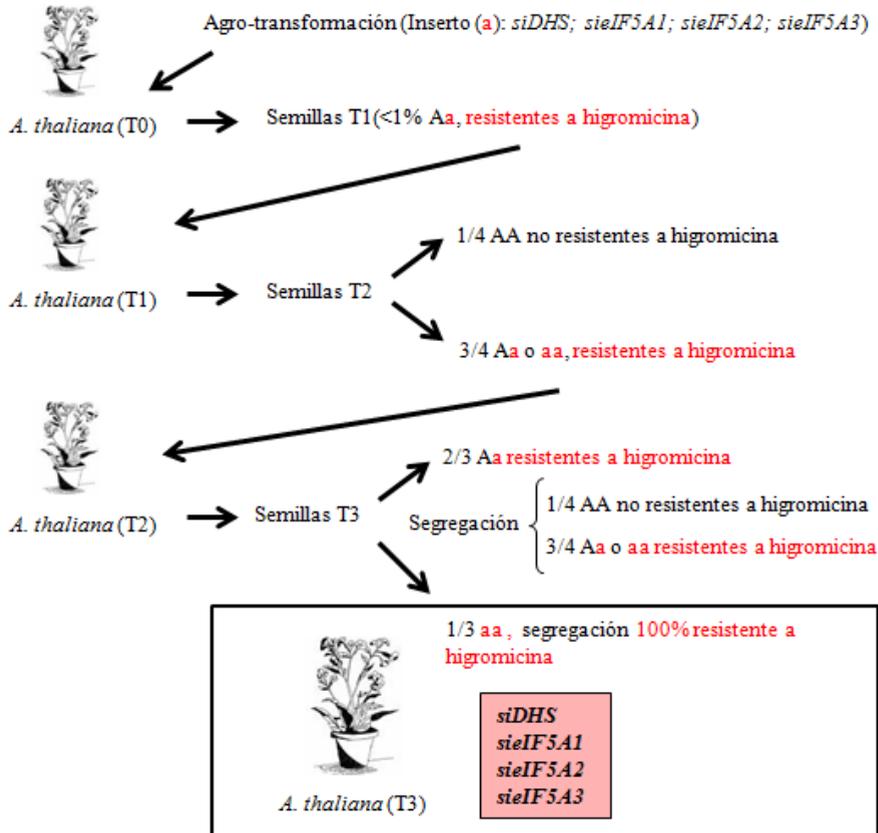


Figura 24. Esquema del proceso de obtención de plantas 100% homocigotas para cada una de las construcciones *siDHS*, *sieIF5A1*, *sieIF5A2* y *sieIF5A3* mediante selección en higromicina. La transformación de plantas silvestres de *A. thaliana* (T0), generó plantas T1 con una copia de la inserción (a) con una segregación 3:1 (Aa, aa: AA). Plantas T2 resistentes a higromicina se seleccionaron para generar plantas T3. De las plantas T2 escogidas, 2/3 segregaban nuevamente 3:1 (Aa, aa: AA) y 1/3 daban lugar a plantas T3 100% homocigotas (aa) para las construcciones de ARNi. Se obtuvieron al menos 5 líneas independientes homocigotas para cada una de las construcciones *siDHS*, *sieIF5A1*, *sieIF5A2* y *sieIF5A3*.

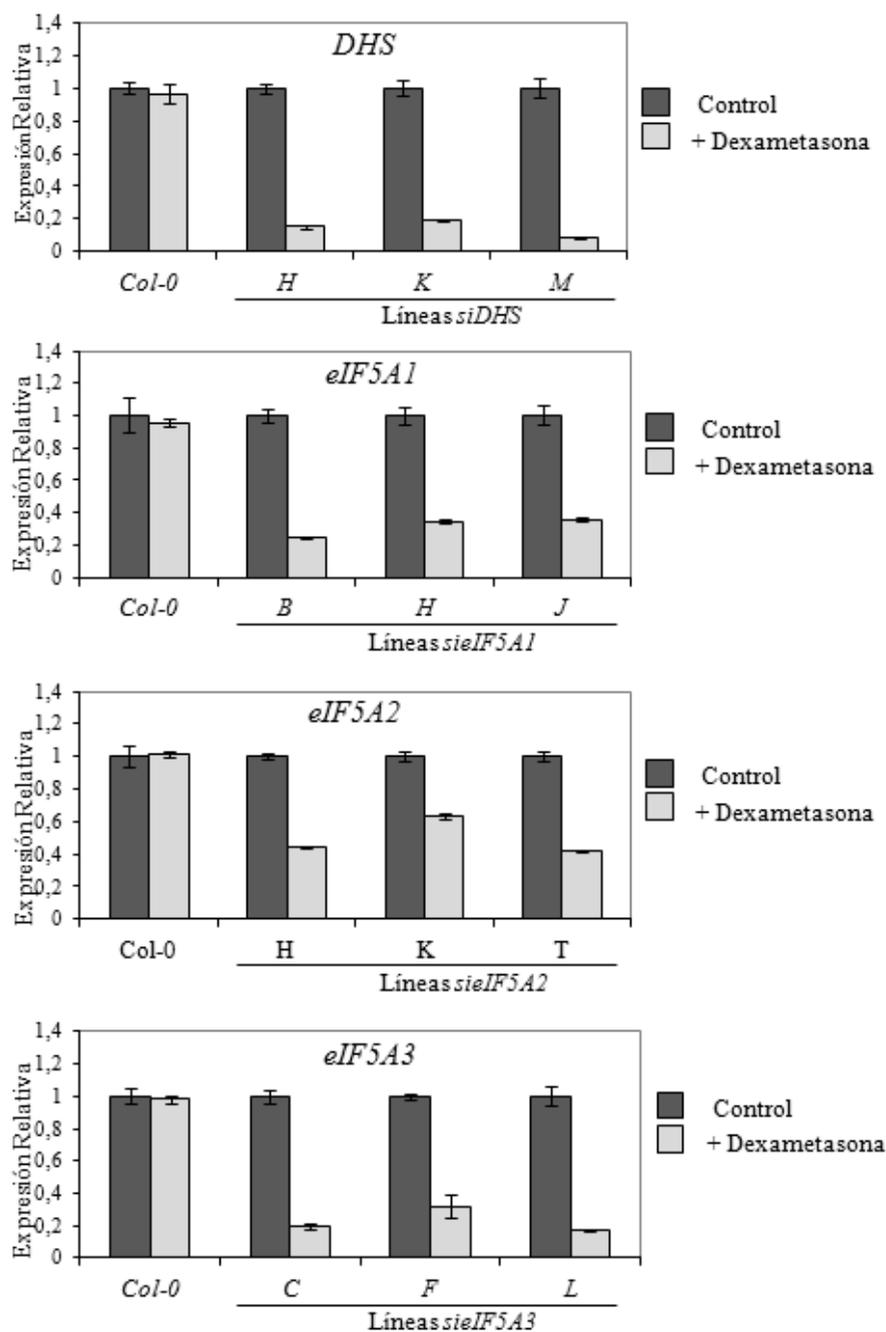


Figura 25. Continúa en la página siguiente.

Figura 25. El nivel de expresión de los ARNm de *DHS*, *eIF5A1*, *eIF5A2* y *eIF5A3* se analizó mediante RT-qPCR, en las líneas de silenciamiento *siDHS*, *siEIF5A1*, *siEIF5A2* y *siEIF5A3*, respectivamente, tratadas o sin tratar (control) con 10 μ M dexametasona. Como control adicional, se analizaron los niveles de cada uno de los transcritos de interés en plantas silvestres (*Col-0*). Los valores de expresión relativa se refirieron de manera independiente con respecto a su control sin dexametasona. Las barras de error representan la desviación estándar procedente de 3 réplicas técnicas.

En los resultados descritos hasta el momento quedaba demostrada la supresión parcial del transcrito de *DHS*, por lo que en el laboratorio esperábamos que la reducción de la actividad de esta enzima provocara una disminución de la hipusinación del factor eIF5A. En el objetivo número 1 de esta tesis se ha conseguido establecer una metodología bioquímica para determinar el patrón de hipusinación de eIF5A en *A. thaliana* [158]. De este modo, para comprobar la reducción en la hipusinación del factor eIF5A en las líneas capaces de la desactivación condicional de la enzima DHS, se crecieron *in vitro* plantas *siDHS K* durante 10 días en presencia o ausencia de dexametasona, al cabo de los cuales se realizaron extractos proteicos totales. Posteriormente, 35 μ g de proteína total de cada una de las muestras fueron separados mediante 2D-E, y se procedió a la detección inmunológica con el anticuerpo anti-eIF5A1, descrito previamente en el objetivo 1. Como muestra la figura 26, el silenciamiento del transcrito de *DHS* con el tratamiento con dexametasona, provocó el aumento de la señal perteneciente a la proteoforma no hipusinada de la isoforma eIF5A1. El análisis de imagen mediante el *software ImageJ* permitió cuantificar este incremento en un 46% con respecto al control sin tratar. En estos experimentos también se detectó la aparición de una nueva señal inmunológica más ácida, probablemente correspondiente a la proteoforma acetilada de eIF5A1, que también se incrementó en un 18% en la muestra tratada con dexametasona. Este resultado indicó que la supresión de los niveles de ARNm de *DHS* había ocasionado un desplazamiento hacia la proteoforma no activa de eIF5A.

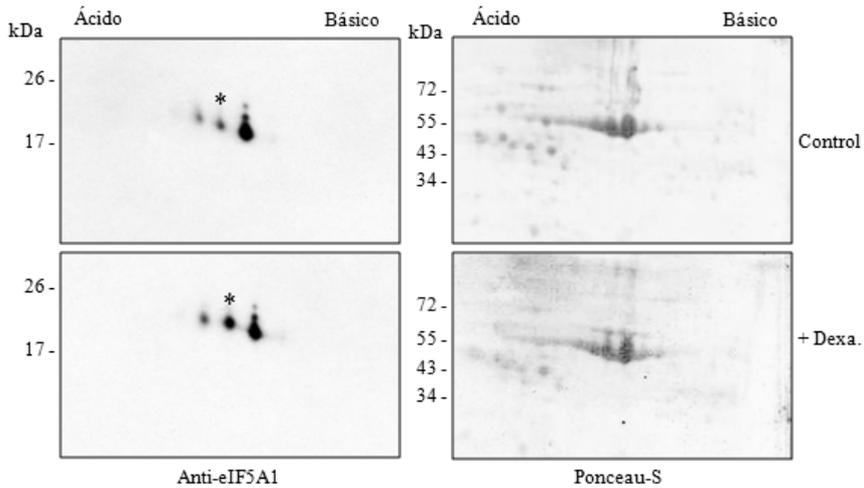


Figura 26. Análisis del patrón de hipusinación mediante detección inmunológica anti-eIF5A1 de muestras de extractos de proteína total (35 μ g) separadas en geles SDS-PAGE bidimensionales, procedentes de plantas *siDHS K*, tratadas o sin tratar (control) con dexametasona durante 10 días en crecimiento *in vitro*. El tratamiento con dexametasona causó un incremento del 46% en la señal perteneciente a la proteoforma no hipusinada de la isoforma eIF5A1, señalada mediante un asterisco.

2.2. Caracterización de las líneas de desactivación condicional a lo largo del desarrollo.

Una vez generadas y validadas las herramientas genéticas para la desactivación condicional de eIF5A en *A. thaliana*, se continuó con el estudio funcional de esta ruta mediante el análisis fenotípico y molecular de las plantas de silenciamiento condicional durante su desarrollo y en distintas condiciones de crecimiento. La mayoría de los estudios se llevaron a cabo con las líneas de silenciamiento de *DHS* (*siDHS*) que permite la desactivación simultánea de las 3 isoformas de eIF5A, si bien en algunos casos validamos los datos obtenidos con las líneas de silenciamiento de los genes que codifican eIF5A (*sieIF5A*).

2.2.1. Implicación del factor eIF5A en el control del tiempo de floración.

Las líneas transgénicas obtenidas, se crecieron *in vitro* en condiciones de fotoperiodo de día largo (16 horas de luz y 8 horas de oscuridad) en presencia de dexametasona (10 μ M) desde el momento de la siembra, y se procedió a la evaluación fenotípica y a la caracterización de las diferencias observadas con respecto a las líneas control sin tratar o plantas silvestres de *A. thaliana*. La primera diferencia que se pudo observar de modo aparente fue que todas las líneas de silenciamiento generadas creciendo en un medio con dexametasona, presentaban un fenotipo de floración temprana con respecto a los controles sin tratar. Tras 11-12 días desde la germinación se observó que las líneas transgénicas tratadas con dexametasona elongaban el tallo floral cuando presentaban de 4 a 6 hojas en la roseta. Sin embargo, las plantas transgénicas crecidas en medio sin dexametasona, no mostraron ninguna diferencia con respecto a las plántulas silvestres, que elongaron el tallo floral cuando la roseta había desarrollado de 6 a 8 hojas tras 16-18 días desde la germinación (Figuras 27 y 28a). Así mismo, los fenotipos de floración temprana fueron reproducidos en el invernadero, aplicando la dexametasona durante 30 días mediante pulverización, al cabo de los cuales las líneas transgénicas habían elongado el tallo y presentaban flores desarrolladas, mientras que las plantas sin tratar no habían elongado todavía el tallo o apenas comenzaban a hacerlo (Figura 28b).

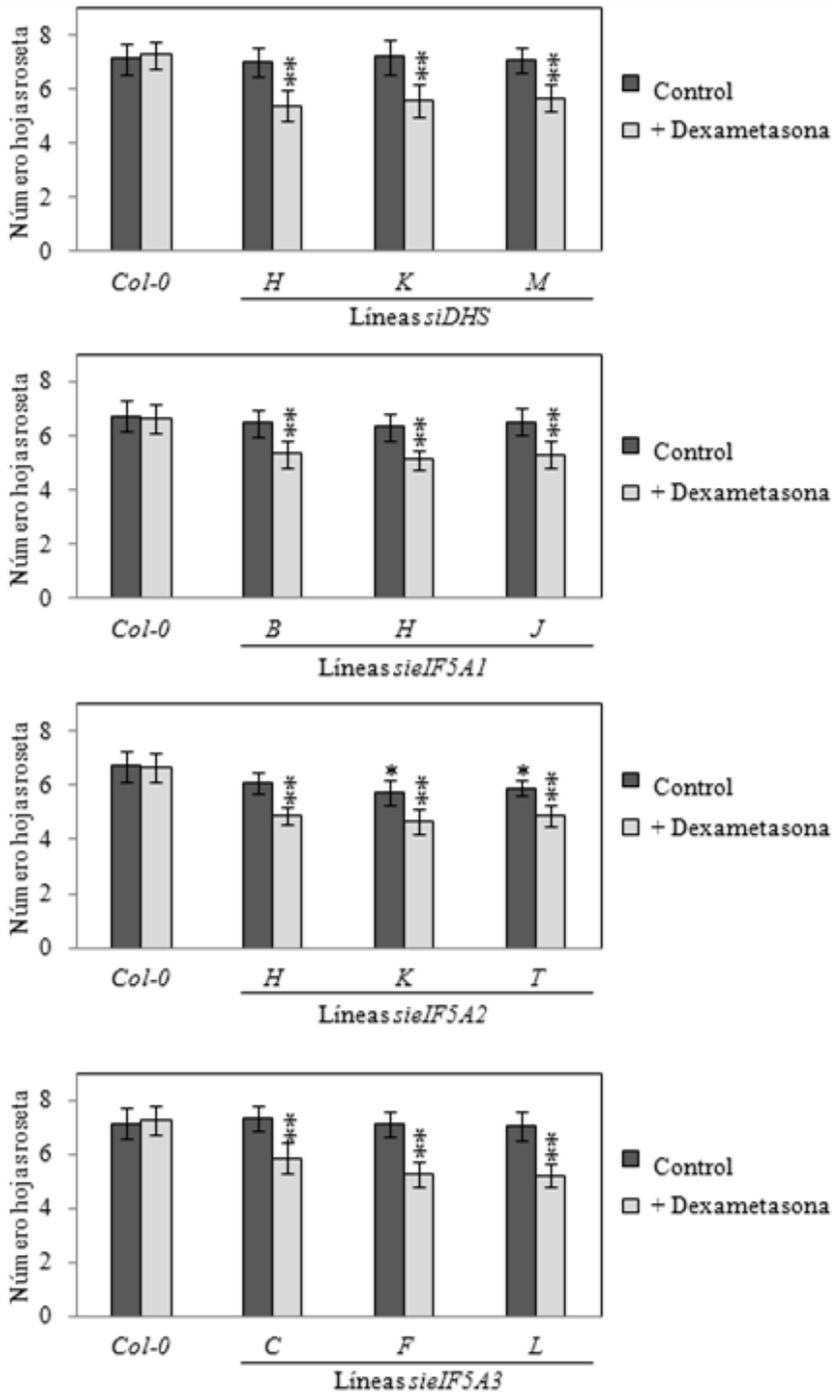


Figura 27. Continúa en la página siguiente.

Figura 27. Recuento del número de hojas de la roseta en el momento de elongación del tallo floral (transición floral). Las líneas de silenciamiento crecidas en medio con dexametasona desde el momento de la siembra, presentaron una transición floral avanzada (de 4 a 6 hojas en la roseta) con respecto a las condiciones control sin dexametasona y plantas silvestres (*Col-0*) (de 6 a 8 hojas en la roseta). Las barras de error representan la desviación estándar de la media del recuento del número de hojas de la roseta de al menos 20 plantas de cada muestra. Los resultados fueron analizados mediante test ANOVA de una vía. Un asterisco indica diferencias significativas ($p < 0.05$) con respecto a las plantas silvestres crecidas tanto en presencia como en ausencia de dexametasona. Dos asteriscos indican diferencias significativas ($p < 0.05$) con respecto a su control sin tratar, además de con respecto a las plantas silvestres crecidas en ambas condiciones.

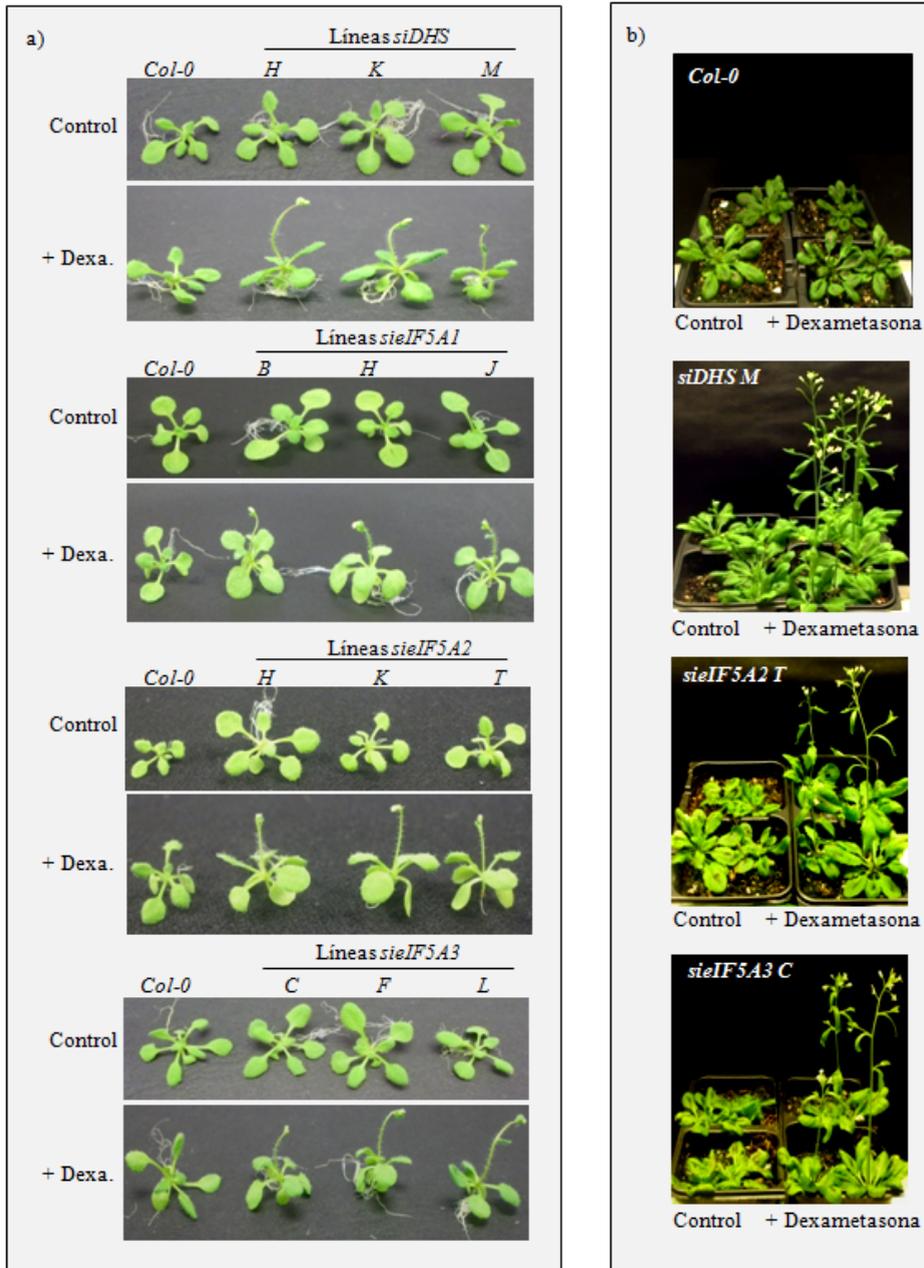


Figura 28. Fenotipos de floración temprana en las líneas de silenciamiento, obtenidos con el tratamiento con dexametasona tanto en cultivo *in vitro* tras 2 semanas de crecimiento (a), como en las plantas crecidas 6 semanas en el invernadero (b), en comparación con las líneas sin tratar y plantas silvestres (*Col-0*) de *A. thaliana*.

Para estudiar la dependencia del fenotipo de floración temprana con respecto a la dosis de dexametasona aplicada, y por lo tanto su relación con el nivel de silenciamiento ocasionado en las líneas transgénicas, se realizaron tratamientos sobre plantas *siDHS K* con cantidades crecientes de dexametasona (2, 5 y 10 μM) desde el momento de la siembra. Mediante RT-qPCR se midió el nivel de transcrito *DHS* a los 9 días de crecimiento tras la germinación y se analizó nuevamente el número de hojas de la roseta en el momento de la transición floral (Figura 29). Los resultados obtenidos demostraron la dependencia en cuanto a la anticipación de la elongación del ápice floral con respecto a concentraciones crecientes de dexametasona, que resultaron acordes a un mayor grado en la supresión del ARNm de *DHS*. La concentración de dexametasona 10 μM fue escogida para el resto de tratamientos de crecimiento *in vitro* en plantas.

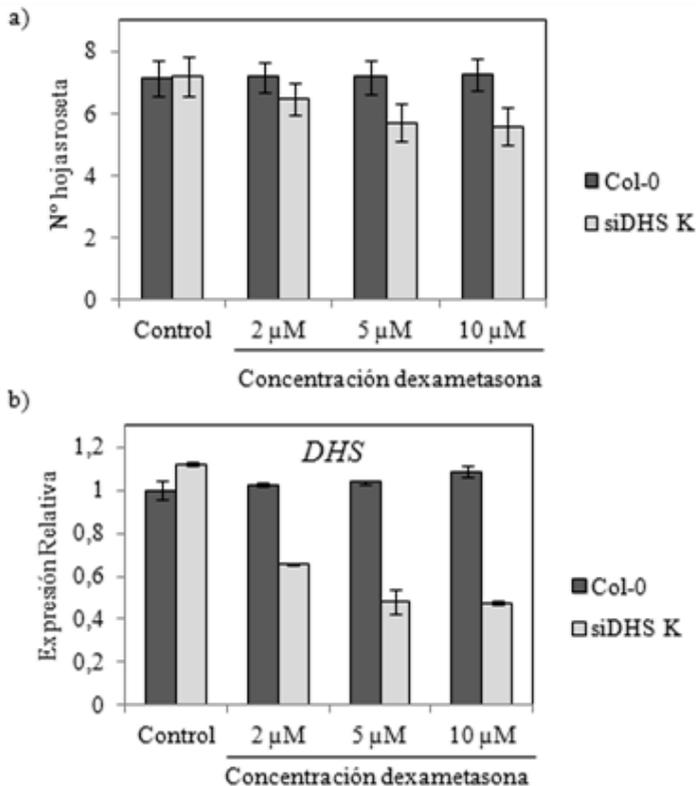


Figura 29. Continúa en la página siguiente.

Figura 29. Efecto de dosis del tratamiento con dexametasona en plantas *siDHS K* sobre el nivel de silenciamiento de *DHS* y la consecuencia sobre el avance en el tiempo de floración. a) Concentraciones crecientes de dexametasona (2, 5 y 10 μM) causaron una progresiva anticipación en el tiempo de floración, en comparación con los controles sin tratar y plantas silvestres (*Col-0*). b) El adelanto en el momento de la transición floral resultó en concordancia con un mayor nivel en la supresión del transcrito de *DHS*, observado tras análisis de RT-qPCR. Las barras de error en a) representan la desviación estándar de la media del recuento del número de hojas de la roseta de al menos 20 plantas de cada muestra. Las barras de error en b) representan la desviación estándar procedente de 3 réplicas técnicas, donde todos los valores de expresión relativa se refirieron con respecto al control sin tratar de *Col-0*.

El control del tiempo de floración es un proceso clave en el desarrollo de las plantas, en el que tiene lugar la transición desde un crecimiento vegetativo a un crecimiento reproductivo, provocando la diferenciación del meristemo apical del tallo (o *SAM* del inglés “*Shoot Apical Meristem*”) en un meristemo floral [159]. Para asegurar que la transición floral ocurre en el momento adecuado, existe una compleja regulación que integra tanto estímulos ambientales como endógenos de la propia planta, creando una compleja red de regulación jerárquica [160]. En el estudio de esta extensa red de control se ha puesto mucho interés en la identificación del florigeno o compuesto universal que cumpla un papel central en la estimulación de la floración [161]. En la actualidad se conoce que el florigeno fundamental es la proteína codificada por el gen *FT* (del inglés “*Flowering Locus T*”) u homólogos, una proteína de gran movilidad cuya expresión se induce de manera específica a lo largo del día (horas de luz) y que es sintetizada en las hojas, viajando a través del floema hasta el meristemo apical para inducir la floración [162-163].

Para comprobar si la anticipación en la transición floral observada en las líneas transgénicas era debida a diferencias en cuanto al grado de expresión de *FT*, se analizó el nivel de ARNm de este gen mediante RT-qPCR en cada una de las 3

líneas independientes *siDHS H, K y M*, crecidas durante 9 días en medio MS con dexametasona desde el momento de la siembra en condiciones de fotoperiodo de día largo, y se compararon con el nivel de transcrito de *FT* en plantas de líneas *siDHS* sin tratar o plantas silvestres de *A. thaliana* crecidas en las mismas condiciones. Dada la expresión cíclica (día-noche) del gen *FT*, todas las muestras fueron recogidas transcurridas las mismas horas de luz (4 horas) del comienzo del día. Como muestra la figura 30, el tratamiento con dexametasona causó una fuerte inducción de la transcripción de *FT*, de 20 a 60 veces con respecto a las plantas en condiciones control. Sin embargo, el tratamiento con dexametasona no causó diferencias a nivel transcripcional de *FT* en plantas silvestres de *A. thaliana*.

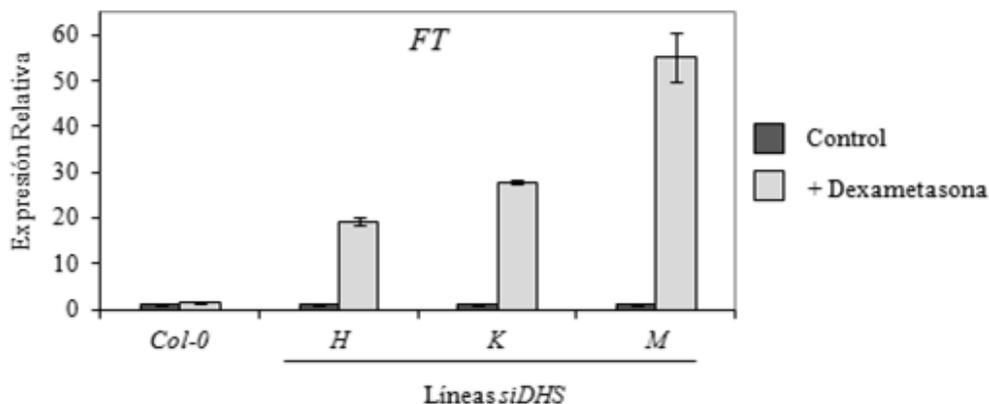


Figura 30. Nivel de expresión del ARNm de *FT* analizado mediante RT-qPCR en las líneas de silenciamiento *siDHS H, K y M*, tratadas o sin tratar (control) con dexametasona. También, se analizó el nivel de expresión de *FT* en plantas silvestres (*Col-0*). Los valores de expresión relativa se refirieron de manera independiente con respecto a su control sin dexametasona. Las barras de error representan la desviación estándar procedente de 3 réplicas técnicas.

Para el control de la floración es de vital importancia que las plantas sean capaces de captar los estímulos del ambiente tales como la duración de las horas de luz y oscuridad (fotoperiodo), las bajas temperaturas (vernalización), y además que tengan la capacidad de responder ante la señalización hormonal interna propia del

desarrollo vegetal (por ejemplo las giberelinas [164]), produciendo la integración de todos estos procesos para dar lugar a la floración de una manera coordinada y en el momento adecuado [159, 165]. La proteína FT cumple un papel central como mediador de esta integración floral y su expresión está altamente regulada a nivel transcripcional [160]. El hecho de que la supresión parcial de la actividad de las diferentes isoformas de eIF5A de *A. thaliana*, a través del silenciamiento de DHS, provocara la inducción de la transcripción del gen *FT* y un adelanto en el momento de la floración, propició el comienzo del análisis de reguladores de la transcripción del propio FT, centrándonos en primer lugar en el estudio del represor floral FLC (del inglés “*Flowering Locus C*”) el cual se une de forma directa al promotor de *FT* inhibiendo su transcripción [166-167]. La regulación de la expresión de FLC se produce a través de la vía autónoma, que responde a señales ambientales como la temperatura de crecimiento o vernalización, y sin embargo es insensible al fotoperiodo [168-169]. Así pues, se analizó mediante RT-qPCR el nivel de transcrito de FLC en las muestras de las líneas *siDHS* tratadas con dexametasona en las que se había observado una fuerte inducción de *FT* (Figura 30), en comparación con muestras sin tratar o líneas silvestres de *A. thaliana*. Como muestra la figura 31, el tratamiento con dexametasona en las líneas *siDHS* no causó diferencias en el nivel de transcrito de FLC, en comparación con los controles sin el glucocorticoide, de la misma manera que sucedió en plantas silvestres crecidas en ambas condiciones.

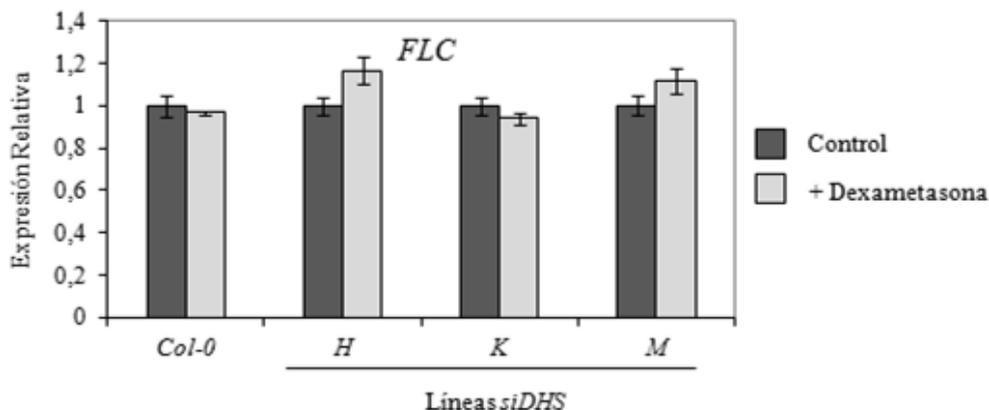


Figura 31. Nivel del transcrito de *FLC* analizado mediante RT-qPCR, en las líneas de silenciamiento *siDHS* *H*, *K* y *M*, tratadas o sin tratar (control) con dexametasona. Los valores de expresión relativa se refirieron de manera independiente con respecto a su control sin dexametasona. Las barras de error representan la desviación estándar procedente de 3 réplicas técnicas.

Como se ha descrito con antelación, el proceso de floración también está regulado a través del fotoperiodo, en el que la duración de las horas de luz sirve como estímulo para controlar el momento adecuado para la floración [165]. *A. thaliana* desde el punto de vista de la floración es una planta facultativa de día largo, lo que quiere decir que es una especie vegetal que florece principalmente y de manera más temprana en condiciones fotoperiódicas de día largo, aunque también puede hacerlo más lentamente y en menor medida en condiciones de día corto (8 horas de luz y 16 horas de oscuridad) [159]. La regulación fotoperiódica de la floración se produce a través del gen *CONSTANS* (*CO*), cuya expresión está regulada por el reloj circadiano y, por lo tanto, sus niveles están controlados por la longitud del día [170]. De esta manera, tan solo bajo condiciones fotoperiódicas de día largo la proteína *CO*, cuyos niveles son estabilizados por la luz [171], es capaz de activar la transcripción de *FT* al unirse en la zona proximal de su promotor [160, 165].

Para investigar si la super-inducción de la transcripción del florígeno *FT* se originaba por una alteración en los niveles de expresión de *CO*, se decidió estudiar

los niveles de los transcritos de *FT* y *CO* a lo largo de los días clave en el control del proceso de floración en cultivo *in vitro* (8 a 12 días tras germinación) de muestras recogidas al cabo de las mismas horas de luz del comienzo del día (4 horas), de plantas transgénicas *siDHS K* tratadas o sin tratar con dexametasona crecidas en día largo. Los datos de expresión obtenidos mediante RT-qPCR, mostraron que el tratamiento con dexametasona causaba un incremento progresivo y significativo de la transcripción del gen *FT*, desde 10 veces en el día 8 hasta 50 veces en el día 12 de crecimiento, con respecto a la muestra control recogida a los 8 días de crecimiento. En cambio, la ausencia de dexametasona causó un incremento progresivo del transcrito de *FT* mucho más atenuado, de 1 a 3 veces, siendo este incremento únicamente significativo a partir del día 12 de crecimiento tras germinación (Figura 32a). Por otro lado, la expresión a nivel de ARNm del gen *CO* ante el tratamiento con dexametasona tan solo mostró diferencias significativas a los 8 y 9 días de crecimiento en comparación con la muestra referencia control recogida a los 8 días, mientras que el resto de muestras tanto control como tratadas, no mostraron diferencias significativas en cuanto a la cantidad de transcrito de *CO* (Figura 32b), lo que sugería que el incremento sucesivo del ARNm de *FT* a lo largo de los días clave en el control del proceso de transición floral a causa de la pérdida parcial de actividad del factor eIF5A, no correspondía con un incremento en el nivel de transcrito de *CO*.

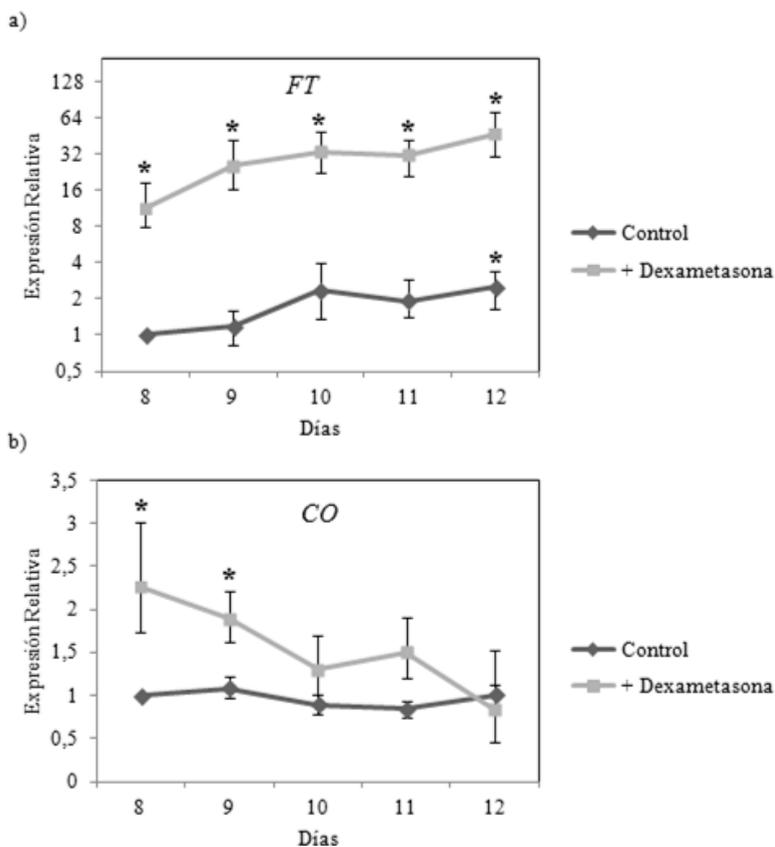


Figura 32. Análisis mediante RT-qPCR del nivel de transcrito de *FT* (a) y *CO* (b), en los días clave del control del proceso de floración (8 a 12 días tras germinación en crecimiento *in vitro*), en líneas *siDHS K* tratadas o sin tratar (control) con dexametasona. El análisis estadístico y los valores de expresión relativa en relación a la muestra control a los 8 días de crecimiento, se obtuvieron mediante el software “*REST 2009*” de Qiagen [172]. Las barras de error representan la desviación estándar procedente de 3 réplicas biológicas exactas. El asterisco indica un nivel de significación menor a 0.05 ($P < 0.05$). En (a) se muestran los valores de expresión relativa en escala logarítmica en base 2, mientras que en (b) en escala lineal.

Para estudiar más en detalle la regulación que ejerce el fotoperiodo en la anticipación del proceso de floración en las plantas transgénicas *siDHS*, se decidió realizar estudios fenotípicos bajo condiciones de fotoperiodo de día corto en

presencia o ausencia de dexametasona, y de esta forma comprobar si el adelanto en el momento de la transición floral dependía del fotoperiodo. Como se muestra en la figura 33, tras 5 meses de crecimiento, las plantas *siDHS* cultivadas en presencia de dexametasona, ya presentaban el ápice floral completamente elongado e incluso presentaban ramificaciones del tallo desde el meristemo de la roseta. En cambio, las plantas cultivadas sin dexametasona, tanto silvestres como *siDHS*, todavía no habían elongado el tallo. Además del adelanto en el momento de la transición floral, las líneas *siDHS* tratadas con dexametasona presentaron una sobreproducción de hojas caulinares que se disponían de manera semejante a la filotaxis que se puede observar en las hojas de la roseta, en espiral muy juntas unas de otras y con muy poca separación entre los entrenudos, hecho no apreciable en las plantas control una vez elongado el tallo (Figura 34).

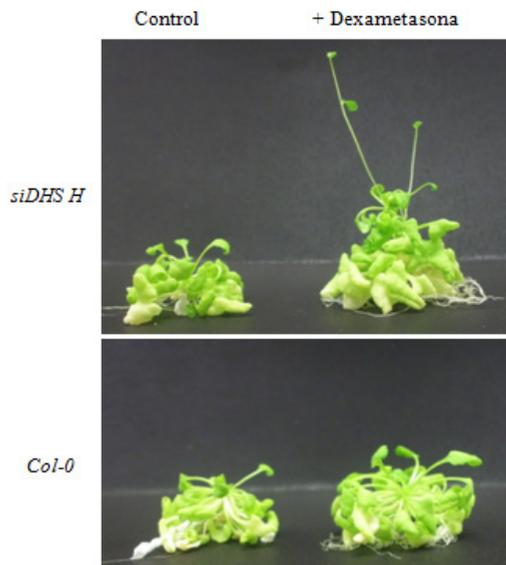


Figura 33. Fenotipos de floración temprana en las líneas *siDHS H* obtenidos con el tratamiento con dexametasona tras 5 meses de crecimiento en cultivo *in vitro* en día corto, en comparación con las líneas sin tratar y plantas silvestres (*Col-0*) de *A. thaliana*.



Figura 34. Aparición de hojas caulinares con una filotaxis equivalente a las hojas de la roseta (indicadas con flechas blancas), en plantas *siDHS K* tratadas con dexametasona (C), en comparación con plantas *siDHS K* en condiciones control (B) y plantas silvestres (*Col-0*) tratadas con el glucocorticoide (A), tras más de 5 meses de crecimiento en día corto.

A causa de la lentitud del crecimiento de *A. thaliana* en día corto que provocaba un gran retraso en el momento de la transición floral, se volvieron a crecer *in vitro* las plantas transgénicas *siDHS* bajo condiciones de día corto, en presencia o ausencia de dexametasona, pero esta vez en un medio MS al que se le añadió 1% de sacarosa para adelantar el crecimiento de las plantas, y se volvió a realizar un recuento de las hojas de la roseta en el momento de elongación del meristemo floral. Tras 16-17 días de crecimiento las líneas transgénicas *siDHS* tratadas con dexametasona elongaron el tallo floral cuando presentaban de 4 a 6 hojas en la roseta. Sin embargo, las líneas *siDHS* crecidas en medio sin dexametasona, así como las plantas silvestres, no mostraron ninguna diferencia entre ellas, elongando el tallo floral cuando la roseta había desarrollado de 8 a 10 hojas tras más de un mes de crecimiento (Figura 36a). Además del fenotipo de floración temprana, bajo las condiciones de crecimiento en fotoperiodo de día corto, se pudieron observar otras diferencias fenotípicas entre el tratamiento con dexametasona y los controles sin el glucocorticoide en líneas *siDHS*, hecho no apreciable en plantas silvestres, en cuanto a la longitud y curvatura de los peciolos de las hojas de la roseta,

observando peciolos más cortos y con una mayor curvatura en las líneas *siDHS* tratadas con dexametasona (Figura 35).

Para comprobar si la adición de un 1% de sacarosa tenía un efecto adicional en el tiempo de floración, durante el crecimiento *in vitro* en presencia o en ausencia de dexametasona de líneas *siDHS* o plantas silvestres, se decidió realizar los estudios de recuentos de hojas de la roseta bajo condiciones de fotoperiodo de día largo añadiendo 1% de sacarosa al medio de crecimiento, observando que no había diferencias en cuanto a los datos recogidos en ausencia de sacarosa descritos anteriormente. Tras 11-12 días de crecimiento las líneas transgénicas *siDHS* tratadas con dexametasona elongaron el meristemo floral cuando presentaban de 4 a 6 hojas en la roseta, a diferencia de las líneas *siDHS* crecidas sin dexametasona, que elongaron el tallo cuando la roseta había desarrollado de 6 a 8 hojas tras más de 16-18 días de crecimiento, de la misma manera que lo hacían las plantas silvestres tanto en presencia como en ausencia de dexametasona (Figura 36b).

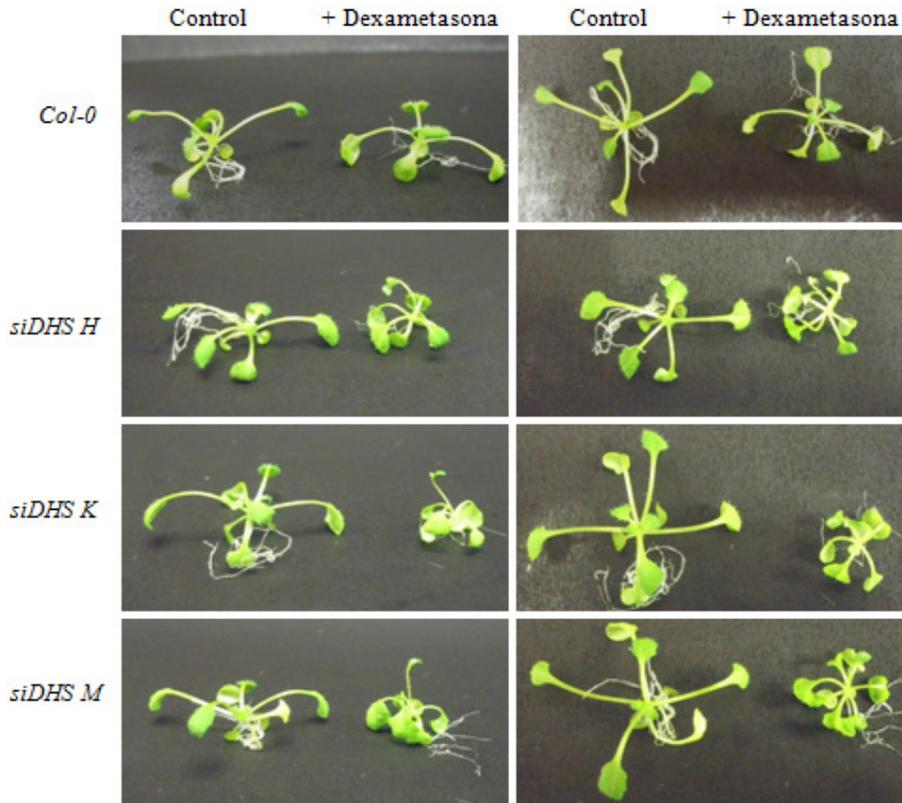


Figura 35. Fenotipos de floración temprana en día corto. Se muestran los fenotipos de líneas *siDHS*, obtenidos con el tratamiento con dexametasona tras 20 días de crecimiento en cultivo *in vitro* en un medio MS con 1% sacarosa, en comparación con las líneas sin tratar y plantas silvestres (*Col-0*) de *A. thaliana*. Los paneles de la derecha con una perspectiva desde arriba, muestran las diferencias en cuanto a la longitud y la curvatura de los peciolo encontradas entre los tratamientos.

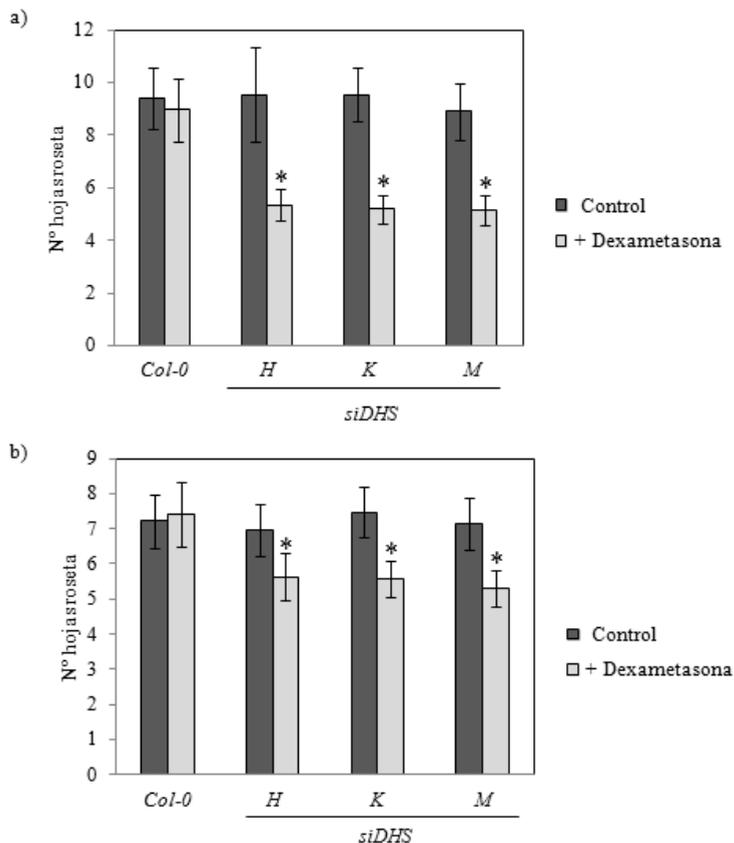


Figura 36. Recuento del número de hojas de la roseta en el momento de elongación del ápice floral. Plantas *siDHS* o silvestres (*Col-0*) se crecieron *in vitro* en un medio con 1% de sacarosa en condiciones de día corto (a) y de día largo (b), en presencia o ausencia de dexametasona. Las barras de error representan la desviación estándar de la media del recuento del número de hojas de la roseta de al menos 20 plantas de cada muestra. Los resultados fueron analizados mediante test ANOVA de una vía. Un asterisco indica diferencias significativas ($P < 0.05$) con respecto a su control sin tratar y las plantas silvestres crecidas tanto en presencia como en ausencia de dexametasona.

Ya que los resultados obtenidos sugerían que el adelanto de floración ocasionado al desactivar a DHS se debía a un incremento en la expresión de FT, se decidió confirmar la dependencia de los fenotipos de floración temprana observados en las líneas transgénicas *siDHS* de la actividad de FT. Esto se realizó transformando

plantas de *A. thaliana* mutantes insercionales por ADN-T en el gen *FT* (*ft-10*), cuya floración es tardía [173], con cepas de *A. tumefaciens* conteniendo la construcción de silenciamiento *siDHS* descrita anteriormente, para de esta manera comprobar si la desactivación parcial de la actividad del factor eIF5A era capaz de suprimir total o parcialmente el fenotipo de floración tardía presente en las plantas mutantes *ft-10* o, de lo contrario, averiguar si el anticipo en el momento de la floración fuera dependiente de la acción de FT. De la misma manera que se describe en la figura 24, se obtuvieron 3 líneas independientes homocigotas dobles para la inserción de ADN-T en el gen *FT* y para la construcción *siDHS*. En estas líneas, *ft-10 siDHS* 3,5 y 18, se analizó mediante RT-qPCR el nivel de silenciamiento del ARNm de *DHS* tras dos semanas de crecimiento *in vitro* en día largo, en presencia o en ausencia de dexametasona (Figura 37). Los resultados obtenidos demostraron una reducción del transcrito del 50% en las plantas tratadas con respecto a los controles sin dexametasona, de la misma manera que ocurrió en las líneas *siDHS* aplicando una concentración de dexametasona de 10 μ M desde el momento de la siembra (descrito anteriormente en la Figura 29b). Tras 3 semanas de crecimiento, las plantas silvestres utilizadas como control adicional ya habían elongado el ápice floral, mientras que los dobles mutantes *ft-10 siDHS* tanto en presencia como en ausencia de dexametasona todavía no lo habían hecho (Figura 38). Las plantas *ft-10 siDHS* fueron incapaces de florecer en las condiciones de crecimiento *in vitro* utilizadas.

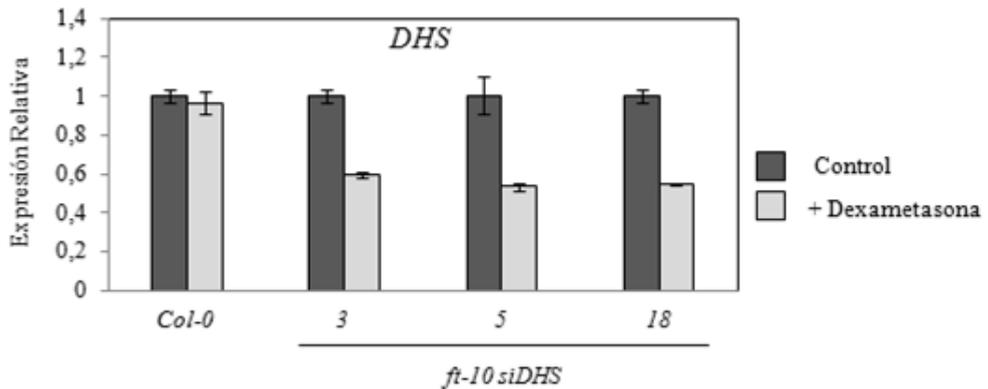


Figura 37. Nivel de silenciamiento del ARNm de *DHS* analizado mediante RT-qPCR, en las líneas doble mutantes *ft-10 siDHS* 3, 5 y 18, tratadas o sin tratar (control) con dexametasona. Los valores de expresión relativa se refirieron de manera independiente con respecto a su control sin dexametasona. Las barras de error representan la desviación estándar procedente de 3 réplicas técnicas.

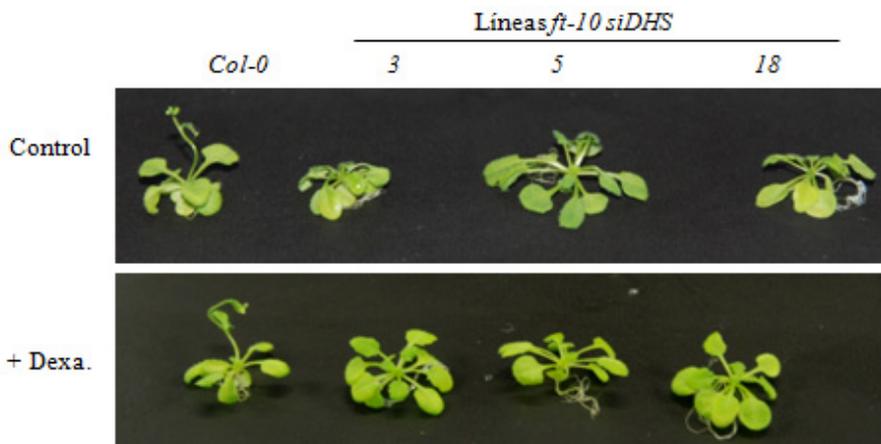


Figura 38. Fenotipos de floración tardía en las líneas *ft-10 siDHS* tanto en presencia como en ausencia de dexametasona. Las plantas se cultivaron *in vitro* durante 3 semanas en día largo, y su crecimiento se comparó con el de plantas silvestres de *A. thaliana* (*Col-0*).

Los resultados obtenidos sugerían que el adelanto en la floración de las líneas *siDHS* tras la desactivación parcial del factor eIF5A dependería de la acción del florigeno FT, cuya desregulación transcripcional sería responsable de la inducción del proceso de transición floral en *A. thaliana*.

Hasta el momento, los experimentos realizados sugerían que el adelanto en la floración y que la desregulación de la expresión del gen *FT* en las líneas *siDHS* tras la desactivación parcial del factor eIF5A, no dependería del fotoperiodo, así como tampoco de una alteración en los niveles de transcrito de *FLC* o *CO*. Además de los factores que controlan la expresión de *FT* descritos anteriormente, también existen mecanismos epigenéticos que regulan la transcripción de este gen [160]. Entre estos mecanismos se ha identificado a la tri-metilación de la lisina 27 de la histona 3 (H3K27me3) y a la tri-metilación de la lisina 4 de la histona 3 (H3K4me3) como marcas epigenéticas que se correlacionan con una regulación transcripcional negativa y positiva respectivamente, siendo éstas clave en el papel sobre el control del tiempo de floración que ejerce *FT* [174-175]. Para el caso de la regulación epigenética de H3K4me3 situada en la zona proximal del promotor y que marca transcripción activa del gen *FT*, en *A. thaliana* existen enzimas histona desmetilasas de la familia *Jumonji* (Jmj) con un dominio conservado llamado JmjC [176-177], que son capaces de ocasionar su desmetilación y la consecuente represión transcripcional del gen *FT* [178]. Se comprobó que estas histonas desmetilasas, llamadas *AtJmj4* (*A. thaliana* *Jumonji* 4) y ELF6 (del inglés “*Early Flowering 6*”) eran portadoras (datos no mostrados) de la secuencia de nucleótidos consenso identificada en otros sistemas, a la cual el factor eIF5A sería capaz de unirse [47]. Además, otros estudios en *A. thaliana* con mutantes de *AtJmj4* y ELF6 [178-179], mostraron una alteración en el tiempo de floración y una desregulación de la expresión del gen *FT*, que correlacionaban con los datos tanto moleculares como fenotípicos observados hasta el momento en el laboratorio en las líneas transgénicas *siDHS*.

Para comprobar si la alteración de la actividad de las desmetilasas *AtJmj4* y ELF6 pudiera estar causando la desregulación transcripcional del gen *FT*, en las líneas *siDHS* tratadas con dexametasona a causa de la pérdida parcial de actividad del factor de traducción eIF5A, se decidió realizar estudios de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP, del inglés “*Chromatin Immunoprecipitation*”) en colaboración

con el laboratorio del Dr. José Jarillo en el Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas (CBGP, Madrid), para estudiar el estado de metilación de la H3K4 en la zona proximal del promotor del gen *FT*. Para ello, se crecieron *in vitro* plantas silvestres y mutantes *siDHS* durante 10 días en presencia o en ausencia de dexametasona en día largo, al cabo de los cuales se realizaron los análisis de CHIP utilizando un anticuerpo anti-H3K4me3. La cantidad de cromatina inmunoprecipitada fue determinada mediante qPCR (Figura 39). Para el análisis qPCR se utilizaron parejas de cebadores específicos para las regiones génicas de *FT*, “-80 pb”, “+60 pb” y “+ 160 pb”, siendo la región “-80 pb” la que se conoce que posee una marca H3K4me3 [178]. Este análisis no reveló ninguna diferencia significativa en cuanto al grado de metilación de la H3K4 entre las distintas muestras analizadas, sugiriendo que la actividad de *AtJmj4* y *ELF6* en las plantas mutantes *siDHS* tras la supresión parcial del transcrito de *DHS* no parece estar afectada.

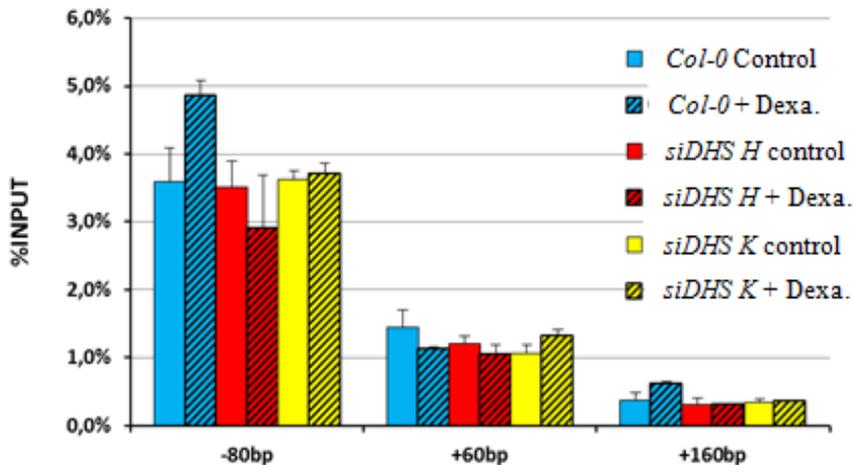


Figura 39. Análisis qPCR de la cromatina inmunoprecipitada en los ensayos de CHIP (anti-H3K4me3) sobre plantas silvestres (*Col-0*) y líneas *siDHS H* y *K*, tratadas o sin tratar (control) con dexametasona durante 10 días de crecimiento *in vitro*. En los análisis de qPCR se utilizaron pares de cebadores para amplificar las regiones del gen *FT* “-80 pb”, “+60 pb” y “+ 160 pb”, siendo la de “-80 pb” la región del promotor donde se conoce que existe una marca H3K4me3. Las barras de error representan la desviación estándar procedente de la repetición de 2 experimentos de CHIP.

2.2.2. Implicación del factor eIF5A en el desarrollo de la arquitectura del tallo.

Una vez se inicia la transición floral, el meristemo apical del tallo se elonga y se desarrolla formando los primordios que darán lugar a las hojas caulinares, flores y órganos florales, siendo necesaria la generación de tejidos estructurales y de sostén que mantengan la arquitectura de la planta y, además, de sistemas vasculares que transporten agua y nutrientes, entre otros compuestos, a todos los órganos de la planta [168, 180]. Con el objetivo de detectar posibles alteraciones durante el desarrollo de la arquitectura del tallo de las líneas transgénicas *siDHS*, estas plantas se cultivaron *in vitro* hasta estadios de desarrollo más tardíos, tanto en presencia como en ausencia de dexametasona desde el momento de la siembra en condiciones de fotoperiodo de día largo. Al cabo de 3 semanas de crecimiento, se comenzaron a detectar diferencias en cuanto al desarrollo del tallo en los mutantes *siDHS* tratados con dexametasona, con respecto a los controles sin tratar y plantas silvestres crecidas en las mismas condiciones. La aplicación de dexametasona en las líneas *siDHS* provocó la aparición de nuevos meristemos apicales secundarios que se ramificaban desde el meristemo de la roseta (del inglés fenotipo tipo “*bushy*”), y además los tallos que desarrollaban eran visiblemente de menor grosor que los controles sin tratar y plantas silvestres de *A. thaliana* (Figura 40).



Figura 40. El tratamiento con dexametasona en líneas *siDHS* provocó la aparición de un fenotipo tipo “bushy”, desarrollando nuevos meristemas apicales que crecían desde el meristemo de la roseta, además de tallos de menor grosor en comparación con los controles sin tratar y plantas silvestres (*Col-0*). Fotografías realizadas al cabo de 25 días de crecimiento.

Curiosamente, estudios anteriores [37, 181] en los que se trabajó con el mutante de *A. thaliana bud2*, que presenta la delección completa del gen *SAMDC4* implicado en la biosíntesis de PAs, también mostraron alteraciones en el desarrollo del tallo tipo “bushy”, de la misma manera que ha sucedido en las líneas *siDHS* tratadas con dexametasona. Además, los mutantes *bud2* mostraron una alteración en la homeostasis de citoquininas, presentando niveles endógenos incrementados de esta fitohormona [181]. El papel de las citoquininas como hormonas que promueven la ramificación del tallo, en la regulación combinatoria que ejerce junto a las auxinas sobre la dominancia apical, está firmemente establecido [182].

2.2.3. Implicación del factor eIF5A en el desarrollo del xilema.

Dentro del sistema vascular, el xilema es el encargado del transporte de agua, nutrientes y moléculas de señalización como las hormonas, a través de elementos traqueales conductores. Además, el sistema xilemático también presenta elementos no conductores, como el parénquima y las fibras, que sirven de soporte nutricional y mecánico para mantener la arquitectura de la planta [183]. Los elementos traqueales (TEs, del inglés “*Traqueary Elements*”) conductores en las plantas angiospermas (como por ejemplo *A. thaliana*) son típicamente vasos perforados en ambos extremos que se agrupan formando columnas o vasos huecos continuos [180]. Existen varios tipos celulares que se distinguen entre sí por su diferente grado de maduración o diferenciación, que viene determinado por procesos de muerte celular y de engrosamiento de su pared secundaria a causa de la deposición de lignina, produciendo diferentes tipos de ornamentación. De menor a mayor grado de maduración se distinguen células de tipo de ornamentación anular, espiral, reticular y punteado. De esta forma, los vasos del protoxilema se componen de células de tipo anular y espiral, y el metaxilema que madura más tardíamente, de células de tipo reticulado y punteado [184]. En la actualidad, se conoce que la muerte y el vaciado completo de los vasos del xilema son necesarios para el transporte [185], y que la muerte celular precede a la lignificación de los TEs *in*

vitro [186]. En estudios realizados con cultivos celulares de *Zinnia elegans* se ha demostrado que la lignificación es un proceso que ocurre después de la muerte celular programada de estas células. Además, estos estudios [187] indican que las células del parénquima que rodean a los TEs muertos podrían participar en el proceso de lignificación. Como se ha mencionado anteriormente en la introducción, la interacción en modo de inhibición recíproca entre auxinas y citoquininas cumple un papel fundamental en la formación y en la diferenciación del sistema vascular de las plantas [135-136, 180, 183], aunque los mecanismos moleculares que controlan dicha modulación hormonal no se han esclarecido totalmente hasta la fecha.

Se han descrito también en la introducción, varios trabajos que han implicado a las isoformas eIF5A1 y eIF5A2 en la formación del xilema [134, 140], y por este motivo se decidió analizar posibles alteraciones en el desarrollo del xilema en las líneas de desactivación condicional *siDHS*. De esta manera, se crecieron plantas silvestres y mutantes *siDHS* de *A. thaliana* en cultivo *in vitro* en presencia o en ausencia de dexametasona durante 2 meses en día largo, al cabo de los cuales se extrajo el hipocotilo de las plantas y se realizaron secciones y tinciones histoquímicas con floroglucinol-HCl, para visualizar los TEs en el microscopio (Figura 41). El tratamiento con dexametasona provocó la reducción del número de elementos xilemáticos, en comparación con los controles sin tratar y plantas silvestres crecidas en ambas condiciones. Estas observaciones concordaban con los estudios previos con mutantes antisentido constitutivos de eIF5A1 en *A. thaliana* que presentaban una formación del xilema muy limitada [140].

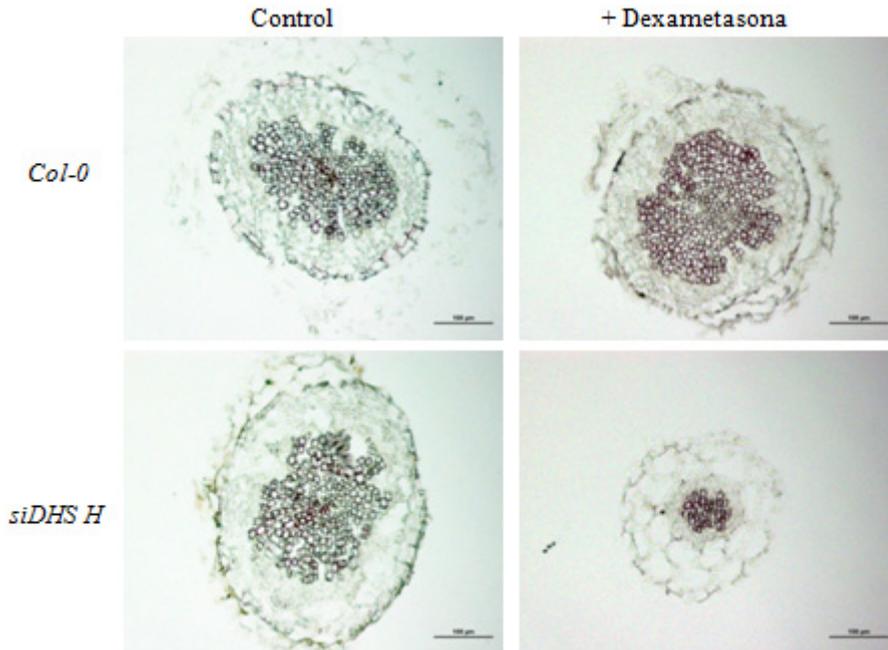


Figura 41. Tinción histoquímica de los elementos traqueales del xilema con floroglucinol-HCl, en secciones de hipocotilo de las líneas *siDHS K* y plantas silvestres (*Col-0*) de *A. thaliana* crecidas durante 2 meses en presencia o en ausencia (control) de dexametasona. Barra de escala 100 µm.

Además, para estudiar el estado de maduración de las células de los elementos traqueales del xilema en las líneas *siDHS* en comparación con plantas silvestres de *A. thaliana*, se decidió observar el tipo de ornamentación de la pared secundaria de las células, mediante la tinción con el fluorocromo blanco de calcoflúor, también de muestras de hipocotilo de estas plantas crecidas *in vitro* durante 2 meses en presencia o en ausencia de dexametasona, y realizar el recuento del número de tipos celulares según dicha ornamentación (anulares y espirales encontradas en protoxilema, y reticulares y punteadas en metaxilema [184]). Como se puede observar en la figura 42, la aplicación de dexametasona en las líneas *siDHS*, además de causar la reducción de los elementos traqueales como se ha descrito anteriormente, provocó un incremento en la proporción de células punteadas, lo

que significaba que prácticamente la totalidad de éstas maduraba completamente formando vasos del metaxilema.

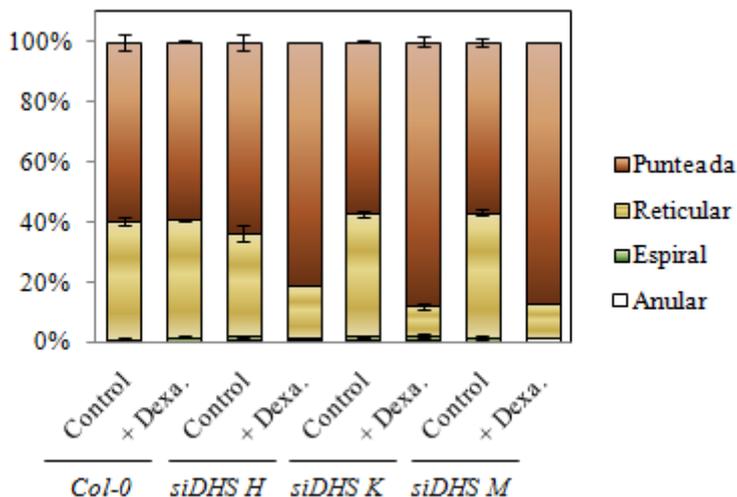


Figura 42. Recuento del tipo de células en función de la deposición de lignina en la pared secundaria (anulares, espirales, reticulares y punteadas) encontradas en los hipocotilos de las líneas *siDHS* tratadas o sin tratar (control) con dexametasona, en comparación con plantas silvestres (*Col-0*) crecidas en ambas condiciones. Las barras de error representan la desviación estándar procedente del recuento del tipo celular de 3 hipocotilos, de los que se analizaron al menos 100 células.

Como se ha introducido previamente, la PA termoespermina también ha sido implicada en el proceso de maduración y diferenciación del xilema [21-22]. Los mutantes enanos *acl5*, deficientes en la síntesis de termoespermina, presentan un engrosamiento defectuoso de la pared secundaria de los elementos traqueales, una hiperproliferación de las células del protoxilema y una maduración incorrecta del metaxilema. Además, se ha postulado que la termoespermina tendría una acción opuesta a la de las auxinas, y esta neutralización podría regular el patrón espacio-temporal de la diferenciación del xilema en plantas [188].

Dado que tanto la termoespermina como el factor eIF5A, cuya actividad depende de la PA espermidina, han sido implicados en la regulación del desarrollo del xilema, y que la pérdida de función de cada uno de ellos ocasiona fenotipos aparentemente opuestos, provocando un aumento y una reducción de la vasculatura xilemática respectivamente, se decidió estudiar la interacción genética entre ambos, a través de la generación del doble mutante *acl5 siDHS*, para descubrir posibles interacciones genéticas entre ambas durante el proceso de desarrollo del xilema. Para ello, se transformaron plantas de *A. thaliana* mutantes homocigotas *acl5-1* [189-190] con cepas de *A. tumefaciens* conteniendo la construcción de silenciamiento *siDHS*, y como se describe en la figura 24, se obtuvieron 3 líneas independientes homocigotas dobles mutantes *acl5-1 siDHS A, E y G*. Tras crecer estas plantas durante 7 días en cultivo *in vitro* en medio MS seguidos de 3 días en medio MS, con o sin dexametasona, se analizó el nivel de silenciamiento del ARNm de *DHS* mediante RT-qPCR, obteniendo una reducción significativa de los niveles de transcrito en las plantas tratadas con dexametasona (Figura 43).

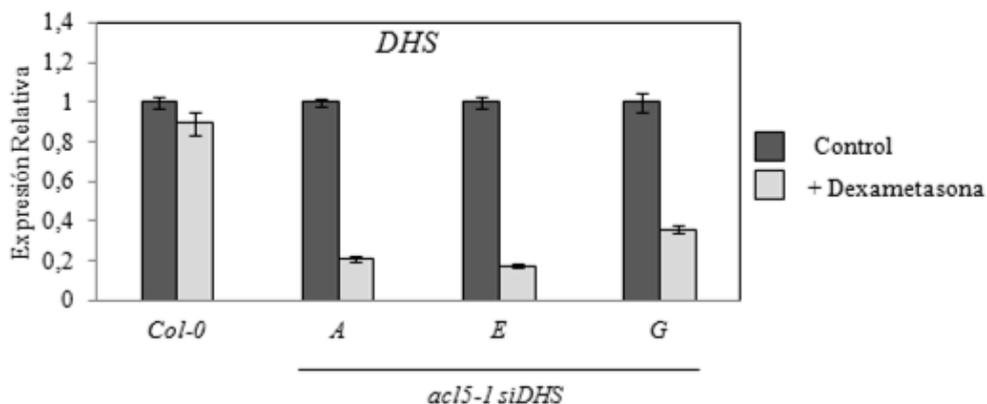


Figura 43. Nivel de silenciamiento del ARNm de *DHS* analizado mediante RT-qPCR, en las líneas doble mutantes *acl5-1 siDHS A, E y G*, tratadas o sin tratar (control) con dexametasona. Los valores de expresión relativa se refirieron de manera independiente con respecto a su control sin dexametasona. Las barras de error representan la desviación estándar procedente de 3 réplicas técnicas.

Para empezar a analizar si la disminución de la actividad de eIF5A era capaz de complementar las alteraciones en el desarrollo xilemático observadas en mutantes *acl5* [22] o viceversa, nuevamente se decidió realizar un estudio comparativo de los elementos traqueales, mediante tinción histoquímica con floroglucinol-HCl en cortes de hipocotilo de plantas mutantes simples *acl5-1* y *siDHS*, y mutantes dobles *acl5-1 siDHS*, crecidas durante 2 meses en presencia o ausencia de dexametasona en día largo. Como muestra la figura 44, los mutantes dobles *acl5-1 siDHS* presentaron una hiperproliferación de los elementos traqueales, tanto en presencia como en ausencia de dexametasona, de manera equivalente a lo que sucedió con el mutante simple *acl5-1*, y a diferencia de las líneas *siDHS* que volvieron a presentar una reducción drástica de los vasos xilemáticos con la aplicación de dexametasona. Aparentemente, estos resultados apuntaban a que la reducción de la actividad del factor eIF5A no era capaz de revertir el fenotipo de hiperproliferación de los elementos traqueales de los mutantes *acl5-1*. Sin embargo, las observaciones de los elementos traqueales en secciones de hipocotilo del doble mutante *acl5-1 siDHS*, no descartaban posibles efectos de complementación en el estado de maduración de las células xilemáticas, teniendo en cuenta que mutantes *acl5* presentan un defecto en la maduración del metaxilema (pérdida de células de tipo punteado) y un incremento de los vasos protoxilemáticos (aparición de células predominantemente espirales) [22].

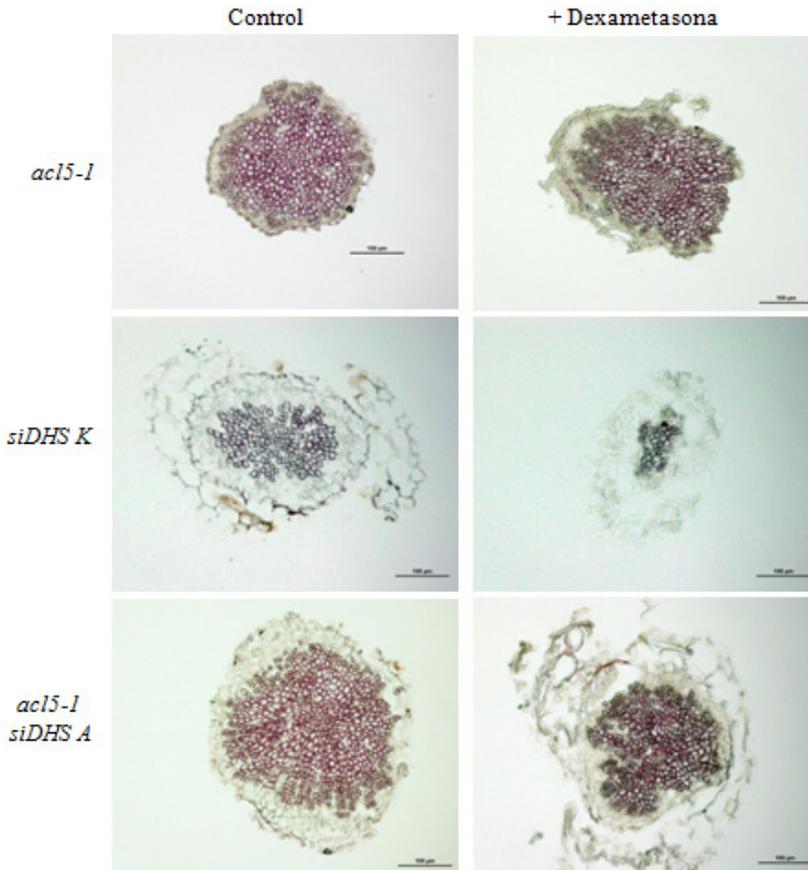


Figura 44. Tinción histoquímica de los elementos traqueales del xilema con floroglucinol-HCl, en secciones de hipocotilo de las líneas *acl5-1*, *siDHS K* y *acl5-1 siDHS A* crecidas durante 2 meses en presencia o en ausencia (control) de dexametasona. Barra de escala 100 μm .

Para estudiar el estado de maduración de las células de los elementos traqueales del xilema, en los dobles mutantes *acl5-1 siDHS* en comparación con los mutantes simples *acl5-1* y plantas silvestres de *A. thaliana*, se decidió estudiar la ornamentación de la pared secundaria de las células, mediante tinción con blanco de calcoflúor, de muestras de hipocotilo de estas plantas crecidas *in vitro* durante 2 meses en presencia o en ausencia de dexametasona, y realizar el recuento del número de tipos celulares. En los mutantes simples *acl5-1*, tanto en presencia como

en ausencia de dexametasona y como se ha descrito previamente en otros trabajos [22], se pudo observar una reducción de células punteadas y un incremento de células de tipo espiral, a causa de la incorrecta maduración del metaxilema y de la hiperproliferación del protoxilema. En los mutantes dobles *acl5-1 siDHS* el tratamiento con dexametasona dio lugar a una complementación parcial del fenotipo del mutante simple *acl5-1*, reduciendo el número de células con el tipo de ornamentación espiral y aumentando las de tipo punteado (Figura 45). Estos resultados indicaban que la supresión parcial de la actividad de eIF5A en los mutantes *acl5-1*, ocasionaba la restauración, aunque incompleta, de la proporción de los distintos tipos de vasos del xilema primario (metaxilema y protoxilema) encontrados en condiciones normales en plantas silvestres.

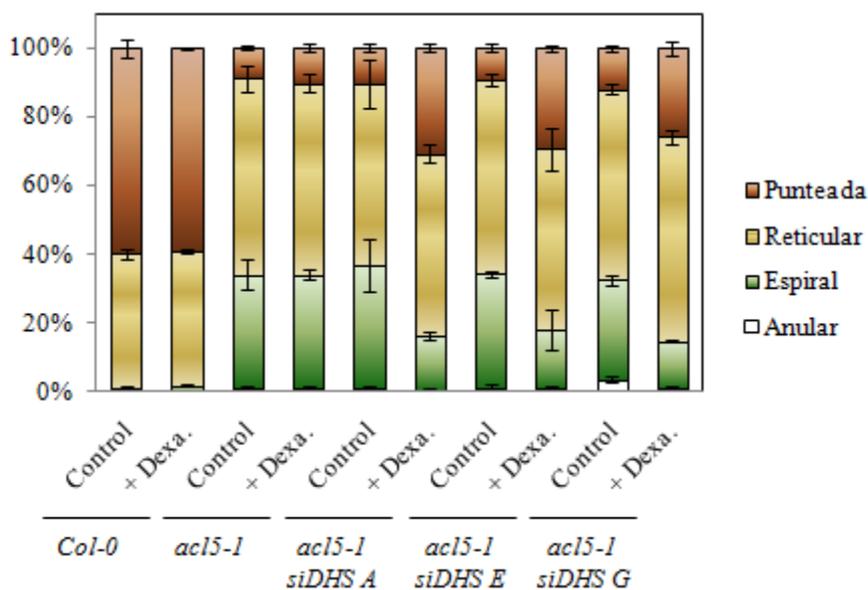


Figura 45. Recuento del tipo de células en función de la deposición de lignina en la pared secundaria (anulares, espirales, reticulares y punteadas) encontradas en los hipocótilos de los mutantes *acl5-1* y los mutantes dobles *acl5-1 siDHS* tratados o sin tratar (control) con dexametasona, en comparación con plantas silvestres (*Col-0*) crecidas en ambas condiciones. Las barras de error representan la desviación estándar procedente del recuento del tipo celular de 3 hipocótilos, de los que se analizaron al menos 100 células.

2.2.4. Implicación del factor eIF5A en el desarrollo de la raíz.

Con motivo de la búsqueda de alteraciones adicionales durante el desarrollo de *A. thaliana* en las plantas transgénicas de silenciamiento *siDHS*, se decidió crecer estas líneas mutantes en cultivo *in vitro* en posición vertical con un fotoperiodo de día largo en presencia o ausencia de dexametasona, para de este modo estudiar el desarrollo de la raíz en comparación al desarrollo de plantas silvestres en las mismas condiciones. Tras 12 días de crecimiento, más no antes, se pudo observar que la supresión parcial del transcrito de *DHS* por la aplicación de dexametasona, estaba causando una inhibición del crecimiento de la raíz en las líneas *siDHS*, a diferencia de lo que sucedía en los controles sin tratar, cuyo desarrollo de la raíz era equivalente al de plantas silvestres crecidas tanto en presencia como en ausencia de dexametasona (Figura 46).

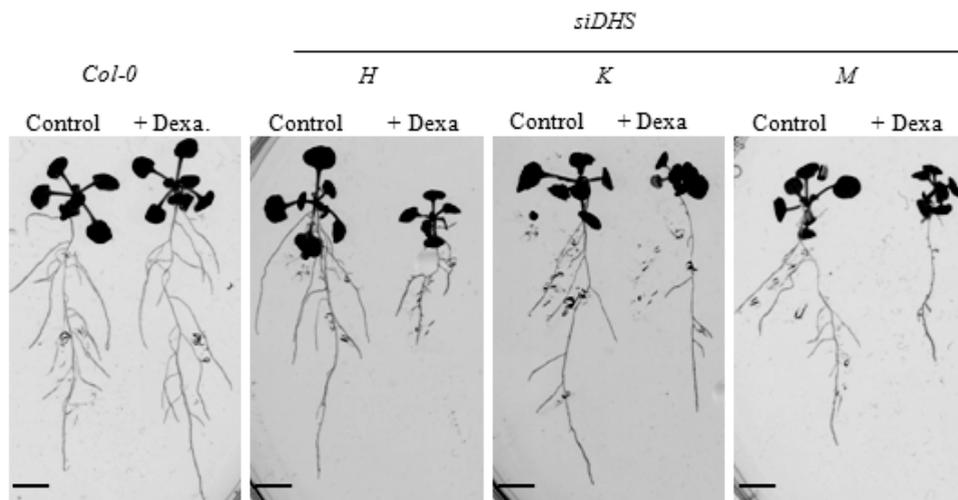


Figura 46. El tratamiento con dexametasona en las líneas de desactivación condicional, *siDHS*, provocó la inhibición del crecimiento de la raíz, a diferencia de los controles sin tratar y plantas silvestres (*Col-0*) crecidas en ambas condiciones, que presentaban un desarrollo de la raíz normal. Las fotografías fueron tomadas tras 2 semanas de crecimiento en cultivo *in vitro* en posición vertical. Barra de escala 0,5 cm.

Al observar en detalle en el microscopio lo que estaba sucediendo durante el desarrollo de la raíz, también se pudo detectar que el tratamiento con dexametasona en líneas *siDHS* provocaba defectos tanto en la morfología como en la disposición de los pelos radiculares, en comparación con los controles sin tratar y plantas silvestres. La aplicación de dexametasona en los mutantes *siDHS* provocó la acumulación de pelos radiculares muy cerca de la zona meristemática y de transición del ápice de la raíz, hecho que se pudo observar principalmente en raíces secundarias (Figura 47). Las zonas meristemática y de transición en el extremo radicular, son lugares que en condiciones normales no deberían presentar dicha disposición, y la presencia de estas alteraciones podría sugerir la existencia de defectos en algún componente indispensable para el control del desarrollo de la raíz, como lo son el citoesqueleto y el balance entre las distintas hormonas, discutido posteriormente [191-192].

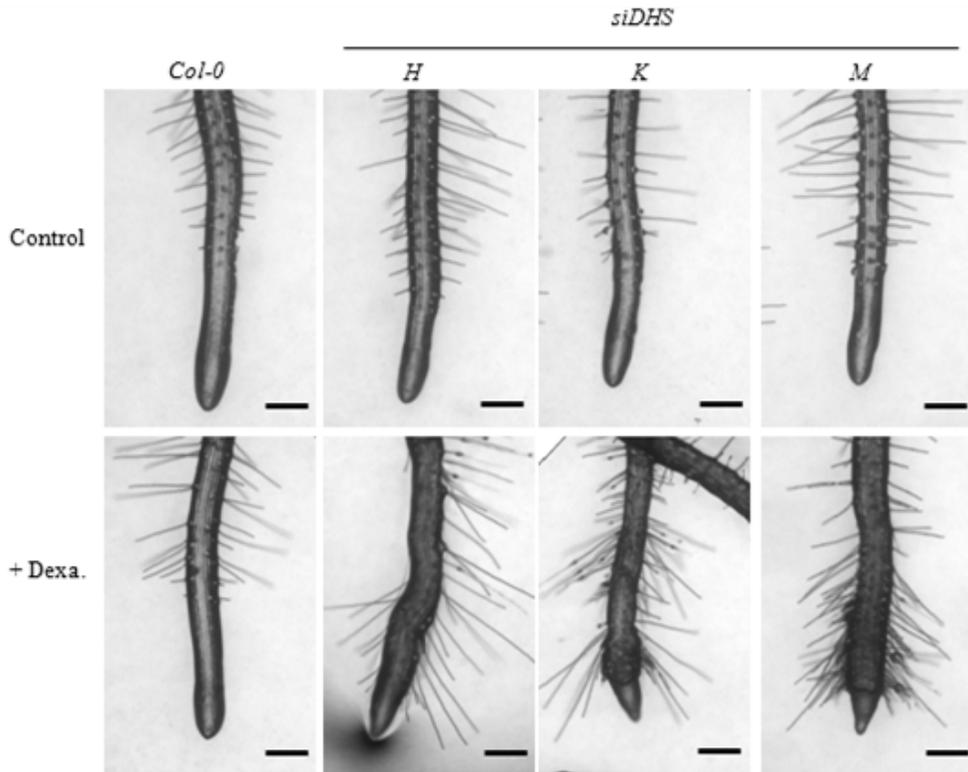


Figura 47. Alteraciones en la morfología y en la disposición de los pelos de la raíz en las líneas *siDHS* tratadas con dexametasona, en comparación con los controles sin tratar y plantas silvestres (*Col-0*). Las fotografías corresponden a raíces secundarias de plántulas de 2 semanas de edad. Barra de escala 200 μm .

2.3. Caracterización de las líneas *siDHS* en respuesta a diferentes estímulos externos, e interacción con otros procesos de señalización.

Como se ha descrito previamente en la introducción, los estudios realizados sobre las PAs y el factor eIF5A en plantas, han implicado a ambos en los procesos de respuesta a estrés y en ciertos mecanismos de señalización y acción hormonal [4, 130, 134, 141]. Por este motivo, se decidió caracterizar la respuesta de las líneas transgénicas *siDHS* a diferentes estímulos externos, y analizar la posible

participación de eIF5A en determinados procesos de señalización ambiental, nutricional y hormonal.

2.3.1. Implicación del factor eIF5A en la señalización por ABA.

La reciente demostración de que el ABA es capaz de inhibir de forma global la traducción de proteínas de *A. thaliana* [147], y los datos reflejados en el apartado 1.4. de esta tesis que muestran alteraciones en el patrón de hipusinación de eIF5A1 por ABA [158], estimuló la idea de estudiar el comportamiento de las líneas *siDHS* ante tratamientos exógenos de ABA. Para ello, estas plantas se crecieron *in vitro* en día largo, en presencia o en ausencia de dexametasona y con distintas cantidades de ABA. La sensibilidad de las plantas se determinó mediante el estudio de la capacidad de germinación determinada por el momento de protrusión de la radícula, y del establecimiento de plántula, valorando la aparición de hojas verdaderas bien desarrolladas. En los resultados obtenidos en el estudio del establecimiento de plántula con concentraciones crecientes de ABA que muestra la figura 48, se pudo observar que las plantas *siDHS K* tratadas con dexametasona mostraban un comportamiento hipersensible al ABA, ya que entre una concentración de 0,1 y 0,2 μM ABA menos de un 50% de las semillas germinadas pudieron establecer el estadio de plántula, hecho que se diferenciaba significativamente con respecto a los mutantes *siDHS K* sin tratar y plantas silvestres de *A. thaliana*. Las plantas *siDHS K* crecidas sin dexametasona, también mostraron un nivel de sensibilidad significativo a la fitohormona ABA en comparación con plantas silvestres, si bien a una concentración de ABA de 0,3 μM prácticamente la totalidad de las semillas *siDHS K* sembradas en presencia de dexametasona no pudieron establecer el estadio de plántula, mientras que a esa concentración de ABA, tanto estas líneas sin tratar como las plantas silvestres crecidas en ambas condiciones, lo hicieron con valores cercanos al 50% y 70% respectivamente (Figura 48 y 49).

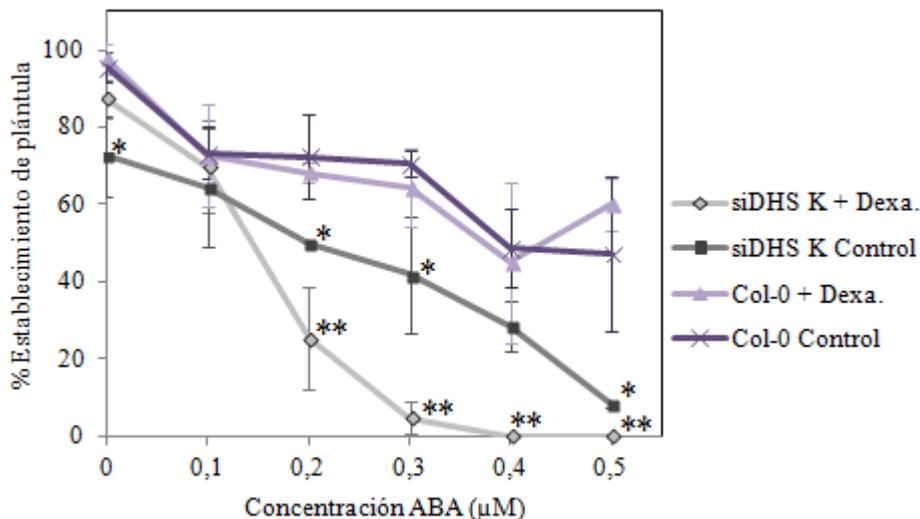


Figura 48. Análisis del porcentaje de establecimiento de plántula realizado en plantas silvestres (*Col-0*) y mutantes *siDHS K* crecidas *in vitro* con cantidades crecientes de ABA en presencia o en ausencia (control) de dexametasona. Las barras de error representan la desviación estándar procedente de 3 réplicas biológicas, de cada una de las cuales se sembraron al menos 20 semillas. Los datos obtenidos para cada una de las concentraciones de ABA estudiadas fueron analizados estadísticamente mediante test ANOVA de una vía. Un asterisco indica diferencias significativas ($P < 0.05$) para esa concentración de ABA concreta, con respecto a las plantas silvestres tanto tratadas como no tratadas con dexametasona. Dos asteriscos indican además, diferencias significativas ($P < 0.05$) entre las plantas *siDHS K* tratadas con dexametasona y sin tratar.

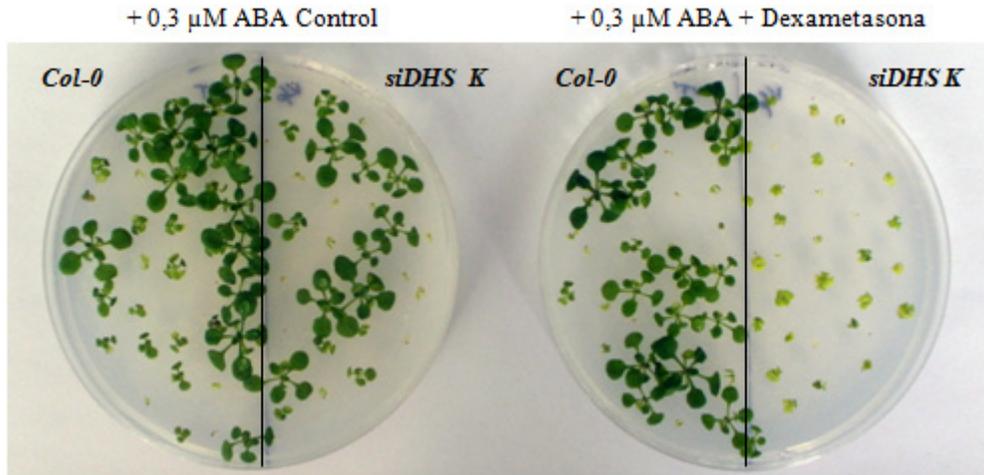


Figura 49. Hipersensibilidad a ABA de las líneas *siDHS K* tratadas con dexametasona, en comparación con los controles sin tratar y plantas silvestres (*Col-0*).

En la figura 50 se muestran los resultados de los experimentos sobre la capacidad de germinación a lo largo del tiempo, tanto en presencia como en ausencia de dexametasona, utilizando condiciones de crecimiento con o sin ABA 2 μM . Con la presencia de 2 μM ABA, la capacidad de germinación de las plantas *siDHS K* tratadas con dexametasona fue significativamente menor que sin dexametasona, y que la de las plantas silvestres crecidas en ambas condiciones. Las plantas *siDHS K* crecidas con 2 μM ABA en ausencia de dexametasona, también presentaban alteraciones significativas en la germinación en comparación con las plantas silvestres que se ponían de manifiesto a partir del día 9 de crecimiento. En condiciones de crecimiento sin ABA, no se detectaron diferencias significativas en cuanto a la germinación de las líneas *siDHS K* entre el control y el tratamiento con dexametasona. Curiosamente, tan solo en ausencia de dexametasona las líneas *siDHS K* presentaron diferencias significativas con respecto a las líneas silvestres, si bien el tratamiento con dexametasona no ocasionó ningún efecto significativo con respecto al control sin tratar en las líneas *siDHS K*.

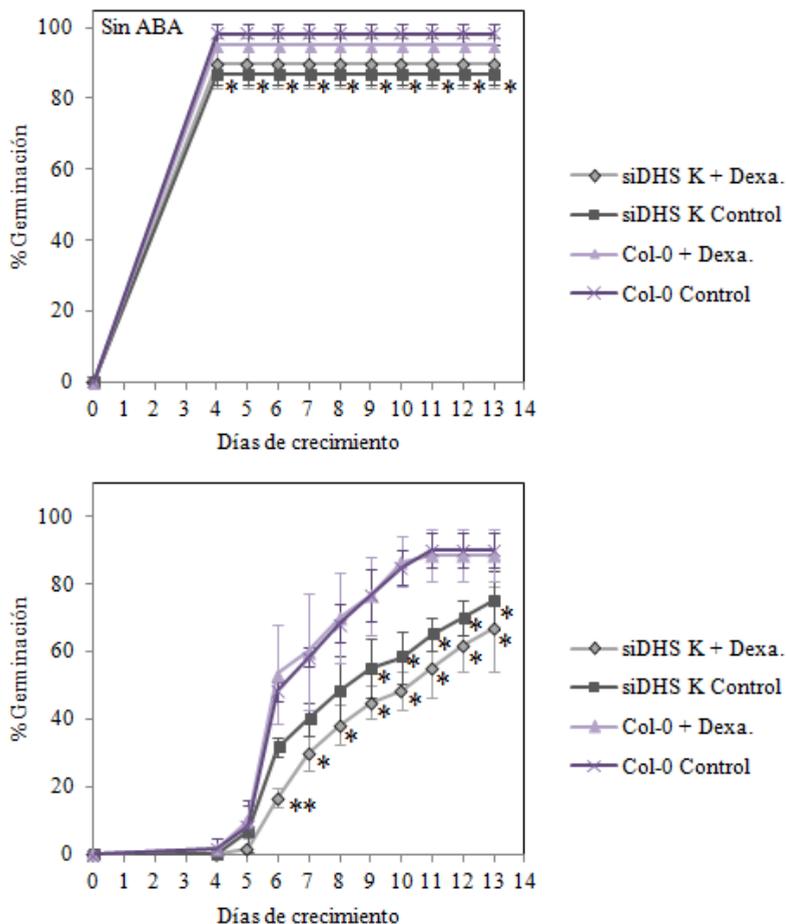


Figura 50. Análisis del porcentaje de germinación realizado en plántas silvestres (*Col-0*) y mutantes *siDHS K* crecidas *in vitro* con o sin ABA 2 μ M, y en presencia o en ausencia (control) de dexametasona. Las barras de error representan la desviación estándar procedente de 3 réplicas biológicas, de cada una de las cuales se sembraron al menos 100 semillas. Los datos obtenidos fueron analizados estadísticamente mediante test ANOVA de una vía. Un asterisco indica diferencias significativas ($P < 0.05$) para ese día de crecimiento concreto, con respecto a las plantas silvestres crecidas tanto en presencia como en ausencia de dexametasona. Dos asteriscos indican además, diferencias significativas ($P < 0.05$) entre las plantas *siDHS K* tratadas con dexametasona y sin tratar.

Los resultados de hipersensibilidad obtenidos en los estudios de establecimiento de plántula y capacidad de germinación, sugieren una posible interacción entre las rutas de hipusinación y de señalización por ABA, de acuerdo con los datos presentados en los resultados de este apartado.

2.3.2. Implicación del factor eIF5A en el control de los niveles de NO.

Como se ha mencionado en la introducción, estudios previos han demostrado que tanto la espermidina como la espermina inducen la biosíntesis de NO en plántulas de *A. thaliana* [19]. En células animales eIF5A participa en la regulación post-transcripcional de la iNOS [114]. Dado que la activación del factor eIF5A es dependiente de la espermidina, en colaboración con el Dr. José León del IBMCP, se procedió a estudiar la posible implicación de este factor en la biosíntesis de NO, a través de la observación de los niveles endógenos de este gas. Para ello, se utilizaron plántulas de 5 días de edad de líneas *siDHS* y plantas silvestres de *A. thaliana*, crecidas *in vitro* en presencia o en ausencia de dexametasona en día largo, y se continuó con la detección de los niveles de NO en raíces de estas plántulas mediante la utilización de la sonda fluorescente DAF-FM DA (4-amino-5-metilamino-2',7'-difluorofluoresceína diacetato) [193], y su observación en el microscopio de fluorescencia (Figura 51). Las líneas *siDHS* tratadas con dexametasona presentaron una disminución en los niveles endógenos de NO, en comparación con las líneas no tratadas, hecho que no se pudo observar en plantas silvestres, cuyos niveles entre ambos tratamientos no presentaron diferencias. Estos resultados sugieren una implicación del factor eIF5A en la biosíntesis de NO.

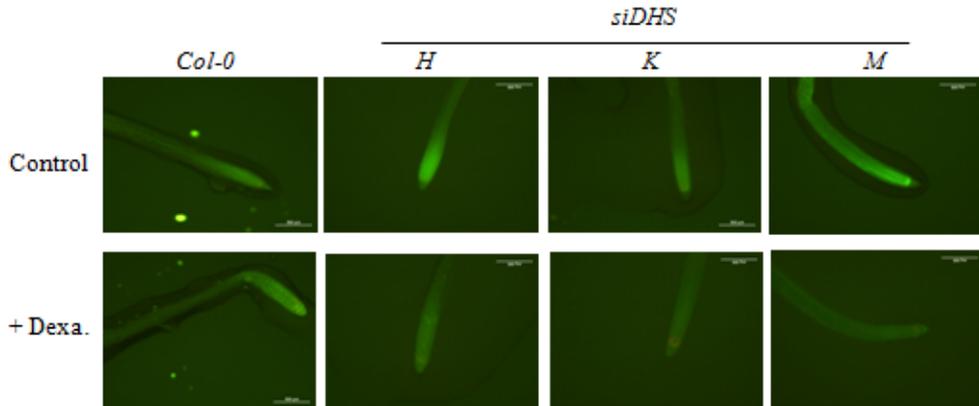


Figura 51. Detección de los niveles endógenos de NO en el microscopio de fluorescencia mediante la incubación con la sonda DAF-FM DA, en raíces de 5 días de edad de plántulas silvestres y de las líneas *siDHS*, tratadas o sin tratar (control) con dexametasona. Barra de escala 500 μ M.

2.3.3. Implicación del factor eIF5A en respuesta a factores externos.

En la actualidad se conoce que la aclimatación de las plantas a condiciones de estrés de origen abiótico está asociada a alteraciones traduccionales y cambios en el contenido global de proteínas [194-195]. Como queda reflejado en la bibliografía, muchas son las evidencias que implican a las PAs en los procesos de respuesta a estrés ambiental en plantas [4, 196-197] y además, en los últimos años se ha implicado concretamente al factor eIF5A de tomate y *A. thaliana* en estos procesos [124, 141]. Se decidió, por lo tanto, evaluar la respuesta de las plantas mutantes *siDHS* ante distintas situaciones de estrés, como las causadas por adición al medio de diferentes concentraciones de glucosa, y el estrés osmótico e iónico que provoca el crecimiento en presencia de sal (NaCl). Para someter a las plantas a condiciones de estrés salino, se crecieron *in vitro* tanto líneas silvestres como *siDHS* en presencia o en ausencia de dexametasona, en medio MS con una concentración de 50 mM NaCl desde el momento de la siembra. Por otro lado, para evaluar el efecto

de la adición de glucosa al medio de crecimiento, se sembraron plantas mutantes *siDHS* y plantas silvestres en un medio MS con o sin dexametasona, donde crecieron *in vitro* durante 5 días. Posteriormente se trasplantaron a un medio MS nuevo, con o sin dexametasona, al que se le había añadido una concentración de 200 mM de glucosa, donde se dejaron crecer durante 7 días más. Como se ha descrito con anterioridad en la figura 46, en las líneas *siDHS* la supresión parcial de *DHS* a causa de la adición de dexametasona ya causaba un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de la raíz. Para poder comparar este hecho con el estudio del efecto de la adición de 50 mM NaCl o 200 mM glucosa durante el desarrollo de los mutantes, se crecieron al mismo tiempo plantas *siDHS* en un medio en presencia o ausencia de dexametasona, sin glucosa ni NaCl en el medio de crecimiento.

Tras 12 días de crecimiento en día largo, se pudo observar un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de la raíz en las líneas *siDHS* tratadas con dexametasona en condiciones de estrés por sal, en comparación con los mutantes sin tratar, cuyo fenotipo de raíz a este tiempo de crecimiento con una concentración de 50 mM de NaCl fue equivalente al de las plantas silvestres. También, la adición de una concentración 200 mM de glucosa en el medio de crecimiento, causó hipersensibilidad de la raíz de las plantas mutantes *siDHS* tratadas con dexametasona. El desarrollo de la raíz de las líneas *siDHS* crecidas en ausencia de dexametasona en condiciones de estrés por glucosa fue nuevamente equivalente al de las plantas silvestres. Si bien el efecto inhibitorio sobre el crecimiento de la raíz también se pudo observar con el tratamiento individual con dexametasona en las líneas *siDHS*, la adición de 50 mM de NaCl o 200 mM de glucosa en el medio de crecimiento, provocó el agravamiento de los fenotipos de desarrollo de la raíz. Estos resultados sugerían que la supresión parcial de la actividad de eIF5A en las líneas *siDHS*, era causante de una menor tolerancia a condiciones de estrés osmótico e iónico y a la presencia de concentraciones elevadas de glucosa (Figura 52).

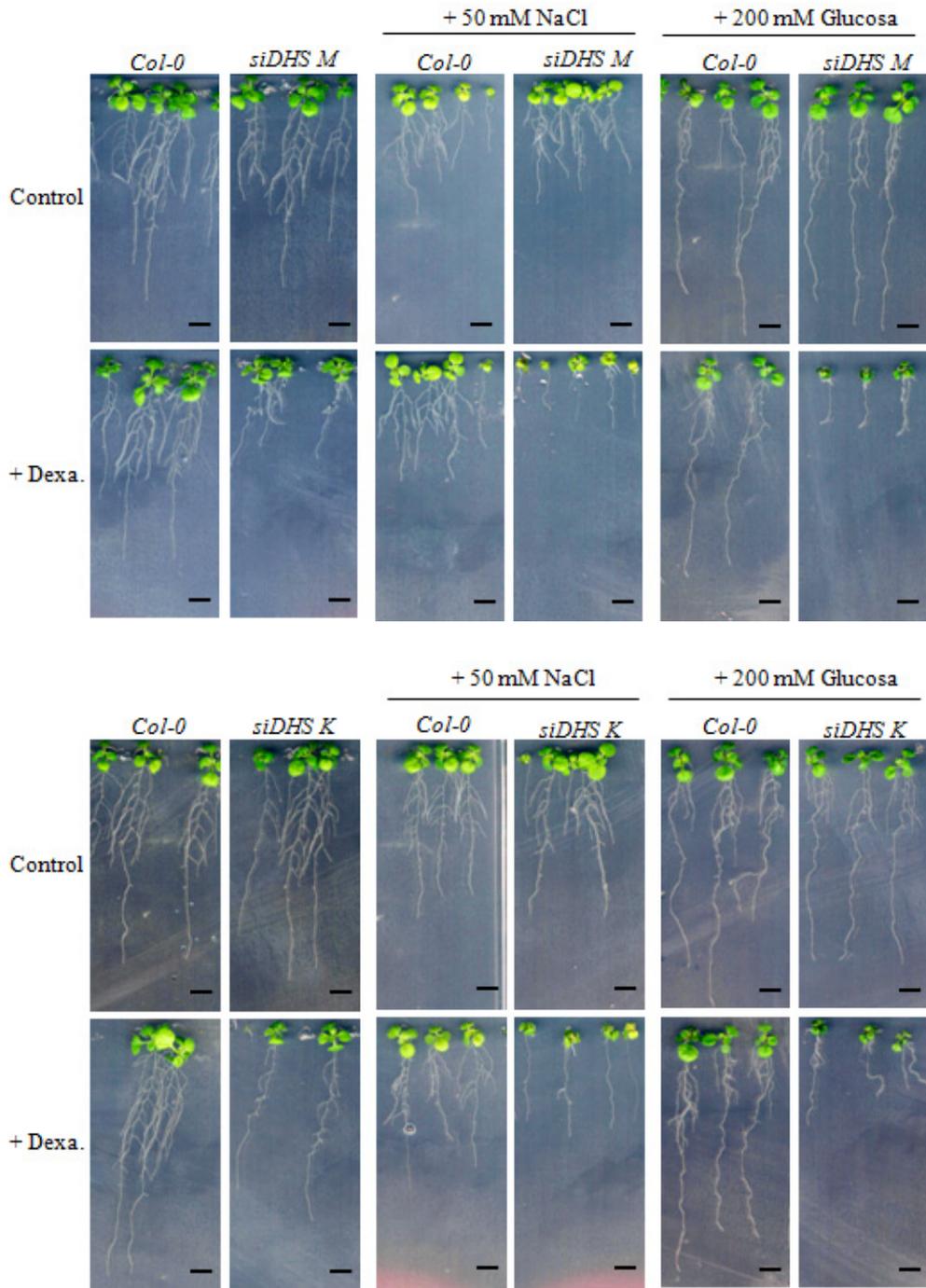


Figura 52. Continúa en la página siguiente.

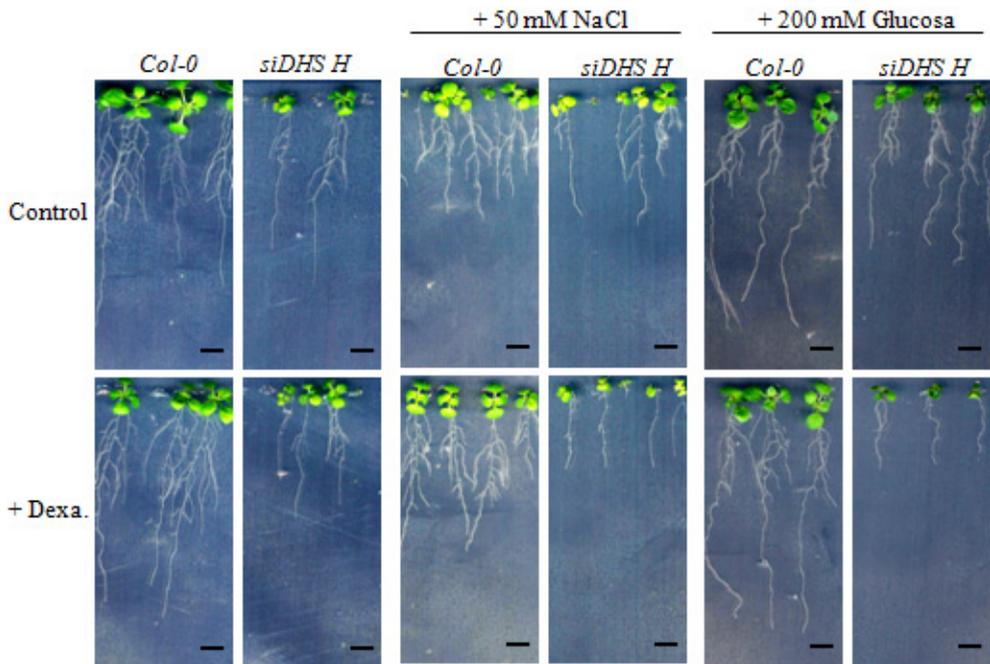


Figura 52. Efecto de la adición de 50 mM de NaCl o 200 mM glucosa en el medio, sobre el crecimiento de las líneas *siDHS* y plantas silvestres (*Col-0*) tratadas o sin tratar con dexametasona. Fotografías realizadas sobre plántulas de 12 días de edad. Barra de escala 0.5 cm.

3. Dianas moleculares de eIF5A.

3.1. Estudio bioinformático de las proteínas con 3 o más prolinas sucesivas en eucariotas.

En la introducción de esta tesis doctoral se ha descrito el hecho de que tanto el factor EF-P en eubacterias como eIF5A en eucariotas, cumplen una función especializada en la traducción de proteínas con 3 o más prolinas sucesivas en su secuencia peptídica [73-74, 94]. Estos datos daban pie a la búsqueda de los primeros ARNm diana que necesitarían la acción especializada de eIF5A para traducirse, al codificar secuencias con prolinas sucesivas [142]. Inicialmente, se realizó la búsqueda en las bases de datos de proteínas con 3 o más prolinas sucesivas. Este estudio se realizó mediante la herramienta bioinformática PatMatch (del inglés “*Pattern Matching*”), para los organismos eucariotas *S. cerevisiae* en la base de datos SGD (del inglés “*Saccharomyces Genome Database*”; www.yeastgenome.org), *H. sapiens* utilizando la fuente bioinformática PIR (del inglés “*Protein Informatic Resource*”; www.pir.georgetown.edu) que rastrea en la base de datos UniProtKB (www.uniprot.org), y *A. thaliana* mediante la base de datos del TAIR (del inglés “*The Arabidopsis Informatic Resource*”; www.arabidopsis.org). En los resultados de esta búsqueda (Figura 53), se pudo observar que en *S. cerevisiae* existen 549 secuencias anotadas (9,3% del total de anotaciones) con al menos 3 prolinas sucesivas, mientras que *H. sapiens* y *A. thaliana* presentan 22191 (14,2% del total) y 4661 (13,2% del total) respectivamente. Hay que tener en cuenta que en las bases de datos de *H. sapiens* existe mucha redundancia y posiblemente estos valores no reflejan con exactitud el número de proteínas únicas implicadas, estando posiblemente sobre-cuantificado. Al aumentar a 5 el número de prolinas sucesivas, se comprobó que el número de secuencias anotadas en las bases de datos en *S. cerevisiae* es de 41 (0,7%), en *H. sapiens* 2811 (1,8%) y para el caso de *A. thaliana* 628 (1,8%). Además, en *S. cerevisiae* y *A. thaliana* existen 2 y 36 proteínas respectivamente, con al menos 10

prolinas sucesivas, mientras que en *H. sapiens* el número de secuencias anotadas con este número de prolinas, todavía resultó en 262.

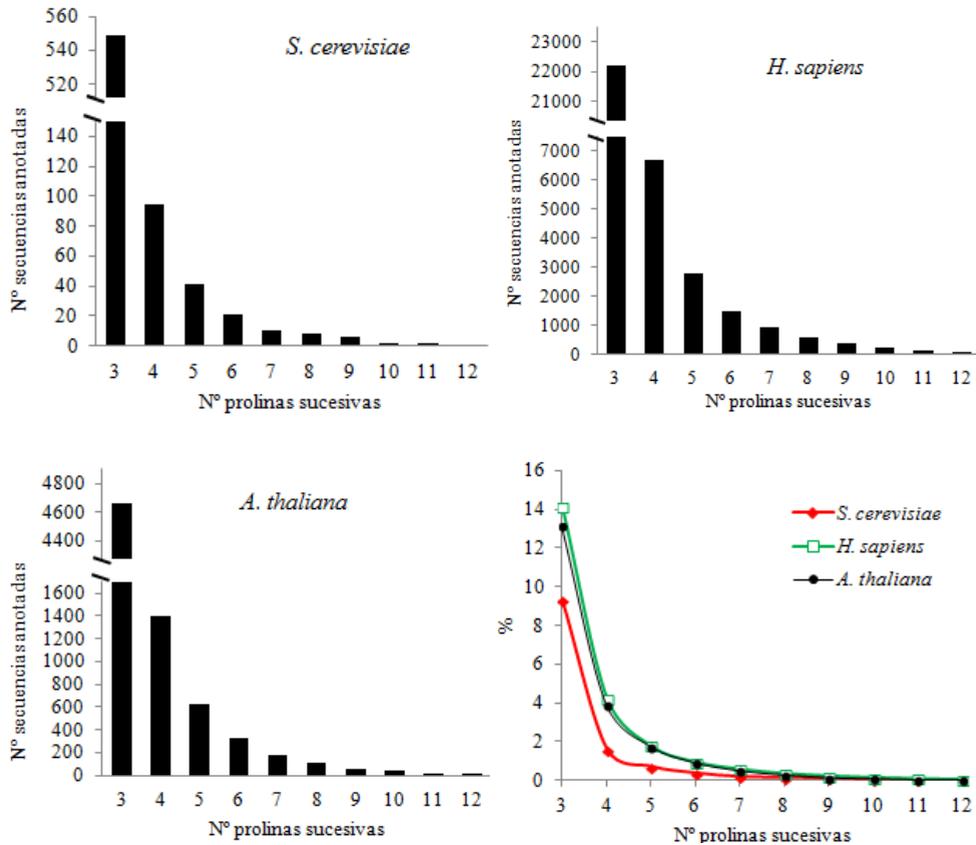


Figura 53. Estudio del número de secuencias de proteínas anotadas en las bases de datos, con 3 o más prolinas sucesivas. Para *S. cerevisiae* se utilizó la base de datos SGD, en el caso de *H. sapiens* se empleó la fuente bioinformática PIR que rastrea en la base de datos UniProtKB, y para *A. thaliana* se utilizó la base de datos del TAIR.

Posteriormente al estudio del número y el porcentaje de secuencias de proteínas anotadas en las bases de datos con prolinas sucesivas, se continuó con el análisis de ontología de estas secuencias, para de esta manera, averiguar si alguna categoría funcional molecular determinada se encontraba enriquecida con la presencia de estos motivos peptídicos. Se decidió investigar dicho enriquecimiento para el caso de secuencias con al menos 5 prolinas en su secuencia primaria para *S. cerevisiae* y

A. thaliana, y de 8 prolinas en el caso de *H. sapiens*. El análisis de ontología se realizó mediante la fuente bioinformática AmigoGO versión 1.8 (http://amigo1.geneontology.org/cgi-bin/amigo/term_enrichment) (Tablas 2, 3 y 4).

Los resultados obtenidos mostraron un enriquecimiento significativo de secuencias con prolinas sucesivas en varias categorías de funciones moleculares. Se observó que estas proteínas principalmente cumplían una función molecular de unión a otros compuestos como proteínas, iones y ácido nucleicos. Entre estas proteínas se encontraron con una alta probabilidad proteínas de unión a componentes del citoesqueleto, concretamente de actina. Este hecho se pudo observar en las 3 especies para las que se realizó el estudio de ontología, sugiriendo una conservación del enriquecimiento de secuencias con prolinas sucesivas, en proteínas que estarían involucradas en la organización del citoesqueleto de actina, y que podrían necesitar la acción especializada de eIF5A para traducirse.

<i>S. cerevisiae</i>			
Función molecular	Frecuencia de proteínas con al menos 5 prolinas sucesivas	Frecuencia en el proteoma	p-value
Unión a actina (GO:0003779)	19.5%	0.7%	2.78e-07
Unión a proteína de citoesqueleto (GO:0008092)	19.5%	1.4%	8.10e-05
Unión a proteína (GO:0005515)	41.5%	11.3%	7.90e-04

Tabla 2. Análisis de ontología en *S. cerevisiae* de las secuencias con al menos 5 prolinas sucesivas.

<i>A. thaliana</i>			
Función molecular	Frecuencia de proteínas con al menos 5 prolinas sucesivas	Frecuencia en el proteoma	p-value
Unión a actina (GO:0003779)	3.7%	0.2%	2.53e-16
Componente estructural de la pared celular (GO:0005199)	2.5%	0.1%	7.95e-16
Unión (GO:0005488)	37.2%	21.7%	4.40e-12
Unión a proteína de citoesqueleto (GO:0008092)	3.7%	0.4%	2.05e-10

Tabla 3. Análisis de ontología en *A. thaliana* de las secuencias con al menos 5 prolinas sucesivas.

<i>H. sapiens</i>			
Función molecular	Frecuencia de proteínas con al menos 8 prolinas sucesivas	Frecuencia en el proteoma	p-value
Unión (GO:0005488)	82.1%	35.1%	2.32e-48
Unión a actina (GO:0003779)	17.1%	0.9%	4.61e-36
Unión a proteína (GO:0005515)	48.0%	14.8%	1.92e-31
Unión a proteína de citoesqueleto (GO:0008092)	18.3%	1.9%	9.96e-27
Unión a ácido nucleico (GO:0003676)	37.0%	10.2%	1.28e-25
Unión a compuesto heterocíclico (GO:1901363)	42.3%	17.3%	1.40e-16
Unión a compuesto cíclico orgánico (GO:0097159)	42.3%	17.5%	2.85e-16
Unión a ión metálico (GO:0046872)	31.7%	10.8%	2.29e-15
Unión a GTPasa Rho (GO:0017048)	5.7%	0.1%	2.43e-15
Unión a ARN poli(A) (GO:0044822)	8.9%	0.6%	4.96e-15
Unión a catión (GO:0043169)	31.7%	11.0%	5.27e-15
Unión a ADN (GO:0003677)	20.7%	5.5%	9.02e-13
Unión a ARN (GO:0003723)	13.4%	2.5%	1.93e-11
Unión a GTPasa Ras (GO:0017016)	6.1%	0.4%	1.50e-10
Unión a ión (GO:0043167)	37.8%	17.7%	1.94e-10
Unión a GTPasa pequeña (GO:0031267)	6.1%	0.4%	3.35e-10
Unión a zinc (GO:0008270)	15.4%	3.7%	4.51e-10
Unión a GTPasa (GO:0051020)	6.1%	0.4%	6.94e-10

Tabla 4. Análisis de ontología en *H. sapiens* de las secuencias con al menos 8 prolinas sucesivas.

3.2. Estudio de los ARNm diana del factor eIF5A, implicados en la organización del citoesqueleto.

Los resultados del análisis bioinformático de las proteínas con prolinas sucesivas, revelaron una alta probabilidad de encontrar entre ellas, proteínas implicadas en la organización del citoesqueleto de actina. Dentro de las categorías funcionales implicadas en la organización del citoesqueleto de actina procedentes de los 3 organismos analizados, se encontraron proteínas ricas en prolinas como las forminas.

Las forminas son una familia de proteínas presentes en eucariotas que se caracterizan por el dominio conservado FH2 (del inglés “*Formin Homology-2*”),

cuya dimerización es responsable de la nucleación de los filamentos de actina a través de un mecanismo independiente del proceso de nucleación mediado por el complejo Arp2/3. Las forminas, además del dominio FH2, también presentan un dominio FH1 rico en prolinas, que es el necesario para la interacción con la proteína profilina, que a su vez es capaz de unirse a los monómeros de actina [198]. De esta manera, la interacción del dominio FH1 de la formina con la profilina unida a la actina monomérica globular (G-actina), permite reclutar los monómeros de actina al filamento (F-actina), y así facilita la polimerización del cable de actina. La mayor parte de los miembros de esta familia, se caracterizan por presentar además de los anteriores, un dominio FH3 responsable de la unión a GTPasa (GDB, del inglés “*GTPase Binding Domain*”), que interacciona con proteínas de la familia de GTPasas de tipo Rho y de manera GTP dependiente. Las forminas no solo cumplen un papel fundamental en la formación de los filamentos de actina durante el remodelado de la arquitectura celular, sino que también son esenciales para los procesos de división celular, migración, adhesión y tráfico intracelular [199].

3.2.1. Estudio de la implicación del factor eIF5A en el control de la organización del citoesqueleto en *A. thaliana*.

En plantas, los microtúbulos y los filamentos de actina cumplen un papel fundamental para el crecimiento polarizado que ocurre durante la morfogénesis celular, y este hecho, ha sido estudiado gracias a la utilización de drogas despolimerizantes principalmente en las células de la epidermis de las hojas, en los hipocotilos, durante el desarrollo del tubo polínico y tricomas, así como en el transcurso del crecimiento de la raíz y la formación de los pelos radiculares, siendo todos ellos tipos celulares modelo para el estudio de las funciones del citoesqueleto durante el crecimiento celular [200-202]. Los microtúbulos, son importantes para el establecimiento y el mantenimiento de la dirección del crecimiento [203], mientras que se ha comprobado que los filamentos de actina son indispensables para el

transporte vesicular de compuestos necesarios para el crecimiento, y la liberación de este material de construcción de la pared celular en las zonas específicas de crecimiento [204]. El tratamiento con la toxina latrunculina B que causa la despolimerización del citoesqueleto de actina, ha demostrado que estos filamentos son necesarios para la correcta expansión celular. El tratamiento con esta droga provoca que las células de la epidermis, raíz e hipocotilos permanezcan sin expandir [200, 205]. Otros estudios genéticos y farmacológicos, han demostrado la importancia del citoesqueleto de actina para el correcto establecimiento de la longitud y morfología de los pelos de la raíz [206].

En los listados de las proteínas ricas en prolinas y que cumplen un papel fundamental en el control de la organización del citoesqueleto de actina, se encontraron miembros de la familia de las forminas de *A. thaliana*. En plantas se han identificado por lo menos 21 isoformas de forminas y todas ellas se caracterizan por presentar los dominios FH1 y FH2. Sin embargo, a diferencia de sus homólogos de levadura y metazoos, ninguna de las forminas de plantas presenta un dominio GBD [207]. Las forminas de *A. thaliana* están separadas en 2 subfamilias filogenéticas. La clase I se caracteriza por la presencia de un péptido señal putativo y un dominio N-terminal que probablemente dirige a estas forminas a la membrana plasmática a través de la vía secretora. Las forminas de la clase II son citoplasmáticas y tienen una naturaleza bioquímica variable [199, 208]. Se desconoce la razón de la existencia de un número tan alto de isoformas de forminas en plantas. Además, la diversidad bioquímica de esta familia dificulta el establecimiento de un mecanismo de acción consensuado. Las forminas de *A. thaliana*, muestran patrones de expresión solapantes y una gran redundancia funcional, por lo que hasta la fecha se han podido establecer unas pocas funciones biológicas concretas para cada una de las isoformas de esta familia de proteínas en plantas [207-208]. Por ejemplo, se ha demostrado la implicación de las forminas de clase I, AFH1y AFH8, en el crecimiento polarizado del tubo polínico y de los pelos de la raíz, respectivamente [209-210].

Para comenzar a investigar la implicación del factor eIF5A en el control de la organización del citoesqueleto de actina en *A. thaliana*, se decidió establecer una colaboración con el laboratorio del Dr. Jaideep Mathur de la Universidad de Guelph en Canadá. El objetivo inicial fue estudiar posibles alteraciones en cuanto a la morfología de las células de las plantas transgénicas *siDHS*, que podrían originarse a consecuencia de defectos en la organización del citoesqueleto de actina. Ya que las líneas *siDHS* tratadas con dexametasona sufrían la inhibición del crecimiento de la raíz acompañado de un fenotipo de acumulación de pelos radiculares cerca del extremo radicular, como se ha descrito anteriormente en las figuras 46 y 47, se decidió estudiar con detalle la morfología de las células del extremo y de los pelos de la raíz. Para ello, se crecieron plantas *siDHS in vitro* en condiciones de día largo en presencia o ausencia de dexametasona, y se visualizó mediante la lupa la aparición de pelos radiculares con un desarrollo alterado, como podrían ser la aparición de pelos ramificados y una longitud anormal. Desde estadios muy tempranos del desarrollo, se pudo observar la aparición de pelos radiculares ramificados en los mutantes *siDHS* tratados con dexametasona, fenotipo no detectable en los controles sin tratar y plantas silvestres (Figura 54).

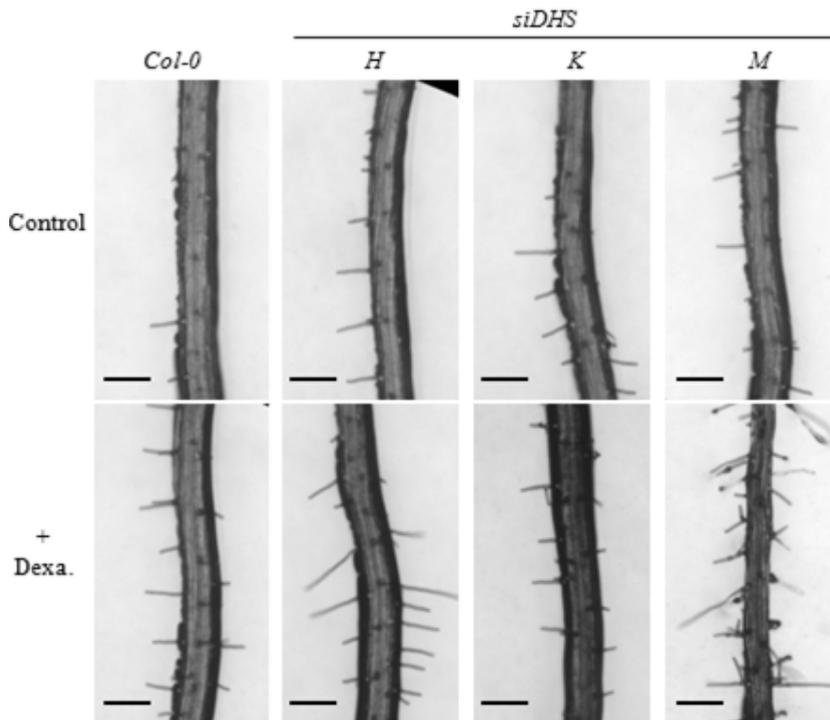


Figura 54. Fenotipo de los pelos radiculares de las líneas *siDHS* tratadas o sin tratar con dexametasona, en comparación con plantas silvestres (*Col-0*). Las fotografías se realizaron mediante la lupa, a los 9 días de crecimiento *in vitro* en la región intermedia de la longitud de la raíz, a 2-3 cm aproximadamente del extremo radicular. Barra de escala 200 μ m.

Para observar posibles defectos en la expansión celular, las paredes de las células de la raíz de plantas silvestres y de las líneas *siDHS* crecidas *in vitro* durante 18 días, fueron teñidas con la molécula fluorescente yoduro de propidio y se observó la morfología celular mediante el microscopio confocal. Mediante la tinción de las paredes celulares, se pudo observar que las células del extremo de la raíz de las líneas *siDHS* tratadas con dexametasona presentaban una morfología anormal, ya que no se habían expandido correctamente, a diferencia de los controles sin tratar y de las plantas silvestres, cuya elongación celular fue equivalente, tanto en la raíz principal como en raíces secundarias (Figura 55).

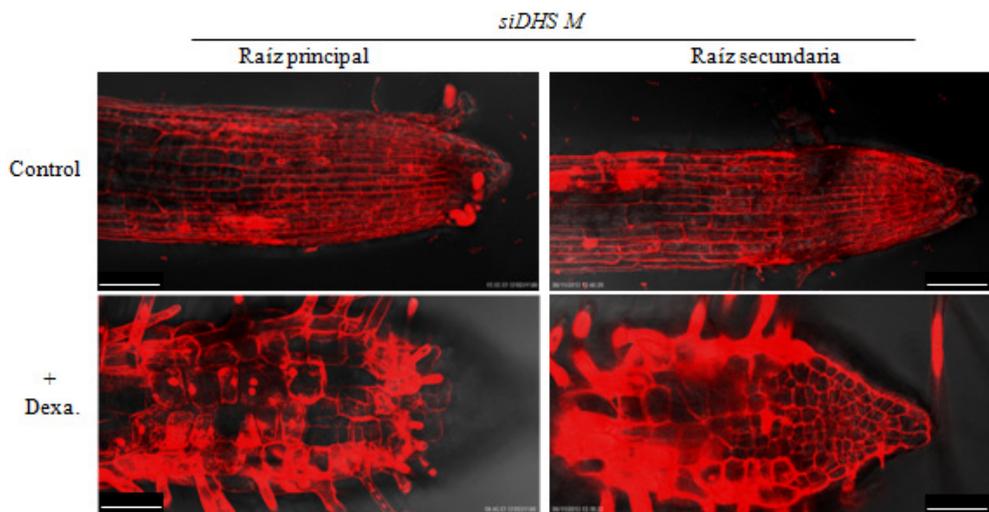


Figura 55. Morfología de las células del extremo de la raíz principal y raíces secundarias tras 18 días de crecimiento *in vitro*, mediante tinción con yoduro de propidio, de líneas *siDHS* tratadas o sin tratar con dexametasona. Barra de escala 50 μ m.

La visualización en el laboratorio de la aparición frecuente de pelos radiculares ramificados desde estadios muy tempranos del desarrollo, y la observación de los defectos en cuanto a la expansión celular de la raíz, que aparentemente podría provocar la acumulación de los pelos en el extremo radicular en plantas *siDHS* tratadas con dexametasona, sugerían posibles alteraciones en la polimerización y estructuración del citoesqueleto de actina [200, 210]. Para poder observar la organización del citoesqueleto de actina, se decidió nuevamente en colaboración con el laboratorio del Dr. Mathur, generar plantas transgénicas doble mutantes *siDHS* y sobre-expresoras del fragmento C-terminal (197 aas) de la proteína talina de ratón, fusionada al extremo C-terminal de la proteína fluorescente GFP (35S:*GFP-mTn*) [211]. La talina es una proteína de unión a los filamentos de actina polimerizados, y el dominio C-terminal contiene los motivos responsables de dicha interacción [212]. La construcción *GFP-mTn* aportada por el Dr. Mathur se introdujo en *A. tumefaciens* para su transformación en las líneas homocigotas *siDHS H, K y M*, generando plantas doble mutantes *siDHS GFP-mTn*, que fueron

propagadas hasta la T2 para su utilización en el laboratorio, generando al menos 10 líneas independientes para cada una de ellas (*siDHS H GFP-mTn*, *siDHS K GFP-mTn*, *siDHS M GFP-mTn*). Posteriormente, se realizó la observación de los filamentos de actina de las líneas transgénicas generadas en diferentes órganos de la planta mediante microscopía confocal. Para observar la disposición del citoesqueleto de actina en el hipocotilo de las plantas, las líneas *siDHS GFP-mTn* se crecieron *in vitro* en presencia o ausencia de dexametasona durante 6 días en oscuridad, para de este modo estimular el crecimiento del hipocotilo. Aparentemente, el tratamiento con dexametasona no provocó defectos en la estructuración de los filamentos de actina en las células del hipocotilo (Figura 56).

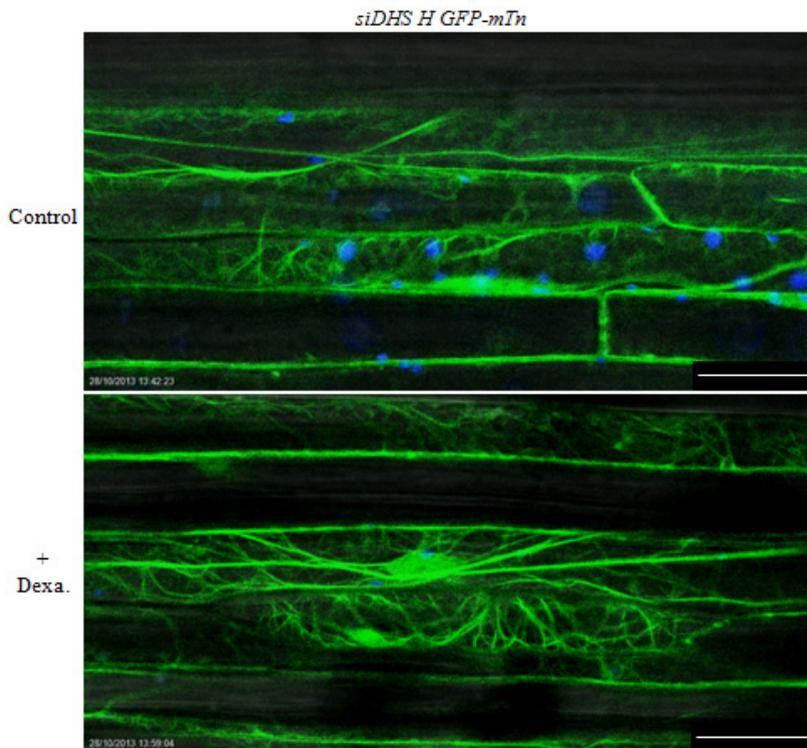


Figura 56. Estructuración del citoesqueleto de actina en las células del hipocotilo de plantas *siDHS H GFP-mTn* crecidas *in vitro* durante 6 días en oscuridad, en presencia o en ausencia de dexametasona. Visualización de la fluorescencia mediante el microscopio confocal. La señal azul es la emitida por los cloroplastos. Barra de escala 25 μ m.

Para observar la organización de los cables de actina en la raíz, nuevamente se crecieron *in vitro* plantas *siDHS GFP-mTn* durante 11 días en condiciones de fotoperiodo de día largo, con o sin dexametasona en el medio de crecimiento, al cabo de los cuales se analizó el estado de polimerización y estructuración de los filamentos de actina en el microscopio confocal. Como muestra la figura 57, en este estadio de desarrollo no se detectaron alteraciones en cuanto a la organización de los cables en las células de la raíz principal, si bien sí se detectaron posibles alteraciones en cuanto a la disposición de los filamentos en algunos pelos radiculares de plantas tratadas con dexametasona, que deberían disponerse paralelos al eje longitudinal, tal y como se describe en la bibliografía [202, 213], y aparentemente se disponían de forma alterada en las líneas *siDHS GFP-mTn* tratadas con dexametasona.

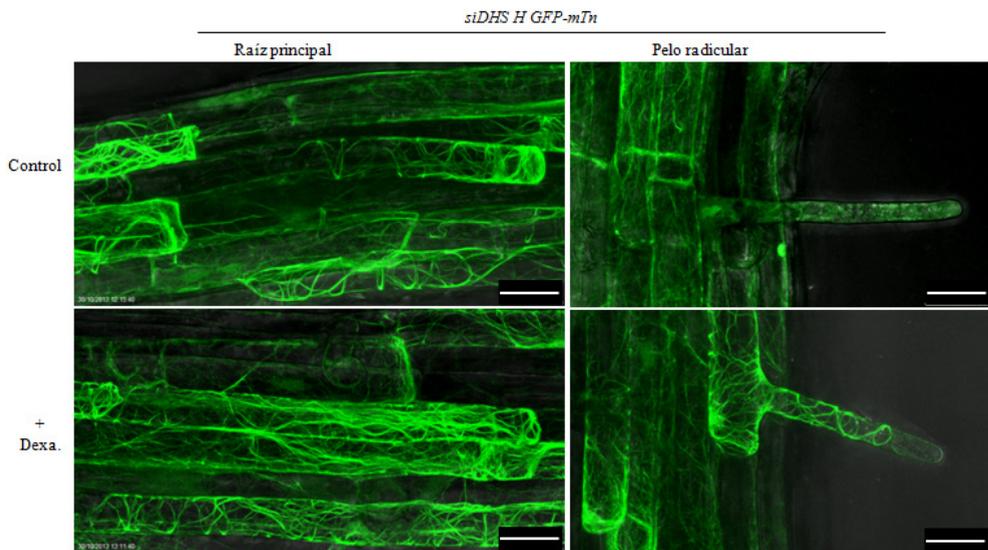


Figura 57. Organización de los filamentos de actina en las raíces de plantas *siDHS H GFP-mTn* crecidas *in vitro* durante 11 días, en presencia o en ausencia de dexametasona. Las fotografías fueron realizadas mediante el microscopio confocal en la región intermedia de la longitud de la raíz, a 2 cm aproximadamente del ápice radicular. Barra de escala 25 μm .

Para analizar qué estaba sucediendo en la organización del citoesqueleto de actina en las células con una expansión anormal y una acumulación de pelos radiculares en el extremo de la raíz de plantas *siDHS* tratadas con dexametasona, se observó la estructuración de los filamentos de actina en las líneas doble mutantes generadas, *siDHS GFP-mTn*, crecidas durante 18 días *in vitro* tanto en presencia como en ausencia del glucocorticoide. A pesar de que no se pudo diferenciar la estructura definida de los filamentos de actina en las regiones pertenecientes al extremo radicular, sí que se pudieron detectar diferencias en la señal fluorescente procedente de la proteína de fusión GFP-Talina, capaz de unirse a la actina polimerizada. Mientras que en los controles todas las células del ápice de la raíz presentaban señal fluorescente distribuida homogéneamente a lo largo del ápice de la raíz, el tratamiento con dexametasona provocó la desaparición de la fluorescencia en las células del extremo radicular, probablemente debido a defectos en la polimerización de los filamentos de actina (Figura 58).

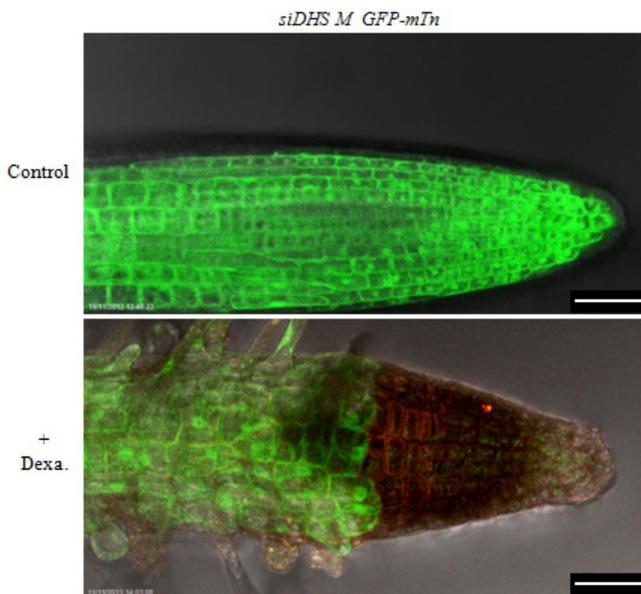


Figura 58. Visualización del citoesqueleto de actina en las células del extremo de raíces secundarias de líneas *siDHS M GFP-mTn* tras 18 días de crecimiento *in vitro* con o sin dexametasona. Visualizado mediante el microscopio confocal. Barra de escala 50 μm .

No se pudieron detectar diferencias en cuanto a la estructuración del citoesqueleto de actina en las células del hipocotilo y de la raíz. Sin embargo, la aparición de alteraciones en la morfología de los pelos radiculares y la observación de defectos en cuanto a la expansión de las células del extremo radicular, que presentaban una señal fluorescente reducida en las líneas *siDHS GFP-mTn*, sugerían la presencia de defectos en cuanto a la polimerización y organización del citoesqueleto de actina. En estos procesos, según nuestra hipótesis de partida, estaría implicado el factor eIF5A cuya acción sería necesaria para traducir proteínas ricas en prolinas sucesivas, como las forminas, las cuales, son esenciales para la correcta polimerización de los filamentos de actina.

3.2.2. Estudio de los ARNm diana del factor eIF5A, implicados en la organización del citoesqueleto en *S. cerevisiae*.

El análisis de ontología realizado en *S. cerevisiae*, concordaba con los resultados publicados en la bibliografía en levadura, en los que tanto la mutación termosensible de eIF5A como la falta de espermidina en estos organismos, provocaban defectos en la organización y polarización del citoesqueleto de actina [100-101]. Además, la reciente publicación de Bauer *et al.* (2013) que demostraba que la espermidina era necesaria para el proceso de reproducción sexual en *S. cerevisiae* [104], alertó sobre la necesidad de la búsqueda de proteínas con prolinas sucesivas en su secuencia primaria, implicadas en la organización del citoesqueleto de actina en el proceso de formación del “shmoo” durante el apareamiento de *S. cerevisiae*. Curiosamente, esta búsqueda dio como resultado la formina, Bni1, la única proteína de levadura que se conoce que presenta 12 prolinas sucesivas en su secuencia primaria, cuya actividad como proteína nucleadora de actina es necesaria para la polimerización y localización dirigida de los filamentos en el extremo de la protrusión [106].

En *S. cerevisiae* se han podido detectar 2 forminas diferentes, Bnr1 y Bni1 [199]. Según la búsqueda en las bases de datos que se realizó en el laboratorio, Bni1 y

Bnr1 son las únicas proteínas de *S.cerevisiae* anotadas hasta la fecha, que presentan al menos 10 prolinas sucesivas en su secuencia primaria. Ambas forminas se unen a proteínas GTPasas de tipo Rho [214], y son requeridas en las levaduras en gemación durante el crecimiento polarizado de la yema [215]. Sin embargo, únicamente se ha descrito el papel de la formina Bni1 durante el proceso de reproducción sexual de levadura. Bni1 se fosforila y se activa por acción de la MAPK Fus3, en el transcurso de la cascada de señalización en respuesta al gradiente de feromonas liberado por el tipo celular de sexo opuesto [104, 106]. El hecho de que la reducción de espermidina, causara la disminución drástica en la formación de los “shmoo” y consecuentemente de la eficiencia en el apareamiento [109], dio lugar al planteamiento de la hipótesis en nuestro laboratorio de que para su traducción, el ARNm de Bni1 podría necesitar la acción especializada del factor eIF5A de levadura, y de esta manera evitar el estancamiento del ribosoma y traducirse correctamente.

Para contrastar esta hipótesis, se plantearon diferentes experimentos que fueron realizados en colaboración con la Dra. Paula Alepuz del laboratorio de genómica funcional de levadura de la UV. Inicialmente, estos experimentos se basaron en el estudio de la capacidad de formación del “shmoo” en mutantes termosensibles de levadura de eIF5A1 (Tif51A), la isoforma de eIF5A que es esencial para la supervivencia celular [96]. Concretamente, se utilizaron 2 alelos mutantes, *tif51A-1* y *tif51A-3* [84, 216], cuyas mutaciones de sustitución les permiten crecer a 25°C, pero que son letales a la temperatura restrictiva de 37°C. Para comprobar la supresión de la expresión de Tif51A en condiciones de temperaturas no permisivas, se crecieron los mutantes *tif51A-1* y *tif51A-3* a 25°C y a 37°C durante diferentes tiempos, y se detectó mediante WB el nivel de proteína de Tif51A en comparación con la cepa de tipo silvestre BY4741 (Figura 59). De esta manera, se confirmó que a partir de las 4 horas de crecimiento a 37°C se producía la supresión completa de la expresión de Tif51A en los 2 alelos termosensibles utilizados.

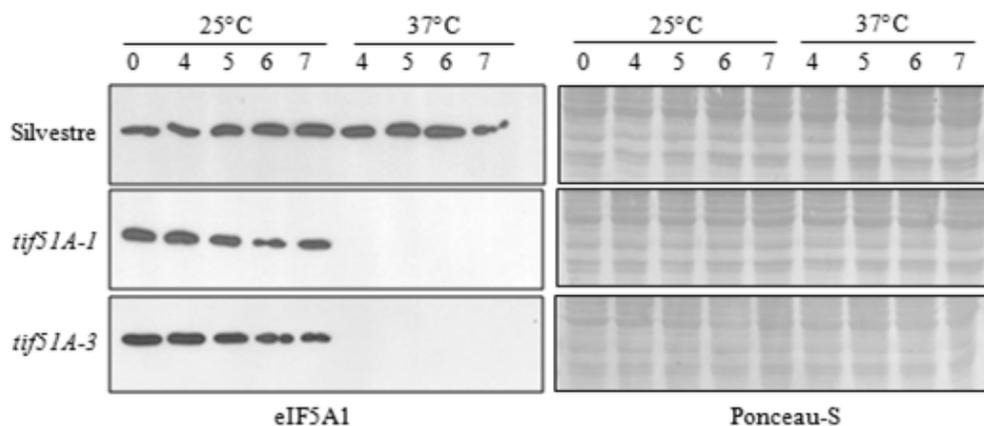


Figura 59. Análisis WB de la isoforma eIF5A1 de levadura en los mutantes termosensibles *tif51A-1* y *tif51A-3* crecidos a 25°C y a 37°C, en comparación con una cepa de tipo silvestre.

Posteriormente, se continuó con el análisis de la polarización del citoesqueleto de actina en los mutantes *tif51A-1* y *tif51A-3* a través del estudio de la capacidad de la formación del “shmoo”. En este estudio también se quiso evaluar la formación de los “shmoo”, en la cepa mutante de delección de la formina Bni1 (*bni1Δ*), y compararlo con los mutantes *tif51A-1* y *tif51A-3*, y cepas silvestres de levadura. En estos experimentos, se crecieron cepas silvestres y mutantes *tif51A-1*, *tif51A-3* y *bni1Δ* durante 2 horas a 25°C en presencia de factor α para inducir la formación del “shmoo”. Posteriormente, se crecieron durante 4 horas más a 25°C o 37°C y se analizó el porcentaje de formación de la protrusión de la membrana celular mediante el microscopio. Como muestra la figura 60, tanto a 25°C como a 37°C el mutante *bni1Δ* presentó una baja formación de “shmoos”, mientras que la capacidad de formación de la protrusión no se mostró alterada en la cepa de tipo silvestre a ambas temperaturas. En cambio, los mutantes termosensibles *tif51A-1* y *tif51A-3* presentaron una formación de “shmoos” muy reducida a temperaturas no permisivas. Estos resultados indicaron que, como la formina Bni1, el factor eIF5A1 es necesario para la formación del “shmoo” durante el proceso de reproducción sexual de levadura.

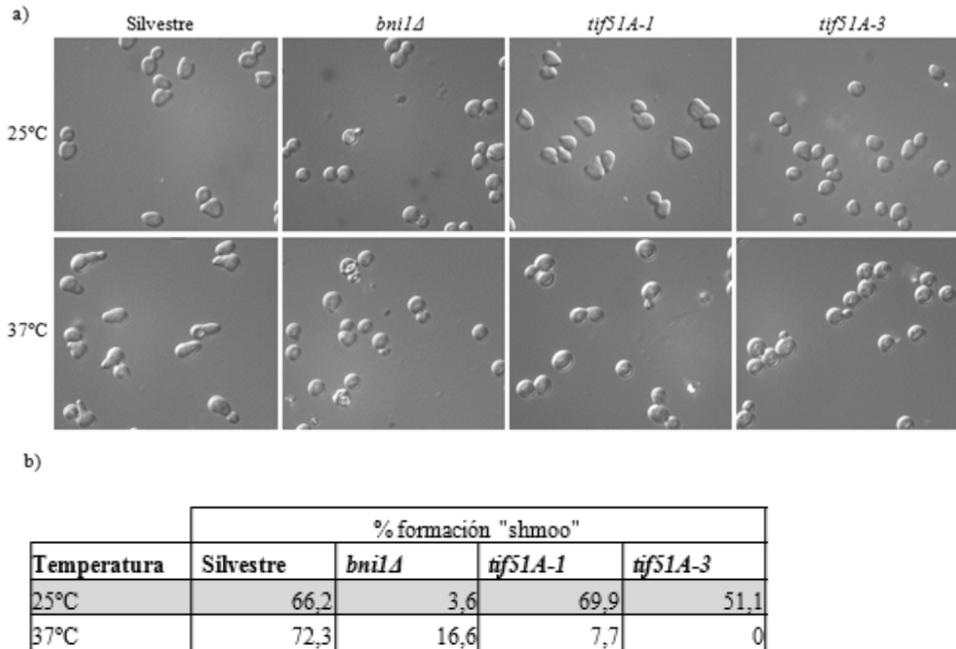


Figura 60. Formación del “shmoo” en los mutantes *tif51A-1*, *tif51A-3* y *bni1Δ*, y cepas silvestres de levadura, crecidos a 25°C o 37°C durante 4 horas. a) Imágenes representativas obtenidas en el microscopio. b) Porcentaje del número de células conteniendo el “shmoo” tras el análisis de al menos 300 células de cada muestra.

Una vez demostrada la implicación del factor eIF5A en la formación del “shmoo”, se continuó con el estudio del nivel de la formina Bni1 en los mutantes termosensibles de Tif51A, ya que según nuestra hipótesis de partida, la traducción de esta proteína se encontraría alterada en estos mutantes debido al estancamiento del ribosoma durante la traducción de la región rica en prolinas sucesivas de Bni1, ocasionando un defecto en la polimerización del citoesqueleto de actina necesaria para la formación del “shmoo”. Para estos estudios se utilizaron cepas de levadura de tipo silvestre y mutantes termosensibles *tif51A-1*, capaces de expresar la proteína Bni1 fusionada después de su secuencia genómica completa, a la etiqueta HA (Bni1-HA) [217]. De esta manera, se crecieron estas cepas durante 2 horas a 25°C en presencia de factor α , y posteriormente se crecieron durante 4 horas más a 37°C. Se recogieron muestras celulares antes del cambio de temperatura, y a las 2 y

4 horas de incubación a 37°C. Mediante WB se analizó el nivel de proteína Bni1-HA, así como la expresión de la proteína constitutiva utilizada como normalizador, Pkg1 (del inglés “*Phosphoglycerate kinase 1*”). También se analizó el nivel de expresión de Tif51A en las muestras (Figura 61). El cambio de 25°C a 37°C no produjo variación en los niveles de Bni1-HA en el silvestre, mientras que el mutante *tif51A-1* mostró una reducción importante de la expresión de Bni1-HA a las 4 horas de incubación a 37°C, que vino acompañada de la disminución de los niveles de Tif51A.

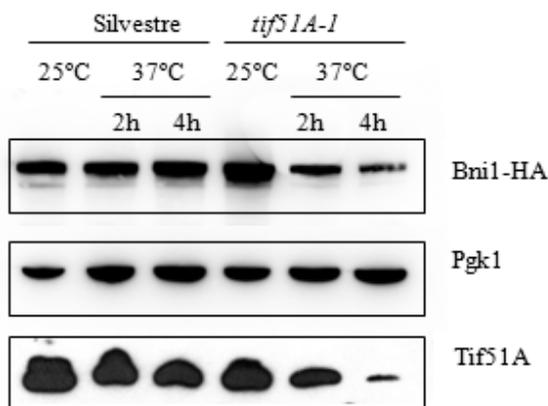


Figura 61. Nivel de expresión obtenido mediante WB de la formina Bni1 etiquetada con HA, en cepas silvestres y mutantes termosensibles *tif51A-1* crecidas a 25°C durante 2 horas en presencia de factor α , y seguidamente transferidas a 37°C durante 4 horas más. Como control normalizador se analizó el nivel de la proteína Pkg1. Se comprobó el nivel de Tif51A en cada una de las muestras.

Estos resultados indicaban que el factor eIF5A es necesario para la traducción de la formina Bni1 y, en consecuencia, para la correcta polarización del citoesqueleto de actina, que es indispensable para la formación del “shmoo” durante el proceso de reproducción de levadura [217].

Estos resultados se han publicado recientemente: Li, T., B. Belda-Palazón, A. Ferrando, and P. Alepuz, *Fertility and Polarized Cell Growth Depends on eIF5A for Translation of Polyproline-Rich Formins in Saccharomyces cerevisiae*. Genetics, 2014. **197**(4): p. 1191-1200.

3.2.3. Estudio de los ARNm diana del factor eIF5A, implicados en la organización del citoesqueleto en *H. sapiens*.

El acoplamiento entre la naturaleza bioquímica y las propiedades mecánicas del citoesqueleto de actina, permite la realización de numerosos procesos celulares en todos los organismos, como el establecimiento de la polaridad celular, morfogénesis, adhesión y migración celular, entre otros [199, 218]. Para modular sus propiedades mecánicas, los filamentos de actina son capaces de organizarse adoptando diversas arquitecturas para generar estructuras diferentes, como por ejemplo la formación de redes entrecruzadas en los lamelipodios mediante los cuales las células exploran el medio, la disposición en haces paralelos en los filopodios para progresar, o la organización en estructuras antiparalelas en las fibras contráctiles [219]. En humanos, la comprensión de los mecanismos moleculares definidos a través de los cuales interviene el citoesqueleto de actina para el cumplimiento de sus funciones celulares, son de gran importancia para la investigación de las actinopatías, en las que el esclarecimiento de la fisiopatología puede ser determinante para el tratamiento de este conjunto de enfermedades raras [220]. Además, está firmemente establecida la función del citoesqueleto de actina para la determinación de la capacidad invasiva y migración celular de las células cancerosas que ocurre durante la metástasis [218, 221-222], dando más importancia aún si cabe, a la investigación de los mecanismos moleculares mediante los cuales se regula la polimerización y organización del citoesqueleto de actina, entre los que se encontraría, según las hipótesis planteadas en el laboratorio, el papel regulador del factor eIF5A sobre la traducción de proteínas implicadas en el control de dicha estructuración.

En el estudio de ontología de las proteínas anotadas en las bases de datos con prolinas consecutivas, se pudo observar una alta representación de proteínas que intervienen en la organización del citoesqueleto de actina, entre las que se encontraron a los miembros de la familia de las forminas de humanos. En *H.*

sapiens se han podido identificar 15 forminas diferentes, que se agrupan en 8 subfamilias según su nivel de homología [223]. Las forminas más estudiadas son las pertenecientes al grupo de las DRFs (del inglés “*Diaphanous-Related Formins*”) que se caracterizan por ser efectores directos de GTPasas tipo Rho, ya que presentan el dominio GBD en la región N-terminal [199]. La función molecular específica de cada una de las forminas permanece en entredicho. Se ha podido comprobar mediante estudios de RT-qPCR en 22 tipos celulares distintos, que las 15 forminas presentan un patrón de expresión uniforme, sugiriendo que podrían cumplir principalmente funciones generales en el organismo, y sin embargo, funciones especializadas en algunos casos [224]. Recientemente, se ha implicado a la formina FHOD1 (del inglés “*Formin Homology Domain-containing protein 1*”) en el desarrollo normal del músculo liso [225], y a la formina FHOD3 en el desarrollo del músculo estriado, tanto esquelético como cardíaco [220]. Por otro lado, se ha observado que la sobre-expresión de la formina DIAPH3 (del inglés “*Diaphnous Homolog 3*”) causa sordera en ratón [226].

Para el estudio de la implicación del factor eIF5A de humanos en la regulación de la organización del citoesqueleto de actina, se decidió establecer una colaboración con el laboratorio de la Dra. Rosa Farràs del Centro de Investigación Principe Felipe (CIPF, Valencia). El objetivo inicial fue realizar abordajes tanto genéticos, por medio de la generación de una respuesta ARNi frente a la isoforma eIF5A1, como farmacológicos con la utilización del inhibidor competitivo de la enzima DHS, GC7 [90], en células humanas HeLa. Como se ha descrito previamente en la introducción, la isoforma eIF5A1 se expresa constitutivamente mientras que la expresión de eIF5A2 es baja, y se ha detectado tan solo en algunos tipos de cáncer [112]. En primer lugar, se realizaron tratamientos con concentraciones crecientes de GC7 (0, 10 y 30 μM) sobre cultivos de células HeLa durante toda la noche. Posteriormente las células se tiñeron con rodamina-faloidina y se analizó la estructuración de los filamentos de actina por medio del microscopio confocal. En paralelo, tras las incubaciones con el inhibidor GC7, se analizó mediante WB el

nivel de la proteína eIF5A1. De este modo, se comprobó que la inhibición de la enzima DHS no afectaba a la expresión de eIF5A1 (Figura 62). Por otro lado, cultivos de células HeLa se transfectaron con un ARN bicatenario capaz de desencadenar una respuesta ARNi específica frente a eIF5A1 (*sieIF5A1*). El silenciamiento a nivel de proteína de la isoforma eIF5A1 se comprobó mediante WB (Figura 62). Posteriormente, se observó la organización de los filamentos de actina tras tinción con rodamina-faloidina en el confocal. Además, el silenciamiento de la proteína eIF5A1 se confirmó mediante inmunofluorescencia, con la utilización de un anticuerpo secundario etiquetado con un fluorocromo verde. El tratamiento con cantidades crecientes de GC7 sobre cultivos de células HeLa provocó la disrupción de los filamentos de actina (Figura 63a), de la misma manera que ocurrió en el caso de la transfección con *sieIF5A1*, observando una desestructuración de los cables de actina. Además, mediante el ensayo de inmunofluorescencia se pudo confirmar que la respuesta ARNi causaba el silenciamiento de la proteína eIF5A1 (Figura 63b).

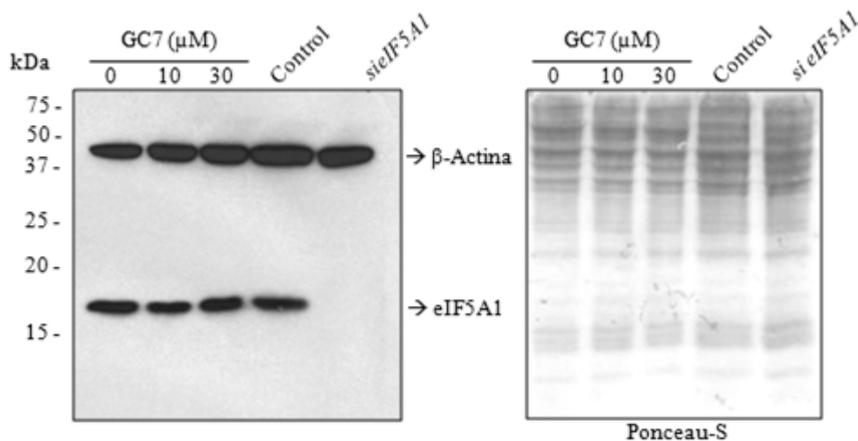


Figura 62. Nivel de la isoforma eIF5A1 obtenido mediante WB, en extractos proteicos obtenidos a partir cultivos de células HeLa tratados con cantidades crecientes de GC7 (0, 10 y 30 μM), o transfectadas con *sieIF5A1*. Como control interno se analizó también el nivel de la proteína β -actina en cada una de las muestras. Se utilizaron 30 μg de proteína total aproximadamente.

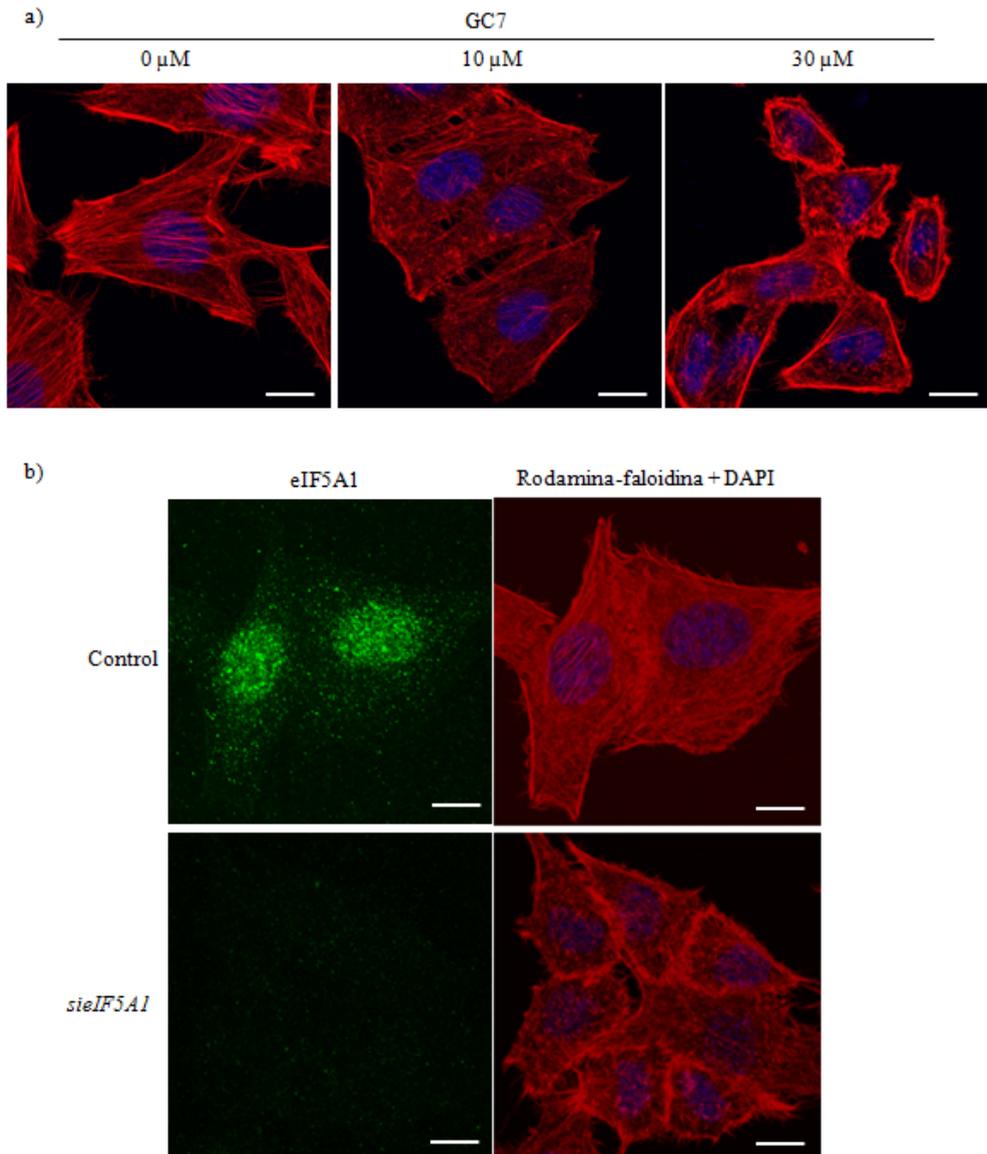


Figura 63. Estructuración del citoesqueleto de actina, mediante tinción con rodamina-faloidina en células HeLa. a) Tratamiento con cantidades crecientes de GC7 (0, 10 y 30 μ M). b) Transfección con *sieIF5A1*. La señal verde se obtuvo mediante inmunofluorescencia frente a eIF5A1. La señal azul se obtuvo mediante la tinción nuclear con DAPI (del inglés, “4',6-Diamidino-2-Phenylindole”). Barra de escala 16 μ m.

Estos resultados sugerían que tanto la inhibición farmacológica como genética de la actividad del factor eIF5A1, provocaban la desestructuración de los filamentos de actina.

Según la hipótesis planteada, la traducción de proteínas con prolinas sucesivas en su secuencia primaria, e implicadas en la correcta organización del citoesqueleto, necesitarían la actividad especializada del factor eIF5A en el ribosoma para su traducción. Para demostrar esta hipótesis, se planteó un experimento para comprobar el efecto global de la disminución de la actividad de eIF5A por el tratamiento con GC7, sobre la traducción *de novo* de las proteínas. Sobre cultivos de células HeLa, se realizaron tratamientos de diferentes tiempos de incubación con GC7 10 μ M (2 horas y durante toda la noche). Como control se utilizaron cultivos sin tratar con GC7. Posteriormente, para poder detectar las proteínas nacientes del ribosoma se utilizó un marcaje metabólico con el compuesto derivado de la metionina, L-azidohomoalanina (AHA), con el que se incubaron los cultivos durante 2 horas en un medio libre de metionina. Los azidas pueden reaccionar con grupos alquino en presencia de Cu(I) formando un anillo triazol estable [227]. De esta manera, las moléculas de AHA incorporadas en las proteínas de nueva síntesis, sustituyendo a las metioninas, pueden reaccionar con una biotina modificada con un grupo alquino, formando un bioconjugado estable (reacción “Click”) [228]. Por tanto, mediante esta estrategia de “Click chemistry” se logra biotinar a las proteínas nacientes del ribosoma, lo que facilita su purificación y posterior análisis.

De esta manera, se partió de 180 μ g de proteína total extraídos de cada uno de los cultivos que habían sido previamente incubados con AHA, que se conjugaron con biotina, y se comprobó que el marcaje de las muestras había ocurrido correctamente mediante detección histoquímica con estreptavidina conjugada a peroxidasa, tras 1D-E y transferencia a una membrana de PVDF (fluoruro de polivinilideno) (Figura 64). Posteriormente, 162 μ g de cada uno de los extractos totales marcados fueron cargados en columna de estreptavidina-agarosa, para de

esta manera purificar a las proteínas de nueva síntesis biotiniladas. Tras esta unión, se procedió a la elución de las proteínas biotiniladas mediante tampón DIGE (del inglés, “*Differential In Gel Electrophoresis*”).

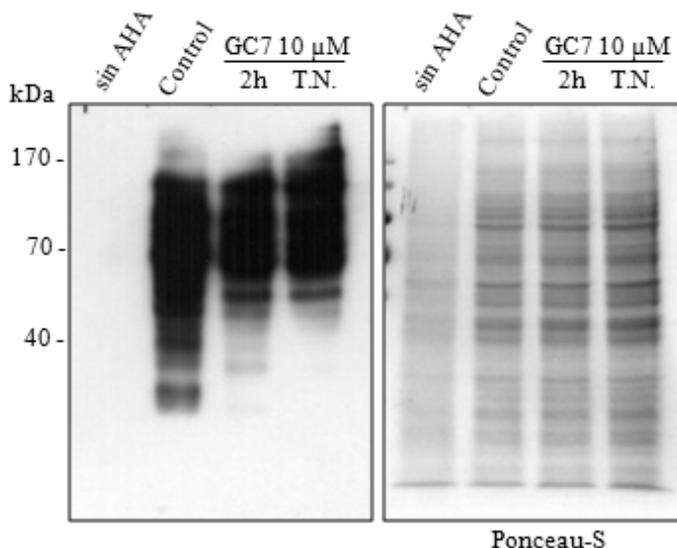


Figura 64. Detección histoquímica mediante estreptavidina-peroxidasa de la biotinilación de las proteínas tras el marcaje de los extractos proteicos con AHA, procedentes de cultivos de células HeLa control, y tratados 2 horas y durante toda la noche (T.N.) con 10 μM GC7. Para comprobar la especificidad de la unión biotina-estreptavidina se utilizó una muestra que no había sido tratada con AHA. Se emplearon 18 μg de proteína total de cada una de las muestras.

Mediante estos experimentos, se pretendía detectar diferencias en cuanto a la síntesis *de novo* de las proteínas entre las muestras control y las tratadas con GC7, con el objetivo de identificar proteínas cuya traducción se encontrara disminuida debido a la reducción de la actividad del factor eIF5A. Además, la presencia de prolina consecutivas en la secuencia primaria de estas proteínas, indicaría que los ARNm de éstas serían dianas moleculares directas de eIF5A. Para conseguir este objetivo, las muestras de proteínas sintetizadas *de novo*, etiquetadas con biotina y purificadas, se marcaron con diferentes fluoróforos: rojo para la muestra control,

azul para el tratamiento de 2 horas con GC7 y verde para la muestra que se incubó durante toda la noche con el inhibidor. Posteriormente se mezclaron las muestras, y la mezcla resultante se separó en una misma 2D-E. Tras esta técnica separativa, se obtuvieron las imágenes del gel con las distintas emisiones de los fluoróforos. El estudio comparativo entre tratamientos fue realizado de manera automática mediante el programa *DeCyderTM 2-D Differential Analysis Software* módulo DIA (del inglés “*Differential In-gel Analysis*”) de GE Healthcare. Con esta mezcla de proteínas diferencialmente marcadas, las proteínas que presentan color rojo serían aquellas reprimidas por tratamiento con GC7, mientras que las que presentan coloración azul o verde serían proteínas inducidas en dichos tratamientos. Aquellas cuyos niveles no cambian en ningún caso, aparecen con color blanco. Tras el análisis volumétrico de las imágenes adquiridas y el procesado de los datos, se continuó con la identificación de las diferencias de expresión resultantes del análisis informático.

En este experimento piloto, el programa no pudo asignar el nivel de significación de estas diferencias debido a la falta de réplicas biológicas. Para tratar de identificar las proteínas que mostraban una expresión diferencial entre tratamientos, el gel de poliacrilamida se tiñó con nitrato de plata. Posteriormente, se extrajeron del gel aquellas proteínas (“*spots*”) cuya señal fluorescente diferencial entre tratamientos, fue identificable visualmente en el gel tras la tinción con nitrato de plata. Estos “*spots*” fueron enviados al laboratorio de proteómica del SCSIE de la UV para su identificación por LC-MS (cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas) (Figura 65).

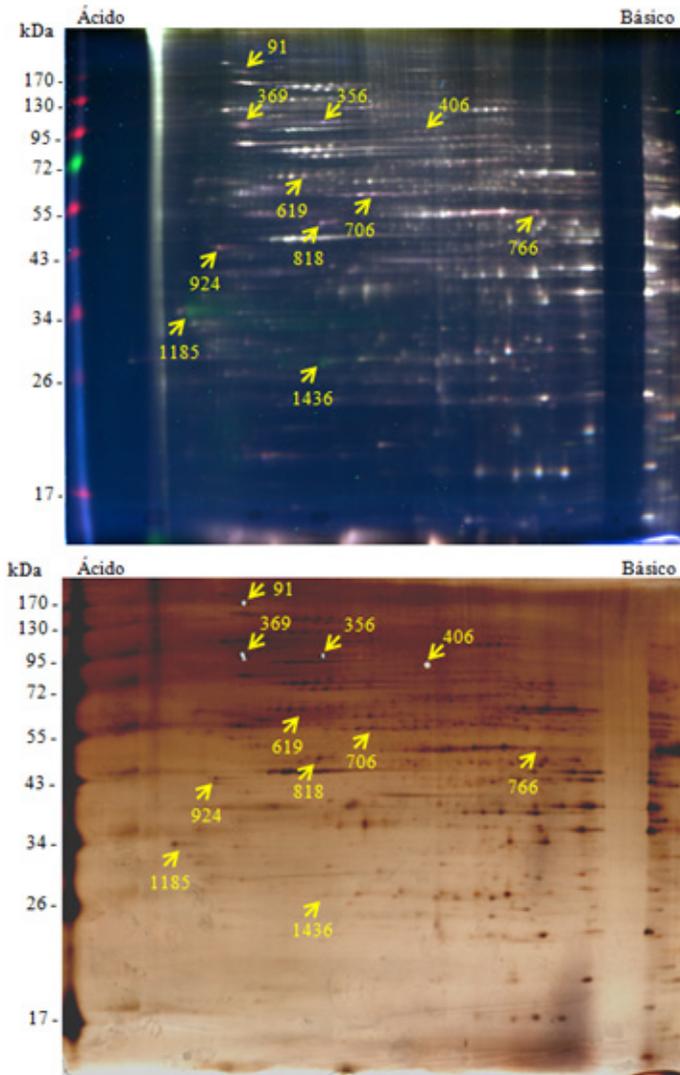


Figura 65. Análisis 2D-E de las muestras de proteínas sintetizadas *de novo*, biotinizadas y purificadas. La muestra control se tiñó con fluorocromo rojo, y las tratadas con GC7 2 horas o durante toda la noche con fluorocromos azul y verde, respectivamente. La parte de arriba muestra la adquisición de la imagen tras la combinación de las señales de los 3 fluorocromos. La parte de abajo muestra la tinción con nitrato de plata del gel SDS-PAGE. Se indican con flechas amarillas los “spots” con expresión diferencial entre tratamientos y detectables tras la tinción con nitrato de plata, que fueron extraídos para su identificación por LC-MS.

Los miembros de la familia de las forminas son proteínas grandes, cuyo peso molecular abarca desde 117 kDa la más pequeña, hasta 180 kDa la más pesada. El rango de puntos isoeléctricos es variable, situándose entre valores de 5.2 para las más ácidas y 9 la más básica. Por esta razón, se hipotetizó que alguno de los “spots” de mayor peso molecular que fueron extraídos del gel y enviados a identificar (números 91, 356, 369 y 406), podría corresponder a forminas. Sin embargo, el análisis por LC-MS no detectó a ninguna de ellas. De entre los “spots” enviados, el resultado más relevante fue la identificación de una proteína implicada en el control de la formación del citoesqueleto de actina y que presenta prolinas sucesivas en su secuencia primaria, la proteína ezrina (número 406). Esta proteína fue escogida para posteriores estudios.

La proteína ezrina de *H. sapiens* tiene un peso molecular aproximado de 70 kDa, y presenta un motivo de 7 prolinas sucesivas en su secuencia primaria. La ezrina es miembro de una familia de proteínas conservadas evolutivamente llamada ERM (Ezrina/Radixina/Moesina), que sirven como nexos de unión entre la membrana plasmática y el citoesqueleto de actina. La función de estas proteínas se ha estudiado fundamentalmente en células epiteliales, donde se ha demostrado su implicación en los procesos de morfogénesis, tráfico vesicular, adhesión y migración celular [229]. Actualmente, hay datos que indican el importante papel de estas proteínas sobre el control de la formación del citoesqueleto de actina durante el desarrollo del cáncer [230]. Se ha demostrado que la expresión de las proteínas ERM se encuentra aumentada en varios tipos de cáncer. También, se ha observado que la deslocalización celular de estas proteínas produce una reducción del contacto entre células, contribuyendo de esta manera al aumento de la capacidad invasiva y el desarrollo del tumor. Concretamente, se ha comprobado la implicación de la proteína ezrina durante metástasis en sarcomas, identificando a esta proteína en las extensiones que presentan las células altamente metastásicas que se producen durante la invasión celular [231].

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos y las observaciones conseguidas en el rastreo en las bases de datos y el análisis de ontología génica, se plantearon diferentes experimentos para tratar de demostrar que la traducción de estas proteínas podría encontrarse alterada en condiciones de supresión de la actividad de dicho factor, y que podría causar los defectos observados en células HeLa. Estos experimentos, se basaron en la desactivación genética de eIF5A mediante la transfección con *sieIF5A1*, y la inhibición farmacológica de la enzima DHS necesaria para la activación de eIF5A, por acción del compuesto GC7. En el caso del estudio de la traducción de las forminas, como representación de esta familia se escogió a la proteína FMNL1 (del inglés “*Formin-Like 1*”, también llamada FRL1) [223], cuya región rica en prolinas tiene hasta 11 prolinas consecutivas en su secuencia primaria.

En primer lugar, se decidió analizar el nivel de expresión de las proteínas ezrina y FMNL1, tras el tratamiento con GC7 o la transfección con *sieIF5A1*. Para el caso de la desactivación farmacológica de eIF5A, cultivos de células HeLa se trataron con GC7 10 μ M durante diferentes tiempos de incubación (2, 4 y 6 horas, y durante toda la noche). Como control del tratamiento con GC7, se utilizaron células sin tratar incubadas toda la noche. Tras los tratamientos con GC7 o la transfección con *sieIF5A1*, se analizó el nivel de expresión de las proteínas de interés mediante WB. Además, como control de expresión entre tratamientos se analizó el nivel de expresión de las proteínas β -actina, GAPDH (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa) y Hsp90 (del inglés “*Heat shock protein 90*”). Además, se confirmó nuevamente el silenciamiento de eIF5A1 en las muestras transfectadas con *sieIF5A1*. Como muestran los resultados de la figura 66, el tratamiento con GC7 causó una disminución de los niveles de FMNL1 y, en menor medida, de la proteína ezrina. Esta reducción de expresión se pudo observar a partir de las 2 horas de incubación con GC7 10 μ M. La transfección con *sieIF5A1* causó la supresión de la expresión de eIF5A1, y produjo una disminución de los niveles de ezrina. Sin embargo, el nivel de FMNL1 parecía no cambiar al silenciarse eIF5A1.

Curiosamente, la transfección con *siEIF5A1* también redujo el nivel de GAPDH, si bien la expresión de las proteínas β -Actina y Hsp90 no se mostró alterada.

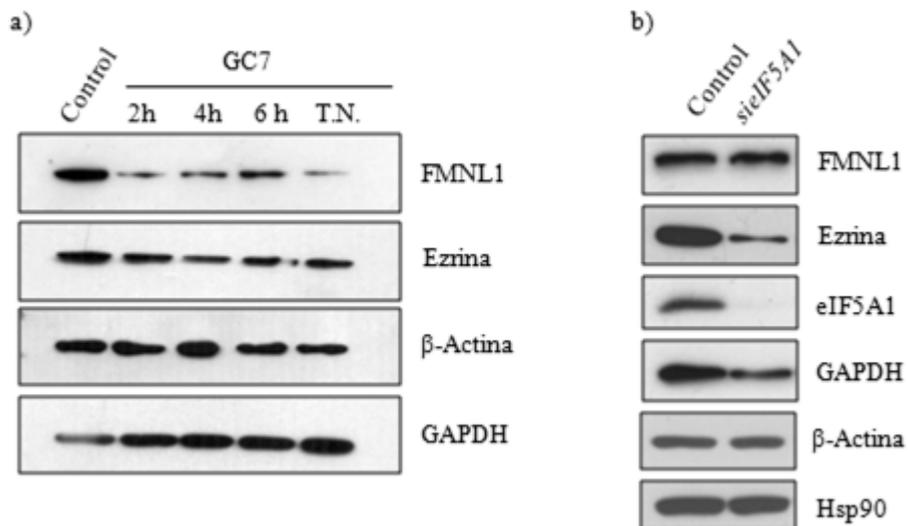


Figura 66. Nivel de expresión de las proteínas FMNL1 y ezrina obtenidos mediante WB, tras el tratamiento con GC7 10 μ M (2, 4 y 6 horas, y duante toda la noche (T.N.)) (a), o la transfección con *siEIF5A1* (b). Como control de expresión se analizó el nivel de las proteínas β -actina, GAPDH y Hsp90. Se emplearon 30 μ g de proteína total de cada una de las muestras.

Para analizar en detalle el proceso de traducción de las proteínas FMNL1 y ezrina, se realizaron estudios sobre la tasa de traducción de estas proteínas, basados en el marcaje metabólico de las proteínas nacientes mediante AHA, su biotilación (reacción “Click”) y purificación, y la detección inmunológica del nivel de su expresión. La incubación de las células durante diferentes tiempos con AHA, ofrece la posibilidad de analizar posteriormente el nivel con el que las proteínas de interés han incorporando el marcaje, siendo indicativo de su proceso de traducción.

Para la realización de estos experimentos, cultivos de células HeLa se trataron con GC7 10 μ M durante 4 horas o se transfectaron con *siEIF5A1*. Posteriormente, cada

cultivo se incubó en un medio libre de metionina durante diferentes tiempos con AHA (0, 1, 2, 4, 6 y 8 horas). Las células se recogieron y se obtuvieron los extractos proteicos totales. Tras la reacción de “Click” y la purificación de las proteínas biotinizadas, se analizó el nivel de expresión de FMNL1 y ezrina mediante WB. El análisis de imagen de la detección inmunológica, permitió realizar el cálculo de la tasa de incremento de la señal obtenida a lo largo del tiempo y, de esta manera, comparar el efecto de la desactivación genética o farmacológica de eIF5A, sobre la tasa de traducción de FMNL1 y ezrina. Como control, se analizaron las tasas de incremento de las proteínas β -actina, GAPDH y Hsp90.

El estudio de la tasa de traducción de las muestras tratadas con GC7, mostró que el tratamiento con el inhibidor ocasionaba un incremento de la tasa de traducción de FMNL1 y ezrina, mientras que no se detectaron diferencias aparentes en la traducción de las proteínas β -actina y GAPDH utilizadas como control. Este resultado, contradecía nuestra hipótesis de partida, en la que se pensó que la inhibición de la enzima DHS y por lo tanto la desactivación de eIF5A, provocaría una disminución de la tasa de traducción de las proteínas que, como FMNL1 y ezrina, tienen prolinas sucesivas en su secuencia primaria. Si bien, no se ha descrito hasta la fecha el efecto que ocasiona la molécula de GC7 sobre el propio ribosoma y a consecuencia, sobre la traducción (Figura 67).

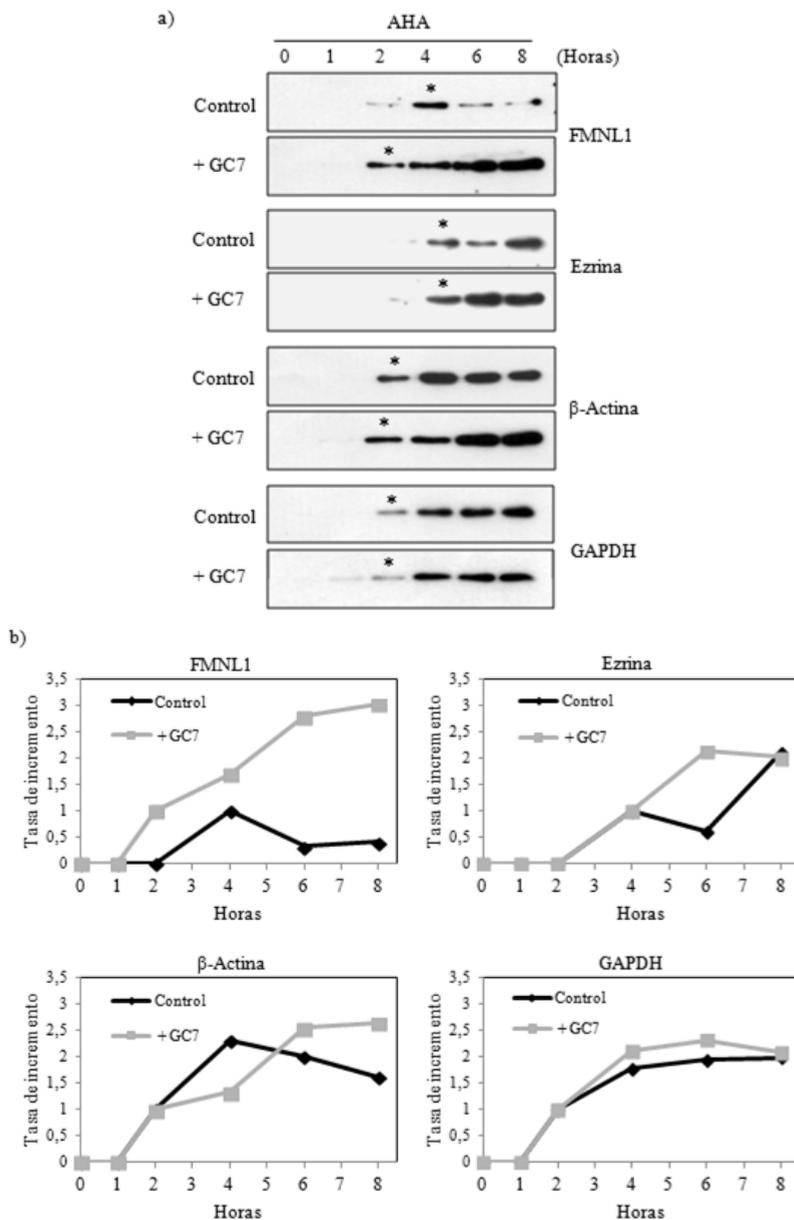


Figura 67. Efecto del inhibidor GC7 sobre la tasa de traducción de las proteínas FMNL1 y ezrina, mediante el análisis de la tasa de incremento de su señal inmunológica tras la incubación con AHA durante diferentes tiempos (0, 1, 2, 4, 6 y 8 horas). a) Análisis WB de las proteínas de interés. b) Representación de la tasa de incremento de las señales inmunológicas obtenidas, calculada mediante *ImageJ* tomando como referencia (adquiriendo un valor de 1) la banda marcada con un asterisco en a).

Por otro lado, el efecto de la desactivación genética de eIFA1 provocó una reducción de la tasa de traducción de las proteínas ezrina y FMNL1, observándose un efecto más drástico sobre la traducción de ezrina. El silenciamiento de eIF5A1 produjo como efecto secundario, un retraso global de la traducción, ya que la señal inmunológica de las proteínas estudiadas se detectó a tiempos más largos de incubación con AHA. Sin embargo, la tasa de incremento de las proteínas β -actina y Hsp90, utilizadas como control, no se vio alterada de modo aparente, a excepción del caso de GAPDH, cuya tasa de traducción también se vio reducida (Figura 68).

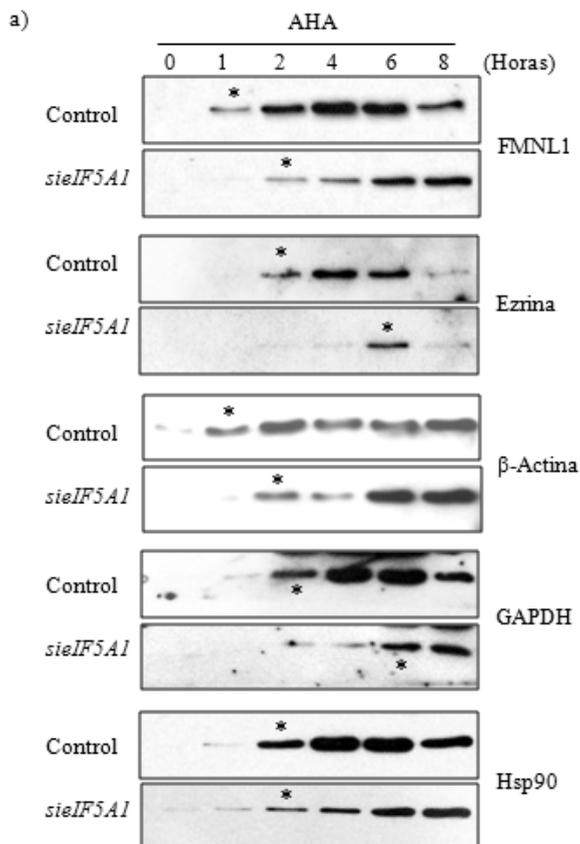


Figura 68. Continúa en la página siguiente.

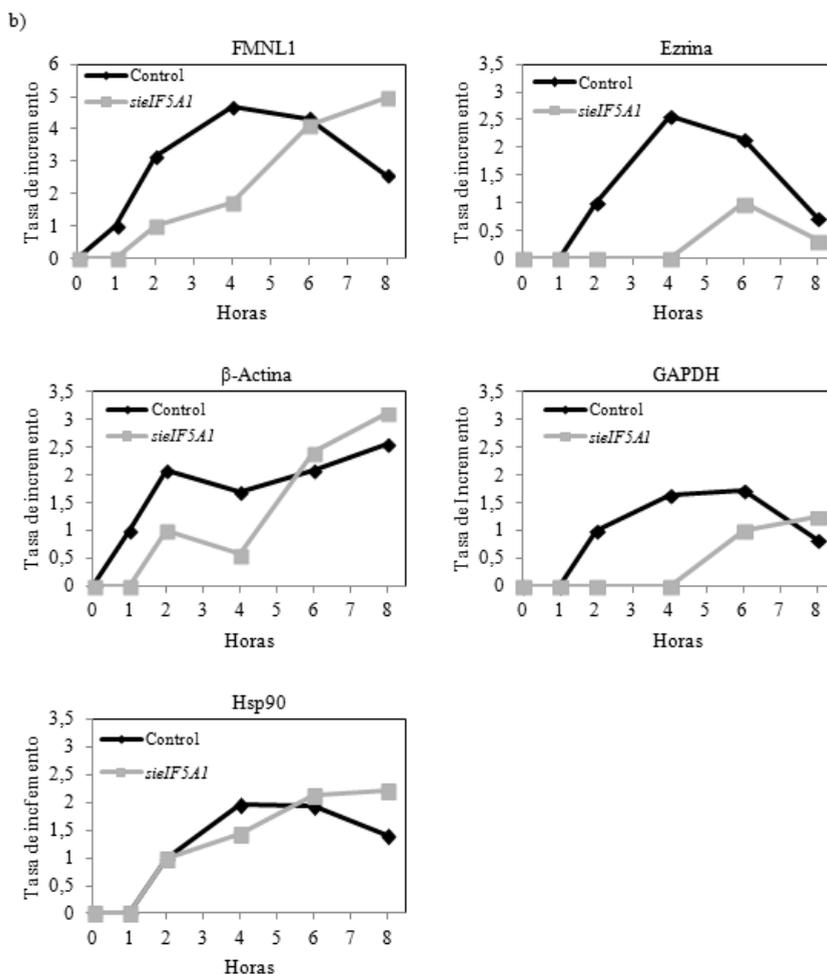


Figura 68. Efecto del silenciamiento de eIF5A1 sobre la tasa de traducción de las proteínas FMNL1 y ezrina, mediante el análisis de la tasa de incremento de su señal inmunológica tras la incubación con AHA durante diferentes tiempos (0, 1, 2, 4, 6 y 8 horas). a) Análisis WB de las proteínas de interés. b) Representación de la tasa de incremento de las señales inmunológicas obtenidas, calculada mediante *ImageJ* tomando como referencia (adquiriendo un valor de 1) la banda marcada con un asterisco en a).

Los resultados obtenidos indicaban que el inhibidor GC7 podría causar la estimulación de la traducción de proteínas con prolinas sucesivas. De manera especulativa, este efecto podría estar ocasionado por su acción como análogo de PAs sobre el ribosoma. Por el contrario, el silenciamiento genético de eIF5A1 ocasionaría una reducción de la tasa de traducción de las proteínas FMNL1 y ezrina, hecho que podría ser responsable de los efectos sobre la polimerización y organización del citoesqueleto de actina observados en células HeLa. Además, la supresión genética de eIF5A1 podría causar un retraso global en el proceso de traducción, probablemente a causa de un enlentecimiento del crecimiento celular.

En el anexo de esta tesis doctoral se han añadido los resultados de la obtención de los perfiles traduccionales de FMNL1 y ezrina, realizados mediante experimentos de centrifugación en gradiente de sacarosa (7-47%) y el análisis del perfil de polisomas, tras la incubación o no, con el inhibidor de la elongación de la traducción cicloheximida (Figuras 73 y 74). De este modo se pretendió confirmar la alteración de la traducción de FMN1 y ezrina debido al tratamiento con GC7 o la transfección con *siEIF5A1*. Sin embargo, los resultados obtenidos no fueron concluyentes.

3.3. Estudio de los ARNm diana del factor eIF5A, implicados en el control del tiempo de floración en *A. thaliana*.

En los resultados obtenidos en los que se implicaba al factor eIF5A de *A. thaliana*, en el control del tiempo de floración, se demostró la dependencia de *FT* sobre los fenotipos de floración temprana observados en los mutantes *siDHS*. Sin embargo, no se detectaron alteraciones en el nivel de expresión de los reguladores transcripcionales de *FT* que se habían estudiado, y que se pensó que podrían estar afectados. El descubrimiento de que el factor eIF5A es necesario para la traducción de proteínas con prolinas sucesivas en su secuencia primaria [94], de nuevo abrió la posibilidad de la búsqueda de reguladores de la transcripción de *FT*, en concreto de reguladores negativos cuya traducción dependiera de la acción especializada de eIF5A. Un defecto de la traducción de estas proteínas en los mutantes *siDHS*, podría ser la causante de la sobre-expresión de *FT* y el motivo del adelanto en la floración.

La búsqueda de proteínas en las bases de datos con prolinas sucesivas en su secuencia primaria, y que fueran reguladores negativos de la transcripción del gen *FT*, identificó 2 proteínas con 7 y 12 prolinas consecutivas, la proteína SMZ (SCHLAFMÜTZE) y su parálogo SNZ (SCHNARCHZAPFEN), respectivamente. SMZ y SNZ son proteínas represoras de la transcripción de *FT* del tipo AP2 (APETALA 2) que están a su vez reguladas por el microARN *miR172* [232]. Se ha descrito que la regulación de la expresión del *miR172*, está controlada por la edad de la planta y por el fotoperiodo a través de GI (GIGANTEA) [233]. También, se ha demostrado que SMZ es capaz de reprimir la transcripción de *FT* por su unión directa a la región 3'UTR [234].

Para estudiar si la traducción de SMZ y SNZ se encontraba alterada en las líneas *siDHS*, se realizaron tratamientos de diferentes tiempos de incubación con la molécula sintética inhibidora de la iniciación de la traducción 4-EGI-1, seguidos de experimentos de centrifugación en gradiente de sacarosa (10-60%) y el análisis del

perfil de polisomas [235]. Se ha demostrado en células animales que el compuesto 4-EGI-1 se une al factor de iniciación de la traducción eIF4E e impide su asociación con la proteína eIF4G, ocasionando la inhibición del inicio de la traducción [236]. La incubación a distintos tiempos con el 4-EGI-1, permite visualizar mediante el análisis de perfiles de polisomas el avance ribosomal, ya que no impide el avance de la elongación. El efecto del inhibidor 4-EGI-1 todavía no se había probado en plantas. En colaboración con el laboratorio de la Dra. Mar Castellano en el CBGP de Madrid, se comprobó mediante ensayos de marcaje metabólico radiactivo que el compuesto 4-EGI-1 inhibía la traducción en plantas (datos no mostrados).

Para la realización de estos experimentos, se crecieron plantas *siDHS K* en cultivo *in vitro* durante 9 días en condiciones de fotoperiodo de día largo, en presencia o ausencia de dexametasona, al cabo de los cuales se iniciaron los tratamientos con 4-EGI-1 (0, 1 y 2 horas de incubación). Tras ellos, y la ultracentrifugación y el fraccionamiento de los gradientes, se realizaron purificaciones de ARN total (los resultados de estas purificaciones se muestran en la figura 75 del anexo). El nivel de los ARNm de interés en cada una de las fracciones y en cada uno de las muestras pertenecientes a los distintos tiempos de incubación con el inhibidor 4-EGI-1, de plantas crecidas en presencia o en ausencia de dexametasona, se analizó mediante RT-qPCR.

Mediante estos experimentos, se comprobó por primera vez el efecto del inhibidor 4-EGI-1 en plantas, y se pudo analizar el perfil traduccional de los ARNm de interés. Como control, se analizó el perfil de polisomas del gen de expresión constitutiva *PDF2*, que carece de motivos de 3 o más prolinas sucesivas en su secuencia.

Por medio de esta estrategia se pudo observar la dinámica del proceso de traducción (Figura 69). Los ribosomas que ya han iniciado la traducción del mensajero se desplazan a lo largo de la cadena, provocando que los mensajeros

sean más densos a causa de que tienen varios ribosomas unidos (polisomas), y por lo tanto situándose en las fracciones más densas (fracciones 6 a 11). La incubación durante 2 horas con el inhibidor de la iniciación 4-EGI-1 provocó el incremento de los mensajeros con un ribosoma o monosoma (fracciones 2 a 4). A medida que los ribosomas van terminando la traducción, se sueltan de la cadena de ARNm y se disponen a iniciar un nuevo ciclo de traducción, hecho que se pudo observar en el caso del transcrito control *PDF2* y de los mensajeros de interés, *SMZ* y *SNZ*, tanto en las muestras tratadas con dexametasona como en las no tratadas. Sin embargo, no se pudieron detectar diferencias aparentes en los perfiles traduccionales de *SMZ* y *SNZ* que indicaran el estancamiento del avance de los ribosomas durante la elongación de la traducción. Estos resultados sugerían que la traducción de *SMZ* y *SNZ* podría no estar afectada en los mutantes *siDHS* tratados con dexametasona, o que la técnica empleada no permite visualizar un posible estancamiento ribosomal por la presencia de prolinas sucesivas.

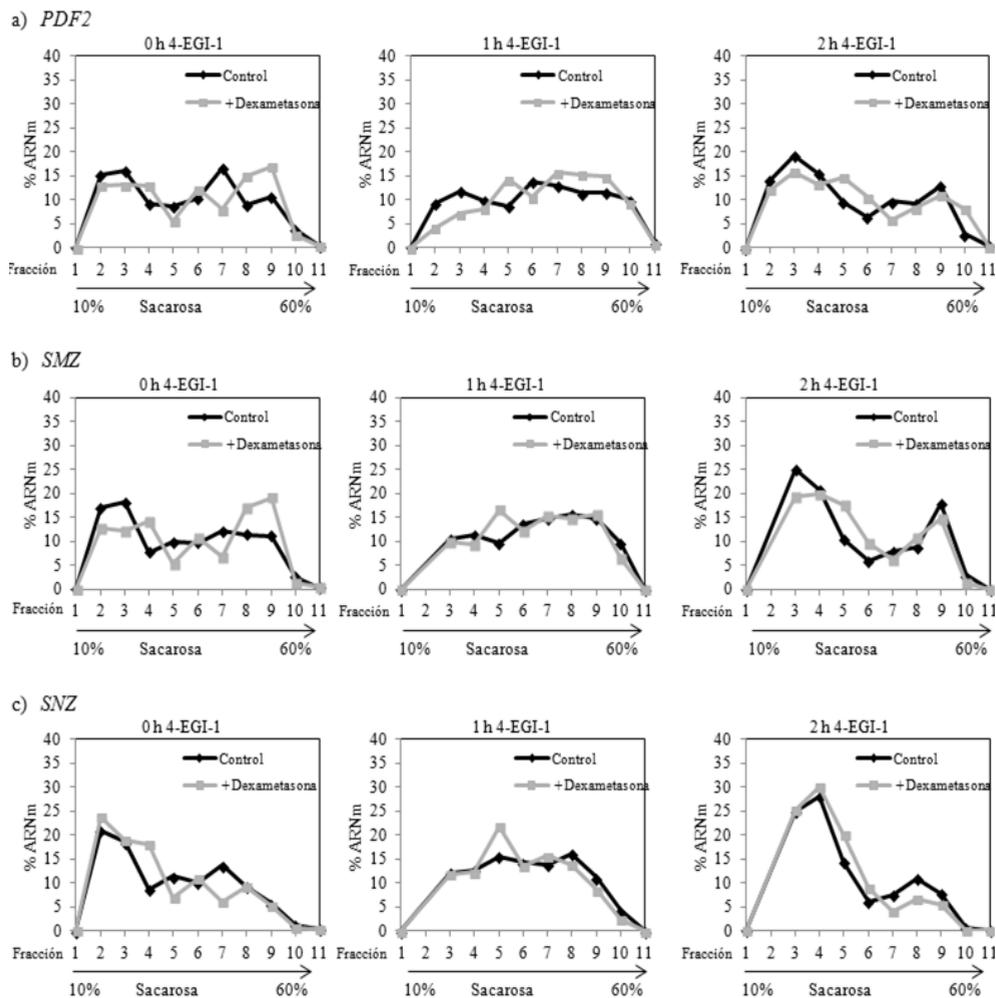


Figura 69. Perfiles traduccionales de muestras de plantas *siDHS K* crecidas 9 días *in vitro* en presencia o ausencia (control) de dexametasona, tratadas con el inhibidor del inicio de la traducción 4-EGI-1 durante diferentes tiempos (0, 1 y 2 horas). Se representa el porcentaje de ARNm obtenido mediante RT-qPCR en cada una de las fracciones recolectadas del gradiente de sacarosa. a) *PDF2*, gen de expresión constitutiva; b) *SMZ*; c) *SNZ*.

3.4. Detección de los ARNm que interaccionan físicamente con eIF5A *in vivo*.

Como se ha descrito en la introducción, además de su papel durante la elongación de la traducción, también se ha demostrado la implicación del factor eIF5A en procesos como el transporte y la degradación de los ARNm [237]. Con el objetivo de identificar los ARNm a los que eIF5A es capaz de unirse y por lo tanto candidatos a ser dianas moleculares reguladas por dicho factor, se planteó la realización de ensayos de inmunoprecipitación de ARN (RIP, del inglés “*RNA Immunoprecipitation*”), con la utilización del anticuerpo anti-eIF5A1 generado en nuestro laboratorio [158].

Para la realización de estos experimentos se partió de 6 g de plántulas silvestres de *A. thaliana* crecidas *in vitro* durante 10 días en día largo. Una parte de este material (3 g) se entrecruzó con 1% formaldehído, mientras que el resto se dejó sin entrecruzar. Posteriormente, se realizaron fraccionamientos núcleo-citosol con cada una de las muestras, y se realizaron ensayos WB para analizar el nivel de proteína eIF5A en las fracciones recogidas, para comprobar el efecto del entrecruzamiento con formaldehído sobre el fraccionamiento núcleo-citosol. Como muestra la figura 70, tras el fraccionamiento núcleo-citosol del material no entrecruzado, se pudo observar que la mayor parte del factor eIF5A aparecía en la fracción citosólica, y en menor medida en la nuclear. En cambio, el entrecruzamiento con formaldehído ocasionó que se detectara la señal de eIF5A principalmente procedente de la fracción nuclear, con la aparición adicional de una señal inmunológica de alto peso molecular. Este hecho podría sugerir que se había producido el entrecruzamiento de eIF5A con otras moléculas formando complejos de mayor tamaño, principalmente en las fracciones nucleares. Así mismo, estos resultados indicaban que el entrecruzamiento con formaldehído sería responsable de que gran parte de eIF5A se fraccionara junto a los núcleos celulares.

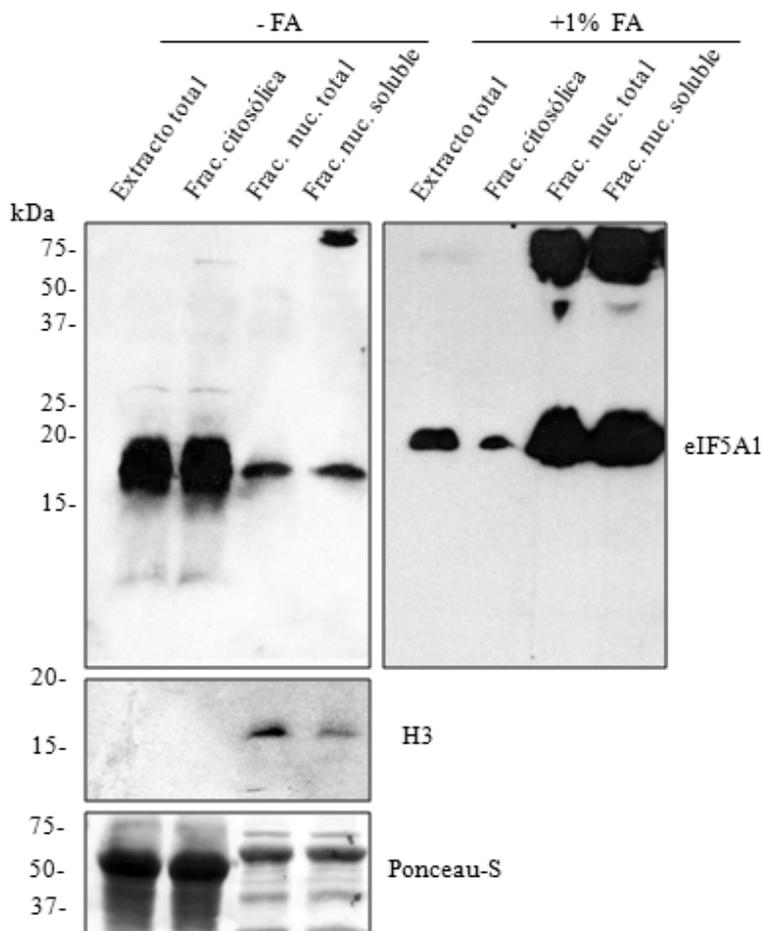


Figura 70. Detección inmunológica de eIF5A mediante WB, en las muestras obtenidas tras el fraccionamiento núcleo-citosol de 3 g de plántulas silvestres de *A. thaliana* entrecruzadas con 1% formaldehído (FA) o sin entrecruzar. Como control nuclear se analizó la señal inmunológica de la histona 3 (H3). Se utilizó el mismo volumen de carga (16 μ l) para cada una de las fracciones obtenidas.

El siguiente paso para la identificación de los ARN que se unen a eIF5A, fue la inmunoprecipitación de dicho factor de las fracciones nucleares y citosólicas, obtenidas a partir del material vegetal entrecruzado con formaldehído. Para comprobar que la inmunoprecipitación del factor eIF5A había funcionado correctamente, se analizó la presencia de eIF5A mediante WB. Como muestra la

figura 71, a diferencia del suero pre-inmune utilizado como control, el anticuerpo anti-eIF5A1 fue capaz de inmunoprecipitar selectivamente al factor eIF5A procedente de las fracciones citosólica y nuclear. Gran parte de la proteína eIF5A procedente de la fracción citosólica no fue capaz de unirse al suero inmune, a diferencia de la fracción nuclear, donde la mayor parte del factor eIF5A pudo ser inmunoprecipitada. Además, tanto en la fracción citosólica como en la nuclear se pudo observar la aparición de bandas inmunológicas específicas del suero inmune de mayor peso molecular, que podrían indicar la interacción del factor eIF5A con otros componentes celulares, como también la detección del dímero de dicho factor.

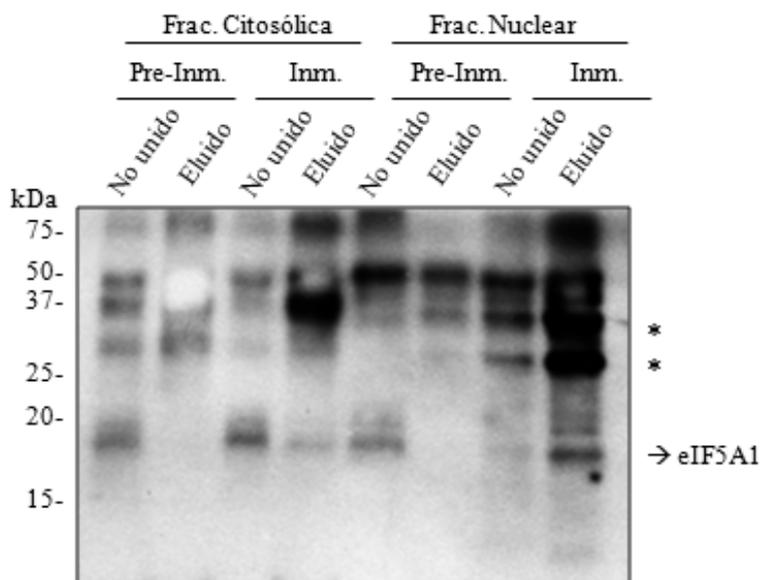


Figura 71. Análisis WB de la inmunoprecipitación de eIF5A en los eluidos obtenidos tras la incubación de las fracciones citosólicas y nucleares con el anticuerpo anti-eIF5A1 (suero inmune), o el suero pre-inmune utilizado como control. Además, se analizaron las muestras conteniendo a los componentes no unidos al suero correspondiente. Se indica la banda de 18 kDa perteneciente al factor eIF5A inmoprecipitado, así como la aparición en los eluidos de bandas específicas inmunoprecipitadas de mayor peso molecular (*). Se utilizó el mismo volumen de carga (16 μ l) para cada una de las muestras.

Una vez obtenidas las muestras conteniendo al factor eIF5A inmunoprecipitado procedente de las fracciones citosólica y nuclear, se continuó con la purificación de los ARN que se habían entrecruzado con eIF5A. Así mismo, las muestras eluidas procedentes de la incubación con el suero pre-inmune se mantuvieron como control y por lo tanto siguieron el mismo proceso de purificación. Tras esta purificación, se procedió a la identificación de los ARN obtenidos mediante una estrategia basada en la síntesis de ADN complementario (ADNc) de cadena completa a través del protocolo SMARTTM (del inglés “*Switching Mechanism At the 5 end of the RNA Transcript*”) [238], seguido de la amplificación de los ADNc obtenidos y su clonación en plásmidos para su posterior secuenciación e identificación. La aproximación SMARTTM se utiliza principalmente para la generación de librerías normalizadas y enriquecidas en ADNc de cadena completa [239].

La tecnología SMARTTM para la síntesis de ADNc de cadena completa utiliza la propiedad que tienen algunas retrotranscriptasas reversas de adicionar 3 nucleótidos de citosina en el extremo 3' de la primera cadena de ADNc sintetizada al finalizar la copia del ARNm molde, hecho que no sucede si la transcripción reversa termina de forma prematura. La copia de la primera cadena de ADNc se produce a partir de un cebador oligo (dT) conteniendo una secuencia adaptadora con sitio de restricción *SfiIA*. La presencia adicional durante la reacción, de otro cebador con 3 nucleótidos de guanina en posición 3' y un sitio *SfiIB*, permite la copia de la cadena recién sintetizada generando un ADNc de doble cadena. La presencia de las secuencias adaptadoras en los 2 cebadores empleados, permite posteriormente la utilización de un segundo par de oligos específicos para esas secuencias, posibilitando la amplificación del ADNc de doble cadena que queda flanqueado por los sitios de restricción *SfiI*. La presencia de estos sitios de restricción, permite a su vez la clonación direccional de los ADNc en el vector *pENTR1A-SfiI* [239-241].

De esta forma, una alícuota de las muestras procedentes de la purificación de los ARN obtenidos tras la inmunoprecipitación de eIF5A, se utilizó para la generación de los ADNc de doble cadena, que fueron posteriormente amplificados por PCR. Como control positivo de la síntesis y amplificación de los ADNc se utilizó una muestra pura de ARN total. Para comprobar el nivel de amplificación obtenido, el mismo volumen de los productos de PCR de cada una de las muestras se separó mediante electroforesis de agarosa (Figura 72). Los resultados de la electroforesis revelaron la amplificación de la población de los ADNc, obtenidos a partir de la purificación de los ARN que se habían entrecruzado con el factor eIF5A inmunoprecipitado procedente de la fracción citosólica. Curiosamente, la muestra de ARN purificada a partir de la fracción nuclear inmunoprecipitada, no produjo amplificación detectable a nivel visual tras la electroforesis, de la misma manera que ocurrió con los controles negativos pertenecientes a las muestras incubadas con el suero pre-inmune.

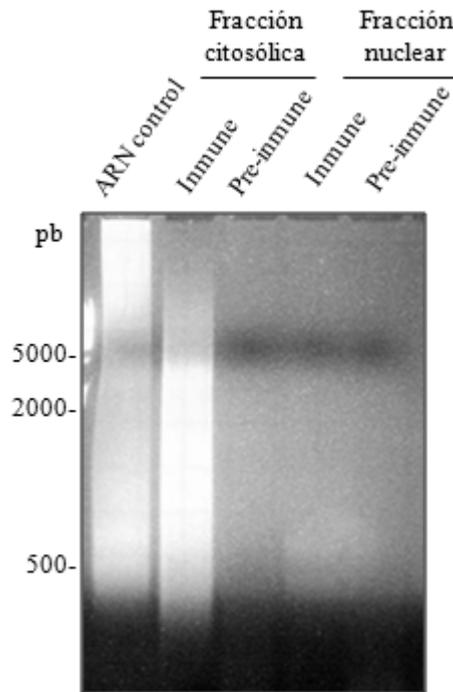


Figura 72. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR obtenidos en la síntesis de ADNc SMARTTM tras el ensayo de RIP. Como control se utilizaron 200 ng de una muestra de ARN total. En las electroforesis se cargaron 15 μ l del volumen total de cada PCR (30 μ l).

A la vista de los resultados conseguidos tras la amplificación de los ADNc inmunoprecipitados junto al factor eIF5A procedente de la fracción citosólica, se procedió a la purificación de la población de los productos de PCR del gel de agarosa. Los ADNc purificados se digirieron con *Sfi*I, se clonaron en el vector *pENTR1A-Sfi*I, y se transformaron en *E. coli* para la identificación de colonias transformantes que habían incorporado el inserto. La selección en kanamicina, dio lugar a más de 300 colonias transformantes. 50 de estos clones transformantes fueron seleccionados para realizar extracciones de ADN plasmídico (ADNp). El análisis de restricción *Sfi*I del ADNp extraído, mostró 4 tipos de insertos diferentes con un tamaño comprendido entre 400 y 1000 pb. Cada uno de los 4 tipos de ADNp, se enviaron al servicio de secuenciación del IBMCP. Mediante el análisis

bioinformático *BLAST* en la base de datos del TAIR, se consiguió la identificación de las secuencias obtenidas. Como muestra la tabla 5, el análisis bioinformático de las secuencias dio lugar a la identificación de los ARN pertenecientes a los genes de las proteínas *GAPC2*, *RBCS1A* y *RNEE/G*. La secuencia primaria de estas proteínas, no presenta motivos de al menos 3 prolina consecutivas. Además de los transcritos de estas proteínas, se identificó una secuencia de función desconocida situada en el cromosoma 2 entre los genes AT2G01021 y AT2G01023. Estos resultados sugieren que los experimentos de RIP realizados, han permitido identificar ARNm que se transcriben altamente en plantas, y que estarían asociados a eIF5A por su presencia en el ribosoma, aunque no necesariamente implicados en la traducción de secuencias que codifican prolina sucesivas.

ID TAIR	Símbolo	Nombre completo
AT1G13440	<i>GAPC2</i>	Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa C2
AT1G67090	<i>RBCS1A</i>	Ribulosa bifosfato carboxilasa cadena pequeña 1A
AT2G04270	<i>RNEE/G</i>	ARNasa tipo E/G

Tabla 5. Identificación de los ARN obtenidos tras el experimento de RIP.

DISCUSIÓN

En este trabajo hemos profundizado en el estudio del factor de traducción eIF5A, cuya activación es dependiente de la espermidina [39]. Nuestros esfuerzos se han centrado en la caracterización bioquímica de la modificación por hipusinación de eIF5A en *A. thaliana*, así como en la implicación funcional de este factor a lo largo del crecimiento y desarrollo de la planta. Además, el reciente descubrimiento de la función especializada de eIF5A en la traducción, ha permitido la identificación en diversos organismos eucariotas de ARNm candidatos a ser regulados por eIF5A.

1. Necesidad de un sistema de monitorización de la hipusinación.

Mientras que en otros sistemas eucariotas como levaduras y mamíferos, la caracterización bioquímica del proceso de hipusinación se ha estudiado exhaustivamente [47, 49, 65, 91, 114, 242], en plantas la investigación se ha centrado en la realización de aproximaciones genéticas para conseguir la sobre-expresión o la supresión de eIF5A [133, 140-141]. En este tipo de aproximaciones debería de incluirse la caracterización molecular de la actividad biológica de eIF5A, para comprobar si la ganancia o pérdida de función han ocurrido de manera correcta. Una de las razones de este requerimiento sería por ejemplo que la ganancia de función de eIF5A podría requerir la co-expresión simultánea de las enzimas de hipusinación, DHS y DOHH, para producir la proteoforma activa de eIF5A. Sin embargo, este abordaje no se ha realizado hasta la fecha en plantas, tal y como ocurre en el trabajo de Ma *et al.* (2010). En el citado artículo, los efectos de la sobre-expresión de eIF5A3 sobre el crecimiento y la respuesta a condiciones de estrés de *A. thaliana*, son atribuidos a una ganancia de función de esta isoforma, sin tener en cuenta el nivel de hipusinación de la proteoforma sobre-expresada [141]. Otro ejemplo que demuestra la necesidad de desarrollar métodos para valorar la actividad funcional de eIF5A, se deriva del estudio reciente de Li *et al.* (2013) en el que pretendieron comprender los mecanismos de tolerancia a estrés salino mediados por espermidina. Estos investigadores, realizaron experimentos de 2D-E y MALDI-TOF/TOF MS para analizar el efecto sobre la expresión diferencial de

Discusión

proteínas en hojas de pepino, de la aplicación exógena de espermidina en condiciones normales o bajo condiciones de estrés salino. De esta manera, pudieron detectar que el factor eIF5A se sobre-expresaba al aplicar espermidina bajo condiciones de estrés salino [243]. Sin embargo, en los resultados publicados no se describió si dicha sobre-expresión correspondía con la proteoforma hipusinada o la no modificada de eIF5A.

En este sentido, nuestra aportación se ha basado en la monitorización del proceso de hipusinación mediante el uso de técnicas bioquímicas e inmunológicas. En concreto, se ha desarrollado una técnica combinada 2D-E/WB, para evaluar las diferencias en cuanto a la movilidad relativa de las distintas isoformas y proteoformas de eIF5A de *A. thaliana*. Mediante esta estrategia, se ha podido demostrar por primera vez que el tratamiento con ABA causa la inactivación de la isoforma eIF5A1, observándose un aumento de la proteoforma no hipusinada (Figura 17). La alteración dependiente de ABA de la hipusinación de eIF5A1, significaría que la traducción de cualquier ARNm regulado por la acción de este factor se encontraría afectada bajo estas condiciones. El estudio bioinformático de las proteínas de *A. thaliana* con al menos 3 prolinas sucesivas, reveló la existencia de más de 4000 secuencias anotadas (Figura 53). Por tanto, permanecen por identificar entre estas secuencias, posibles dianas ARNm de eIF5A dependientes de ABA, y su confirmación mediante estudios de análisis traduccional.

Además de la aplicación de la técnica desarrollada de 2D-E/WB para estudios relacionados con ABA, hemos conseguido aplicar con éxito estas técnicas en otros casos. Por un lado los experimentos incluidos en la tesis doctoral realizada por Enric Sayas en el laboratorio del Dr. Ramón Serrano en el IBMCP, describen el efecto del homólogo estructural de la espermidina, la noespermidina [244-245], sobre el sistema de hipusinación de *A. thaliana*. La noespermidina se ha podido detectar en alfalfa (*Medicago sativa*), algas y bacterias, y además se ha descrito su papel como agente anti-tumoral en ratón [246]. Los experimentos de Enric Sayas

Discusión

se basaron en la técnica 2D-E/WB desarrollada en esta tesis doctoral con la utilización del anticuerpo anti-eIF5A1. Sus resultados revelaron que al tratar las plantas con noespermidina se producía un aumento de la señal más ácida correspondiente a la proteoforma inactiva no modificada de eIF5A1, lo que sugería que la noespermidina provocaba la inhibición competitiva de la enzima DHS. De la misma forma, el estudio del patrón bioquímico de hipusinación realizado en nuestro laboratorio, ha servido para validar la supresión a nivel de proteína de la enzima DHS en las plantas de silenciamiento *siDHS*. Al aplicar la dexametasona, se obtuvo un aumento de la señal perteneciente a la proteoforma no hipusinada del factor eIF5A (Figura 26). En estos experimentos también se detectó la aparición de una nueva señal inmunológica más ácida, probablemente correspondiente a la proteoforma acetilada no hipusinada de eIF5A1 (Tabla 1). Esta señal también se encontraba aumentada al aplicar dexametasona. Este resultado concordaba con los datos procedentes de estudios en células HeLa [49], en los que se demostró que las proteoformas no hipusinadas se acetilaban rápidamente. Por último hay que resaltar la utilidad de esta técnica bioquímica para visualizar posibles efectos de la CK2 sobre la enzima DHS, ya que la desactivación condicional de dicha quinasa incrementa la proteoforma no hipusinada de eIF5A1 (Figura 16).

2. Función de eIF5A en el desarrollo de *A. thaliana*.

Además de los abordajes de tipo bioquímico para caracterizar el proceso de hipusinación de eIF5A en plantas, también hemos realizado en paralelo estudios funcionales basados en abordajes genéticos para la desactivación genética condicional de la ruta de eIF5A. Debido a la esencialidad del factor eIF5A [44, 153], fue necesaria la elaboración de un sistema condicional para el silenciamiento vía ARNi de cada una de las isoformas de eIF5A o de la enzima DHS. La caracterización de la desactivación condicional de las distintas isoformas de eIF5A y de DHS a lo largo del desarrollo, permitió implicar al factor eIF5A en el control del tiempo de floración. Se observaron fenotipos de floración temprana en cada una de

Discusión

las líneas transgénicas generadas, *sieIF5A1*, *sieIF5A2*, *sieIF5A3* y *siDHS* (Figuras 27 y 28). Existe la teoría de que la presencia de varias isoformas de eIF5A en plantas, puede ser debida a una especialización funcional de cada una de ellas [122]. Sin embargo, la desactivación individual o simultánea de todas y cada una de ellas dio lugar al mismo fenotipo de floración temprana. Se ha demostrado que el factor eIF5A existe en forma de homodímero [64-65]. Los experimentos de BiFC entre las distintas isoformas de eIF5A (Figura 19) han logrado determinar la posibilidad de formar heterodímeros, hecho que podría explicar la necesidad de la acción combinada de las 3 isoformas de eIF5A para mantener el desarrollo normal de la planta.

La caracterización de las plantas *siDHS* demostró que la sobre-expresión de FT independiente del fotoperiodo, era la responsable de los fenotipos de floración temprana observados (Figura 30). Sin embargo, no se detectaron alteraciones en el nivel de expresión de los reguladores transcripcionales de *FT* que se estudiaron, (Figuras 31, 32 y 39). La búsqueda bioinformática de reguladores de la transcripción de *FT* que tuvieran poli-prolinas, nos llevó al estudio traduccional de las proteínas SMZ y SNZ. Este estudio se llevó a cabo mediante análisis del perfil de polisomas y el tratamiento con el inhibidor del inicio de la traducción 4-EGI-1. Sin embargo, en estos experimentos no se pudo observar el estancamiento en el avance de los ribosomas que explicara la sobre-expresión de FT, a causa del defecto en la traducción de SMZ y SNZ (Figura 69). Se ha demostrado que el mutante *snz-1* es hipersensible al ABA y al estrés osmótico [247], lo que concuerda con los resultados de floración temprana, hipersensibilidad a ABA y estrés osmótico observados en las plantas *siDHS*. Probablemente las limitaciones de la técnica de análisis del perfil de polisomas han impedido la detección del estancamiento del ribosoma durante la traducción de SNZ. Esta técnica podría requerir la elaboración de extractos específicos de tejido, que además deberían de obtenerse en un estado concreto del desarrollo de la planta para, de este modo, llegar a observar un defecto en la traducción de los ARNm de interés y, quizás, el

Discusión

uso de técnicas alternativas complementarias como por ejemplo el ensayo “*Toeprint*” [248].

Además de los fenotipos de floración, otro proceso de desarrollo en el que está implicado eIF5A es el de la diferenciación del xilema. Curiosamente se ha observado una posible relación entre el estado de maduración del xilema y el tiempo de floración, procedente de estudios de mutantes defectuosos en la formación de la pared celular secundaria [249]. En estos estudios se observó que mutantes hipolignificados florecían de manera temprana, mientras que mutantes hiperlignificados lo hacían de manera retrasada. En nuestros estudios sobre el desarrollo del xilema en hipocotilos de plantas *siDHS*, observamos que presentaban hipocotilos con una cantidad disminuida de TEs, y que prácticamente la totalidad de estas células maduraban completamente formando vasos del metaxilema (Figuras 41 y 42). Será necesario evaluar el contenido global de lignina en estas plantas transgénicas de *siDHS*, para valorar una posible correlación entre alteraciones en el tiempo de floración y el proceso global de lignificación.

Profundizando en los mecanismos de formación del xilema y la implicación de otras PAs en dicho proceso, decidimos estudiar la interacción genética entre la señalización mediada por la termoespermina [22] y la acción del factor eIF5A en el proceso de formación del xilema de *A. thaliana*. Para ello, se realizaron estudios fenotípicos de complementación con la generación del doble mutante *acl5-1 siDHS* (Figuras 44 y 45). Los resultados obtenidos, demostraron una complementación funcional mutua entre ambas rutas en el proceso de xilogénesis en el hipocotilo de *A. thaliana*. Probablemente, la acción de eIF5A sobre el proceso de formación del xilema tiene lugar de una manera independiente de la vía regulada por la termoespermina. Si bien, para confirmar esta hipótesis tendría que caracterizarse a nivel molecular en el doble mutante la expresión de los genes regulados por la termoespermina en la formación del xilema.

Discusión

Una idea subyacente a estos estudios de desarrollo del xilema, es la posible implicación de ambas rutas reguladas por PAs en la señalización hormonal de dicho proceso. Como se ha descrito en la introducción, las auxinas y las citoquininas son fitohormonas clave en la formación del xilema y funcionan de forma mutuamente inhibitoria [135]. Concentraciones altas de auxinas inducen la formación de vasos del protoxilema [250]. En cambio, las citoquininas regulan negativamente la diferenciación del protoxilema [139]. Un defecto en el transporte o la señalización de las auxinas o citoquininas provoca la alteración del balance entre estas fitohormonas, desplazando el equilibrio hacia una de ellas [135]. En relación con la posible modulación que ejercen las PAs sobre la acción hormonal, se ha sugerido la interacción entre la termoespermina y las auxinas en el proceso de diferenciación del xilema [21]. Se ha demostrado que la termoespermina se requiere para regular la diferenciación del xilema inducida por la señalización de las auxinas [188]. Además, se ha comprobado en *Populus* que *ACL5* afecta negativamente a los niveles endógenos de auxinas, mientras éstas regulan positivamente la expresión de *ACL5*, a través de un mecanismo de retroalimentación que mantiene los niveles de termoespermina en el xilema [251]. Recientemente también se ha observado la sobre-expresión de genes implicados en la señalización de auxinas en mutantes *acl5* [252]. Estos datos concordaban con los resultados en los que se observó en las plantas *acl5-1* una hiperproliferación del protoxilema (Figura 44), sugiriendo la presencia de niveles aumentados de auxinas en estas plantas. En cambio, los resultados obtenidos con las plantas *siDHS*, en los que se observó una inhibición del crecimiento de la raíz (Figura 46), la aparición de un fenotipo de ramificación del tallo tipo “*bushy*” (Figura 40), y la presencia de TEs completamente lignificados (metaxilema) (Figura 42), sugerían que las líneas de silenciamiento *siDHS* podrían tener niveles incrementados de citoquininas y/o de su señalización. El papel de las citoquininas en el proceso de ramificación del tallo está comprobado [182]. Además, los mutantes de pérdida de función de la enzima SAMDC4, *bud2*, que presentan también un fenotipo tipo “*bushy*”, tienen

Discusión

niveles aumentados de citoquininas, y son hipersensibles a las mismas [181]. Estudios moleculares y fenotípicos en *A. thaliana* [253], también han revelado la importancia de la interacción entre las auxinas y las citoquininas, en el proceso de desarrollo del meristemo apical de las raíces principales y secundarias. La aplicación de citoquininas exógenas inhibe tanto el crecimiento de la raíz principal como la iniciación de raíces laterales. Experimentos en curso mediante la aplicación de citoquininas a las plantas transgénicas *siDHS*, permitirán elucidar su capacidad de respuesta durante el crecimiento de la raíz.

En 2013 se ha implicado al factor eIF5A2 (FBR12) de *A. thaliana* en la formación del protoxilema a través de la señalización por citoquininas [134]. Los resultados de caracterización del mutante heterocigoto, *fbr12*, mostraron que las plantas presentaban raíces primarias más cortas y un aumento de vasos protoxilemáticos. Las plantas *fbr12* presentaban una sensibilidad reducida hacia la aplicación exógena de citoquininas. La mutación combinada de FBR12 y de componentes de la cascada de señalización por citoquininas, ocasionaban el agravamiento de los fenotipos observados en el desarrollo del protoxilema en mutantes *fbr12*. La mutación en el gen regulador negativo de citoquininas *AHP6* provocaba la supresión del fenotipo mutante de *fbr12*. El tratamiento con la citoquinina benziladenina (BA) impidió la diferenciación del protoxilema de raíces de plantas silvestres, mientras que las plantas *fbr12* mostraban resistencia a dicho tratamiento. Estos resultados indicaban que para la especificación de las células del protoxilema mediada por citoquininas era necesaria la acción de FBR12. No obstante, el fenotipo de inhibición del crecimiento de la raíz principal en las plantas *fbr12* no concuerda con un defecto en la señalización de las citoquininas. De la misma forma, los resultados obtenidos con el mutante *fbr12* se contradecían con los datos observados en nuestro laboratorio en las plantas *siDHS*, en las que la señalización mediada por citoquininas parecía estar incrementada. El estudio del efecto de la aplicación de BA sobre el desarrollo del protoxilema de la raíz de las plantas

siDHS, permitirá contrastar nuestras observaciones con las recientemente publicadas [134].

3. Implicación de eIF5A en la organización del citoesqueleto de actina.

Como se ha descrito en los resultados del apartado 3.2.1., la aparición de alteraciones en la morfología de los pelos radiculares y la observación de defectos en cuanto a la expansión de las células del extremo radicular de las plantas de silenciamiento *siDHS*, sugerían la presencia de defectos en cuanto a la polimerización y organización del citoesqueleto de actina. El ápice de la raíz en crecimiento de *A. thaliana* consta de 4 partes claramente diferenciadas según la actividad celular: la zona meristemática, la zona de transición, la zona de elongación y la zona en la que termina el crecimiento celular [191]. En la zona de transición, las células post-mitóticas procedentes de la zona meristemática sufren una serie de cambios fundamentales para adquirir una arquitectura y fisiología celular adecuada. Para ello, en las células post-mitóticas es necesario el establecimiento de re-ordenamientos dramáticos del citoesqueleto de actina, que son esenciales para que posteriormente las células puedan expandirse rápida y axialmente en la zona de elongación [254]. La despolimerización de los filamentos de actina por la exposición del ápice radicular a latrunculina B, impide que las células entren en la zona de elongación, mientras que el meristemo apical mantiene el aporte de células hacia la zona de transición. Esto ocasiona que la raíz crezca de manera muy lenta y que la zona de transición se expanda basalmente [205]. La zona de transición es la única parte que, por sus características citológicas y metabólicas, es capaz de percibir y responder a un amplio rango de estímulos ambientales [191]. Además, la zona de transición está especializada en el transporte intercelular de auxinas [191, 255]. Los defectos en cuanto a la expansión celular observados en las plantas *siDHS* podrían explicarse por una alteración en la polimerización y organización de los filamentos de actina. Esta alteración sería la responsable de un re-ordenamiento inadecuado del citoesqueleto en las células de

Discusión

la zona de transición del ápice radicular. Además, se podría especular con que los defectos en la polimerización y organización del citoesqueleto de actina serían responsables de la alteración del transporte vesicular, que es esencial para la dinámica normal de los transportadores de auxinas. Defectos en el transporte de auxinas podrían provocar alteraciones en el flujo de señalización de estas fitohormonas. El defecto en la señalización de las auxinas causaría la alteración del balance hormonal entre éstas y las citoquininas, desplazando el equilibrio.

Los flujos de gradientes de auxinas se encuentran finamente regulados por una compleja red de transporte, en la que intervienen las proteínas PIN-FORMED (PIN) [256]. El papel de las proteínas PIN es fundamental para determinar la homeostasis de las auxinas [257]. La dinámica de las proteínas PIN está regulada mediante el control de su concentración y localización subcelular asimétrica, que a su vez está controlada mediante el tráfico vesicular. Los inhibidores del transporte de auxinas actúan generalmente interfiriendo sobre el tráfico vesicular [258]. Al mismo tiempo, el citoesqueleto de actina controla que el transporte vesicular se produzca correctamente [259-260]. Las drogas que causan la despolimerización de los filamentos de actina como la latrunculina B, alteran la localización de los transportadores de auxinas, provocando como consecuencia el desarrollo anormal de los procesos regulados por la señalización de las auxinas [261]. Por tanto, la correcta organización del citoesqueleto de actina es fundamental para que las plantas tengan una correcta sensibilidad hacia las auxinas [262].

Un aspecto esencial de este trabajo ha sido la búsqueda de potenciales dianas mRNAs de eIF5A, que pudieran ser clientes a nivel de transporte núcleo-citosol o durante el proceso de traducción. En este sentido, el descubrimiento de la función eIF5A para la traducción especializada de proteínas con 3 o más prolinas sucesivas [94], dio pie a la búsqueda en las bases de datos de ARNm candidatos cuya traducción dependería de la acción de eIF5A (Figura 53). El análisis de ontología permitió descubrir el enriquecimiento de proteínas implicadas en el control de la

Discusión

polimerización y organización del citoesqueleto de actina, entre las secuencias anotadas en las bases de datos con motivos de poli-prolinas (Tablas 2, 3 y 4). Este hecho ocurrió en *A. thaliana*, *S. cerevisiae* y *H. sapiens*, sugiriendo la conservación de dicho enriquecimiento. Dentro de las categorías funcionales obtenidas implicadas en la organización del citoesqueleto de actina de estos organismos, se encontraron las forminas. En *A. thaliana* se han identificado 21 isoformas de forminas que muestran patrones de expresión solapantes y una gran redundancia funcional [207-208]. Además, no existen anticuerpos específicos disponibles que faciliten el estudio traduccional particular de cada una de las forminas de *A. thaliana*. Por tanto, para estudiar la implicación de eIF5A en la traducción de las forminas en *A. thaliana*, sería necesaria la expresión de cada formina fusionada a una etiqueta que pudiera ser detectada inmunológicamente en las plantas *siDHS*. Esta estrategia, permitiría evaluar el nivel de expresión de las forminas en condiciones de pérdida de actividad de eIF5A. Mediante esta aproximación podríamos analizar el nivel de expresión de todas las proteínas candidatas a ser reguladas por eIF5A encontradas tras el análisis bioinformático, para las que no se dispondría de anticuerpos específicos.

En *S. cerevisiae* existen solo 2 forminas, Bni1 y Bnr1, hecho que facilita el estudio de la implicación de eIF5A en la traducción de esta familia de proteínas. Únicamente se ha descrito el papel de la formina Bni1 durante el proceso de reproducción sexual de levadura [104, 106]. Además, el descubrimiento de la necesidad de la espermidina para la formación de los “shmoo” y, en consecuencia, para una adecuada eficiencia en el apareamiento [109], nos dio la pista para estudiar la posible implicación de eIF5A y la formina Bni1 en la formación del “shmoo”. Tanto los mutantes de pérdida de función de Bni1 como los mutantes termosensibles de eIF5A (*tif51A*), mostraron el requerimiento de ambos para la formación del “shmoo” en levadura (Figura 60). Posteriormente pudimos demostrar que la traducción de los motivos de poli-prolinas de Bni1 requiere la actividad de eIF5A en levadura. Esto se consiguió mediante el etiquetado

Discusión

genómico de la formina Bni1 en cepas termosensibles de eIF5A1 (Tif51A) de levadura (Figura 61). Estos resultados relacionaban por primera vez la función molecular de eIF5A con una diana específica y un proceso fisiológico concreto [217].

Por otro lado, los resultados obtenidos en células HeLa con el inhibidor GC7 y la transfección con *sieIF5A1* han demostrado que la pérdida de actividad de eIF5A causa defectos en la organización del citoesqueleto de actina en *H. sapiens* (Figura 63). En humanos, el citoesqueleto de actina es de gran importancia para el establecimiento de la polaridad celular, morfogénesis, adhesión y migración celular [199, 218]. También, el citoesqueleto de actina es esencial para la determinación de la capacidad invasiva y migración celular de las células cancerosas durante la metástasis [218, 221-222]. El papel de las forminas es muy importante en este proceso de transición celular y migración de células epiteliales a células mesenquimales [263-265]. El factor eIF5A se ha implicado en numerosos tipos de cáncer, y se ha observado su sobre-expresión durante metástasis [111-112]. En este trabajo hemos realizado estudios mediante la estrategia de “*Click chemistry*”, puesta a punto en células humanas, para tratar de identificar alteraciones en proteínas nacientes del ribosoma con poli-prolinas e implicadas en el control de la organización del citoesqueleto de actina, cuya traducción estaría disminuida al tratar las células con GC7. Como resultado se identificó la proteína ezrina (Figura 65). Se ha demostrado la implicación de ezrina en morfogénesis, tráfico vesicular, adhesión, migración celular, y el desarrollo del cáncer [229-231].

El análisis WB de la formina FMNL1 y de la proteína ezrina al tratar células HeLa con GC7, mostró la disminución del nivel de estas proteínas. Sin embargo, la transfección con *sieIF5A1* pareció disminuir tan sólo la expresión de ezrina (Figura 66). Para profundizar en el estudio de la implicación de eIF5A en la traducción de FMNL1 y ezrina, se realizaron análisis de la tasa de traducción mediante la combinación de las estrategias de “*Click chemistry*” y WB. El tratamiento con el

Discusión

inhibidor GC7 causó un aparente incremento de la tasa de traducción de FMNL1 y ezrina (Figura 67). Esta aparente discrepancia con los resultados esperados podrían explicarse por distintas razones. En primer lugar, el efecto que ocasiona la molécula de GC7 sobre el ribosoma no se ha descrito en detalle hasta la fecha. En cambio, sí que se ha sugerido el efecto que pueden causar las PAs, espermidina y espermina, en el proceso traduccional. En concreto, tanto la espermidina como la espermina podrían intervenir acelerando el reconocimiento del codón del ARNm, alterando la estructura y la dinámica del brazo anti-codón del aminoacil-ARNt en el ribosoma [266]. La molécula de GC7 es un análogo de la espermidina que es capaz de competir con ésta durante la reacción de hipusinación [267]. Los resultados obtenidos en nuestro laboratorio podrían sugerir un efecto estimulador de GC7 sobre la traducción de proteínas con poli-prolinas, de una manera semejante al efecto que causaría la unión del factor eIF5A hipusinado al ribosoma. Sin embargo, que el tratamiento con GC7 provocara un incremento de la tasa de traducción de FMNL1 y ezrina (Figura 67), no concordaba con la disminución del nivel total de estas proteínas observada tras el tratamiento con el inhibidor (Figura 66). Esta discrepancia podría explicarse si el tratamiento con GC7 hubiera producido una alteración en la vida media de estas proteínas, mediante un aumento de la tasa de degradación a causa de un aumento anormal de la tasa de síntesis, hipótesis que debería ser contrastada. Otra posibilidad que explique estos resultados, sería que la mayor acumulación de proteína naciente se encuentre estancada en el ribosoma y de ahí su acumulación. En cualquier caso, esperamos poder aclarar estos resultados mediante estudios futuros con la técnica de “*Toeprint*”, que permite verificar estancamientos ribosomales.

El silenciamiento de eIF5A1 en células HeLa mediante ARNi resultó en la reducción de la expresión de ezrina. Aparentemente el nivel de FMNL1 no estaba afectado (Figura 66). Sin embargo, el estudio de la tasa de traducción demostró que el silenciamiento de eIF5A1 alteraba la tasa de síntesis de estas proteínas (Figura 68). Curiosamente la tasa de traducción de GAPDH, empleada como control,

Discusión

también parecía haberse afectado. Por el momento no podemos descartar que GAPDH, que ha sido identificada como posible diana en los estudios RIP en *A. thaliana*, sea una auténtica diana de eIF5A quizás a nivel de exportación del núcleo al citosol, de forma similar a lo que ocurre con la iNOS en humanos [114].

Para confirmar los resultados sobre la tasa de traducción de FMNL1 y ezrina se analizaron los perfiles traduccionales de estas proteínas. Los resultados descritos en el anexo (Figuras 73 y 74) demostraron para el caso de FMNL1 que, los perfiles traduccionales concordaban con una estimulación del avance ribosomal al tratar las células con GC7 y, por el contrario, con un mayor estancamiento en el caso de la transfección de *sieIF5A1*. Este mayor estancamiento sería también el esperado para el caso de la traducción de ezrina. Sin embargo, la transfección con *sieIF5A1* no produjo diferencias aparentes en su perfil traduccional. De nuevo, las limitaciones de la técnica podrían impedir la observación del estancamiento ribosomal durante la traducción de ezrina. También es importante constatar que las agrupaciones de secuencias con poli-prolinas en los distintos ARNm analizados no son equivalentes ni en su longitud ni en su ubicación en el mensajero, con lo que ante la ausencia de datos publicados hasta el momento sobre estancamiento ribosomal por poli-prolinas cuantificado mediante perfiles de polisomas, no podemos extraer conclusiones sobre estos estudios. Por lo tanto, los resultados obtenidos en el caso de los perfiles traduccionales de FMNL1 no son concluyentes y requerirían confirmación.

4. EF-P y eIF5A como mecanismos de control de calidad de la traducción.

El estudio de los mecanismos que controlan la traducción es fundamental para la comprensión del proceso global de expresión génica. En las células existen mecanismos de vigilancia que comprueban la calidad de los ARNm que se están traduciendo en los ribosomas (del inglés “*mRNA surveillance*”) [268]. De esta forma, los ARNm defectuosos son preferentemente degradados por la maquinaria

Discusión

de vigilancia. En la actualidad se conoce que estos mecanismos incluyen la degradación de ARNm que contienen codones de parada prematuros (del inglés “*Nonsense-Mediated mRNA Decay*” (NMD)), la degradación de ARNm que carecen de un codón de parada en pauta (del inglés “*Non-Stop mRNA decay*” (NSD)), y la degradación de ARNm que contienen ribosomas estancados dentro de la secuencia codificante (del inglés “*No-Go mRNA Decay*” (NGD)). En todos estos casos, la maquinaria traduccional reconoce indirectamente los defectos en los ARNm por el efecto provocado sobre los ribosomas en traducción activa [269-271]. La idea de que el proceso de “*mRNA surveillance*” es un proceso inespecífico se ha descartado, y actualmente se describe como un proceso activo específico que está altamente regulado [268]. Un ejemplo es la demostración del papel de la termoespermina en el control traduccional del factor de transcripción SAC51, en un mecanismo que implica un proceso particular de “*mRNA surveillance*”. El ARNm de SAC51 contiene 4 uORFs (del inglés “*upstream ORFs*”) en posición 5' antes del comienzo de la ORF principal. Se ha demostrado que la cuarta uORF posee un codón de parada prematuro que impide la traducción de la ORF principal, y por lo tanto, inhibe la traducción de SAC51. Se ha sugerido que la termoespermina podría interactuar con la región 5' que contiene las uORFs, y de esta manera actuar facilitando el alcance del ribosoma al comienzo de la ORF principal [272-273].

Por otro lado, se ha descrito que las proteínas no se traducen con la misma eficiencia. Las diferencias en cuanto a eficiencia traduccional son responsables de la variación fenotípica, e incluso de la divergencia entre especies [274]. En bacterias se han identificado varios motivos peptídicos que causan el estancamiento del ribosoma y que, en consecuencia, hacen disminuir la tasa de traducción. Entre estos motivos se encuentran las secuencias de poli-prolinas [275]. En bacterias, como sucede en el caso de eIF5A en eucariotas, el factor EF-P es necesario para aliviar el estancamiento del ribosoma durante la traducción de proteínas con al menos 3 prolinas sucesivas. Sin embargo, se ha demostrado que EF-P no es capaz de facilitar la traducción de otros péptidos que también causan estancamiento [73-

Discusión

74, 275]. El factor EF-P en bacterias y su ortólogo estructural eIF5A en eucariotas, deberían ser considerados como miembros de la maquinaria del mecanismo de vigilancia necesario para evitar la activación de la ruta NGD dentro del control de calidad de la traducción [276]. En este sentido, no sería de extrañar en un futuro próximo la identificación de ARNm clientes de eIF5A con secuencias ricas en prolinas sucesivas, implicadas en diversos procesos del desarrollo vegetal.

CONCLUSIONES

Conclusiones

1. Se ha desarrollado una técnica combinada 2D-E/WB para evaluar las diferencias en cuanto a la movilidad relativa de las distintas isoformas y proteoformas de eIF5A de *A. thaliana*. Mediante esta estrategia se ha conseguido monitorizar el proceso de hipusinación y demostrar por primera vez que el tratamiento con ABA inhibe la activación por hipusinación de la isoforma eIF5A1.
2. La desactivación condicional de la ruta dependiente de eIF5A produce alteraciones durante el desarrollo y en respuesta a condiciones adversas de crecimiento. Entre los fenotipos dependientes de eIF5A, con este trabajo hemos identificado alteraciones como: floración temprana, inhibición del crecimiento de la raíz, alteraciones en los pelos radiculares, ramificación del tallo y la presencia de TEs completamente lignificados (metaxilema) en los hipocotilos. También hemos descrito hipersensibilidad al ABA, sal y glucosa, así como niveles reducidos de NO. Algunos de estos fenotipos sugieren posibles interacciones con procesos de señalización hormonal como las citoquininas.
3. El factor eIF5A está implicado en el control de la transición floral a través de la regulación de la transcripción del florigeno FT. La desactivación de eIF5A provoca la sobre-expresión de FT independiente del fotoperiodo.
4. La generación del doble mutante *acl5-1 siDHS* ha demostrado la complementación funcional mutua entre las rutas de hipusinación y de señalización mediada por termoespermina en el proceso de xilogénesis, sugiriendo rutas independientes durante el proceso de maduración del xilema.
5. El análisis de ontología reveló un enriquecimiento de proteínas con poliprolinas entre las implicadas en la organización del citoesqueleto de actina. La alteración de la actividad de eIF5A provoca defectos en la estructuración de los filamentos de actina en *A. thaliana*, *S. cerevisiae* y *H. sapiens*.

Conclusiones

6. La reproducción sexual en la levadura *S. cerevisiae* requiere la actividad de eIF5A para la traducción de la formina Bni1 que regula la formación del citoesqueleto de actina.
7. En células humanas, el inhibidor competitivo de la enzima DHS, GC7, tiene un efecto estimulador sobre la traducción de proteínas con poli-prolinas, como la formina FMNL1 y ezrina. En cambio, el silenciamiento vía ARNi de eIF5A1 produce un defecto en la tasa de traducción de estas proteínas.
8. La actividad de eIF5A en el ribosoma parece estar conservada en eucariotas, y afecta fundamentalmente a proteínas con poli-prolinas implicadas en la organización del citoesqueleto de actina.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Material biológico, manipulación y condiciones de crecimiento.

1.1. *Escherichia coli*.

Para el clonaje de todas y cada una de las construcciones obtenidas en esta tesis doctoral se utilizaron células electrocompetentes de la cepa GC10. Para los experimentos de expresión heteróloga de proteínas se utilizaron células químicamente competentes de la cepa BL21(DE3) pLysE. Los plásmidos de *GATEWAY*TM con secuencias *ccdB* se propagaron en la cepa DB3.1TM de Life Technologies.

1.1.1. Medios de cultivo y temperatura de crecimiento.

Para el crecimiento de *E. coli* se utilizó el medio LB (Luria-Bertani, o alternativamente del inglés “*Lysogeny Broth*”) compuesto por 1% triptona, 0.5% extracto de levadura y 1% NaCl, ajustándose el pH a 7.0 con NaOH. En el caso del crecimiento de *E. coli* en medio sólido (LB agar) se añadió además 2% de agar bacteriológico. Para los experimentos de expresión heteróloga también se utilizó el medio 2x YT, compuesto por 1.6% peptona, 1% extracto de levadura y 1% de NaCl, pH 7.0. Previamente a su uso los medios de cultivo fueron esterilizados mediante autoclave a 120°C y 1 atmósfera de presión durante 20 minutos. Cuando fue necesario, una vez atemperado el medio (idealmente por debajo de 50°C), se añadió el antibiótico de selección adecuado. La temperatura estándar para el crecimiento de *E. coli* fue de 37°C.

1.1.2. Transformación de *E. coli*.

1.1.2.1. Electroporación.

Las células electrocompetentes de la cepa GC10 se generaron según el protocolo de Dower *et al.* (1988). 20-90 ng de ADN de la mezcla de ligación o recombinación a transformar se añadieron a 50 µl de una suspensión concentrada de células

electrocompetentes, y la mezcla resultante se pipeteó en una cubeta de electroporación de 0.2 cm de separación entre electrodos (“*Gene Pulser[®] Cuvette*” de Bio-Rad), estéril y previamente enfriada. La electroporación se realizó en el sistema “*Gene Pulser[®]*” de Bio-Rad, con unas condiciones de 200 Ohms, 25 μ F y 2.5 kV (12.5 kV/cm). Inmediatamente después del pulso se añadió 1 ml de LB y se dejaron recuperar las células a 37°C durante 1 hora en agitación [277]. Para la siembra en placa (LB agar) de las bacterias transformantes, la mezcla resultante de la electroporación se centrifugó durante 1-2 minutos a 12000 g y se eliminaron 950 μ l del sobrenadante. El precipitado de células se resuspendió en el volumen restante y se sembró en LB agar, conteniendo el antibiótico adecuado con ayuda de una varilla de vidrio estéril.

1.1.2.2. Choque térmico.

Las células BL21(DE3) pLysE químicamente competentes se prepararon de la siguiente manera: 1 ml de un cultivo crecido durante toda la noche se inoculó en 100 ml de LB líquido, el cual se dejó crecer a 37°C en agitación hasta alcanzar una OD600 (del inglés “*Optical Density*”, a 600 nm) de 0.2-0.3. Posteriormente, el cultivo se centrifugó a 3000 g a 4°C durante 15 minutos y se eliminó el sobrenadante. A partir de ese momento las células se mantuvieron todo el tiempo en frío. El precipitado de células se resuspendió con 50 ml de 100 mM Ca₂Cl, y se incubó durante 1 hora en hielo. Seguidamente, se volvió a centrifugar a 3000 g a 4°C durante 15 minutos y se eliminó el sobrenadante. El precipitado de células se resuspendió en 5 ml de 100 mM Ca₂Cl y 15% glicerol. Finalmente se hicieron alícuotas de 150-200 μ l en tubos de 1.5 ml que se almacenaron a -80°C.

Para las transformaciones, 20-90 ng de ADN de la mezcla de ligación o recombinación a transformar, se añadieron a 150 μ l de una suspensión concentrada de células químicamente competentes. La mezcla resultante se incubó durante 30 minutos en hielo, y a continuación se realizó un choque térmico de 5 minutos a 37°C. Tras el choque se añadió 1 ml de LB, y se dejaron recuperar las células a

37°C durante 1 hora en agitación. La siembra de las bacterias transformantes en LB agar se realizó como se detalla anteriormente.

1.2. *Agrobacterium tumefaciens*.

Para la agro-transformación de *A. thaliana* y los experimentos de expresión transitoria y BiFC en *N. benthamiana*, se utilizaron células químicamente competentes de la cepa GV3101/pMP90.

1.2.1. Medios de cultivo y temperatura de crecimiento.

Para el crecimiento de *A. tumefaciens* se utilizó LB o LB agar descrito previamente. La temperatura estándar para el crecimiento de *A. tumefaciens* fue de 28°C.

1.2.2. Transformación de *A. tumefaciens*.

Las células químicamente competentes de la cepa GV3101/pMP90 se prepararon según el protocolo de Chen *et al.* (1994). 0.5-1 µg del ADN a transformar se añadieron a una suspensión concentrada de dichas células y la mezcla se incubó 10 minutos en hielo. Posteriormente, las mezclas se congelaron en nitrógeno líquido durante 5 minutos y se dejaron descongelar durante 25 minutos a 37°C. Seguidamente se añadió 1 ml de LB y se dejaron recuperar las células a 28°C durante 2-3 horas en agitación [278]. La siembra de las bacterias transformantes en LB agar se realizó como se detalla anteriormente.

1.3. *Saccharomyces cerevisiae*.

1.3.1. Cepas.

La cepa de tipo silvestre utilizada fue BY4741 (fuente Euroscarf). También se utilizó la cepa mutante de delección de la formina Bni1 *bni1Δ* (fuente Euroscarf), los mutantes termosensibles del factor eIF5A1 *tif51A-1* y *tif51A-3* (fuente Li *et al.*

(2011) [216]), y el mutante *tif51A-1* capaz de expresar la proteína Bni1 etiquetada con 6 copias de HA, PAY725 (fuente Li *et al.* (2014) [217]).

1.3.2. Medios y condiciones de crecimiento.

Las cepas de *S. cerevisiae* se crecieron en medio líquido YPD (del inglés “*Yeast extract-Peptone-Dextrose*”) compuesto por 1% extracto de levadura, 2% peptona y 2% glucosa. Como condiciones permisivas las células se crecieron a 25°C. Como condiciones no permisivas se crecieron a 37°C.

1.3.3. Tratamiento con factor α .

Se realizaron tratamientos con 10 $\mu\text{g/ml}$ de factor α (Sigma-Aldrich) durante 2 horas.

1.4. *Arabidopsis thaliana*.

Como genotipo silvestre se utilizaron plantas de *A. thaliana* ecotipo *Col-0*, a partir de las cuales se generaron los mutantes de silenciamiento (*siDHS*, *siEIF5A1* *siEIF5A2* y *siEIF5A3*). Además, la línea *siDHS* obtenida fue utilizada para generar dobles mutantes *siDHS GFP-mTn*. También se utilizó la línea mutante *acl5-1* (fuente Imai *et al.* (2004) [32]) para generar los dobles mutantes *acl5-1 siDHS*. La generación de las plantas transgénicas se describe en el apartado 2.1.2. de resultados. Por otro lado, en este trabajo también se utilizaron plantas transgénicas del mutante dominante negativo condicional *CKA3^{mut}* (fuente Moreno-Romero *et al.* (2008) [56]).

1.4.1. Cultivo *in vitro*.

1.4.1.1. Medios de cultivo.

Para el crecimiento *in vitro* de *A. thaliana* se utilizó el medio Murashige & Skoog (MS) de composición 2.45 g/l de sales MS (Duchefa Biochemie) y 1.28 g/l (6mM)

MES, ajustándose el pH a 5.7 con KOH. En otros casos que se especifican a lo largo del apartado de resultados, al medio de cultivo MS se le adicionó 1% sacarosa. Para la solidificación del medio se añadió 1% de “*Phyto agar*” (Duchefa Biochemie). Se utilizaron placas de Petri de 9 o 14 cm de diámetro, placas cuadradas de 12 cm de lado. El medio se esterilizó mediante autoclave como se describe previamente. Cuando fue necesario, una vez atemperado el medio por debajo de 50°C, se añadió el antibiótico o el compuesto de tratamiento adecuado.

1.4.1.2. Esterilización y siembra de las semillas.

Para llevar a cabo la esterilización de las semillas de *A. thaliana* se utilizó la solución de esterilización I (etanol 70%, Tritón X-100 0.005%) y la solución de esterilización II (etanol absoluto o en su defecto al 96%). En primer lugar se añadió 1 ml de solución I por cada 30-40 μ l de semillas en un tubo de 1.5 ml, 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 12000 g durante 30 segundos) y se eliminó el sobrenadante. Posteriormente se añadió 1 ml de solución II y se volvió a mezclar por inversión durante 3-4 minutos más. Las semillas se decantaron hacia el fondo del tubo como se describe anteriormente y se recogieron mediante la pipeta para depositarlas sobre papel de filtro previamente autoclavado (120°C, 1 atm de presión, 20 minutos), donde se dejaron secar durante 15 minutos en la cabina de flujo laminar. La siembra en placa de las semillas se realizó con ayuda de varillas de vidrio o puntas de pipeta estériles. Las placas se sellaron mediante cinta porosa (Leukopor o Micropore), y las semillas se dejaron estratificar durante 2-3 días a 4°C en oscuridad, tras los cuales se llevaron a la cámara de cultivo *in vitro*.

1.4.1.3. Condiciones de crecimiento *in vitro*.

El crecimiento estándar *in vitro* de *A. thaliana* se realizó en una cámara de cultivo a una temperatura de 22 \pm 1°C en condiciones de día largo (16 horas de luz y 8 horas

de oscuridad), con una intensidad lumínica de $100-110 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. En otros casos especificados a lo largo del apartado de resultados, el crecimiento se llevó a cabo en condiciones de día corto (8 horas de luz y 16 horas de oscuridad), a la misma temperatura y con la misma intensidad lumínica que en día largo.

1.4.1.4. Tratamiento con dexametasona.

El tratamiento con dexametasona (Sigma-Aldrich) estándar utilizado durante el crecimiento *in vitro* de *A. thaliana* se realizó a una concentración final de $10 \mu\text{M}$ a partir de una solución concentrada 0.1 M , disuelta en dimetilsulfóxido (DMSO). Para el tratamiento control se utilizó el mismo volumen que se añadió de la solución de dexametasona pero en este caso únicamente de DMSO. El tratamiento con dexametasona se realizó cultivando las plantas desde el momento de la siembra en un medio MS con dexametasona. Tal y como se refiere en el apartado de resultados de esta tesis y, de manera alternativa, también se realizaron experimentos en los que se inició la inducción con dexametasona en estadios más tardíos del crecimiento, cultivando las plantas durante 7 días en MS, y posteriormente traspasándolas a un medio con dexametasona durante 3 días más. El traspaso de las plantas se realizó con pinzas, o mediante el cultivo de las plantas sobre una membrana de nylon “*MTS Nyltal 25-63 \mu\text{M}*” estéril, que a su vez se depositó sobre el medio sólido.

1.4.1.5. Tratamientos con ABA.

Los tratamientos con ABA se realizaron a partir de una solución de concentrada de 10 mM ABA (Sigma-Aldrich) disuelta en 50 mM Tris-HCl pH 8.8. En el estudio de las alteraciones causadas en el perfil 2D-E de eIF5A por el tratamiento con ABA (apartado 1.4. de resultados), plantas cultivadas durante 9 días en MS, se traspasaron a un medio con $10 \mu\text{M}$ ABA durante 3 horas. Para el estudio de la implicación del factor eIF5A en la señalización de ABA las plantas (apartado 2.3.1. de resultados), en los experimentos de establecimiento de plántula se cultivaron

Materiales y Métodos

durante 2 semanas en medio MS con concentraciones crecientes de esta fitohormona (0.1, 0.2, 0.3, 0.4 y 0.5 μM), y con una cantidad de 2 μM ABA para el caso del análisis del porcentaje de germinación. En todos los casos, como control de los tratamientos de ABA, se añadió al medio el mismo volumen de Tris-HCl pH 8.8 50 mM que se había añadido de la solución concentrada de ABA.

1.4.1.6. Tratamientos con sal (NaCl) y glucosa.

El tratamiento con sal se realizó cultivando las plantas en medio MS con una concentración de 50 mM NaCl desde el momento de la siembra durante 2 semanas. En el caso del tratamiento con glucosa las plantas se cultivaron previamente en medio MS 5 días, y posteriormente se traspasaron a un medio con 200 mM glucosa donde crecieron durante 7-10 días más.

1.4.1.7. Tratamiento con 4-EGI-1.

Plántulas de 9-10 días de edad cultivadas *in vitro*, se trataron con 200 μM de 4-EGI-1 (Calbiochem) a partir de una solución concentrada 50 mM disuelta en DMSO. Para ello, 300 mg de plántulas se pasaron a tubos de 50 ml donde se incubaron con 2 ml de MS líquido al que se le había añadido previamente 200 μM de 4-EGI-1, y se incubaron durante 1 y 2 horas en la poyata a temperatura ambiente mediante una plataforma agitadora. En el tratamiento control se sustituyó el volumen añadido de la solución concentrada de 4-EGI-1 por DMSO. Posteriormente el material se recogió para su procesado (véase más adelante).

1.4.2. Cultivo en el invernadero.

1.4.2.1. 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 envolvente y

se llevaron a la cámara de estratificación donde permanecieron durante 2-3 días en oscuridad a 4°C. Tras la estratificación, las plantas se llevaron a una cámara de cultivo en día largo con las mismas condiciones de crecimiento que en cultivo *in vitro*.

1.4.2.2. Tratamiento con dexametasona.

El tratamiento con dexametasona en el invernadero se realizó mediante la pulverización de una disolución compuesta de 10 µM dexametasona y 0.015% (v/v) Silwet L-77, elaborada a partir de una solución concentrada de dexametasona 25 mM disuelta en etanol absoluto. La pulverización de la dexametasona se inició sobre plántulas desarrolladas de 12 días de edad, y se realizó 3 días por semana en días alternos durante 30 días. En el tratamiento control se sustituyó el volumen añadido de dexametasona 25 mM por etanol absoluto.

1.4.3. Transformación por agro-infección.

La transformación de *A. thaliana* se realizó mediante *A. tumefaciens* por el método “*floral dip*” [279] según el protocolo de Clough *et al.* (1998).

1.5. *Nicotiana benthamiana*.

Para los experimentos de expresión transitoria y BiFC se utilizaron plantas de *N. benthamiana* silvestres.

1.5.1. Cultivo y condiciones de crecimiento.

Las plantas de *N. benthamiana* se cultivaron en el invernadero en una cámara de crecimiento bajo las mismas condiciones controladas de día largo que se describen anteriormente.

1.5.2. Agro-transformación, expresión transitoria y BiFC.

La transformación de *N. bethamiana* para los experimentos de expresión transitoria y BiFC se realizó según el protocolo de Belda *et al.* (2012) [9]. En los experimentos de validación del silenciamiento (apartado 2.1.1. de resultados) las cepas de *A. tumefaciens* conteniendo las construcciones de silenciamiento, se infiltraron con una OD600 10 veces superior a las cepas conteniendo las construcciones que codificaban las proteínas a silenciar.

1.5.3. Tratamiento con dexametasona.

Se utilizó una disolución compuesta por 10 μ M dexametasona y 0.02% Silwet L-77, preparada a partir de una solución concentrada de dexametasona 0.1 M disuelta en DMSO. La aplicación de la dexametasona se realizó justo antes y un día después de la agro-infiltración mediante una brocha de pelo fino, tanto en el haz y como en el envés de las hojas.

1.6. *Homo sapiens*.

1.6.1. Línea celular, medios de cultivo y condiciones de crecimiento.

Se utilizaron células HeLa. El medio estándar para el crecimiento de esta línea celular fue el medio comercial DMEM (del inglés “*Dulbecco's Modified Eagle Medium*” de Gibco[®], Life Technologies), suplementado con 10% de suero bovino fetal y antibióticos (penicilina (10 u/ml) y estreptomycin (10 μ g/ml), añadidos a partir de la solución comercial “*Penicillin-Streptomycin*” 10000 u/ml Gibco[®], Life Technologies). El crecimiento se realizó a 37°C en cultivos celulares de monocapa adherente. El medio de crecimiento se renovó cada 24 horas.

1.6.2. Tratamiento con GC7.

Los cultivos de células HeLa se trataron con 10 μ M o 30 μ M GC7 durante diferentes tiempos de incubación, a partir de una solución concentrada de 10 mM GC7 (Biosearch Technologies) disuelto en 10 mM ácido acético. En el momento de iniciar el tratamiento con GC7 las células tuvieron una confluencia del 30-50%. En este momento el medio de crecimiento se renovó, sustituyéndolo por un medio DMEM/F12 (Gibco[®], Life Technologies) suplementado con suero y antibióticos como se describe anteriormente, y se le añadió 10 μ M o 30 μ M GC7. En los tratamientos control se añadió el mismo volumen de la solución concentrada de GC7 pero únicamente de 10 mM ácido acético. Se realizaron diferentes tiempos de incubación tal y como se describe en los resultados.

1.6.3. Transfección con *siEIF5A1*.

Se siguió el protocolo descrito por Pérez-Benavente *et al.* (2013) [280]. El ARNsi utilizado fue “*ON-TARGET plus Human EIF5A siRNA*” de Dharmacon (GE Healthcare).

2. Técnicas de análisis y manipulación de ácidos nucleicos.

2.1. Extracción del ADN plasmídico (ADNp) de *E. coli*.

Se siguió un método basado en la lisis alcalina de las células. 1.5 ml de un cultivo saturado de *E. coli* se centrifugaron a 12000 g durante 1 minuto. El sobrenadante se eliminó y el precipitado de células se resuspendió con 0.25 ml de solución I (1% glucosa; 25mM Tris-HCl pH 8.0; 10 mM EDTA (del inglés “*Ethylenediaminetetraacetic acid*”) pH 8.0 y 0.1 mg/ml ARNasa). A continuación, se añadieron 0.25 mL de Solución II (1% SDS y 0.2 N NaOH) y se mezcló por inversión durante 2-3 minutos. Posteriormente se adicionaron 0.35 ml de solución III (3 M NaAc pH 5.5), volviendo a mezclar. Seguidamente se centrifugó la mezcla neutralizada durante 15 minutos a 12000 g y se recogió el sobrenadante, el cual se

precipitó en hielo durante 30 minutos con 0.7 volúmenes de isopropanol. Se centrifugó 15 minutos a 12000 g y se descartó el sobrenadante. Posteriormente, el precipitado de ADN se lavó con etanol al 70%, centrifugando 5 minutos a 12000 g. Una vez seco, el precipitado se resuspendió en 50 µl de agua estéril.

2.2. Reacciones de PCR.

Para la amplificación de las secuencias de ARNsi (*siDHS*, *sieIF5A1*, *sieIF5A2* y *sieIF5A3*) flanqueadas por los sitios *attB* y su posterior clonación *GATEWAYTM* en el vector destino *pOpOff2* (Tabla 6), se utilizó la enzima “*Pfx50TM DNA Polymerase*” de Life Technologies. Las reacciones de PCR contenían, en un volumen final de 20 µl, los siguientes componentes: “*Pfx50TM PCR Mix 1x*” (Life Technologies), dNTP Mix cada uno 0.3 mM, cebador directo o Fdw (del inglés “*Fordward*”) 0.625 µM, cebador reverso o Rev (del inglés “*Reverse*”) 0.625 µM, 200 ng de ADN genómico y 2.5 u de “*Pfx50TM DNA Polymerase*” (Life Technologies). Las condiciones utilizadas fueron las siguientes: 1 ciclo de desnaturalización a 94°C durante 2 minutos; 35 ciclos de desnaturalización (30 segundos a 95°C), hibridación de los cebadores (30 segundos a 50-60°C) y extensión (1 minuto a 68°C); 1 ciclo de 5 minutos a 68°C.

Para la amplificación de cada una de las ORFs de *eIF5A1*, *eIF5A2* y *eIF5A3* en fusión N-terminal con el sitio de corte de la proteasa “*PreScission 3C*” (3C) y flanqueadas por los sitios *attB* para su posterior clonación *GATEWAYTM* en el vector destino *pDest15* (Tabla 7), se realizaron dos rondas de amplificación de PCR. En la primera ronda de amplificación se utilizaron 2 µl por reacción de ADNc sintetizado como se describe más adelante en el punto 2.6. En la segunda ronda de amplificación se utilizaron 100-200 ng de ADN generado en la primera amplificación. En las reacciones de PCR se utilizó la enzima “*Pfx50TM DNA Polymerase*” de Life Technologies, que se realizaron tal y como se describe anteriormente, a excepción del ADN utilizado como molde.

Amplificación	Cebador	Secuencia
<i>siDHS</i>	Fdw	5'-GGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT GGCAAAGGATTATTGACTACAAGAC -3'
	Rev	5'-GGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT TATACTGTGATGCTACCATAGCC -3'
<i>steIF5A1</i>	Fdw	5'-GGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT AAATATCCAAAATAGGAGTCACC -3'
	Rev	5'-GGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT GTGAGACTAACAAAGCCTCCCCTT-3'
<i>steIF5A2</i>	Fdw	5'-GGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT TTCGGAGAAGATGAGATTGGGA-3'
	Rev	5'-GGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT CCTTCTCTTCCCCTCCTATATAAAA-3'
<i>steIF5A3</i>	Fdw	5'-GGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT GGGAAACACATGTGGGCTTAAATT-3'
	Rev	5'-GGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT AGGCTATGTATTATCAAGTTTGACAGAGTC-3'

Tabla 6. Secuencias de los cebadores utilizados para la amplificación de las secuencias de ARNsi para su clonación *GATEWAY*TM. Las secuencias *attB* se marcan en negrita.

Para la amplificación de las ORFs flanqueadas por los sitios *attB*, de las enzimas de hipusinación *DHS* y *DOHH*, y de cada una de las isoformas de eIF5A, con o sin codón de parada de la traducción, con o sin las secuencias 5' o 3'-UTR, para su clonación *GATEWAY*TM en los vectores destino *pMDC43*, *pMDC83*, *PYFN43*, *pYFC43*, *pQLinkGD* y *pQLinkHD* (Tabla 8), se utilizó la enzima “*Pfx50*TM DNA Polymerase” de Life Technologies, tal y como se describe anteriormente, utilizando como molde 2 µl por reacción de ADNc sintetizado como se describe más adelante en el punto 2.6.

Todos los productos de amplificación se purificaron mediante el kit “*NucleoSpin*[®] Gel and PCR Clean-up” (Macherey-Nagel), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Amplificación	Ronda	Cebador	Secuencia
<i>3C-DHS</i>	1 ^a	Fdw	5'- <u>CTGTTCCAGGGGCCCATGGAGGATGATC</u> GTGTTTTTC-3'
	2 ^a	Fdw	5'- GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGG CTTACTGGAAGTTCTGTTCCAGGGGCCCATG-3'
	1 ^a y 2 ^a	Rev	5'- GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGG GTTTAAGTCTTAGACTCACAGGT-3'
<i>3C-DOHH</i>	1 ^a	Fdw	5'- <u>CTGTTCCAGGGGCCCATGGAATCTAATG</u> GATCAGTT-3'
	2 ^a	Fdw	5'- GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGG CTTACTGGAAGTTCTGTTCCAGGGGCCCATG-3'
	1 ^a y 2 ^a	Rev	5'- GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGG GTTTAGTGAACAAGCGGGTCTTG-3'
<i>3C-eIF5A1</i>	1 ^a	Fdw	5'- <u>CTGTTCCAGGGGCCCATGTCCGACGAGG</u> AGCATCAC-3'
	2 ^a	Fdw	5'- GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGG CTTACTGGAAGTTCTGTTCCAGGGGCCCATG-3'
	1 ^a y 2 ^a	Rev	5'- GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGG GTTCACCTGGGACCGATGTCCTT3'
<i>3C-eIF5A2</i>	1 ^a	Fdw	5'- <u>CTGTTCCAGGGGCCCATGTCTGACGACG</u> AGCACCAC-3'
	2 ^a	Fdw	5'- GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGG CTTACTGGAAGTTCTGTTCCAGGGGCCCATG-3'
	1 ^a y 2 ^a	Rev	5'- GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGG GTTTACTTGCCACCACCACTTC-3'
<i>3C-eIF5A3</i>	1 ^a	Fdw	5'- <u>CTGTTCCAGGGGCCCATGTCAGACGACG</u> AGCATCAC-3'
	2 ^a	Fdw	5'- GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGG CTTACTGGAAGTTCTGTTCCAGGGGCCCATG-3'
	1 ^a y 2 ^a	Rev	5'- GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGG GTTTACTTGGGACCAACTTCCTT-3'

Tabla 7. Secuencias de los cebadores utilizados para la amplificación de las secuencias de interés fusionadas al sitio de corte de la proteasa 3C (subrayados) para su clonación *GATEWAYTM*. Las secuencias *attB* se marcan en negrita.

Amplificación	Tipo	Cebador	Secuencia
<i>DOHH</i>	sin codón de parada	Fdw	5'- GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGG CTTAATGGAATCTAATGGATCAGTT-3'
		Rev	5'- GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGG GTCGTGAACAAGCGGGTCTTGCCT-3'
<i>DHS</i>	sin codón de parada	Fdw	5'- GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGG CTTAATGGAGGATGATCGTGTTC-3'
		Rev	5'- GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGG GTCAGTCTTAGACTCACAGGTTTG-3'
	+3'-UTR	Fdw	5'- GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGG CTTAATGGAGGATGATCGTGTTC-3'
		Rev	5'- GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGG GTCGGCAAAGGATTATTGACTACA-3'
<i>eIF5A1</i>	sin codón de parada	Fdw	5'- GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGG CTTAATGTCCGACGAGGAGCATCAC-3'
		Rev	5'- GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGG GTCCTTGGGACCGATGTCCTT AAG-3'
	+3'-UTR	Fdw	5'- GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGG CTTAATGTCCGACGAGGAGCATCAC-3'
		Rev	5'- GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGG GTC AAGGAAAAGGTTGAAGAAGAT-3'
<i>eIF5A2</i>	sin codón de parada	Fdw	5'- GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGG CTTAATGTCTGACGACGACCAC-3'
		Rev	5'- GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGG GTCCTTGCCACCACCACTTCCTT-3'
	Sin codón de parada +5'-UTR	Fdw	5'- GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGG CTTACCTTCCTTCCCCTCCTATA-3'
		Rev	5'- GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGG GTCCTTGCCACCACCACTTCCTT-3'
<i>eIF5A3</i>	sin codón de parada	Fdw	5'- GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGG CTTAATGTCAGACGACGAGCATCAC-3'
		Rev	5'- GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGG GTCCTTGGGACCAACTTCCTTGAG-3'
	+3'-UTR	Fdw	5'- GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGG CTTAATGTCAGACGACGAGCATCAC-3'
		Rev	5'- GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGG GTCGGGAAACACATGTGGGCTTA-3'

Tabla 8. Secuencias de los cebadores utilizados para la amplificación de las secuencias de interés con o sin las secuencias 3' o 5'-UTRs, o sin codón de parada, para la clonación *GATEWAYTM*. Las secuencias *attB* se marcan en negrita.

2.3. Técnicas de clonación.

2.3.1. Clonación *GATEWAY*TM.

Se utilizó el sistema de clonación *GATEWAY*TM de Life Technologies basado en el proceso de recombinación del fago lambda.

2.3.1.1. Reacción BP.

En un tubo de 1.5 ml se añadieron 20-100 ng (2-3 µl) del producto de amplificación de la PCR flanqueado por sitios *attB*, 100 ng (1-2 µl) del vector de entrada *pDONR-Zeo* (Life Technologies) y 1 µl de “*BP Clonase*TM *II enzyme mix*” (Life Technologies), y la mezcla se agitó mediante vortex suave. La mezcla se incubó toda la noche a 25°C. Posteriormente, se añadió 1 µl de proteinasa K 1%, y se incubó 10 minutos a 37°C, tras los cuales se colocó la muestra en hielo, y se procedió a la transformación de *E. coli* cepa GC10 por electroporación. La selección de bacterias transformantes se realizó añadiendo 50 µg/ml zeocina al medio de crecimiento.

2.3.1.2. Reacción LR.

En un tubo de 1.5 ml se añadieron 100 ng (1-3 µl) del vector de entrada recombinante con el inserto flanqueado por sitios *attL*, 100 ng (1-3 µl) del vector de destino adecuado y 1 µl de “*LR Clonase*TM *II enzyme mix*” (Life Technologies), y la mezcla se agitó mediante vortex suave. La mezcla se incubó toda la noche a 25°C. Posteriormente, se añadió 1 µl de proteinasa K 1%, y se incubó 10 minutos a 37°C, tras los cuales se colocó la muestra en hielo, y se procedió a la transformación de *E. coli* por electroporación. En la tabla 9 se representan los vectores destinos utilizados en este trabajo, así como sus marcadores de selección.

Nombre	Fuente	Selección Bacterias	Selección Plantas
<i>pMDC43</i>	Curtis <i>et al.</i> (2003)	Kanamicina 50 µg/ml	Higromicina 15 µg/ml
<i>pMDC83</i>	Curtis <i>et al.</i> (2003)	Kanamicina 50 µg/ml	Higromicina 15 µg/ml
<i>pYFN43</i>	Belda-Palazón <i>et al.</i> (2012)	Kanamicina 50 µg/ml	Higromicina 15 µg/ml
<i>pYFC43</i>	Belda-Palazón <i>et al.</i> (2012)	Kanamicina 50 µg/ml	Higromicina 15 µg/ml
<i>pOpOff2</i>	Wielopolska <i>et al.</i> (2005)	Kanamicina 50 µg/ml	Higromicina 15 µg/ml
<i>pQLinkGD</i>	Addgene #13673	Ampicilina 100 µg/ml	-
<i>pQLinkHD</i>	Addgene #13668	Ampicilina 100 µg/ml	-
<i>pDest15</i>	Life Technologies	Ampicilina 100 µg/ml	-

Tabla 9. Vectores destino utilizados para la clonación *GATEWAYTM*, así como el antibiótico empleado para la selección de transformantes en bacterias y/o plantas.

2.3.2. Clonación LIC.

El método seguido fue el descrito por Scheich *et al.* (2007) [144]. Las ORFs amplificadas por PCR de *eIF5A1-3*, y *DHS* y *DOHH* se clonaron previamente mediante tecnología *GATEWAYTM* en los vectores de expresión *pQLinkGD* y *pQLinkHD*, respectivamente. En primer lugar, His-DOHH se subclonó como fragmento de restricción *PacI-PacI* en el vector *pQLinkHD-DHS* digerido con *SwaI*, generando la construcción doble His-DHS/His-DOHH. Para ello se realizaron los siguientes pasos:

Digestiones con *PacI* o *SwaI*:

- 2.5 µg del plásmido *pQLinkHD -DOHH* se mezclaron con 90 u de *PacI* (Fermentas) en un volumen final de 100 µl y se incubó a 37°C durante toda la noche. Se utilizó tampón “*Buffer PacI*” (Fermentas).
- 2.5 µg del plásmido *pQLinkHD -DHS* se mezclaron con 90 u de *SwaI* (Fermentas) en un volumen final de 100 µl a 30°C durante toda la noche. El tampón usado fue “*Buffer O*” (Fermentas).

Materiales y Métodos

Los productos de restricción una vez separados y purificados como se detalla anteriormente, se trataron diferencialmente con T4 polimerasa dependiendo de la restricción realizada:

- 50 ng del fragmento *PacI-PacI* se mezclaron con 2.5 mM de dCTP, 1 u de T4 ADN polimerasa (Thermo Scientific) y 3 µl de tampón de reacción 5x (335mM Tris-HCl pH 8.8, 33 mM MgCl₂, 5 mM ditiotreitól (DTT), 84 mM (NH₄)₂SO₄ en un volumen total de 15 µl.
- 50 ng del fragmento *SwaI*, se mezclaron con 2.5 mM de dGTP, 1 u de T4 polimerasa y 3 µl de tampón de reacción 5x en un volumen total de 15 µl.

Las mezclas se incubaron 20 minutos a 22°C, y 20 minutos a 65°C (inactivación). Posteriormente se procedió a la reacción de ligación. Se mezcló la misma cantidad de ambos fragmentos (mínimo 10 ng) y se incubó 2 minutos a 65°C. Se añadió 6 mM EDTA y se incubó toda la noche a 25°C. Posteriormente se transformó *E. coli* cepa GC10 por electroporación.

En segundo lugar, se realizó la subclonación de cada una de las isoformas de eIF5A fusionadas a GST (GST-eIF5A1-3) como fragmento de restricción *PacI-PacI* en el vector *pQLinkHD-DHS/His-DOHH* digerido con *SwaI* para generar la construcción triple His-DHS/His-DOHH/GST-eIF5A1-3. Para ello, se realizaron los mismos pasos que para la subclonación de His-DOHH en el vector *pQLinkHD-DHS*.

Finalmente, las construcciones generadas se introdujeron en *E. coli* cepa BL21(DE3) pLysE por choque térmico.

2.4. Extracción del ARN total de *A. thaliana*.

En todas y cada una de las técnicas de manipulación de ARN llevadas a cabo en este trabajo, tanto el material como los compuestos utilizados, se autoclavaron (120°C, 1 atm, 40 minutos) para conseguir la eliminación de las ARNasas.

Además, en algunos casos el material se lavó previamente con SDS 1% y agua autoclavada libre de nucleasas. Para la extracción de ARN total procedente de *A. thaliana*, por lo general se partió de 100 mg de tejido vegetal fresco, el cual se pulverizó con nitrógeno líquido con ayuda de un mortero. Para dicha extracción se utilizó el sistema “*Real total RNA spin plants and fungi kit*” de Real (Durviz) o el kit “*NucleoSpin[®] RNA Plant*” de Macherey-Nagel, siguiendo las instrucciones del fabricante. Para asegurarnos de la completa eliminación del ADN contaminante, la muestra de ARN total se trató además con DNasa, utilizando el sistema “*Ambion[®] TURBO DNA-free[™] DNase Treatment and Removal Reagents*” de Life Technologies, siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente, a la preparación de ARN total libre de ADN se le añadió un volumen de CILi 6 M y se incubó en hielo durante al menos 1 hora (idealmente durante toda la noche). Tras la precipitación del ARN, se centrifugó a 12000 g durante 15 minutos a 4°C y se eliminó el sobrenadante. El precipitado de ARN se lavó con etanol 70% centrifugando 5 minutos a 12000 g, y se dejó secar en la poyata. Una vez seco, el precipitado se resuspendió en 50 µl de agua estéril. La integridad del ARN extraído se comprobó mediante un gel de electroforesis.

2.5. Electroforesis de ácidos nucleicos (ADN y ARN).

Para la separación del ADN se utilizaron geles de agarosa al 1%, mezclada y disuelta por calentamiento en el microondas con tampón de electroforesis 1x TBE (Tris, Borato, EDTA) de Bio-Rad. Una vez atemperada la mezcla, se añadió una gota de una solución de bromuro de etidio al 0.07% (AppliChem). El tampón añadido para la carga de las muestras fue “*6x DNA Loading Dye*” (Fermentas).

En el caso de las electroforesis de ARN los geles utilizados fueron de agarosa al 1.3% en TBE. Como tampón de carga se utilizó “*2x RNA Loading Dye*” (Fermentas).

Una vez finalizada la electroforesis, para la visualización del ADN o ARN se utilizó un transiluminador de luz ultravioleta (UV) a 254 nm de longitud de onda (Uvitec), y en el caso de iluminación para extraer fragmentos de agarosa se utilizó una lámpara UV a 366 nm.

2.6. Reacciones de transcripción reversa.

Para el paso de ARNm a ADNc se utilizó hasta 1 µg de ARN total purificado, mediante el kit “*PrimeScriptTM RT reagent kit (Perfect Real Time)*” de Takara, siguiendo el protocolo de transcripción reversa descrito por el fabricante para “*SYBR[®] Green assay*”. El volumen de la muestra de ADNc obtenido (10 µl) se llevó a 100 µl con agua libre de nucleasas.

2.7. PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR).

Para el análisis de qPCR se utilizó el kit “*Premix Ex Taq (Perfect Real Time)*” de Takara o el “*PyroTaq EvaGreen qPCR Mix Plus (ROX)*” de Cultek, utilizando 0.4 µl de muestra de ADNc en cada reacción de 10 µl totales, siguiendo las instrucciones del fabricante. En la tabla 10 se describe la secuencia y la concentración final de los cebadores utilizados para cada amplificación. La concentración adecuada se determinó previamente en el laboratorio de manera experimental testando distintas concentraciones. Cada reacción se depositó en la placa “*MicroAmp[®] Fast Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode (0,1 ml)*” de Applied Biosystems. El equipo utilizado fue el “*7500 Fast Real-Time PCR System*” de Applied Biosystems. Las condiciones de reacción empleadas fueron las siguientes: 1 ciclo de desnaturalización a 95°C durante 30 segundos (Takara) o 15 minutos (Cultek); 40 ciclos de desnaturalización (15 segundos a 95°C), hibridación de los cebadores (30 segundos a 55°C) y extensión (30 segundos a 60°C); 1 ciclo de disociación (15 segundos a 95°C, 1 minuto a 60°C, 15 segundos a 95°C)

Con los resultados de la qPCR, se realizó una medida relativa de la expresión génica mediante el método de $2^{\Delta\Delta Ct}$ [281], utilizando el programa informático

Materiales y Métodos

“7500 Software v2.0.4” (Applied Biosystems). En el caso de *A. thaliana* y salvo especificado diferente en los resultados de esta tesis, los niveles de transcrito a estudiar se refirieron con respecto al ARNm del gen de expresión constitutiva *PDF2* [282]. Las eficiencias comparables de amplificación para cada pareja de cebadores fueron previamente determinadas en el laboratorio. De manera alternativa, en algún caso especificado en los resultados, los valores de expresión relativa así como el análisis estadístico de los resultados se obtuvieron mediante el software “*REST 2009*” de Qiagen.

Gen	Cebador	Concentración (nM)	Secuencia
<i>DHS</i>	Fdw	300	5'-CTCACAGGTTTGGTCTCTCTTTG-3'
	Rev	900	5'-GTTCTGCTAAAACCGTTAAGGTATAC-3'
<i>eIF5A1</i>	Fdw	300	5'-GGAGAGGAACAGATCAATGCTC-3'
	Rev	900	5'-GAGTAATGGAAGCCTACAGAAGAAG-3'
<i>eIF5A2</i>	Fdw	300	5'-TGCTCACTTCTCTCTTCTTAGG-3'
	Rev	900	5'-GATTGCTGGCCTCAAAG-3'
<i>eIF5A3</i>	Fdw	300	5'-AGGATATTGTTGTGTCTGTCATG-3'
	Rev	900	5'-TTATTATTATTACTTGGGACCAACTTC-3'
<i>PDF2</i>	Fdw	300	5'-TCAACATCTGGGTCTTCACTTAGC-3'
	Rev	900	5'-GATGCAATCTCTCATTCCGATAGTC-3'
<i>FT</i>	Fdw	300	5'-GGTGGATCCAGATGTTCCAA-3'
	Rev	900	5'-ATTGCCAAAGGTTGTTCCAG-3'
<i>FLC</i>	Fdw	300	5'-TGTGGATAGCAAGCTTGTGG-3'
	Rev	900	5'-TGGCTCTAGTCACGGAGAGG-3'
<i>CO</i>	Fdw	300	5'-AACGACATAGGTAGTGGAGAGAACAAC-3'
	Rev	300	5'-GCAGAATCTGCATGGCAATACA-3'
<i>RAB18</i>	Fdw	500	5'-ATGGCGTCTTACCAGAACCGT-3'
	Rev	500	5'-CCAGATCCGGAGCGGTGAAGC-3'
<i>RD29B</i>	Fdw	500	5'-ATGGAGTCACAGTTGACACGTCC-3'
	Rev	500	5'-GAGATAGTCATCTTACCACCAGG-3'
<i>SMZ</i>	Fdw	300	5'-GTATCAATCGGTCCACGATG-3'
	Rev	900	5'-CCTGATGATGCTGCAACTGT-3'
<i>SNZ</i>	Fdw	300	5'-GCACAACGATCTCGAGCTAA-3'
	Rev	900	5'-CGTCACCGATCGATTCAAAC-3'
<i>FMNL1</i>	Fdw	300	5'-GCACTGAAACCCAGCCAGATCACC-3'
	Rev	900	5'-GGAAGTCCAGGCCAGAGCCTGC-3'
<i>EZRINA</i>	Fdw	900	5'-CTGAGACTGCCGTGCTCTTG-3'
	Rev	900	5'-GTAAGTTTGTGCTGGTCCATCACT-3'
<i>GAPDH</i>	Fdw	900	5'-GAAGGTGAAGGTCCGAGTC-3'
	Rev	900	5'-GAAGATGGTGTATGGGATTTC-3'
β -ACTINA	Fdw	50	5'-ACCAACTGGGACGATATGGAGAAGA-3'
	Rev	600	5'-CGCACGATTTCCCTCTCAGC-3'
<i>HSP90</i>	Fdw	900	5'-ATTGTCCCACGACGTGCTCCTT-3'
	Rev	900	5'-ATCCTCCGAGTCTACCACCCTCTAAT-3'
<i>LUC</i>	Fdw	300	5'-TGGCAGAAGCTATGAAACGA-3'
	Rev	900	5'-ATAAATAACGCGCCCAACAC-3'

Tabla 10. Secuencia y concentración empleada de cada uno de los cebadores en las reacciones de qPCR.

3. Técnicas de análisis y manipulación de proteínas.

3.1. Expresión heteróloga en *E. coli* y purificación de las proteínas recombinantes.

250-1000 ml de medio 2x YT conteniendo al antibiótico adecuado, se utilizaron para cultivar *E. coli* cepa BL21(DE3) pLysE transformada con las construcciones de interés. Los cultivos se crecieron a 37°C hasta alcanzar una OD600 de 0.3-0.4, momento en el que se añadió 0.8 mM de IPTG y se incubó a 28°C durante 3-4 horas más. Se separaron alícuotas de 1 ml de los cultivos antes y después de la inducción con IPTG. Estas alícuotas se centrifugaron 1-2 minutos a 12000 g, se eliminó el sobrenadante y los precipitados celulares se resuspendieron con 100 µl de LB 1x (del inglés “*Loading Buffer*” compuesto por 1.5% SDS, 20 mM ditioeritritol (DTE), 2 mM EDTA, 6% sacarosa, 0.05 mg/ml azul bromofenol y 60 mM Tris HCl 6.8).

Las células se recogieron por centrifugación (15 minutos a 3000 g), y el precipitado se resuspendió en 0.5 ml de tampón de extracción frío por cada 250 ml de cultivo crecido. El tampón de extracción se compuso de TBS 1x (del inglés “*Tris-Buffered Saline*”, 20 mM Tris-HCl pH 7.6, 150 mM NaCl), 1 mM DTT y 10 µl de PIC (del inglés *Protease Inhibitor Cocktail for bacterial cells*”, de Sigma-Aldrich). El precipitado resuspendido se mantuvo enfriado durante todo el proceso posterior. Así pues, se procedió a lisar las células mediante el sonicador “*Ultra Processor 200 S*” (Dr. Hielscher) en unas condiciones de 50% de fuerza máxima en dos tandas de 30 segundos. Para eliminar los restos celulares, el lisado celular se centrifugó durante 15 minutos a 30000 g a 4°C y se recogió el sobrenadante, correspondiente al extracto total de proteínas bacteriano. El precipitado de componentes celulares insolubles se resuspendió en 1 ml de TBS 1x mediante vortex. Para los análisis previos a pequeña escala, se recogieron alícuotas de 16 µl del extracto de proteínas solubles y del resuspendido de componentes insolubles, que se mezclaron con un volumen apropiado de LB 5x. Una vez comprobada

Materiales y Métodos

mediante electroforesis SDS-PAGE la presencia de proteína recombinante soluble, se procedió a su posterior purificación por afinidad.

El siguiente paso fue la purificación de las proteínas fusionadas a la etiqueta GST. Para ello se utilizó la resina de glutatión agarosa de ABT (del inglés “*Agarose Bead Technologies*”). 0.5-1 ml de la resina previamente lavada 3 veces con 2 ml de TBS 1x frío (mezclado por inversión, centrifugación de 5 minutos a 400 g y eliminado del sobrenadante) se mezcló con 2-4 ml del extracto total de proteínas solubles obtenido y se incubó durante toda la noche a 4°C. Posteriormente se recogió el volumen de proteínas no unidas a la resina (se separó una alícuota de 16 µl que se mezcló con LB 5x), y se realizaron 3 lavados con TBS 1x, para seguidamente proceder a la elución de las proteínas que habían quedado unidas a la resina de glutatión agarosa. Para ello se realizaron 2 pasos de elución con 0.5-1 ml de tampón de elución (50 mM Tris-HCl pH 8.0 y 10 mM L-glutatión reducido). Para la elución se incubó 5 minutos en agitación suave y se centrifugó 5 minutos a 400 g, tras los cuales se recogió el sobrenadante. Se separaron alícuotas de 16 µl de cada una de las eluciones y se mezclaron con LB 5x. Para eliminar el exceso de glutatión y concentrar a las proteínas purificadas en la mitad de volumen aproximadamente, la muestra se lavó con TBS 1X mediante un concentrador “*Vivaspin 20 5 kDa MWCO*” (GE Healthcare) siguiendo las instrucciones del fabricante, o alternativamente mediante diálisis.

Para eliminar la etiqueta de GST de las proteínas purificadas, las muestras concentradas libres de glutatión se volvieron a unir con la resina de glutatión agarosa (1 volumen de resina por cada 1-2 volúmenes de muestra). Tras la unión se recogió el volumen no unido a la resina y se lavó 3 veces con 1 volumen de tampón de digestión (TBS 1x, 1 mM DTT y 1 mM EDTA). Tras el último lavado se añadió 1 volumen de tampón de digestión y 12 u de proteasa “*PreScission 3C*” (GE Healthcare), y la mezcla se incubó durante toda la noche a 4°C. El sobrenadante conteniendo a la proteína pura libre de GST se recogió por centrifugación. Para

Materiales y Métodos

comprobar que el corte había ocurrido correctamente, y que además la proteasa había quedado unida a la resina, tanto la proteasa como la GST se obtuvieron por elución por competición con glutatión. Se recogieron alícuotas de 16 μ l que se mezclaron con LB 5x.

Todas las alícuotas recogidas mezcladas con LB se separaron en electroforesis 1D-E.

3.2. Extracción de proteínas de *S. cerevisiae*.

La extracción de proteínas se realizó como se describe en Miguel *et al.* (2013) [283]. La cuantificación de proteínas de las muestras se realizó mediante el método Bradford (Bio-Rad). La cantidad de extracto proteico adecuada se mezcló con LB 5x para separar a las proteínas en 1D-E.

3.3. 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 por 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 (Sigma-Aldrich) 30 μ l 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. Para acabar de eliminar los restos vegetales el extracto se pasó por un filtro de polipropileno de 0.45 μ m (VWR). La cantidad de proteínas en cada uno de los extractos obtenidos se cuantificó mediante el método Bradford (Bio-Rad). La cantidad deseada del extracto se mezcló con LB 5x para realizar 1D-E, o se procesó para realizar geles 2D-E.

3.4. Extracción de proteínas en *H. sapiens*.

Se partió de 1 cultivo de células HeLa crecido en una placa de Petri de 9 cm de diámetro (aproximadamente $5-7 \times 10^6$ células). En primer lugar se eliminó el medio de crecimiento por aspiración y se lavó con 5 ml de PBS (del inglés “*Phosphate-Buffered Saline*” de Gibco[®], Life Technologies) frío. Posteriormente se añadieron otros 5 ml de PBS frío y las células se recogieron con ayuda de un raspador y la pipeta, depositándolas en un tubo de 15 ml. Este paso se repitió de nuevo otra vez. Las muestras se centrifugaron a 7000 g a 4°C durante 1-2 minutos, y se eliminó el sobrenadante. El precipitado de células se mezcló con 200 μ l de tampón “*Triplex*” compuesto por 50 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 0.1% SDS, 1% NP-40, 0.5% (w/v) DOC (deoxicolato de sodio), 2 μ g/ml leupeptina, 2 μ g/ml aprotinina y 1 mM PMSF (del inglés “*Phenylmethylsulfonyl Fluoride*”). La muestra se mezcló mediante vortex y se incubó durante 30 minutos en hielo, mezclando ocasionalmente por inversión. Posteriormente se centrifugó a 12000 g a 4°C durante 15 minutos. Se recogió el sobrenadante y se realizó la cuantificación de proteínas mediante el método Bradford (Bio-Rad). La cantidad deseada del extracto se mezcló con “*Laemmli Buffer*” 5x (0.25 M Tris-HCl pH 6.8, 10% SDS, 0.5 M DTT, 30% sacarosa, 0.5% azul de bromofenol) para realizar 1D-E.

3.5. Electroforesis SDS-PAGE.

3.5.1. 1D-E.

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 12000 g.

Se utilizó el sistema “*Mini-Protean[®] Tetra handcast systems*” de Bio-Rad. El gel separador se compuso de 10-14% *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 1D-E los geles se utilizaron para tinción Coomassie o para realizar ensayos WB.

3.5.2. 2D-E.

En primer lugar se procedió a precipitar las proteínas de la muestra. Para ello se añadió un volumen de ácido tricloroacético (TCA) al 20% y se incubó 1 hora en hielo. Posteriormente se centrifugó a 8000-10000 g 15 minutos a 4°C y se eliminó el sobrenadante. El precipitado de proteínas se lavó 2-3 veces con 1 ml de acetona fría, disgregándolo mediante vortex y sonicación, y centrifugando a 8000-10000 g 15 minutos. Tras el último lavado se eliminó la acetona y el precipitado se resuspendió en tampón de lisis-2D compuesto por 7 M urea, 2 M tiourea y 4% CHAPS (sulfonato de 3-[(3-colamidopropil)-dimetilamonio]-1-propano). Los contaminantes no proteicos se eliminaron utilizando el kit “2D Clean-Up” (GE Healthcare) siguiendo las instrucciones del fabricante, y se volvió a solubilizar la muestra en tampón de lisis-2D. La cuantificación de proteínas de las muestras se realizó mediante el método Bradford (Bio-Rad).

Las muestras disueltas en tampón de lisis-2D se mezclaron con 1 volumen de tampón de rehidratación para el isoelectroenfoque (tampón IEE, compuesto por 8 M urea, 4% CHAPS, 0.005% azul de bromofenol) conteniendo además, 65 mM DTT y 1% “IPG buffer pH 3–11” (GE Healthcare).

Para la primera dimensión de la 2D-E se utilizaron tiras de 7 cm con un gradiente inmovilizado de pH 4-7, a excepción del resultado obtenido en el 2D-E de la figura 65, donde se utilizó una tira de 24 cm y un gradiente de pH de 3 a 11. Para la segunda dimensión se utilizaron geles SDS-PAGE separadores al 14% cuya composición se describe anteriormente. La 2D-E se realizó como se describe en Belda-Palazón *et al.* (2014) [158].

Los geles 2D-E obtenidos se utilizaron para tinción Coomassie o con nitrato de plata, o alternativamente para el escaneado de la fluorescencia, o la realización de ensayos WB.

3.6. Marcaje con fluoróforos y escaneado de la fluorescencia.

Para el marcaje con fluoróforos de las muestras proteicas, se utilizaron “*CyDyes DIGE fluors (Cy2, Cy3, Cy5)*” de GE Healthcare según las instrucciones del fabricante.

Para la realización de 2D-E a partir de las muestras de las distintas isoformas de eIF5A purificadas y marcadas diferencialmente con fluoróforos, se utilizó 1 µg aproximadamente de cada una de ellas. Las isoformas marcadas se separaron individualmente en 2D-E independientes o de forma conjunta en un único gel. Las isoformas marcadas también se separaron de forma combinada junto a 15 µg de extracto total de proteínas de *A. thaliana*. En todos los casos, el volumen de la muestra resultante se llevó hasta 40 µl con tampón de lisis-2D. La muestra se mezcló con tampón IEE y se continuó con la realización del 2D-E según el punto 3.5.2.

La fluorescencia procedente de las proteínas marcadas se visualizó mediante escaneado utilizando el sistema “*Typhoon Trio scanner*” (GE Healthcare) como se describe en Belda-Palazón *et al.* (2014).

3.7. Tinción Coomassie.

El gel de electroforesis (1D-E o 2D-E) 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.

3.8. Tinción con nitrato de plata.

Se utilizó el kit “*PlusOne Silver Staining Kit, protein*” de GE Helthcare siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.9. Análisis WB.

Tras la realización de la 1D-E o 2D-E se procedió a la transferencia en condiciones húmedas de las proteínas del gel a una membrana (de PVDF “*Immun-Blot® PVDF Membrane*” o de nitrocelulosa (0.45µm) de Bio-Rad), utilizando el sistema “*Mini Trans-Blot® Cell*” (Bio-Rad). El tampón de transferencia empleado se compuso de 5 g/l Tris base, 3.1 g/l 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 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 TBST (TBS 1x, 5% leche desnatada, 0.05% Tween 20). Seguidamente se incubó como mínimo 1 hora con la disolución adecuada del anticuerpo primario de interés en TBST. Se realizaron 3 lavados de 10 minutos con TBST, y se procedió a la incubación durante al menos 1 hora con una disolución del anticuerpo secundario adecuado en TBST. Posteriormente se realizaron 3 lavados con TBST y se procedió al revelado del WB. En la tabla 11 se

reflejan las diluciones de los anticuerpos primarios y secundarios utilizados en este trabajo.

Anticuerpos Primarios	Tipo	Fuente	Dilución
anti-eIF5A1 de <i>A. thaliana</i>	Policlonal de conejo	Belda-Palazón <i>et al.</i> (2014)	1:5000 a 1:20000
anti-eIF5A1 de <i>S. cerevisiae</i>	Policlonal de conejo	Valentini <i>et al.</i> (2002)	1/10000
anti-eIF5A1 de <i>H. sapiens</i>	Monoclonal	Sigma-Aldrich	1:1000
anti-HA (12C5A)	Monoclonal	Roche	1:1000
Anti-PGK1 de <i>S. cerevisiae</i>	Policlonal de conejo	Abcam	1:1000
Anti- β -Actina de <i>H. sapiens</i>	Monoclonal	Sigma-Aldrich	1:5000
Anti-GAPDH de <i>H. sapiens</i>	Monoclonal	Chemicon International	1:5000
Anti-FMNL1 de <i>H. sapiens</i>	Policlonal de conejo	Abcam	1:1000
Anti-Ezrina de <i>H. sapiens</i>	Monoclonal	Thermo Scientific	1:400
Anti-HSP90 de <i>H. sapiens</i>	Policlonal de conejo	Abcam	1:1000
Anticuerpos Secundarios	Tipo	Fuente	Dilución
Anti-IgG(conejo)-HRP	Policlonal de burro	Santa Cruz Biotechnology	1:5000 a 1:50000
Anti-IgG(ratón)-HRP	Policlonal de conejo	Sigma-Aldrich	1:50000
TrueBlot®: Anti-IgG(conejo)- HRP	Monoclonal	Rockland	1:1000 a 1:4000
Proteína de afinidad	Tipo	Fuente	Dilución
Estreptavidina-HRP	-	Chemicon International	1:100000

Tabla 11. Anticuerpos primarios y secundarios, así como la proteína de afinidad (estreptavidina), utilizados para la detección quimio-luminiscente de las proteínas de interés. Se detallan las diluciones empleadas. HRP del inglés “*horseradish peroxidase*”.

El revelado se realizó utilizando el kit de detección quimioluminiscente “AmershamTM ECL Western Blotting analysis system” (GE Healthcare) o, para detecciones que requirieron una mayor sensibilidad, el sistema “SuperSignal West Femto Chemiluminescent Substrate” (Thermo Scientific). Para ambos revelados se siguieron las instrucciones de los fabricantes. Se utilizaron películas fotográficas “Amersham HyperfilmTM ECL” (GE Healthcare). La membrana de PVDF o de nitrocelulosa y la película fotográfica se pusieron en contacto en oscuridad utilizando el “Bio Max Cassette” de Kodak. Los tiempos de exposición se optimizaron para cada caso. El revelador empleado fue el “X-OMAT 2000 Processor” (Kodak).

3.10. Digestión con tripsina, MALDI-TOF-MS y GCxGC/TOF-MS.

1.5 µg de cada una de las isoformas de eIF5A purificadas, tanto hipusinadas como no modificadas, se digirieron con tripsina (“*Sequencing Grade Modified Trypsin*” de Promega) como describe Shevchenko *et al.* (1996) [284]. Los productos de digestión se analizaron mediante MADI-TOF-MS como describe Belda-Palazón *et al.* (2014).

Para el análisis de GCxGC/TOF-MS se utilizaron 0.4 mg de la proteína GST-eIF5A2 hipusinada o sin modificar. El análisis se realizó como describe Belda *et al.* (2014).

4. Análisis de polisomas.

4.1. *A. thaliana.*

Por cada muestra se utilizaron aproximadamente 300 mg de plántulas de 9-10 días de edad, tratadas o no previamente con 4-EGI-1. El material vegetal se pulverizó en nitrógeno líquido con la ayuda de un mortero hasta obtener un polvo fino que se depositó en tubos de 2 ml. A cada muestra se le añadió 1 ml de tampón de extracción (200 mM Tris-HCl pH 9.0, 200 mM KCl, 5 mM EGTA (del inglés “*Ethylene Glycol Tetraacetic Acid*”), 35 mM MgCl₂, 4% Tritón X-100, 1% (w/v) DOC, 5 mM DTT, 0.5 mg/ml heparina), y se incubó 30 minutos en hielo, mezclando ocasionalmente por inversión. En los casos en los que interesó tratar con cicloheximida y cloramfenicol, éstos se añadieron al tampón de extracción a 80-100 µg/ml y 50 µg/ml respectivamente. Posteriormente se centrifugó a 16000 g durante 15 minutos a 4° C tantas veces como fue necesario hasta obtener un sobrenadante totalmente limpio de restos vegetales. La muestra se mantuvo a 4° C (o en hielo) durante todo el proceso hasta la lectura de los perfiles.

Los gradientes de sacarosa utilizados fueron del 10 al 60% con un volumen de 11 ml. Los gradientes se cargaron en tubos de polipropileno de 13.2 ml (Beckman

Coulter), y se realizaron de forma automatizada según las instrucciones del fabricante mediante el propio aparato de análisis de polisomas “*Density Gradient Fractionation System*” (Teledyne Isco), a partir de las soluciones A (10% sacarosa, 40 mM Tris-HCl pH 8.4, 20 mM KCl, 10 mM MgCl₂) y B (60% sacarosa, 40 mM Tris-HCl pH 8.4, 20 mM KCl, 10 mM MgCl₂), preparadas previamente en el laboratorio. En los casos en los que interesó tratar con cicloheximida y cloramfenicol, éstos se añadieron a las soluciones A y B, a 10 µg/ml y 5 µg/ml respectivamente

Posteriormente, 300-400 µl de cada muestra se depositaron en la parte superior de la mezcla del gradiente y se ultracentrifugaron 3 horas y 40 minutos a 4°C a 35000 rpm (rotor SW 41 Ti (Beckman Coulter), aproximadamente 210000 g). Tras la ultracentrifugación las muestras se pasaron por el sistema de análisis de polisomas con un flujo de 1 ml/minuto, que permitió además, la recolección de las muestras en forma de fracciones individuales de 1 ml, de menor a mayor densidad. A medida que se recogieron las fracciones, se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C hasta su procesado.

4.2. *H. sapiens*.

Por cada muestra se utilizaron cultivos adherentes de células HeLa (4 placas de 9 cm de diámetro o 9 pocillos de 3.5 cm de diámetro), previamente tratadas con GC7 durante 4 horas o transfectadas con *sieIF5A1*. Seguidamente se añadió 100 µg/ml cicloheximida al medio de crecimiento, y se incubó durante 15 minutos a 37°C. A partir de este momento las células se mantuvieron en frío. Los cultivos adherentes se lavaron (decantación y aspiración del tampón de lavado) 2 veces con 2-5 ml de PBS frío suplementado con 100 µg/ml cicloheximida. Tras el último lavado se volvieron a añadir 2-5 ml de tampón de lavado, y se recogieron las células mediante un raspador y la pipeta. Las células se depositaron en tubos de 15 ml y el sobrenadante se eliminó tras centrifugar a 7000 g a 4°C durante 1 minuto. En los casos en los que no interesó tratar con cicloheximida, tras la incubación con GC7 o

Materiales y Métodos

la transfección con *sieIF5A1*, se procedió a los lavados con PBS frío sin cicloheximida y a la recogida de las células.

Las células se mezclaron con 500 μ l de tampón de lisis (7% sacarosa, 50 mM Tris-HCl pH 7.6, 25 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 1% Tritón X-100, 0.1% (w/v) DOC, 2 μ g/ml leupeptina, 2 μ g/ml aprotinina, 1 mM PMSF y 100 μ g/ml cicloheximida), con el que se incubó durante 30 minutos en hielo mezclándose ocasionalmente por inversión. En los casos en los que no interesó tratar con cicloheximida, ésta no se añadió al tampón de lisis. Posteriormente las mezclas se centrifugaron a 10000 g a 4°C durante 10 minutos, y se recogió el sobrenadante.

Los gradientes de sacarosa utilizados fueron del 7 al 47% con un volumen de 11 ml. Los gradientes se cargaron en tubos de polipropileno de 13.2 ml (Beckman Coulter). Los gradientes se realizaron de forma manual a partir de la solución A (7% sacarosa, 50 mM NH₄Cl, 50 mM Tris acetato pH 7.0, 12 mM MgCl₂, 1 mM DTT) y la solución B (47% sacarosa, 50 mM NH₄Cl, 50 mM Tris acetato pH 7.0, 12 mM MgCl₂, 1 mM DTT). En tubos independientes, se realizaron mezclas entre ambas soluciones para obtener 5 fases de concentración de sacarosa diferente (7, 17, 27,37 y 47%), teniendo en cuenta que en cada gradiente de 11 ml cada una de las fases estaba compuesta por 2.2 ml. Las mezclas fueron las siguientes:

- 7%: 1 volumen de solución A.
- 17%: 3/4 volúmenes de solución A y 1/4 volúmenes de solución B.
- 27%: 1/2 volúmenes de solución A y 1/2 volúmenes de solución B.
- 37%: 1/4 volúmenes de solución A y 3/4 volúmenes de solución B.
- 47%: 1 volumen de solución B.

Cada fase de 2.2 ml se cargó en los tubos de ultracentrífuga con ayuda de una pipeta de Pasteur de vidrio de mayor a menor densidad, impidiendo que se mezclaran durante el pipeteo. Los tubos se incubaron en posición vertical durante toda la noche a 4°C.

Posteriormente, 450 µl de cada muestra se depositaron en la parte superior del gradiente y se ultracentrifugó 2 horas a 4°C a 35000 rpm (rotor SW 41 Ti (Beckman Coulter), aproximadamente 210000 g). Tras la ultracentrifugación se procedió a la recolección manual de fracciones 1 ml de menor a mayor densidad con ayuda de la pipeta. A medida que se recogieron las fracciones, se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C hasta su procesado.

4.3. Procesado y análisis de las fracciones.

Tras la recolección de las 11 fracciones de 1 ml de cada uno de los gradientes, se continuó con el procesado de las muestras para extraer el ARN total de las mismas. En primer lugar y, para conseguir el objetivo de poder cuantificar la cantidad de ARNm de interés que hay en cada fracción, fue necesaria la adición del control interno *LUC* (“*Luciferase Control RNA*” de Promega). Por ello, se añadió 1 ng de ARN de luciferasa a cada una de las fracciones, antes del procesado de las mismas. Seguidamente, se añadieron 100 µl de una solución compuesta por SDS 5%, 0.2 M EDTA, y se mezcló bien por inversión o vortex suave. Posteriormente, se añadió 1 volumen de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1), se mezcló mediante vortex e inversión, y se centrifugó 1-2 minutos a 12000 g. Se recogió la fase acuosa y se mezcló con 1 volumen de etanol absoluto (o en su defecto al 96%) y se mezcló mediante vortex y por inversión. Seguidamente la muestra se centrifugó al menos 30 minutos a 12000 g, y se descartó el sobrenadante. El precipitado de ácidos nucleicos se dejó secar en la poyata, y posteriormente se resuspendió con 60-100 µl de agua libre de nucleasas. Tras ello, se añadió 1 volumen de CILi 6 M y se dejó precipitar al menos 1 hora (idealmente toda la noche) en hielo. Posteriormente se centrifugó 15 minutos a 12000 g a 4°C y se eliminó el sobrenadante. Se añadieron 150 µl de etanol 70% y se centrifugó 5 minutos a 12000 g. Se eliminó el sobrenadante, y el precipitado de ARN se dejó secar completamente en la poyata. Finalmente se resuspendió con 20 µl de agua libre de nucleasas. La integridad del ARN extraído se comprobó mediante un gel de electroforesis de agarosa. En las

Materiales y Métodos

figuras 73, 74 y 75 del anexo, se muestran los ARN extraídos de las fracciones de cada uno de los gradientes.

Tras la extracción del ARN de cada una de las fracciones se procedió a realizar la transcripción reversa utilizando como molde 7 μl de cada extracción en un volumen final de 10 μl que, tras este proceso, se llevó a 100 μl con agua libre de nucleasas. A continuación se procedió a la cuantificación de los ADNc de interés en cada una de las muestras (fracciones) mediante qPCR. Para cada reacción de qPCR, con un volumen final de 10 μl , se utilizaron 2.4 μl de molde de ADNc. En la tabla 10 se describe la secuencia y la concentración final, determinada previamente en el laboratorio, de los cebadores utilizados para cada amplificación.

La cuantificación del ARN presente en cada fracción, para la obtención de los perfiles traduccionales, se realizó a través del cálculo del $2^{\Delta\text{Ct}}$, utilizando como referencia el ARN de la luciferasa (*LUC*) empleado como control interno. La cantidad de ARN en cada fracción se reflejó como porcentaje con respecto a la cantidad de ARN total en cada gradiente (suma del ARN de las 11 fracciones) de procedencia.

5. Inmunoprecipitación de ARN (RIP).

5.1. Fraccionamiento núcleo-citosol.

Para la realización del fraccionamiento núcleo-citosol se partió de 6 g de plántulas silvestres de *A. thaliana* crecidas *in vitro* durante 9-10 días. La mitad de este material (3 g) se pulverizó con nitrógeno líquido hasta obtener polvo fino con ayuda de un mortero, y la otra mitad se entrecruzó con formaldehído 1%.

Para el entrecruzamiento con formaldehído, las plántulas se depositaron en tubos de 50 ml, donde se incubaron 15 minutos en agitación suave a temperatura ambiente con tampón de entrecruzamiento (3-5 ml de tampón por cada 500 mg de plántulas) compuesto por 0.4 M sacarosa, 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA, 1

Materiales y Métodos

mM PMSF y 1% formaldehído. Posteriormente, se detuvo el entrecruzamiento al añadir 125 mM de glicina e incubando durante 10 minutos más. Se realizaron 2-3 lavados con 5 ml de agua estéril fría, y el material se pulverizó con nitrógeno líquido y un mortero.

Tanto el material entrecruzado con 1% formaldehído como el no entrecruzado, se mezcló con tampón NIB (del inglés “*Nuclear Isolation Buffer*”) compuesto por 10 mM HEPES (ácido 4-(2-hidroxi)etil-1-piperazinotanosulfónico) pH 7.6, 250 mM sacarosa, 5mM KCl, 5mM MgCl₂, 5mM EDTA, 14 mM β-mercaptoetanol, 0.6% Tritón-X-100 y 1% PVP (polivinilpirrolidona). La mezcla se incubó en hielo durante 15 minutos mezclando por inversión ocasional. Posteriormente la muestra se filtró 2 veces por una capa de “*Miracloth*” (Millipore), y para separar la fase citosólica de la nuclear se centrifugó el filtrado a 3000 g a 4°C 10 minutos. Se recogió el sobrenadante (600 µl de fase citosólica), y con el precipitado (fase nuclear) resultante se realizaron varios pasos de resuspensión (sin vortex) en NIB (2 ml) y centrifugación hasta obtener la fase nuclear blanquecina. Posteriormente, el precipitado de núcleos se resuspendió en 400 µl de tampón NIB II (10 mM HEPES pH 7.6, 250 mM sacarosa, 5 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 5 mM EDTA). La fase nuclear se depositó sobre 1 ml de la solución PSB (del inglés “*Percoll Solution Buffer*”) compuesta por 15% Percoll® (Sigma-Aldrich), 10 mM HEPES pH 8.0, 250 mM sacarosa, 5 mM KCl, 5 mM MgCl₂ y 5 mM EDTA, y se centrifugó 10 minutos a 3000 g. Se eliminó el sobrenadante. Seguidamente el precipitado nuclear se resuspendió en 400 µl de NLB (del inglés “*Nuclear Lysis Buffer*”) compuesto por 50 mM Tris-HCl pH 7.6, 1% SDS y 10 mM EDTA, y se mezcló la muestra vigorosamente mediante vortex. La fase nuclear soluble (sobrenadante) se separó de la insoluble (precipitado) mediante centrifugación (5 minutos a 12000 g). La fase nuclear insoluble se resuspendió con 50 µl LB 1x. El mismo volumen de cada una de las fases obtenidas mezcladas con LB 5x, se separó mediante 1D-E y se realizaron ensayos WB para analizar el nivel de las proteínas de interés en las fracciones recogidas.

5.2. Inmunoprecipitación.

20 μ l de suero anti-eIF5A1 o pre-inmune (control) se centrifugaron 5 minutos a 12000 g en tubos de 1.5 ml. Se eliminó el sobrenadante, y cada precipitado de inmunoglobulinas se mezcló con 1 ml de fase citosólica entrecruzada con formaldehído 1%. De la misma manera, 100 μ l de cada fase nuclear soluble entrecruzada, se mezcló con 900 μ l de tampón de dilución (15 mM Tris-HCl pH 7.6, 1 mM EDTA, 1% Tritón X-100, 150 mM NaCl), y se añadieron a cada precipitado de inmunoglobulinas. Seguidamente, cada una de las muestras se mezcló con 50 μ l de bolas magnéticas conjugadas a proteína A (“*Dynabeads*[®] *Protein A for Immunoprecipitation*” de Life Technologies), previamente lavadas 3 veces con 1 ml de TBS 1x con ayuda de un imán (“*DynaMag*TM”, Life Technologies), y se incubaron durante toda la noche a 4°C en agitación suave. Posteriormente se recogió el volumen de los componentes no unidos a proteína A, y se hicieron 3 lavados con TBS 1x. La elución se realizó incubando 2 veces con 75 μ l de tampón de elución (100 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA, 1% SDS) durante 10 minutos a 37°C en agitación. A las muestras eluidas se añadieron 10 u de “*RiboLock RNase Inhibitor*” (Thermo Scientific). El mismo volumen de cada una de las muestras obtenidas se mezcló con LB 5x y se separó mediante 1D-E. Se realizaron ensayos WB para analizar el nivel de las proteínas inmunoprecipitadas. En estos ensayos, para disminuir las señales contaminantes procedentes de las cadenas pesada y ligera de las inmunoglobulinas inmunoprecipitadas, se utilizó el anticuerpo secundario “*Rabbit TrueBlot*[®]: *Anti-Rabbit IgG HRP*” de Rockland.

5.3. Extracción del ARN inmunoprecipitado.

La mitad del volumen de cada muestra eluida se mezcló con 200 mM de NaCl y 20 μ g de proteinasa K. Las mezclas se incubaron durante 1 hora a 42°C, y posteriormente 1 hora a 65°C. Tras deshacerse el entrecruzamiento, las muestras se llevaron hasta 200 μ l con agua libre de nucleasas, y se mezclaron con 1 volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), mediante vortex e inversión. Las

mezclas se centrifugaron 1-2 minutos a 12000 g y se recogió el sobrenadante (fase acuosa). Cada fase acuosa se mezcló con 1 volumen de CILi 6 M y se incubó durante al menos 1 hora en hielo (idealmente toda la noche). Posteriormente se centrifugó a 12000 g a 4°C durante 15 minutos, y se eliminó el sobrenadante. El precipitado de ARN se lavó con etanol al 70%, centrifugando 5 minutos a 12000 g, y se resuspendió en 90-100 µl de agua libre de nucleasas. Las muestras se trataron con 4-6 u de DNasa I (“*TURBO™ DNase*” de Ambion®, Life Technologies) siguiendo las instrucciones del fabricante, y posteriormente se volvieron a repetir los pasos de tratamiento de las muestras con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico, precipitación con CILi 6M y lavado con etanol al 70%, como se describe anteriormente. Finalmente, los precipitados de ARN se resuspendieron en 40 µl de agua libre de nucleasas.

5.4. Síntesis de ADNc SMART™ y amplificación por PCR.

Una vez purificados los ARN a partir de los inmunoprecipitados se procedió a la síntesis de ADNc a través del protocolo SMART™ [238]. En primer lugar se produjo la reacción de síntesis de la primera cadena de ADNc en un volumen final de 10 µl. Para ello, se mezclaron 5 µl de ARN inmunoprecipitado puro y 1 µl 10 µM del cebador *SMARTRevCDNA*, y se incubó 3 minutos a 65°C. Seguidamente, las muestras se depositaron en hielo y se añadieron 2 µl “*5x PrimeScript™ Buffer*” (Takara), 1 µl “*PrimeScript™ RT Enzyme Mix I*” (Takara) y 1 µl 10 µM del cebador *SMARTFdwCDNA*. Como control, como molde se utilizaron 200 ng de una muestra de ARN total. Las mezclas se incubaron a 42°C durante 1 hora, y posteriormente se depositaron en hielo.

Una vez sintetizada la primera cadena de ADNc se procedió a su amplificación mediante PCR. Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de 30 µl utilizando como molde 2 µl de cada una de las muestras de ADNc sintetizadas en el paso anterior. Las reacciones de PCR contenían además los siguientes reactivos: 1x “*LA PCR Buffer II (Mg2+ free)*” (Takara), 2.5 mM MgCl₂, 0.4 mM “*dNTPs*

Mixture” (Takara), 5 u “*LA Taq*[®] *DNA Polymerase*” (Takara), 0.1 μM del cebador *SMARTFdwPCR* y 0.1 μM del cebador *SMARTRevPCR*. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 1 ciclo de desnaturalización a 94°C durante 1 minuto; 25 ciclos de desnaturalización (15 segundos a 95°C), hibridación de los cebadores (30 segundos a 60°C) y extensión (10 minutos a 68°C).

Posteriormente 2 μl de los productos de amplificación se utilizaron para realizar una segunda reacción de PCR de la misma composición y con las mismas condiciones que en el paso anterior. En la tabla 12 se describen las secuencias de los cebadores utilizados en el protocolo SMARTTM. Para comprobar la amplificación obtenida, el mismo volumen de cada una de las muestras (15 μl) se separó mediante electroforesis de agarosa.

Nombre	Cebador	Secuencia
<i>SMARTFdwDNA</i>	Fdw	5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT GGCCATTATGGCCGGG-3'
<i>SMARTRevDNA</i>	Rev	5'-ATTCTAGAGGCCGAGGCCGACATG TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTNNN-3'
<i>SMARTFdwPCR</i>	Fdw	5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3'
<i>SMARTRevPCR</i>	Rev	5'-ATTCTAGAGGCCGAGGCCGACATG-3'

Tabla 12. Secuencia de los cebadores utilizados en el protocolo SMARTTM.

5.5. Clonación en *pENTR1A-SfiI*.

Una vez confirmada la amplificación de los ADNc, se procedió a su clonación en el vector *pENTR1A-SfiI* (fuente Marques *et al.* (2009) [241]). Para ello, la mezcla de 4 reacciones de amplificación (120 μl) se llevó a 200 μl con agua, y se añadió 1 volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1). Se mezcló mediante vortex e inversión y se centrifugó 1-2 minutos a 12000 g. Se recogió el sobrenadante (fase acuosa), y se mezcló con 0.1 volúmenes de acetato de sodio 3 M y 2.5 volúmenes de etanol absoluto. Se incubó durante toda la noche a 4°C, y posteriormente se centrifugó a 12000 g 15 minutos. Se eliminó el sobrenadante y el

Materiales y Métodos

precipitado de ADN se lavó con etanol al 70%, centrifugando 5 minutos a 12000 g. El precipitado se dejó secar en la poyata y se resuspendió con 40 μ l de agua. Seguidamente, la muestra se digirió con 50 u de la enzima de restricción *Sfi*I (Thermo Scientific). Para ello, se añadió a la muestra tampón de restricción G 1x (Thermo Scientific), y se incubó al menos 4 horas a 50°C. El producto de restricción se separó en un gel de electroforesis al 1% agarosa y se purificó. Posteriormente, el volumen de la muestra se llevó hasta 200 μ l con agua y se volvió a precipitar el ADN mediante acetato sódico y etanol, como se describe anteriormente. El precipitado de ADN se lavó nuevamente con etanol al 70%, y finalmente se resuspendió en 12 μ l de agua.

Por otro lado, 5 μ g del vector *pENTR1A-Sfi*I se digirieron con 80 u de *Sfi*I, como se describe anteriormente. El producto de restricción se separó en un gel de electroforesis al 1% agarosa, y se purificó. Posteriormente 400-500 ng del vector digerido se trataron durante 1 hora a 50°C con 2 u de fosfatasa alcalina (CIAP, del inglés “*Calf Intestinal Alkaline Phosphatase*” de Life Technologies), siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez tratada con CIAP, la muestra se mezcló con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico, se precipitó con acetato sódico y etanol absoluto, y se lavó con etanol al 70%, tal y como se describe anteriormente. Finalmente el precipitado se resuspendió en 10-20 μ l de agua.

Las reacciones de ligación se llevaron cabo en un volumen final de 15 μ l. Para ello se mezclaron 12 μ l del ADNc amplificado por PCR y digerido con *Sfi*I y 40 ng del vector *pENTR1A-Sfi*I lineal tratado con CIAP. Seguidamente se añadieron 5 u de “*T4 DNA Ligase*” (Thermo Scientific), y 1.5 μ l de “*10x T4 DNA Ligase Buffer*” (Thermo Scientific) compuesto por 400 mM Tris-HCl, 100 mM MgCl₂, 100 mM DTT, 5 mM ATP. Como ligación control, se sustituyeron los 12 μ l de ADNc por agua. Las mezclas se incubaron durante toda la noche a 16°C. Posteriormente 5 μ l de las muestras de ligación se utilizaron para transformar *E.coli* cepa GC10 por

electroporación. La selección de las bacterias transformantes se realizó utilizando 50 µg/ml de kanamicina.

6. Inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP).

Los experimentos de ChIP en plantas se realizaron en el laboratorio del Dr. Jarillo ubicado en el CBGP de Madrid como describe Ramirez-Parra *et al.* (2004) y Gendrel *et al.* (2002) [285-286]. Para ello, se utilizó un anticuerpo anti-H3K4me3 monoclonal (Millipore). Los cebadores utilizados en las reacciones de qPCR para amplificar las regiones del gen *FT* “-80 pb”, “+60 pb” y “+ 160 pb”, se detallan en Jeong *et al.* (2009) [178].

7. Análisis de la tasa de traducción *in vivo* mediante “Click chemistry”.

La medida de la tasa de traducción se basó en el análisis de la incorporación a lo largo del tiempo del análogo de la metionina, AHA, en las proteínas nacientes del ribosoma. La reacción de “Click” entre ésta y la biotina-alquino, permitió la purificación y el análisis, mediante WB, de la tasa de traducción de las proteínas sintetizadas *de novo*.

7.1. Incorporación del AHA.

Por cada muestra se utilizaron cultivos adherentes de células HeLa (1 pocillo de 3.5 cm de diámetro), previamente tratados con GC7 durante 4 horas o transfectados con *sief5A1*. El primer paso fue el intercambio del medio de crecimiento por un medio libre de metionina. Para ello, se eliminó el medio mediante aspiración y se realizaron 2 lavados con 1 ml de PBS atemperado a 37°C. Posteriormente se añadió 1 ml de medio libre de metionina (DMEM –Met, Gibco® (Life Technologies) suplementado con suero y antibióticos como se describe anteriormente). En las muestras que habían sido previamente tratadas con GC7 y en sus controles, al medio de crecimiento se le añadió además, 10 µM GC7 y 10 mM ácido acético, respectivamente. Los cultivos se incubaron durante 1 hora a 37°C.

Materiales y Métodos

Tras la incubación de las células en un medio libre de metionina, se añadió 50 μM AHA (“*Click-iT*[®] AHA”, Life Technologies), a partir de una solución concentrada 50 mM AHA disuelta en DMSO. En los controles se sustituyó el volumen de AHA añadido por DMSO. Se realizaron incubaciones a diferentes tiempos (0, 1, 2, 4, 6 y 8 horas) a 37°C. Tras cada incubación se realizaron 3 lavados con 1 ml de PBS frío. Seguidamente se volvió añadir 1 ml de PBS y las células se recogieron mediante un raspador y la pipeta, depositándolas en tubos de 15 ml. El sobrenadante se eliminó tras centrifugar 1-2 minutos a 7000 g a 4°C. Las células se almacenaron a -80°C hasta su utilización.

7.2. Reacción de “Click”.

Tras la incorporación del AHA y la recogida de las células se procedió a la lisis de las mismas. Para ello, cada precipitado de células se mezcló mediante vortex con 60 μl de tampón “*Triplex*”. La mezcla se incubó 30 minutos en hielo, y posteriormente se centrifugó a 12000 g a 4°C durante 15 minutos. Se recogió el sobrenadante y se realizó la cuantificación de proteínas mediante el método Bradford (Bio-Rad).

Para la realización de las reacciones de “Click” se utilizó el kit “*Click-iT*[®] Protein Reaction Buffer Kit” de Life Technologies, siguiendo las instrucciones del fabricante. En cada reacción se utilizó la misma cantidad de cada una de las muestras (100-180 μg). Se utilizó una concentración 40 μM de biotina-alquino (“*Biotin-PEG4-alkyne*” de Sigma-Aldrich), que se añadió a partir de una solución concentrada 4 mM disuelta en DMSO.

7.3. Purificación de las proteínas biotiniladas.

El primer paso para la purificación de las proteínas biotiniladas fue la eliminación del exceso de biotina. Para ello se utilizaron columnas para la limpieza de muestras o el intercambio de tampón “*PD MiniTrap G-25*” de GE Healthcare, siguiendo el

Materiales y Métodos

protocolo “*Spin*” descrito por el fabricante. El tampón de equilibrado empleado se compuso de 1% NP-40 y 0.1% SDS, en PBS.

El siguiente paso fue la unión de las proteínas biotinizadas a una matriz de estreptavidina-agarosa. Las uniones se realizaron en columnas “*Mobicol Classic*” de 1 ml y filtros de 10 μm de tamaño de poro (MoBiTec). Cada una de las muestras (200 μl) se mezcló con 50 μl de estreptavidina-agarosa (Sigma-Aldrich), previamente lavada 2 veces con 400 μl de PBS, centrifugándose 2 minutos a 1800 g. Las mezclas se incubaron durante 1 hora en agitación suave. Posteriormente se recogió el volumen de proteínas no unidas a estreptavidina y se realizaron 3 lavados con 1% NP-40% en PBS. Finalmente se realizó la elución añadiendo 50 μl de 2x “*Laemmli Buffer*”, incubando 10 minutos a 95°C y centrifugando 2 minutos a 1800 g.

7.4. Análisis WB y cálculo de la tasa de incremento.

El mismo volumen de cada una de las muestras (25 μl) se separó en 1D-E y se detectó mediante WB el nivel de expresión de las proteínas de interés. Las señales obtenidas se cuantificaron mediante el *software Image J*. La tasa de traducción se determinó a través del cálculo del incremento de la intensidad de la señal inmunológica en cada una de las bandas a lo largo del tiempo de incorporación del AHA (0, 1, 2, 4, 6, y 8 horas), tomándose como referencia (adquiriendo el valor de 1) la primera banda cuantificable.

8. Técnicas de microscopía.

La observación microscópica de *S. cerevisiae* se realizó en fresco utilizando el microscopio óptico “*Axioskop 2 Fluorescence Microscope*” (Zeiss), y las imágenes se capturaron mediante la cámara “*AxioCam MRm*” (Zeiss). En el resto de técnicas microscópicas llevadas a cabo en este trabajo se utilizó el microscopio óptico “*Nikon Eclipse E600*” con cámara digital refrigerada “*DS-Ri 1*” equipado de sistema de epi-fluorescencia. Para la observación de *A. thaliana* también se utilizó

la lupa binocular “*Nikon SMZ800*” con cámara digital refrigerada “*Color View 12*”. Para la microscopía confocal se utilizaron los equipos de Leica “*True Confocal Scanning (TCS) SL*” en el caso de plantas o el “*TCS-SP2-AOBS*” en el caso de células humanas. Las imágenes se capturaron y se procesaron mediante el programa “*Leica Confocal Software*” (LCS).

8.1. *A. thaliana*.

8.1.1. Recuento de tipos celulares del xilema en hipocotilos.

Se utilizaron hipocotilos extraídos de plantas de 2 meses de edad crecidas *in vitro*. Los hipocotilos se depositaron en 1 ml de solución de maceración (50% ácido acético y 3% peróxido de hidrógeno), donde se incubaron durante 4 horas a 95°C cuidando de mantener siempre el mismo volumen de la solución de maceración. Posteriormente se eliminó la solución y se lavó dos veces con agua estéril. Se añadió 1 ml de agua estéril y 150 µl de una solución de 0.5 M Na₂CO₃. Se comprobó la neutralización del pH y se retiró la solución. Se realizaron 3 lavados con agua. Finalmente se resuspendió con 50 µl de agua estéril y se conservaron los hipocotilos a 4 °C hasta su uso.

En el momento de su visualización, se disgregaron los hipocotilos mediante pipeteo. 10 µl de la suspensión se colocaron sobre un portaobjetos y se tiñeron con 10 µl de calcoflúor 0.01% en agua (w/v). La observación se realizó en el microscopio “*Nikon Eclipse E600*” utilizando una lámpara de fluorescencia “*UV Nikon*” y el filtro para la visualización de calcoflúor. Por cada planta/hipocotilo analizado se fotografiaron al menos 100 células.

8.1.2. Cortes de hipocotilo para tinción histoquímica.

Se utilizaron hipocotilos extraídos de plantas de 2 meses de edad crecidas *in vitro*. Cada hipocotilo se depositó en 500 µl de solución de fijación (3.7% formaldehído, 5% ácido acético y 50% etanol) en tubos de 1.5 ml. Los tubos se colocaron en una

bomba de vacío Edwards y se infiltraron hasta que la solución de fijación empezó a bullir. Las muestras se dejaron en reposo durante 5 minutos y se repitió la infiltración dos veces más. Los hipocotilos se incubaron durante toda la noche a 4°C. Posteriormente, los hipocotilos se incluyeron en parafina automáticamente utilizando el procesador de tejidos “Leica TP1020”. Tras la inclusión, se formaron los bloques de parafina mediante el equipo “Leica EG1150 H” y se dejaron solidificar a 4°C. Los bloques se almacenaron a 4°C hasta su uso.

Los bloques se cortaron con un grosor de 10 µm utilizando un microtomo “Microm HM330”. Los cortes se colocaron sobre portaobjetos de poli-lisina. Para la fijación de las muestras en parafina se incubaron durante toda la noche a 40°C utilizando el equipo “Paltonic” de Selecta. Posteriormente para desparafinar las muestras se realizaron 2 incubaciones de 10 minutos con “Histo-Clear” (Thermo Scientific). Seguidamente, se realizaron incubaciones consecutivas de 2 minutos con etanol al 100, 75, 50 y 25%, finalizando con una incubación con agua, tras la que se dejaron secar los cortes. Posteriormente, los cortes se tiñeron utilizando una solución de floroglucinol-HCl compuesta por floroglucinol 0.16 M, etanol 16% y HCl 7.4%. Se utilizaron 3 gotas de la solución de floroglucinol en cada portaobjetos. Los cortes se observaron en campo claro utilizando el microscopio óptico.

8.1.3. Tinción con yoduro de propidio.

Plántulas de *A. thaliana* crecidas *in vitro* se incubaron en una solución de 10 µg/ml yoduro de propidio durante 10-15 minutos. Posteriormente se seccionaron las raíces y se depositaron sobre un portaobjetos con una gota de agua. Se visualizó la fluorescencia en el microscopio confocal utilizando el láser de excitación de helio y neón (He-Ne I) a 543 nm, con un divisor de haz doble dicróico (488/543) y una detección espectral entre 600 y 660 nm.

8.1.4. Detección de NO.

Raíces de plántulas crecidas *in vitro* durante 5 días de edad se incubaron durante 1 hora con 10 μM de DAF-FM DA disuelto en tampón de tinción compuesto por 5 mM MES-KOH pH 5.7, 0.25 mM KCl, 1 mM CaCl_2 , a temperatura ambiente en oscuridad. Posteriormente, se realizaron 3 lavados de 10 minutos con tampón de tinción, y se procedió a la observación en el microscopio confocal. Para ello, se utilizó el láser de excitación de argón (Ar) a 488 nm, con un divisor de haz dicróico de 500 nm y una detección espectral entre 510 y 520 nm

8.1.5. Visualización del citoesqueleto de actina.

La estructuración de los filamentos de actina se observó gracias a la emisión fluorescente de la GFP fusionada a la proteína talina mediante el microscopio confocal. Para ello se utilizó el láser de excitación de argón (Ar) a 488 nm, con un dicróico de 500 nm y una detección espectral entre 510 y 535 nm.

8.2. *N. benthamiana*: experimentos de expresión transitoria y BiFC.

Se utilizaron secciones circulares de 1-2 cm de diámetro de hojas agro-infiltradas. Las secciones se depositaron sobre un portaobjetos cubiertas con “Mowiol[®] 4-88” (Polysciences) preparado siguiendo las instrucciones del fabricante. La fluorescencia se visualizó en el lado abaxial de las hojas mediante el microscopio confocal. Las imágenes fluorescentes debidas a las proteínas GFP e YFP, fueron obtenidas usando el láser de excitación de Ar a 488 nm, como se indica en el punto 8.1.5. Para observar la fluorescencia debida a la proteína mRFP, se utilizó el láser de excitación de He-Ne I a 543 nm, con un divisor de haz doble dicróico (488/543) y una detección espectral entre 564 y 610 nm.

8.3. *H. sapiens*.

Para llevar a cabo las técnicas de microscopía se colocaron láminas de 12 mm de diámetro (“*Cover glasses thickness No. 1 circular*” de Marienfeld) en las placas de crecimiento antes de cultivar las células HeLa. Las láminas se incubaron previamente con luz UV 10-15 minutos en la cabina de flujo laminar. Tras el cultivo y el tratamiento adecuado de las células se eliminó el medio de crecimiento por aspiración, y las células se lavaron con DMEM. Seguidamente se añadió 0.2 mg/ml DTSP (del inglés “*Dithiobis(succinimidyl propionate)*”) en DMEM y se incubó durante 15 minutos a 37°C. Posteriormente se realizaron 2 lavados de 5 minutos con 100 mM glicina en DMEM, y 2 lavados de 5 minutos con PBS. Se eliminó el PBS y se añadió solución Tsb (0.5% Tritón X-100 en tampón sb, compuesto por 1 mM EGTA, 4% polietilenglicol (PEG) 6000, 100 mM PIPES (del inglés “*1,4-piperazinediethanesulfonic acid*”) pH 6.9). Se incubó 10 minutos a temperatura ambiente. Tras ello, se realizaron 2 incubaciones más de 5 minutos con Tsb. Posteriormente se eliminó la solución y se añadió paraformaldehído al 4% en PBS y se incubó a temperatura ambiente 15 minutos. Tras la incubación se realizaron 2 lavados de 5 minutos con glicina 100 mM en PBS, seguidos de 2 lavados de 5 minutos con PBS.

8.3.1. Tinción con rodamina-faloidina y DAPI.

Para el marcaje de los filamentos de actina se utilizó rodamina-faloidina (“*Phalloidin, Tetramethyl-rhodamine B isothiocyanate (TRITC)*” de Sigma-Aldrich), preparada siguiendo las instrucciones del fabricante. Las láminas se incubaron con 50 µg/ml de rodamina-faloidina en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente, y se realizaron 2 lavados de 5 minutos con PBS. Las láminas además se tiñeron con DAPI 1.5 µg/ml cuando se montaron con el medio de montaje “*VECTASHIELD® Mounting Medium with DAPI*” de Vector Laboratories. La fluorescencia se visualizó en el microscopio confocal. Para observar la fluorescencia debida al TRITC, se utilizó el láser de excitación de He-

Ne I a 543 nm, un divisor de rayos acústico-óptico (AOBS, del inglés “*Acousto-Optical Beam Splitter*”) y una detección espectral entre 570 y 613 nm. Para observar también de forma simultánea la fluorescencia debida al DAPI, se utilizó el láser diodo a 405 nm, un divisor AOBS y una detección espectral entre 420 y 460 nm.

8.3.2. Inmunofluorescencia indirecta.

Para los ensayos de inmunofluorescencia las láminas se incubaron con 0.5% BSA (del inglés “*Bovine Serum Albumin*”) en PBS durante 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se incubó durante al menos 1 hora a temperatura ambiente (idealmente toda la noche a 4°C) con la disolución del anticuerpo primario (dilución 1:1000 del anticuerpo anti-eIF5A1 de *H. sapiens*) preparada en 0.5% BSA en PBS. Posteriormente, se realizaron 2 lavados de 10 minutos con PBS, y se incubó con la disolución del anticuerpo secundario preparada en 0.5% BSA en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. Como anticuerpo secundario se utilizó una dilución 1:2000 de un anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado a fluoróforo verde (“*Alexa Fluor® 488 Donkey Anti-Mouse IgG (H+L) Antibody*” de Life Technologies). Se realizaron 2 lavados de 10 minutos con PBS y las láminas se enjuagaron con agua. Las láminas se montaron con el medio “*VECTASHIELD® Mounting Medium with DAPI*” de Vector Laboratories y la fluorescencia se visualizó en el microscopio confocal. Para observar la fluorescencia debida al “*Alexa Fluor® 488*”, se utilizó el láser de excitación de Ar a 488 nm, un divisor AOBS y una detección espectral entre 500 y 540 nm. En este caso, para observar manera simultánea la fluorescencia debida al DAPI, se utilizó el láser diodo a 405 nm, un divisor AOBS y una detección espectral entre 420 y 440 nm.

BIBLIOGRAFÍA

Bibliografía

1. Ahuja, I., R.C.H. de Vos, A.M. Bones, and R.D. Hall, *Plant molecular stress responses face climate change*. Trends in Plant Science, 2010. **15**(12): p. 664-674.
2. Nicotra, A.B., O.K. Atkin, S.P. Bonser, A.M. Davidson, E.J. Finnegan, U. Mathesius, P. Poot, M.D. Purugganan, C.L. Richards, F. Valladares, and M. van Kleunen, *Plant phenotypic plasticity in a changing climate*. Trends in Plant Science, 2010. **15**(12): p. 684-692.
3. Santner, A. and M. Estelle, *Recent advances and emerging trends in plant hormone signalling*. Nature, 2009. **459**(7250): p. 1071-1078.
4. Tiburcio, A.F., T. Altabella, M. Bitrian, and R. Alcazar, *The roles of polyamines during the lifespan of plants: from development to stress*. Planta, 2014.
5. Alcázar, R., T. Altabella, F. Marco, C. Bortolotti, M. Reymond, C. Koncz, P. Carrasco, and A. Tiburcio, *Polyamines: molecules with regulatory functions in plant abiotic stress tolerance*. Planta, 2010. **231**(6): p. 1237-1249.
6. Galston, A.W. and R.K. Sawhney, *Polyamines in plant physiology*. PLANT PHYSIOLOGY, 1990. **94**(2): p. 406-410.
7. Hanfrey, C., S. Sommer, M.J. Mayer, D. Burtin, and A.J. Michael, *Arabidopsis polyamine biosynthesis: absence of ornithine decarboxylase and the mechanism of arginine decarboxylase activity*. Plant J, 2001. **27**(6): p. 551-560.
8. Panicot, M., E.G. Minguet, A. Ferrando, R. Alcazar, M.A. Blazquez, J. Carbonell, T. Altabella, C. Koncz, and A.F. Tiburcio, *A Polyamine Metabolon Involving Aminopropyl Transferase Complexes in Arabidopsis*. Plant Cell 2002. **14**(10): p. 2539-2551.
9. Belda-Palazón, B., L. Ruiz, E. Martí, S. Tárraga, A.F. Tiburcio, F. Culiáñez, R. Farràs, P. Carrasco, and A. Ferrando, *Aminopropyltransferases Involved in Polyamine Biosynthesis Localize Preferentially in the Nucleus of Plant Cells*. PLoS ONE, 2012. **7**(10): p. e46907.
10. Cona, A., G. Rea, R. Angelini, R. Federico, and P. Tavladoraki, *Functions of amine oxidases in plant development and defence*. Trends in Plant Science, 2006. **11**(2): p. 80-88.
11. Ferrando, A., P. Carrasco, J.C. Cuevas, T. Altabella, and A.F. Tiburcio, *Integrated molecular analysis of the polyamine pathway in abiotic stress signalling in Nitrogen acquisition and assimilation in higher plants*, S. Amancio and I. Stulen, Editors. 2005. p. 207-230.

Bibliografía

12. Thomas, T. and T. Thomas, *Polyamines in cell growth and cell death: molecular mechanisms and therapeutic applications*. Cell Mol Life Sci, 2001. **58**: p. 244 - 258.
13. Igarashi, K. and K. Kashiwagi, *Modulation of cellular function by polyamines*. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2010. **42**(1): p. 39-51.
14. Kusano, T., T. Berberich, C. Tateda, and Y. Takahashi, *Polyamines: essential factors for growth and survival*. Planta, 2008. **228**(3): p. 367-381.
15. Cuevas, J.C., R. Lopez-Cobollo, R. Alcazar, X. Zarza, C. Koncz, T. Altabella, J. Salinas, A.F. Tiburcio, and A. Ferrando, *Putrescine Is Involved in Arabidopsis Freezing Tolerance and Cold Acclimation by Regulating Abscisic Acid Levels in Response to Low Temperature*. Plant Physiol., 2008. **148**(2): p. 1094-1105.
16. Cuevas, J.C., R. Lopez-Cobollo, R. Alcazar, X. Zarza, C. Koncz, T. Altabella, J. Salinas, A.F. Tiburcio, and A. Ferrando, *Putrescine as a signal to modulate the indispensable ABA increase under cold stress*. Plant Signal Behav., 2009. **4**: p. 1-2.
17. Alet, A.I., D.H. Sanchez, J.C. Cuevas, M. Marina, P. Carrasco, T. Altabella, A.F. Tiburcio, and O.A. Ruiz, *New insights into the role of spermine in Arabidopsis thaliana under long-term salt stress*. Plant Sci, 2012. **182**: p. 94-100.
18. Gonzalez, M.E., F. Marco, E.G. Minguet, P. Carrasco-Sorli, M.A. Blázquez, J. Carbonell, O.A. Ruiz, and F.L. Pieckenstain, *Perturbation of spermine synthase gene expression and transcript profiling provide new insights on the role of the tetraamine spermine in Arabidopsis defense against Pseudomonas viridiflava*. Plant Physiol, 2011. **156**(4): p. 2266-77.
19. Tun, N.N., C. Santa-Catarina, T. Begum, V. Silveira, W. Handro, E.I.S. Floh, and G.F.E. Scherer, *Polyamines Induce Rapid Biosynthesis of Nitric Oxide (NO) in Arabidopsis thaliana Seedlings*. Plant Cell Physiol., 2006. **47**(3): p. 346-354.
20. Simontacchi, M., C. Garcia-Mata, C.G. Bartoli, G.E. Santa-Maria, and L. Lamattina, *Nitric oxide as a key component in hormone-regulated processes*. Plant Cell Rep, 2013. **32**(6): p. 853-66.
21. Vera-Sirera, F., E.G. Minguet, S.K. Singh, K. Ljung, H. Tuominen, M.A. Blázquez, and J. Carbonell, *Role of polyamines in plant vascular development*. Plant Physiology and Biochemistry, 2010. **48**(7): p. 534-539.
22. Muñoz, L., E.G. Minguet, S.K. Singh, E. Pesquet, F. Vera-Sirera, C.L. Moreau-Courtois, J. Carbonell, M.A. Blázquez, and H. Tuominen, *ACAULIS5 controls Arabidopsis xylem specification through the*

Bibliografia

- prevention of premature cell death*. Development, 2008. **135**(15): p. 2573-2582.
23. Hamana, K., M. Niitsu, K. Samejima, and T. Itoh, *Polyamines of the thermophilic eubacteria belonging to the genera Thermosipho, Thermaerobacter and Caldicellulosiruptor*. Microbios, 2001. **104**(409): p. 177-85.
 24. Wortham, B.W., C.N. Patel, and M.A. Oliveira, *Polyamines in bacteria: pleiotropic effects yet specific mechanisms*. Adv Exp Med Biol, 2007. **603**: p. 106-15.
 25. Wortham, B., M. Oliveira, and C. Patel, *Polyamines in Bacteria: Pleiotropic Effects yet Specific Mechanisms*, in *The Genus Yersinia*, R. Perry and J. Fetherston, Editors. 2007, Springer New York. p. 106-115.
 26. Oshima, T., *Unique polyamines produced by an extreme thermophile, Thermus thermophilus*. Amino Acids, 2007. **33**(2): p. 367-372.
 27. Mandal, S., A. Mandal, H.E. Johansson, A.V. Orjalo, and M.H. Park, *Depletion of cellular polyamines, spermidine and spermine, causes a total arrest in translation and growth in mammalian cells*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2013. **110**(6): p. 2169-2174.
 28. Seiler, N. and F. Raul, *Polyamines and the Intestinal Tract*. Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences, 2007. **44**(4): p. 365-411.
 29. Casero, R.A. and L.J. Marton, *Targeting polyamine metabolism and function in cancer and other hyperproliferative diseases*. Nat Rev Drug Discov, 2007. **6**(5): p. 373-390.
 30. Mackintosh, C.A. and A.E. Pegg, *Effect of spermine synthase deficiency on polyamine biosynthesis and content in mice and embryonic fibroblasts, and the sensitivity of fibroblasts to 1,3-bis-(2-chloroethyl)-N-nitrosourea*. Biochem J, 2000. **351 Pt 2**: p. 439-47.
 31. Hamasaki-Katagiri, N., Y. Katagiri, C.W. Tabor, and H. Tabor, *Spermine is not essential for growth of Saccharomyces cerevisiae: identification of the SPE4 gene (spermine synthase) and characterization of a spe4 deletion mutant*. Gene, 1998. **210**(2): p. 195-201.
 32. Imai, A., T. Akiyama, T. Kato, S. Sato, S. Tabata, K.T. Yamamoto, and T. Takahashi, *Spermine is not essential for survival of Arabidopsis*. FEBS Letters, 2004. **556**(1-3): p. 148-152.
 33. Hamasaki-Katagiri, N., C.W. Tabor, and H. Tabor, *Spermidine biosynthesis in Saccharomyces cerevisiae: Polyamine requirement of a null mutant of the SPE3 gene (spermidine synthase)*. Gene, 1997. **187**(1): p. 35-43.

Bibliografia

34. Wang, X., Y. Ikeguchi, D.E. McCloskey, P. Nelson, and A.E. Pegg, *Spermine Synthesis Is Required for Normal Viability, Growth, and Fertility in the Mouse*. Journal of Biological Chemistry, 2004. **279**(49): p. 51370-51375.
35. Urano, K., T. Hobo, and K. Shinozaki, *Arabidopsis ADC genes involved in polyamine biosynthesis are essential for seed development*. FEBS Letters, 2005. **579**(6): p. 1557-1564.
36. Imai, A., T. Matsuyama, Y. Hanzawa, T. Akiyama, M. Tamaoki, H. Saji, Y. Shirano, T. Kato, H. Hayashi, D. Shibata, S. Tabata, Y. Komeda, and T. Takahashi, *Spermidine Synthase Genes Are Essential for Survival of Arabidopsis*. Plant Physiol., 2004. **135**(3): p. 1565-1573.
37. Ge, C., X. Cui, Y. Wang, Y. Hu, Z. Fu, D. Zhang, Z. Cheng, and J. Li, *BUD2, encoding an S-adenosylmethionine decarboxylase, is required for Arabidopsis growth and development*. Cell Res, 2006. **16**(5): p. 446-456.
38. Cooper, H.L., M.H. Park, J.E. Folk, B. Safer, and R. Braverman, *Identification of the hypusine-containing protein hy⁺ as translation initiation factor eIF-4D*. Proc Natl Acad Sci, 1983. **80**(7): p. 1854-1857.
39. Chattopadhyay, M.K., C.W. Tabor, and H. Tabor, *Spermidine but not spermine is essential for hypusine biosynthesis and growth in Saccharomyces cerevisiae: spermine is converted to spermidine in vivo by the FMS1-amine oxidase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(24): p. 13869-74.
40. Chattopadhyay, M.K., M.H. Park, and H. Tabor, *Hypusine modification for growth is the major function of spermidine in Saccharomyces cerevisiae polyamine auxotrophs grown in limiting spermidine*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2008. **105**(18): p. 6554-6559.
41. Shiba, T., H. Mizote, T. Kaneko, T. Nakajima, K. Yasuo, and I. sano, *Hypusine, a new amino acid occurring in bovine brain: Isolation and structural determination*. Biochim Biophys Acta (BBA) - General Subjects, 1971. **244**(3): p. 523-531.
42. Park, M., *The post-translational synthesis of a polyamine-derived amino acid, hypusine, in the eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF5A)*. J Biochem, 2006. **139**: p. 161 - 169.
43. Wolff, E.C., K.R. Kang, Y.S. Kim, and M.H. Park, *Posttranslational synthesis of hypusine: evolutionary progression and specificity of the hypusine modification*. Amino Acids, 2007. **33**(2): p. 341-350.
44. Park, M.H., K. Nishimura, C.F. Zanelli, and S.R. Valentini, *Functional significance of eIF5A and its hypusine modification in eukaryotes*. Amino Acids, 2010. **38**(2): p. 491-500.

Bibliografia

45. Hanawa-Suetsugu, K., S. Sekine, H. Sakai, C. Hori-Takemoto, T. Terada, S. Unzai, J.R. Tame, S. Kuramitsu, M. Shirouzu, and S. Yokoyama, *Crystal structure of elongation factor P from Thermus thermophilus HB8*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(26): p. 9595-600.
46. Tong, Y., I. Park, B.-S. Hong, L. Nedyalkova, W. Tempel, and H.-W. Park, *Crystal structure of human eIF5A1: Insight into functional similarity of human eIF5A1 and eIF5A2*. Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics, 2009. **75**(4): p. 1040-1045.
47. Xu, A. and K.Y. Chen, *Hypusine Is Required for a Sequence-specific Interaction of Eukaryotic Initiation Factor 5A with Postsynthetic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment RNA*. J.Biol.Chem., 2001. **276**(4): p. 2555-2561.
48. Klier, H., R. Csonga, H.C. Joao, C. Eckerskorn, M. Auer, F. Lottspeich, and J. Eder, *Isolation and Structural Characterization of Different Isoforms of the Hypusine-Containing Protein eIF-5A from HeLa Cells*. Biochemistry, 1995. **34**(45): p. 14693-14702.
49. Lee, S.B., J.H. Park, J. Kaewel, M. Sramkova, R. Weigert, and M.H. Park, *The effect of hypusine modification on the intracellular localization of eIF5A*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2009. **383**(4): p. 497-502.
50. Ishfaq, M., K. Maeta, S. Maeda, T. Natsume, A. Ito, and M. Yoshida, *Acetylation regulates subcellular localization of eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF5A)*. FEBS Lett, 2012. **586**(19): p. 3236-41.
51. Parreiras, E.S.L.T., M.D. Gomes, E.B. Oliveira, and C.M. Costa-Neto, *The N-terminal region of eukaryotic translation initiation factor 5A signals to nuclear localization of the protein*. Biochem Biophys Res Commun, 2007. **362**(2): p. 393-8.
52. Lipowsky, G., F.R. Bischoff, P. Schwarzmaier, R. Kraft, S. Kostka, E. Hartmann, U. Kutay, and D. Gorlich, *Exportin 4: a mediator of a novel nuclear export pathway in higher eukaryotes*. The EMBO Journal, 2000. **19**(16): p. 4362-4371.
53. Zender, L., W. Xue, J. Zuber, C.P. Semighini, A. Krasnitz, B. Ma, P. Zender, S. Kubicka, J.M. Luk, P. Schirmacher, W.R. McCombie, M. Wigler, J. Hicks, G.J. Hannon, S. Powers, and S.W. Lowe, *An oncogenomics-based in vivo RNAi screen identifies tumor suppressors in liver cancer*. Cell, 2008. **135**(5): p. 852-64.
54. Rosorius, O., B. Reichart, F. Kratzer, P. Heger, M.C. Dabauvalle, and J. Hauber, *Nuclear pore localization and nucleocytoplasmic transport of eIF-5A: evidence for direct interaction with the export receptor CRM1*. Journal of Cell Science, 1999. **112**(14): p. 2369-2380.

Bibliografia

55. Kang, H.A., H.G. Schwelberger, and J.W. Hershey, *Translation initiation factor eIF-5A, the hypusine-containing protein, is phosphorylated on serine in Saccharomyces cerevisiae*. J Biol Chem, 1993. **268**(20): p. 14750-6.
56. Moreno-Romero, J., M. Carme Espunya, M. Platara, J. Ariño, and M. Carmen Martínez, *A role for protein kinase CK2 in plant development: evidence obtained using a dominant-negative mutant*. The Plant Journal, 2008. **55**(1): p. 118-130.
57. Lebska, M., A. Ciesielski, L. Szymona, L. Godecka, E. Lewandowska-Gnatowska, J. Szczegieliński, and G. Muszynska, *Phosphorylation of maize eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF5A) by casein kinase 2: identification of phosphorylated residue and influence on intracellular localization of eIF5A*. J Biol Chem, 2010. **285**(9): p. 6217-26.
58. Lewandowska-Gnatowska, E., L. Szymona, M. Lebska, J. Szczegieliński, and G. Muszynska, *Phosphorylation of maize eukaryotic translation initiation factor on Ser2 by catalytic subunit CK2*. Mol Cell Biochem, 2011. **356**(1-2): p. 241-4.
59. Chung, J., A.A. Rocha, R.R. Tonelli, B.A. Castilho, and S. Schenkman, *Eukaryotic initiation factor 5A dephosphorylation is required for translational arrest in stationary phase cells*. Biochem J, 2013. **451**(2): p. 257-67.
60. Kang, K.R. and S.I. Chung, *Characterization of yeast deoxyhypusine synthase: PKC-dependent phosphorylation in vitro and functional domain identification*. Exp Mol Med, 1999. **31**(4): p. 210-6.
61. Kang, K.R., J.S. Kim, S.I. Chung, M.H. Park, Y.W. Kim, D. Lim, and S.Y. Lee, *Deoxyhypusine synthase is phosphorylated by protein kinase C in vivo as well as in vitro*. Exp Mol Med, 2002. **34**(6): p. 489-95.
62. Kang, K.R. and S.I. Chung, *Protein kinase CK2 phosphorylates and interacts with deoxyhypusine synthase in HeLa cells*. Experimental & molecular medicine, 2003. **35**(6): p. 556-564.
63. Shang, Y., X. Zhao, B. Tian, Y. Wang, F. Ren, B. Jia, Y. Zhai, W. Chen, D. He, and Z. Chang, *CHIP/Stub1 interacts with eIF5A and mediates its degradation*. Cellular Signalling, 2014. **26**(5): p. 1098-1104.
64. Gentz, P.M., G.L. Blatch, and R.A. Dorrington, *Dimerization of the yeast eukaryotic translation initiation factor 5A requires hypusine and is RNA dependent*. FEBS Journal, 2009. **276**(3): p. 695-706.
65. Dias, C., W. Garcia, C. Zanelli, and S. Valentini, *eIF5A dimerizes not only in vitro but also in vivo and its molecular envelope is similar to the EF-P monomer*. Amino Acids, 2013. **44**(2): p. 631-644.

Bibliografia

66. Yanagisawa, T., T. Sumida, R. Ishii, C. Takemoto, and S. Yokoyama, *A paralog of lysyl-tRNA synthetase aminoacylates a conserved lysine residue in translation elongation factor P*. *Nat Struct Mol Biol*, 2010. **17**(99): p. 1136-1143.
67. Roy, H., S.B. Zou, T.J. Bullwinkle, B.S. Wolfe, M.S. Gilreath, C.J. Forsyth, W.W. Navarre, and M. Ibba, *The tRNA synthetase paralog PoxA modifies elongation factor-P with (R)-beta-lysine*. *Nat Chem Biol*, 2011. **7**(10): p. 667-9.
68. Park, J.H., H.E. Johansson, H. Aoki, B.X. Huang, H.Y. Kim, M.C. Ganoza, and M.H. Park, *Post-translational modification by beta-lysylation is required for activity of Escherichia coli elongation factor P (EF-P)*. *J Biol Chem*, 2012. **287**(4): p. 2579-90.
69. Balibar, C.J., D. Iwanowicz, and C.R. Dean, *Elongation factor P is dispensable in Escherichia coli and Pseudomonas aeruginosa*. *Curr Microbiol*, 2013. **67**(3): p. 293-9.
70. Aoki, H., J. Xu, A. Emili, J.G. Chosay, A. Golshani, and M.C. Ganoza, *Interactions of elongation factor EF-P with the Escherichia coli ribosome*. *FEBS Journal*, 2008. **275**(4): p. 671-681.
71. Blaha, G., R.E. Stanley, and T.A. Steitz, *Formation of the First Peptide Bond: The Structure of EF-P Bound to the 70S Ribosome*. *Science*, 2009. **325**(5943): p. 966-970.
72. Bullwinkle, T.J., S.B. Zou, A. Rajkovic, S.J. Hersch, S. Elgamal, N. Robinson, D. Smil, Y. Bolshan, W.W. Navarre, and M. Ibba, *(R)-beta-Lysine-modified Elongation Factor P Functions in Translation Elongation*. *Journal of Biological Chemistry*, 2013. **288**(6): p. 4416-4423.
73. Ude, S., J. Lassak, A.L. Starosta, T. Kraxenberger, D.N. Wilson, and K. Jung, *Translation Elongation Factor EF-P Alleviates Ribosome Stalling at Polyproline Stretches*. *Science*, 2013. **339**(6115): p. 82-85.
74. Doerfel, L.K., I. Wohlgemuth, C. Kothe, F. Peske, H. Urlaub, and M.V. Rodnina, *EF-P Is Essential for Rapid Synthesis of Proteins Containing Consecutive Proline Residues*. *Science*, 2013. **339**(6115): p. 85-88.
75. Kemper, W.M., K.W. Berry, and W.C. Merrick, *Purification and properties of rabbit reticulocyte protein synthesis initiation factors M2Balpha and M2Bbeta*. *J Biol Chem*, 1976. **251**(18): p. 5551-5557.
76. Kang, H.A. and J.W.B. Hershey, *Effect of Initiation-Factor eIF5A Depletion on Protein-Synthesis and Proliferation of Saccharomyces cerevisiae*. *J.Biol.Chem.*, 1994. **269**(6): p. 3934-3940.
77. Zuk, D. and A. Jacobson, *A single amino acid substitution in yeast eIF-5A results in mRNA stabilization*. *EMBO J*, 1998. **17**(10): p. 2914-25.

Bibliografia

78. Zanelli, C.F., A.L. Maragno, A.P. Gregio, S. Komili, J.R. Pandolfi, C.A. Mestriner, W.R. Lustrì, and S.R. Valentini, *eIF5A binds to translational machinery components and affects translation in yeast*. Biochem Biophys Res Commun, 2006. **348**(4): p. 1358-66.
79. Sievert, H., S. Venz, O. Platas-Barradas, V.M. Dhople, M. Schaletzky, C.-H. Nagel, M. Braig, M. Preukschas, N. Pällmann, C. Bokemeyer, T.H. Brümmendorf, R. Pörtner, R. Walther, K.E. Duncan, J. Hauber, and S. Balabanov, *Protein-protein-interaction Network Organization of the Hypusine Modification System*. Molecular & Cellular Proteomics, 2012. **11**(11): p. 1289-1305.
80. Cano, V.S., G.A. Jeon, H.E. Johansson, C.A. Henderson, J.H. Park, S.R. Valentini, J.W. Hershey, and M.H. Park, *Mutational analyses of human eIF5A-I--identification of amino acid residues critical for eIF5A activity and hypusine modification*. FEBS J, 2008. **275**(1): p. 44-58.
81. Dias, C.A., V.S. Cano, S.M. Rangel, L.H. Apponi, M.C. Frigieri, J.R. Muniz, W. Garcia, M.H. Park, R.C. Garratt, C.F. Zanelli, and S.R. Valentini, *Structural modeling and mutational analysis of yeast eukaryotic translation initiation factor 5A reveal new critical residues and reinforce its involvement in protein synthesis*. FEBS J, 2008. **275**(8): p. 1874-88.
82. Saini, P., D.E. Eyler, R. Green, and T.E. Dever, *Hypusine-containing protein eIF5A promotes translation elongation*. Nature, 2009. **459**(7243): p. 118-121.
83. Gregio, A.P.B., V.P.S. Cano, J.S. Avaca, S.R. Valentini, and C.F. Zanelli, *eIF5A has a function in the elongation step of translation in yeast*. Biochem Biophys Res Comm, 2009. **380**(4): p. 785-790.
84. Valentini, S.R., J.M. Casolari, C.C. Oliveira, P.A. Silver, and A.E. McBride, *Genetic Interactions of Yeast Eukaryotic Translation Initiation Factor 5A (eIF5A) Reveal Connections to Poly(A)-Binding Protein and Protein Kinase C Signaling*. Genetics, 2002. **160**(2): p. 393-405.
85. Schrader, R., C. Young, D. Kozian, R. Hoffmann, and F. Lottspeich, *Temperature-sensitive eIF5A Mutant Accumulates Transcripts Targeted to the Nonsense-mediated Decay Pathway*. Journal of Biological Chemistry, 2006. **281**(46): p. 35336-35346.
86. Zanelli, C. and S. Valentini, *Is there a role for eIF5A in translation*. Amino Acids, 2007. **33**: p. 351 - 358.
87. Parker, R. and U. Sheth, *P Bodies and the Control of mRNA Translation and Degradation*. Molecular Cell, 2007. **25**(5): p. 635-646.
88. Buchan, J.R. and R. Parker, *Eukaryotic Stress Granules: The Ins and Outs of Translation*. Molecular Cell, 2009. **36**(6): p. 932-941.

Bibliografía

89. Gilks, N., N. Kedersha, M. Ayodele, L. Shen, G. Stoecklin, L.M. Dember, and P. Anderson, *Stress Granule Assembly Is Mediated by Prion-like Aggregation of TIA-1*. *Molecular Biology of the Cell*, 2004. **15**(12): p. 5383-5398.
90. Shi, X.-P., K.-C. Yin, J. Ahern, L.J. Davis, A.M. Stern, and L. Waxman, *Effects of NI-guanyl-1,7-diaminoheptane, an inhibitor of deoxyhypusine synthase, on the growth of tumorigenic cell lines in culture*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1996. **1310**(1): p. 119-126.
91. Li, C.H., T. Ohn, P. Ivanov, S. Tisdale, and P. Anderson, *eIF5A Promotes Translation Elongation, Polysome Disassembly and Stress Granule Assembly*. *PLoS ONE*, 2010. **5**(4): p. e9942.
92. Hauber, I., D. Bevec, J. Heukeshoven, F. Kratzer, F. Horn, A. Choidas, T. Harrer, and J. Hauber, *Identification of cellular deoxyhypusine synthase as a novel target for antiretroviral therapy*. *J Clin Invest*, 2005. **115**: p. 76 - 85.
93. Bevec, D., H. Jaksche, M. Oft, T. Wohl, M. Himmelspach, A. Pacher, M. Schebesta, K. Koettnitz, M. Dobrovnik, R. Csonga, F. Lottspeich, and J. Hauber, *Inhibition of HIV-1 replication in lymphocytes by mutants of the Rev cofactor eIF-5A*. *Science*, 1996. **271**(5257): p. 1858-60.
94. Gutierrez, E., B.-S. Shin, Christopher J. Woolstenhulme, J.-R. Kim, P. Saini, Allen R. Buskirk, and Thomas E. Dever, *eIF5A Promotes Translation of Polyproline Motifs*. *Molecular Cell*, 2013. **51**(1): p. 35-45.
95. Schnier, J., H.G. Schwelberger, Z. Smit-McBride, H.A. Kang, and J.W. Hershey, *Translation initiation factor 5A and its hypusine modification are essential for cell viability in the yeast *Saccharomyces cerevisiae**. *Molecular and Cellular Biology*, 1991. **11**(6): p. 3105-3114.
96. Wohl, T., H. Klier, H. Ammer, F. Lottspeich, and V. Magdolen, *The HYP2 gene of *Saccharomyces cerevisiae* is essential for aerobic growth: characterization of different isoforms of the hypusine-containing protein Hyp2p and analysis of gene disruption mutants*. *Mol Gen Genet*, 1993. **241**(3-4): p. 305-11.
97. Schwelberger, H.G., H.A. Kang, and J.W. Hershey, *Translation initiation factor eIF-5A expressed from either of two yeast genes or from human cDNA. Functional identity under aerobic and anaerobic conditions*. *J Biol Chem*, 1993. **268**(19): p. 14018-25.
98. Clement, P.M.J., C.A. Henderson, Z.A. Jenkins, Z. Smit-McBride, E.C. Wolff, J.W.B. Hershey, M.H. Park, and H.E. Johansson, *Identification and characterization of eukaryotic initiation factor 5A-2*. *European Journal of Biochemistry*, 2003. **270**(21): p. 4254-4263.

Bibliografía

99. Magdolen, V., H. Klier, T. Wohl, F. Klink, H. Hirt, J. Hauber, and F. Lottspeich, *The function of the hypusine-containing proteins of yeast and other eukaryotes is well conserved*. Mol Gen Genet, 1994. **244**(6): p. 646-52.
100. Zanelli, C.F. and S.R. Valentini, *Pkc1 acts through Zds1 and Gic1 to suppress growth and cell polarity defects of a yeast eIF5A mutant*. Genetics, 2005: p. genetics.
101. Balasundaram, D., C.W. Tabor, and H. Tabor, *Spermidine or spermine is essential for the aerobic growth of Saccharomyces cerevisiae*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1991. **88**(13): p. 5872-5876.
102. Park, M.H., Y.B. Lee, and Y.A. Joe, *Hypusine is essential for eukaryotic cell proliferation*. Biological Signals, 1997. **6**(3): p. 115-123.
103. Lefèvre, P.L.C., M.-F. Palin, and B.D. Murphy, *Polyamines on the Reproductive Landscape*. Endocrine Reviews, 2011. **32**(5): p. 694-712.
104. Merlini, L., O. Dudin, and S.G. Martin, *Mate and fuse: how yeast cells do it*. Open Biol, 2013. **3**(3): p. 130008.
105. Slaughter, B.D., S.E. Smith, and R. Li, *Symmetry breaking in the life cycle of the budding yeast*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2009. **1**(3): p. a003384.
106. Matheos, D., M. Metodiev, E. Muller, D. Stone, and M.D. Rose, *Pheromone-induced polarization is dependent on the Fus3p MAPK acting through the formin Bni1p*. J Cell Biol, 2004. **165**(1): p. 99-109.
107. Evangelista, M., K. Blundell, M.S. Longtine, C.J. Chow, N. Adames, J.R. Pringle, M. Peter, and C. Boone, *Bni1p, a yeast formin linking cdc42p and the actin cytoskeleton during polarized morphogenesis*. Science, 1997. **276**(5309): p. 118-22.
108. Pruyne, D., M. Evangelista, C. Yang, E. Bi, S. Zigmond, A. Bretscher, and C. Boone, *Role of formins in actin assembly: nucleation and barbed-end association*. Science, 2002. **297**(5581): p. 612-5.
109. Bauer, M.A., D. Carmona-Gutiérrez, C. Ruckenstein, A. Reisenbichler, E.V. Megalou, T. Eisenberg, C. Magnes, H. Jungwirth, F.M. Sinner, T.R. Pieber, K.-U. Fröhlich, G. Kroemer, N. Tavernarakis, and F. Madeo, *Spermidine promotes mating and fertilization efficiency in model organisms*. Cell Cycle, 2013. **12**(2): p. 346-352.
110. Hanauske-Abel, H.M., M.H. Park, A.R. Hanauske, A.M. Popowicz, M. Lalande, and J.E. Folk, *Inhibition of the G1-S transition of the cell cycle by inhibitors of deoxyhypusine hydroxylation*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research, 1994. **1221**(2): p. 115-124.

Bibliografia

111. Caraglia, M., M.H. Park, E.C. Wolff, M. Marra, and A. Abbruzzese, *eIF5A isoforms and cancer: two brothers for two functions?* Amino acids, 2013. **44**(1): p. 103-9.
112. Clement, P.M.J., H.E. Johansson, E.C. Wolff, and M.H. Park, *Differential expression of eIF5A-1 and eIF5A-2 in human cancer cells.* FEBS Journal, 2006. **273**(6): p. 1102-1114.
113. Nishimura, K., S. Lee, J. Park, and M. Park, *Essential role of eIF5A-1 and deoxyhypusine synthase in mouse embryonic development.* Amino Acids, 2012. **42**(2): p. 703-710.
114. Maier, B., T. Ogihara, A.P. Trace, S.A. Tersey, R.D. Robbins, S.K. Chakrabarti, C.S. Nunemaker, N.D. Stull, C.A. Taylor, J.E. Thompson, R.S. Dondero, E.C. Lewis, C.A. Dinarello, J.L. Nadler, and R.G. Mirmira, *The unique hypusine modification of eIF5A promotes islet β cell inflammation and dysfunction in mice.* J.Clin.Invest., 2010. **120**(6): p. 2156-2170.
115. Hoque, M., H. Hanauske-Abel, P. Palumbo, D. Saxena, D. D'Alliessi Gandolfi, M. Park, T. Pe'ery, and M. Mathews, *Inhibition of HIV-1 gene expression by Ciclopirox and Deferiprone, drugs that prevent hypusination of eukaryotic initiation factor 5A.* Retrovirology, 2009. **6**(1): p. 1-17-17.
116. Guan, X.Y., J.S.T. Sham, T.C.M. Tang, Y. Fang, K.K. Huo, and J.M. Yang, *Isolation of a Novel Candidate Oncogene within a Frequently Amplified Region at 3q26 in Ovarian Cancer.* Cancer Research, 2001. **61**(9): p. 3806-3809.
117. Cracchiolo, B.M., D.S. Heller, P.M.J. Clement, E.C. Wolff, M.H. Park, and H.M. Hanauske-Abel, *Eukaryotic initiation factor 5A-1 (eIF5A-1) as a diagnostic marker for aberrant proliferation in intraepithelial neoplasia of the vulva.* Gynecologic Oncology, 2004. **94**(1): p. 217-222.
118. Nishimura, K., K. Murozumi, A. Shirahata, M. Park, K. Kashiwagi, and K. Igarashi, *Independent roles of eIF5A and polyamines in cell proliferation.* Biochem J, 2005. **385**: p. 779 - 785.
119. Chen, Z.P., Y.P. Yan, Q.J. Ding, S. Knapp, J.A. Potenza, H.J. Schugar, and K.Y. Chen, *Effects of inhibitors of deoxyhypusine synthase on the differentiation of mouse neuroblastoma and erythroleukemia cells.* Cancer Lett, 1996. **105**(2): p. 233-9.
120. Caraglia, M., M. Marra, G. Giuberti, A.M. D'Alessandro, A. Baldi, P. Tassone, S. Venuta, P. Tagliaferri, and A. Abbruzzese, *The eukaryotic initiation factor 5A is involved in the regulation of proliferation and apoptosis induced by interferon-alpha and EGF in human cancer cells.* J Biochem, 2003. **133**(6): p. 757-65.

Bibliografía

121. Taylor, C.A., M. Senchyna, J. Flanagan, E.M. Joyce, D.O. Cliche, A.N. Boone, S. Culp-Stewart, and J.E. Thompson, *Role of eIF5A in TNF-alpha-mediated apoptosis of lamina cribrosa cells*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2004. **45**(10): p. 3568-76.
122. Thompson, J.E., M.T. Hopkins, C. Taylor, and T.W. Wang, *Regulation of senescence by eukaryotic translation initiation factor 5A: implications for plant growth and development*. Trends in Plant Science, 2004. **9**(4): p. 174-179.
123. Kim, K.K., L.W. Hung, H. Yokota, R. Kim, and S.H. Kim, *Crystal structures of eukaryotic translation initiation factor 5A from Methanococcus jannaschii at 1.8 Å resolution*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(18): p. 10419-24.
124. Wang, T.-W., L. Lu, D. Wang, and J.E. Thompson, *Isolation and Characterization of Senescence-induced cDNAs Encoding Deoxyhypusine Synthase and Eucaryotic Translation Initiation Factor 5A from Tomato*. J. Biol. Chem., 2001. **276**(20): p. 17541-17549.
125. Chamot, D. and C. Kuhlemeier, *Differential expression of genes encoding the hypusine-containing translation initiation factor, eIF-5A, in tobacco*. Nucleic Acids Res, 1992. **20**(4): p. 665-9.
126. Ma, Y., E. Miura, B.K. Ham, H.W. Cheng, Y.J. Lee, and W.J. Lucas, *Pumpkin eIF5A isoforms interact with components of the translational machinery in the cucurbit sieve tube system*. The Plant Journal, 2010. **64**(3): p. 536-550.
127. Wang, T.W., L. Lu, D. Wang, and J.E. Thompson, *Isolation and characterization of senescence-induced cDNAs encoding deoxyhypusine synthase and eucaryotic translation initiation factor 5A from tomato*. J Biol Chem, 2001. **276**(20): p. 17541-9.
128. Wang, T.W., C.G. Zhang, W. Wu, L.M. Nowack, E. Madey, and J.E. Thompson, *Antisense Suppression of Deoxyhypusine Synthase in Tomato Delays Fruit Softening and Alters Growth and Development*. PLANT PHYSIOLOGY, 2005. **138**(3): p. 1372-1382.
129. Lisón, P., S. Tárraga, P. López-Gresa, A. Saurí, C. Torres, L. Campos, J.M. Bellés, V. Conejero, and I. Rodrigo, *A noncoding plant pathogen provokes both transcriptional and posttranscriptional alterations in tomato*. PROTEOMICS, 2013. **13**(5): p. 833-844.
130. Wang, T.W., L. Lu, C.G. Zhang, C. Taylor, and J.E. Thompson, *Pleiotropic effects of suppressing deoxyhypusine synthase expression in Arabidopsis thaliana*. Plant Mol Biol, 2003. **52**(6): p. 1223-1235.

Bibliografia

131. Duguay, J., S. Jamal, Z. Liu, T.W. Wang, and J.E. Thompson, *Leaf-specific suppression of deoxyhypusine synthase in Arabidopsis thaliana enhances growth without negative pleiotropic effects*. J. Plant. Physiol., 2007. **164**(4): p. 408-420.
132. Feng, H., Q. Chen, J. Feng, J. Zhang, X. Yang, and J. Zuo, *Functional Characterization of the Arabidopsis Eukaryotic Translation Initiation Factor 5A-2 That Plays a Crucial Role in Plant Growth and Development by Regulating Cell Division, Cell Growth, and Cell Death*. Plant Physiol., 2007. **144**(3): p. 1531-1545.
133. Hopkins, M.T., Y. Lampi, T.-W. Wang, Z. Liu, and J.E. Thompson, *Eukaryotic Translation Initiation Factor 5A Is Involved in Pathogen-Induced Cell Death and Development of Disease Symptoms in Arabidopsis*. Plant Physiol., 2008. **148**(1): p. 479-489.
134. Ren, B., Q. Chen, S. Hong, W. Zhao, J. Feng, H. Feng, and J. Zuo, *The Arabidopsis Eukaryotic Translation Initiation Factor eIF5A-2 Regulates Root Protoxylem Development by Modulating Cytokinin Signaling*. The Plant Cell Online, 2013.
135. Bishopp, A., H. Help, S. El-Showk, D. Weijers, B. Scheres, J. Friml, E. Benková, Ari P. Mähönen, and Y. Helariutta, *A Mutually Inhibitory Interaction between Auxin and Cytokinin Specifies Vascular Pattern in Roots*. Current Biology, 2011. **21**(11): p. 917-926.
136. Bishopp, A., E. Benková, and Y. Helariutta, *Sending mixed messages: auxin-cytokinin crosstalk in roots*. Current Opinion in Plant Biology, 2011. **14**(1): p. 10-16.
137. Mähönen, A.P., M. Bonke, L. Kauppinen, M. Riikonen, P.N. Benfey, and Y. Helariutta, *A novel two-component hybrid molecule regulates vascular morphogenesis of the Arabidopsis root*. Genes & Development, 2000. **14**(23): p. 2938-2943.
138. Mahonen, A.P., M. Higuchi, K. Tormakangas, K. Miyawaki, M.S. Pischke, M.R. Sussman, Y. Helariutta, and T. Kakimoto, *Cytokinins regulate a bidirectional phosphorelay network in Arabidopsis*. Curr Biol, 2006. **16**(11): p. 1116-22.
139. Mahonen, A.P., A. Bishopp, M. Higuchi, K.M. Nieminen, K. Kinoshita, K. Tormakangas, Y. Ikeda, A. Oka, T. Kakimoto, and Y. Helariutta, *Cytokinin Signaling and Its Inhibitor AHP6 Regulate Cell Fate During Vascular Development*. Science, 2006. **311**(5757): p. 94-98.
140. Liu, Z., J. Duguay, F. Ma, T.W. Wang, R. Tshin, M.T. Hopkins, L. McNamara, and J.E. Thompson, *Modulation of eIF5A1 expression alters xylem abundance in Arabidopsis thaliana*. J.Exp.Bot., 2008. **59**(4): p. 939-950.

Bibliografia

141. Ma, F., Z. Liu, T.W. Wang, M.T. Hopkins, C.A. Peterson, and J.E. Thompson, *Arabidopsis eIF5A3 influences growth and the response to osmotic and nutrient stress*. *Plant Cell Environ.*, 2010. **33**(10): p. 1682-1696.
142. Rossi, D., R. Kuroshu, C.F. Zanelli, and S.R. Valentini, *eIF5A and EF-P: two unique translation factors are now traveling the same road*. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 2014. **5**(2): p. 209-22.
143. Park, J.H., C.A. Dias, S.B. Lee, S.R. Valentini, M. Sokabe, C.S. Fraser, and M.H. Park, *Production of active recombinant eIF5A: reconstitution in E.coli of eukaryotic hypusine modification of eIF5A by its coexpression with modifying enzymes*. *Protein Eng Des Sel*, 2011. **24**(3): p. 301-9.
144. Scheich, C., D. Kummel, D. Soumailakakis, U. Heinemann, and K. Bussow, *Vectors for co-expression of an unrestricted number of proteins*. *Nucleic Acids Res*, 2007. **35**(6): p. e43.
145. Jin, B.F., K. He, H.X. Wang, J. Wang, T. Zhou, Y. Lan, M.R. Hu, K.H. Wei, S.C. Yang, B.F. Shen, and X.M. Zhang, *Proteomic analysis of ubiquitin-proteasome effects: insight into the function of eukaryotic initiation factor 5A*. *Oncogene*, 2003. **22**(31): p. 4819-4830.
146. Chevallet, M., S. Luche, and T. Rabilloud, *Silver staining of proteins in polyacrylamide gels*. *Nat Protoc*, 2006. **1**(4): p. 1852-8.
147. Guo, J., S. Wang, O. Valerius, H. Hall, Q. Zeng, J.-F. Li, D.J. Weston, B.E. Ellis, and J.-G. Chen, *Involvement of Arabidopsis RACK1 in Protein Translation and Its Regulation by Abscisic Acid*. *Plant Physiol*, 2011. **155**(1): p. 370-383.
148. Saez, A., A. Rodrigues, J. Santiago, S. Rubio, and P.L. Rodriguez, *HABI-SWI3B interaction reveals a link between abscisic acid signaling and putative SWI/SNF chromatin-remodeling complexes in Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2008. **20**(11): p. 2972-88.
149. Curtis, M.D. and U. Grossniklaus, *A Gateway Cloning Vector Set for High-Throughput Functional Analysis of Genes in Planta*. *Plant Physiol.*, 2003. **133**(2): p. 462-469.
150. Liao, D.-I., E.C. Wolff, M.H. Park, and D.R. Davies, *Crystal structure of the NAD complex of human deoxyhypusine synthase: an enzyme with a ball-and-chain mechanism for blocking the active site*. *Structure*, 1998. **6**(1): p. 23-35.
151. Kerppola, T.K., *Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC) Analysis as a Probe of Protein Interactions in Living Cells*. *Annual Review of Biophysics*, 2008. **37**(1): p. 465.

Bibliografía

152. Ferrando, A., Z. Koncz-Kálmán, R. Farràs, A. Tiburcio, J. Schell, and C. Koncz, *Detection of in vivo protein interactions between Snf1-related kinase subunits with intron-tagged epitope-labelling in plants cells*. *Nucleic Acids Res*, 2001. **29**(17): p. 3685-3693.
153. Pagnussat, G.C., H.J. Yu, Q.A. Ngo, S. Rajani, S. Mayalagu, C.S. Johnson, A. Capron, L.F. Xie, D. Ye, and V. Sundaresan, *Genetic and molecular identification of genes required for female gametophyte development and function in Arabidopsis*. *Development*, 2005. **132**(3): p. 603-614.
154. Sashital, D.G. and J.A. Doudna, *Structural insights into RNA interference*. *Curr Opin Struct Biol*, 2010. **20**(1): p. 90-7.
155. Wielopolska, A., H. Townley, I. Moore, P. Waterhouse, and C. Helliwell, *A high-throughput inducible RNAi vector for plants*. *Plant Biotechnology Journal*, 2005. **3**(6): p. 583-590.
156. Craft, J., M. Samalova, C. Baroux, H. Townley, A. Martinez, I. Jepson, M. Tsiantis, and I. Moore, *New pOp/LhG4 vectors for stringent glucocorticoid-dependent transgene expression in Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 2005. **41**(6): p. 899-918.
157. Murashige, T. and F. Skoog, *A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures*. *Physiologia Plantarum*, 1962. **15**(3): p. 473-497.
158. Belda-Palazón, B., M.A. Nohales, J.L. Rambla, J.L. Aceña, O. Delgado, S. Fustero, M.C. Martínez, A. Granell, J. Carbonell, and A. Ferrando, *Biochemical quantitation of the eIF5A hypusination in Arabidopsis thaliana uncovers ABA-dependent regulation*. *Frontiers in Plant Science*, 2014. **5**.
159. Kim, D.-H., M.R. Doyle, S. Sung, and R.M. Amasino, *Vernalization: Winter and the Timing of Flowering in Plants*. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 2009. **25**(1): p. 277-299.
160. Pin, P.A. and O. Nilsson, *The multifaceted roles of FLOWERING LOCUS T in plant development*. *Plant, Cell & Environment*, 2012. **35**(10): p. 1742-1755.
161. Zeevaart, J.A., *Leaf-produced floral signals*. *Curr Opin Plant Biol*, 2008. **11**(5): p. 541-7.
162. Taoka, K., I. Ohki, H. Tsuji, C. Kojima, and K. Shimamoto, *Structure and function of florigen and the receptor complex*. *Trends Plant Sci*, 2013. **18**(5): p. 287-94.
163. Song, Y.H., S. Ito, and T. Imaizumi, *Flowering time regulation: photoperiod- and temperature-sensing in leaves*. *Trends Plant Sci*, 2013. **18**(10): p. 575-83.

Bibliografía

164. Blazquez, M.A., R. Green, O. Nilsson, M.R. Sussman, and D. Weigel, *Gibberellins promote flowering of arabidopsis by activating the LEAFY promoter*. Plant Cell, 1998. **10**(5): p. 791-800.
165. Turck, F., F. Fornara, and G. Coupland, *Regulation and identity of florigen: FLOWERING LOCUS T moves center stage*. Annu Rev Plant Biol, 2008. **59**: p. 573-94.
166. Helliwell, C.A., C.C. Wood, M. Robertson, W. James Peacock, and E.S. Dennis, *The Arabidopsis FLC protein interacts directly in vivo with SOC1 and FT chromatin and is part of a high-molecular-weight protein complex*. Plant J, 2006. **46**(2): p. 183-92.
167. Yant, L., J. Mathieu, and M. Schmid, *Just say no: floral repressors help Arabidopsis bide the time*. Current Opinion in Plant Biology, 2009. **12**(5): p. 580-586.
168. Levy, Y.Y. and C. Dean, *The transition to flowering*. Plant Cell, 1998. **10**(12): p. 1973-90.
169. Blazquez, M.A. and D. Weigel, *Integration of floral inductive signals in Arabidopsis*. Nature, 2000. **404**(6780): p. 889-92.
170. Suarez-Lopez, P., K. Wheatley, F. Robson, H. Onouchi, F. Valverde, and G. Coupland, *CONSTANS mediates between the circadian clock and the control of flowering in Arabidopsis*. Nature, 2001. **410**(6832): p. 1116-20.
171. Valverde, F., A. Mouradov, W. Soppe, D. Ravenscroft, A. Samach, and G. Coupland, *Photoreceptor regulation of CONSTANS protein in photoperiodic flowering*. Science, 2004. **303**(5660): p. 1003-6.
172. Pfaffl, M.W., G.W. Horgan, and L. Dempfle, *Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR*. Nucleic Acids Research, 2002. **30**(9): p. e36-e36.
173. Yoo, S.K., K.S. Chung, J. Kim, J.H. Lee, S.M. Hong, S.J. Yoo, S.Y. Yoo, J.S. Lee, and J.H. Ahn, *CONSTANS activates SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1 through FLOWERING LOCUS T to promote flowering in Arabidopsis*. Plant Physiol, 2005. **139**(2): p. 770-8.
174. Chen, X., Y. Hu, and D.-X. Zhou, *Epigenetic gene regulation by plant Jumonji group of histone demethylase*. Biochem. Biophys. Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms, 2011. **1809**(8): p. 421-426.
175. Mosammaparast, N. and Y. Shi, *Reversal of histone methylation: biochemical and molecular mechanisms of histone demethylases*. Annu Rev Biochem, 2010. **79**: p. 155-79.

Bibliografía

176. Takeuchi, T., Y. Yamazaki, Y. Katoh-Fukui, R. Tsuchiya, S. Kondo, J. Motoyama, and T. Higashinakagawa, *Gene trap capture of a novel mouse gene, jumonji, required for neural tube formation*. *Genes Dev*, 1995. **9**(10): p. 1211-22.
177. Tsukada, Y., J. Fang, H. Erdjument-Bromage, M.E. Warren, C.H. Borchers, P. Tempst, and Y. Zhang, *Histone demethylation by a family of JmjC domain-containing proteins*. *Nature*, 2006. **439**(7078): p. 811-6.
178. Jeong, J.-H., H.-R. Song, J.-H. Ko, Y.-M. Jeong, Y.E. Kwon, J.H. Seol, R.M. Amasino, B. Noh, and Y.-S. Noh, *Repression of FLOWERING LOCUS T Chromatin by Functionally Redundant Histone H3 Lysine 4 Demethylases in Arabidopsis*. *PLoS ONE*, 2009. **4**(11): p. e8033.
179. Lu, F., X. Cui, S. Zhang, C. Liu, and X. Cao, *JMJ14 is an H3K4 demethylase regulating flowering time in Arabidopsis*. *Cell Res*, 2010. **20**(3): p. 387-390.
180. Ye, Z.H., *Vascular tissue differentiation and pattern formation in plants*. *Annu Rev Plant Biol*, 2002. **53**: p. 183-202.
181. Cui, X., C. Ge, R. Wang, H. Wang, W. Chen, Z. Fu, X. Jiang, J. Li, and Y. Wang, *The BUD2 mutation affects plant architecture through altering cytokinin and auxin responses in Arabidopsis*. *Cell Res*, 2010. **20**: p. 576-586.
182. Shimizu-Sato, S., M. Tanaka, and H. Mori, *Auxin-cytokinin interactions in the control of shoot branching*. *Plant Molecular Biology*, 2009. **69**(4): p. 429-435-435.
183. Ye, Z.H., G. Freshour, M.G. Hahn, D.H. Burk, and R. Zhong, *Vascular development in Arabidopsis*. *Int Rev Cytol*, 2002. **220**: p. 225-56.
184. Kubo, M., M. Udagawa, N. Nishikubo, G. Horiguchi, M. Yamaguchi, J. Ito, T. Mimura, H. Fukuda, and T. Demura, *Transcription switches for protoxylem and metaxylem vessel formation*. *Genes & Development*, 2005. **19**(16): p. 1855-1860.
185. Bollhöner, B., J. Prestele, and H. Tuominen, *Xylem cell death: emerging understanding of regulation and function*. *Journal of Experimental Botany*, 2012. **63**(3): p. 1081-1094.
186. Pesquet, E., A.V. Korolev, G. Calder, and C.W. Lloyd, *The Microtubule-Associated Protein AtMAP70-5 Regulates Secondary Wall Patterning in Arabidopsis Wood Cells*. *Current Biology*, 2010. **20**(8): p. 744-749.
187. Pesquet, E., B. Zhang, A. Gorzsás, T. Puhakainen, H. Serk, S. Escamez, O. Barbier, L. Gerber, C. Courtois-Moreau, E. Alatalo, L. Paulin, J. Kangasjärvi, B. Sundberg, D. Goffner, and H. Tuominen, *Non-Cell-*

Bibliografia

- Autonomous Postmortem Lignification of Tracheary Elements in Zinnia elegans*. The Plant Cell 2013. **25**(4): p. 1314-1328.
188. Yoshimoto, K., Y. Noutoshi, K.-i. Hayashi, K. Shirasu, T. Takahashi, and H. Motose, *A Chemical Biology Approach Reveals an Opposite Action between Thermospermine and Auxin in Xylem Development in Arabidopsis thaliana*. Plant and Cell Physiology, 2012. **53**(4): p. 635-645.
189. Hanzawa, Y., T. Takahashi, and Y. Komeda, *ACL5: an Arabidopsis gene required for internodal elongation after flowering*. The Plant Journal, 1997. **12**(4): p. 863-874.
190. Hanzawa, Y., T. Takahashi, A.J. Michael, D. Burtin, D. Long, M. Pineiro, G. Coupland, and Y. Komeda, *ACAULIS5, an Arabidopsis gene required for stem elongation, encodes a spermine synthase*. EMBO J, 2000. **19**(16): p. 4248-4256.
191. Verbelen, J.P., T. De Cnodder, J. Le, K. Vissenberg, and F. Baluska, *The Root Apex of Arabidopsis thaliana Consists of Four Distinct Zones of Growth Activities: Meristematic Zone, Transition Zone, Fast Elongation Zone and Growth Terminating Zone*. Plant Signal Behav, 2006. **1**(6): p. 296-304.
192. Ubeda-Tomas, S. and Malcolm J. Bennett, *Plant Development: Size Matters, and It's All Down to Hormones*. Current Biology, 2010. **20**(12): p. R511-R513.
193. Sheng, J.Z., D. Wang, and A.P. Braun, *DAF-FM (4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein) diacetate detects impairment of agonist-stimulated nitric oxide synthesis by elevated glucose in human vascular endothelial cells: reversal by vitamin C and L-sepiapterin*. J Pharmacol Exp Ther, 2005. **315**(2): p. 931-40.
194. Kosová, K., P. Vítámvás, I.T. Prášil, and J. Renaut, *Plant proteome changes under abiotic stress — Contribution of proteomics studies to understanding plant stress response*. Journal of Proteomics, 2011. **74**(8): p. 1301-1322.
195. Matsuura, H., Y. Ishibashi, A. Shinmyo, S. Kanaya, and K. Kato, *Genome-Wide Analyses of Early Translational Responses to Elevated Temperature and High Salinity in Arabidopsis thaliana*. Plant Cell Physiol., 2010. **51**(3): p. 448-462.
196. Urano, K., Y. Yoshida, T. Nanjo, Y. Igarashi, M. Seki, F. Sekiguchi, K. Yamaguchi-Shinozaki, and K. Shinozaki, *Characterization of Arabidopsis genes involved in biosynthesis of polyamines in abiotic stress responses and developmental stages*. Plant Cell and Environment, 2003. **26**(11): p. 1917-1926.

Bibliografia

197. Takahashi, T. and J.-I. Kakehi, *Polyamines: ubiquitous polycations with unique roles in growth and stress responses*. *Ann Bot*, 2010. **105**(1): p. 1-6.
198. Chesarone, M.A. and B.L. Goode, *Actin nucleation and elongation factors: mechanisms and interplay*. *Current Opinion in Cell Biology*, 2009. **21**(1): p. 28-37.
199. Goode, B.L. and M.J. Eck, *Mechanism and function of formins in the control of actin assembly*. *Annu Rev Biochem*, 2007. **76**: p. 593-627.
200. Mathur, J. and M. Hulskamp, *Microtubules and microfilaments in cell morphogenesis in higher plants*. *Curr Biol*, 2002. **12**(19): p. R669-76.
201. Hussey, P.J., T. Ketelaar, and M.J. Deeks, *Control of the actin cytoskeleton in plant cell growth*. *Annu Rev Plant Biol*, 2006. **57**: p. 109-25.
202. Thomas, C., S. Tholl, D. Moes, M. Dieterle, J. Papuga, F. Moreau, and A. Steinmetz, *Actin bundling in plants*. *Cell Motil Cytoskeleton*, 2009. **66**(11): p. 940-57.
203. Giddings, T.H., *Microtubule-mediated control of microfibril deposition: a re-examination of the hypothesis*. *The Cytoskeletal Basis of Plant Growth and Form.*, 1991: p. 85-99.
204. Foissner, I., I.K. Lichtscheidl, and G.O. Wasteneys, *Actin-based vesicle dynamics and exocytosis during wound wall formation in characean internodal cells*. *Cell Motil Cytoskeleton*, 1996. **35**(1): p. 35-48.
205. Baluška, F., J. Jasik, H.G. Edelmann, T. Salajová, and D. Volkmann, *Latrunculin B-Induced Plant Dwarfism: Plant Cell Elongation Is F-Actin-Dependent*. *Developmental Biology*, 2001. **231**(1): p. 113-124.
206. Baluska, F., J. Salaj, J. Mathur, M. Braun, F. Jasper, J. Samaj, N.H. Chua, P.W. Barlow, and D. Volkmann, *Root hair formation: F-actin-dependent tip growth is initiated by local assembly of profilin-supported F-actin meshworks accumulated within expansin-enriched bulges*. *Dev Biol*, 2000. **227**(2): p. 618-32.
207. Cvrckova, F., M. Novotny, D. Pickova, and V. Zarsky, *Formin homology 2 domains occur in multiple contexts in angiosperms*. *BMC Genomics*, 2004. **5**(1): p. 44.
208. Blanchoin, L. and C.J. Staiger, *Plant formins: Diverse isoforms and unique molecular mechanism*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 2010. **1803**(2): p. 201-206.
209. Cheung, A.Y. and H.M. Wu, *Overexpression of an Arabidopsis formin stimulates supernumerary actin cable formation from pollen tube cell membrane*. *Plant Cell*, 2004. **16**(1): p. 257-69.

Bibliografía

210. Yi, K., C. Guo, D. Chen, B. Zhao, B. Yang, and H. Ren, *Cloning and Functional Characterization of a Formin-Like Protein (AtFH8) from Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 2005. **138**(2): p. 1071-1082.
211. Kost, B., P. Spielhofer, and N.-H. Chua, *A GFP-mouse talin fusion protein labels plant actin filaments in vivo and visualizes the actin cytoskeleton in growing pollen tubes*. *The Plant Journal*, 1998. **16**(3): p. 393-401.
212. McCann, R.O. and S.W. Craig, *The I/LWEQ module: a conserved sequence that signifies F-actin binding in functionally diverse proteins from yeast to mammals*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. **94**(11): p. 5679-84.
213. Park, E. and A. Nebenführ, *Cytoskeleton and Root Hair Growth*, in *The Plant Cytoskeleton*, B. Liu, Editor. 2011, Springer New York. p. 259-275.
214. Imamura, H., K. Tanaka, T. Hihara, M. Umikawa, T. Kamei, K. Takahashi, T. Sasaki, and Y. Takai, *Bni1p and Bnr1p: downstream targets of the Rho family small G-proteins which interact with profilin and regulate actin cytoskeleton in Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J*, 1997. **16**(10): p. 2745-55.
215. Evangelista, M., D. Pruyne, D.C. Amberg, C. Boone, and A. Bretscher, *Formins direct Arp2/3-independent actin filament assembly to polarize cell growth in yeast*. *Nat Cell Biol*, 2002. **4**(3): p. 260-9.
216. Li, Z., F.J. Vizeacoumar, S. Bahr, J. Li, J. Warringer, F.S. Vizeacoumar, R. Min, B. Vandersluis, J. Bellay, M. Devit, J.A. Fleming, A. Stephens, J. Haase, Z.Y. Lin, A. Baryshnikova, H. Lu, Z. Yan, K. Jin, S. Barker, A. Datti, G. Giaever, C. Nislow, C. Bulawa, C.L. Myers, M. Costanzo, A.C. Gingras, Z. Zhang, A. Blomberg, K. Bloom, B. Andrews, and C. Boone, *Systematic exploration of essential yeast gene function with temperature-sensitive mutants*. *Nat Biotechnol*, 2011. **29**(4): p. 361-7.
217. Li, T., B. Belda-Palazon, A. Ferrando, and P. Alepuz, *Fertility and Polarized Cell Growth Depends on eIF5A for Translation of Polyproline-Rich Formins in Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 2014. **197**(4): p. 1191-1200.
218. Artman, L., V. Dormoy-Raclet, C. von Roretz, and I.E. Gallouzi, *Planning your every move: The role of beta-actin and its post-transcriptional regulation in cell motility*. *Semin Cell Dev Biol*, 2014.
219. Blanchoin, L., R. Boujemaa-Paterski, C. Sykes, and J. Plastino, *Actin dynamics, architecture, and mechanics in cell motility*. *Physiol Rev*, 2014. **94**(1): p. 235-63.

Bibliografía

220. Rubenstein, P.A. and K.K. Wen, *Insights into the effects of disease-causing mutations in human actins*. Cytoskeleton (Hoboken), 2014. **71**(4): p. 211-29.
221. Lohmer, L.L., L.C. Kelley, E.J. Hagedorn, and D.R. Sherwood, *Invadopodia and basement membrane invasion in vivo*. Cell Adh Migr, 2014. **8**(3).
222. Friedl, P. and D. Gilmour, *Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2009. **10**(7): p. 445-57.
223. Schönichen, A. and M. Geyer, *Fifteen formins for an actin filament: A molecular view on the regulation of human formins*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research, 2010. **1803**(2): p. 152-163.
224. Krainer, E.C., J.L. Ouderkirk, E.W. Miller, M.R. Miller, A.T. Mersich, and S.D. Blystone, *The multiplicity of human formins: Expression patterns in cells and tissues*. Cytoskeleton, 2013: p. n/a-n/a.
225. Mi-Mi, L., S. Votra, K. Kemphues, A. Bretscher, and D. Pruyne, *Z-line formins promote contractile lattice growth and maintenance in striated muscles of C. elegans*. J Cell Biol, 2012. **198**(1): p. 87-102.
226. Schoen, C.J., M. Burmeister, and M.M. Lesperance, *Diaphanous homolog 3 (Diap3) overexpression causes progressive hearing loss and inner hair cell defects in a transgenic mouse model of human deafness*. PLoS One, 2013. **8**(2): p. e56520.
227. Breinbauer, R. and M. Kohn, *Azide-alkyne coupling: a powerful reaction for bioconjugate chemistry*. Chembiochem, 2003. **4**(11): p. 1147-9.
228. Dieterich, D.C., A.J. Link, J. Graumann, D.A. Tirrell, and E.M. Schuman, *Selective identification of newly synthesized proteins in mammalian cells using bioorthogonal noncanonical amino acid tagging (BONCAT)*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2006. **103**(25): p. 9482-9487.
229. Arpin, M., D. Chirivino, A. Naba, and I. Zwaenepoel, *Emerging role for ERM proteins in cell adhesion and migration*. Cell Adh Migr, 2011. **5**(2): p. 199-206.
230. Clucas, J. and F. Valderrama, *ERM proteins in cancer progression*. J Cell Sci, 2014. **127**(Pt 2): p. 267-75.
231. Briggs, J.W., L. Ren, R. Nguyen, K. Chakrabarti, J. Cassavaugh, S. Rahim, G. Bulut, M. Zhou, T.D. Veenstra, Q. Chen, J.S. Wei, J. Khan, A. Uren, and C. Khanna, *The ezrin metastatic phenotype is associated with the initiation of protein translation*. Neoplasia, 2012. **14**(4): p. 297-310.

Bibliografía

232. Huijser, P. and M. Schmid, *The control of developmental phase transitions in plants*. Development, 2011. **138**(19): p. 4117-4129.
233. Jung, J.H., Y.H. Seo, P.J. Seo, J.L. Reyes, J. Yun, N.H. Chua, and C.M. Park, *The GIGANTEA-regulated microRNA172 mediates photoperiodic flowering independent of CONSTANS in Arabidopsis*. Plant Cell, 2007. **19**(9): p. 2736-48.
234. Mathieu, J., L.J. Yant, F. Mürdter, F. Küttner, and M. Schmid, *Repression of Flowering by the miR172 Target SMZ*. PLoS Biology, 2009. **7**(7): p. e1000148.
235. Chen, P.-J. and Y.-S. Huang, *CPEB2-eEF2 interaction impedes HIF-1[alpha] RNA translation*. EMBO J, 2012. **31**(4): p. 959-971.
236. Moerke, N.J., H. Aktas, H. Chen, S. Cantel, M.Y. Reibarkh, A. Fahmy, John D. Gross, A. Degterev, J. Yuan, M. Chorev, J.A. Halperin, and G. Wagner, *Small-Molecule Inhibition of the Interaction between the Translation Initiation Factors eIF4E and eIF4G*. Cell, 2007. **128**(2): p. 257-267.
237. Zanelli, C.F. and S.R. Valentini, *Is there a role for eIF5A in translation?* Amino Acids, 2007. **33**(2): p. 351-358.
238. Zhu, Y.Y., E.M. Machleder, A. Chenchik, R. Li, and P.D. Siebert, *Reverse transcriptase template switching: a SMART approach for full-length cDNA library construction*. Biotechniques, 2001. **30**(4): p. 892-7.
239. Wellenreuther, R., I. Schupp, T.G.c. Consortium, A. Poustka, and S. Wiemann, *SMART amplification combined with cDNA size fractionation in order to obtain large full-length clones*. BMC Genomics, 2004. **5**(1): p. 36.
240. Marques, M.C. and M.A. Perez-Amador, *Construction and analysis of full-length and normalized cDNA libraries from citrus*. Methods Mol Biol, 2012. **815**: p. 51-65.
241. Marques, M.C., H. Alonso-Cantabrana, J. Forment, R. Arribas, S. Alamar, V. Conejero, and M.A. Perez-Amador, *A new set of ESTs and cDNA clones from full-length and normalized libraries for gene discovery and functional characterization in citrus*. BMC Genomics, 2009. **10**: p. 428.
242. Patel, P.H., M. Costa-Mattioli, K.L. Schulze, and H.J. Bellen, *The Drosophila deoxyhypusine hydroxylase homologue nero and its target eIF5A are required for cell growth and the regulation of autophagy*. The Journal of Cell Biology, 2009. **185**(7): p. 1181-94.
243. Li, B., L. He, S. Guo, J. Li, Y. Yang, B. Yan, and J. Sun, *Proteomics reveal cucumber Spd-responses under normal condition and salt stress*. Plant Physiol Biochem, 2013. **67**: p. 7-14.

Bibliografia

244. Fuell, C., K.A. Elliott, C.C. Hanfrey, M. Franceschetti, and A.J. Michael, *Polyamine biosynthetic diversity in plants and algae*. *Plant Physiol Biochem*, 2010. **48**(7): p. 513-520.
245. Rodriguez-Garay, B., G.C. Phillips, and G.D. Kuehn, *Detection of Norspermidine and Norspermine in Medicago sativa L. (Alfalfa)*. *Plant Physiol*, 1989. **89**(2): p. 525-9.
246. Prakash, N.J., T.L. Bowlin, G.F. Davis, P.S. Sunkara, and A. Sjoerdsma, *Antitumor activity of norspermidine, a structural homologue of the natural polyamine spermidine*. *Anticancer Res*, 1988. **8**(4): p. 563-8.
247. Zou, Y., Y. Wang, L. Wang, L. Yang, R. Wang, and X. Li, *miR172b Controls the Transition to Autotrophic Development Inhibited by ABA in Arabidopsis*. *PLoS ONE*, 2013. **8**(5): p. e64770.
248. Sachs, M.S., Z. Wang, A. Gaba, P. Fang, J. Belk, R. Ganesan, N. Amrani, and A. Jacobson, *Toeprint analysis of the positioning of translation apparatus components at initiation and termination codons of fungal mRNAs*. *Methods*, 2002. **26**(2): p. 105-14.
249. Cassan-Wang, H., N. Goué, M.N. SAIDI, S. Legay, P. Sivadon, D. Goffner, and J. Grima-Pettenati, *Identification of novel transcription factors regulating secondary cell wall formation in Arabidopsis*. *Frontiers in Plant Science*, 2013. **4**.
250. Aloni, R., E. Aloni, M. Langhans, and C.I. Ullrich, *Role of cytokinin and auxin in shaping root architecture: regulating vascular differentiation, lateral root initiation, root apical dominance and root gravitropism*. *Ann Bot*, 2006. **97**(5): p. 883-93.
251. Milhinhos, A., J. Prestele, B. Bollhoner, A. Matos, F. Vera-Sirera, J.L. Rambla, K. Ljung, J. Carbonell, M.A. Blazquez, H. Tuominen, and C.M. Miguel, *Thermospermine levels are controlled by an auxin-dependent feedback loop mechanism in Populus xylem*. *Plant J*, 2013. **75**(4): p. 685-98.
252. Tong, W., K. Yoshimoto, J. Kakehi, H. Motose, M. Niitsu, and T. Takahashi, *Thermospermine modulates expression of auxin-related genes in Arabidopsis*. *Front Plant Sci*, 2014. **5**: p. 94.
253. Hwang, I., J. Sheen, and B. Muller, *Cytokinin signaling networks*. *Annu Rev Plant Biol*, 2012. **63**: p. 353-80.
254. Baluska, F., S. Vitha, P.W. Barlow, and D. Volkmann, *Rearrangements of F-actin arrays in growing cells of intact maize root apex tissues: a major developmental switch occurs in the postmitotic transition region*. *Eur J Cell Biol*, 1997. **72**(2): p. 113-21.

Bibliografía

255. Blilou, I., J. Xu, M. Wildwater, V. Willemsen, I. Paponov, J. Friml, R. Heidstra, M. Aida, K. Palme, and B. Scheres, *The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in Arabidopsis roots*. Nature, 2005. **433**(7021): p. 39-44.
256. Habets, M.E. and R. Offringa, *PIN-driven polar auxin transport in plant developmental plasticity: a key target for environmental and endogenous signals*. New Phytol, 2014. **203**(2): p. 362-77.
257. Dhonukshe, P., H. Tanaka, T. Goh, K. Ebine, A.P. Mahonen, K. Prasad, I. Blilou, N. Geldner, J. Xu, T. Uemura, J. Chory, T. Ueda, A. Nakano, B. Scheres, and J. Friml, *Generation of cell polarity in plants links endocytosis, auxin distribution and cell fate decisions*. Nature, 2008. **456**(7224): p. 962-6.
258. Geldner, N., J. Friml, Y.D. Stierhof, G. Jurgens, and K. Palme, *Auxin transport inhibitors block PIN1 cycling and vesicle trafficking*. Nature, 2001. **413**(6854): p. 425-8.
259. Dhonukshe, P., I. Grigoriev, R. Fischer, M. Tominaga, D.G. Robinson, J. Hasek, T. Paciorek, J. Petrasek, D. Seifertova, R. Tejos, L.A. Meisel, E. Zazimalova, T.W. Gadella, Jr., Y.D. Stierhof, T. Ueda, K. Oiwa, A. Akhmanova, R. Brock, A. Spang, and J. Friml, *Auxin transport inhibitors impair vesicle motility and actin cytoskeleton dynamics in diverse eukaryotes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(11): p. 4489-94.
260. Friml, J., J. Wisniewska, E. Benkova, K. Mendgen, and K. Palme, *Lateral relocation of auxin efflux regulator PIN3 mediates tropism in Arabidopsis*. Nature, 2002. **415**(6873): p. 806-9.
261. Hou, G., D.R. Mohamalawari, and E.B. Blancaflor, *Enhanced gravitropism of roots with a disrupted cap actin cytoskeleton*. Plant Physiol, 2003. **131**(3): p. 1360-73.
262. Lanza, M., B. Garcia-Ponce, G. Castrillo, P. Catarecha, M. Sauer, M. Rodriguez-Serrano, A. Paez-Garcia, E. Sanchez-Bermejo, C.M. T, Y. Leo del Puerto, L.M. Sandalio, J. Paz-Ares, and A. Leyva, *Role of actin cytoskeleton in brassinosteroid signaling and in its integration with the auxin response in plants*. Dev Cell, 2012. **22**(6): p. 1275-85.
263. Nurnberg, A., T. Kitzing, and R. Grosse, *Nucleating actin for invasion*. Nat Rev Cancer, 2011. **11**(3): p. 177-87.
264. Pettee, K.M., K.M. Dvorak, A.L. Nestor-Kalinoski, and K.M. Eisenmann, *An mDia2/ROCK signaling axis regulates invasive egress from epithelial ovarian cancer spheroids*. PLoS One, 2014. **9**(2): p. e90371.
265. Lin, Y.N., J.R. Izbicki, A. Konig, J.K. Habermann, C. Blechner, T. Lange, U. Schumacher, and S. Windhorst, *Expression of DIAPH1 is up-regulated*

Bibliografia

- in colorectal cancer and its down-regulation strongly reduces the metastatic capacity of colon carcinoma cells.* Int J Cancer, 2014. **134**(7): p. 1571-82.
266. Hetrick, B., P.K. Khade, K. Lee, J. Stephen, A. Thomas, and S. Joseph, *Polyamines accelerate codon recognition by transfer RNAs on the ribosome.* Biochemistry, 2010. **49**(33): p. 7179-89.
267. Landau, G., Z. Bercovich, M.H. Park, and C. Kahana, *The role of polyamines in supporting growth of mammalian cells is mediated through their requirement for translation initiation and elongation.* J Biol Chem, 2010. **285**(17): p. 12474-81.
268. van Hoof, A. and E.J. Wagner, *A brief survey of mRNA surveillance.* Trends Biochem Sci, 2011. **36**(11): p. 585-92.
269. Harigaya, Y. and R. Parker, *No-go decay: a quality control mechanism for RNA in translation.* Wiley Interdiscip Rev RNA, 2010. **1**(1): p. 132-41.
270. Ge, Z., P. Mehta, J. Richards, and A.W. Karzai, *Non-stop mRNA decay initiates at the ribosome.* Molecular Microbiology, 2010: p. no-no.
271. Schweingruber, C., S.C. Rufener, D. Zund, A. Yamashita, and O. Muhlemann, *Nonsense-mediated mRNA decay - mechanisms of substrate mRNA recognition and degradation in mammalian cells.* Biochim Biophys Acta, 2013. **1829**(6-7): p. 612-23.
272. Imai, A., Y. Hanzawa, M. Komura, K.T. Yamamoto, Y. Komeda, and T. Takahashi, *The dwarf phenotype of the Arabidopsis acl5 mutant is suppressed by a mutation in an upstream ORF of a bHLH gene.* Development, 2006. **133**(18): p. 3575-3585.
273. Takano, A., J.-I. Kakehi, and T. Takahashi, *Thermospermine is Not a Minor Polyamine in the Plant Kingdom.* Plant and Cell Physiology, 2012. **53**(4): p. 606-616.
274. Man, O. and Y. Pilpel, *Differential translation efficiency of orthologous genes is involved in phenotypic divergence of yeast species.* Nat Genet, 2007. **39**(3): p. 415-21.
275. Woolstenhulme, C.J., S. Parajuli, D.W. Healey, D.P. Valverde, E.N. Petersen, A.L. Starosta, N.R. Guydosh, W.E. Johnson, D.N. Wilson, and A.R. Buskirk, *Nascent peptides that block protein synthesis in bacteria.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(10): p. E878-87.
276. Giudice, E. and R. Gillet, *The task force that rescues stalled ribosomes in bacteria.* Trends Biochem Sci, 2013. **38**(8): p. 403-11.

Bibliografía

277. Dower, W.J., J.F. Miller, and C.W. Ragsdale, *High efficiency transformation of E. coli by high voltage electroporation*. Nucleic Acids Res, 1988. **16**(13): p. 6127-45.
278. Chen, H., R.S. Nelson, and J.L. Sherwood, *Enhanced recovery of transformants of Agrobacterium tumefaciens after freeze-thaw transformation and drug selection*. Biotechniques, 1994. **16**(4): p. 664-8, 670.
279. Clough, S.J. and A.F. Bent, *Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana*. Plant J, 1998. **16**(6): p. 735-743.
280. Perez-Benavente, B., J.L. Garcia, M.S. Rodriguez, A. Pineda-Lucena, M. Piechaczyk, J. Font de Mora, and R. Farras, *GSK3-SCF(FBXW7) targets JunB for degradation in G2 to preserve chromatid cohesion before anaphase*. Oncogene, 2013. **32**(17): p. 2189-99.
281. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $[\Delta\Delta]CT$ Method*. Methods, 2001. **25**(4): p. 402-408.
282. Czechowski, T., M. Stitt, T. Altmann, M.K. Udvardi, and W.R. Scheible, *Genome-Wide Identification and Testing of Superior Reference Genes for Transcript Normalization in Arabidopsis*. Plant Physiol., 2005. **139**(1): p. 5-17.
283. Miguel, A., F. Monton, T. Li, F. Gomez-Herreros, S. Chavez, P. Alepuz, and J.E. Perez-Ortin, *External conditions inversely change the RNA polymerase II elongation rate and density in yeast*. Biochim Biophys Acta, 2013. **1829**(11): p. 1248-55.
284. Shevchenko, A., O.N. Jensen, A.V. Podtelejnikov, F. Sagliocco, M. Wilm, O. Vorm, P. Mortensen, H. Boucherie, and M. Mann, *Linking genome and proteome by mass spectrometry: large-scale identification of yeast proteins from two dimensional gels*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(25): p. 14440-5.
285. Ramirez-Parra, E., M.A. Lopez-Matas, C. Frundt, and C. Gutierrez, *Role of an atypical E2F transcription factor in the control of Arabidopsis cell growth and differentiation*. Plant Cell, 2004. **16**(9): p. 2350-63.
286. Gendrel, A.-V., Z. Lippman, C. Yordan, V. Colot, and R.A. Martienssen, *Dependence of Heterochromatic Histone H3 Methylation Patterns on the Arabidopsis Gene DDM1*. Science, 2002. **297**(5588): p. 1871-1873.

ANEXO

1. Figuras suplementarias.

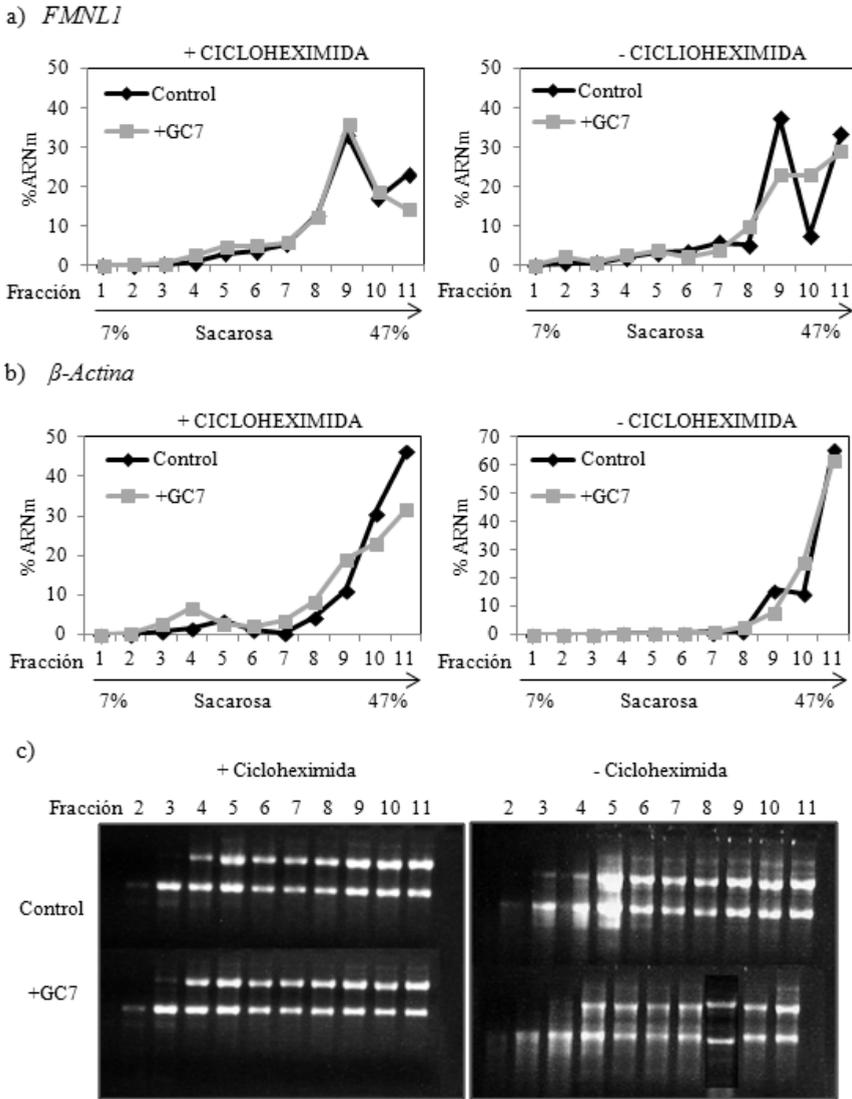


Figura 73. Estudio del avance ribosomal mediante la observación del perfil traducional de muestras de células HeLa, incubadas o no (control) con 10 μ M GC7 durante 4 horas, tratadas o sin tratar con el inhibidor de la elongación de la traducción cicloheximida (100 μ g/ml). Se representa el porcentaje de ARNm obtenido mediante RT-qPCR en cada una de las fracciones recolectadas del gradiente de sacarosa. a) *FMNL1*; b) β -Actina. En el apartado c) se incluyen los ARN extraídos de las fracciones de cada uno de los gradientes, separados en un gel de agarosa.

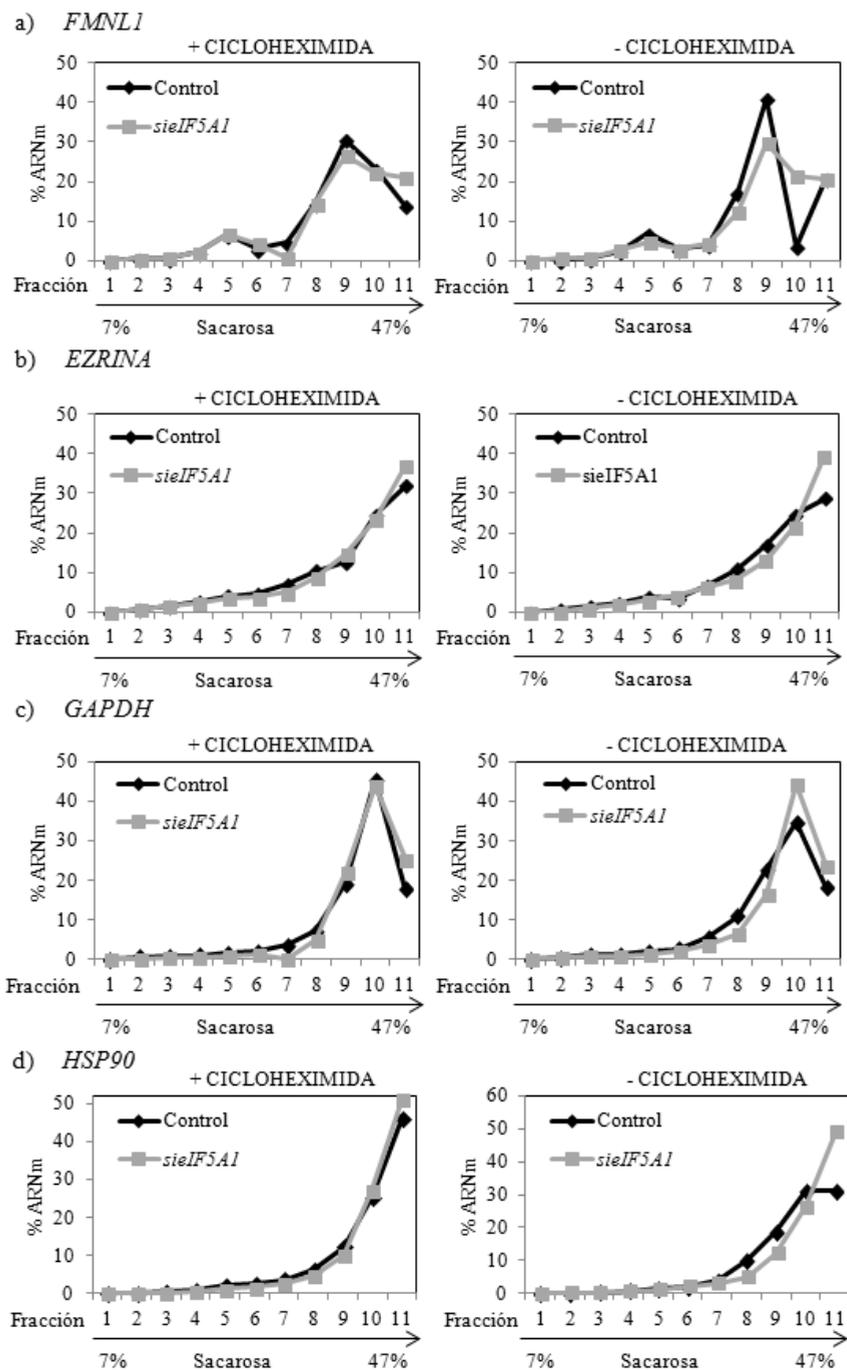


Figura 74. Continúa en la página siguiente.

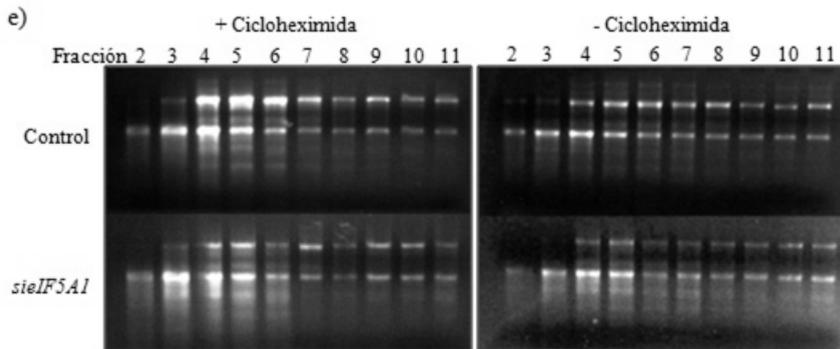


Figura 74. Estudio del avance ribosomal mediante la observación del perfil traduccional de muestras de células HeLa, transfectadas o no (control) con *siIF5A1*, tratadas o sin tratar con el inhibidor de la elongación de la traducción cicloheximida (100 µg/ml). Se representa el porcentaje de ARNm obtenido mediante RT-qPCR en cada una de las fracciones recolectadas del gradiente de sacarosa. a) *FMNLI*; b) *EZRINA*; c) *GAPDH*; d) *HSP90*. En el apartado. e) se incluyen los ARN extraídos de las fracciones de cada uno de los gradientes, separados en un gel de agarosa.

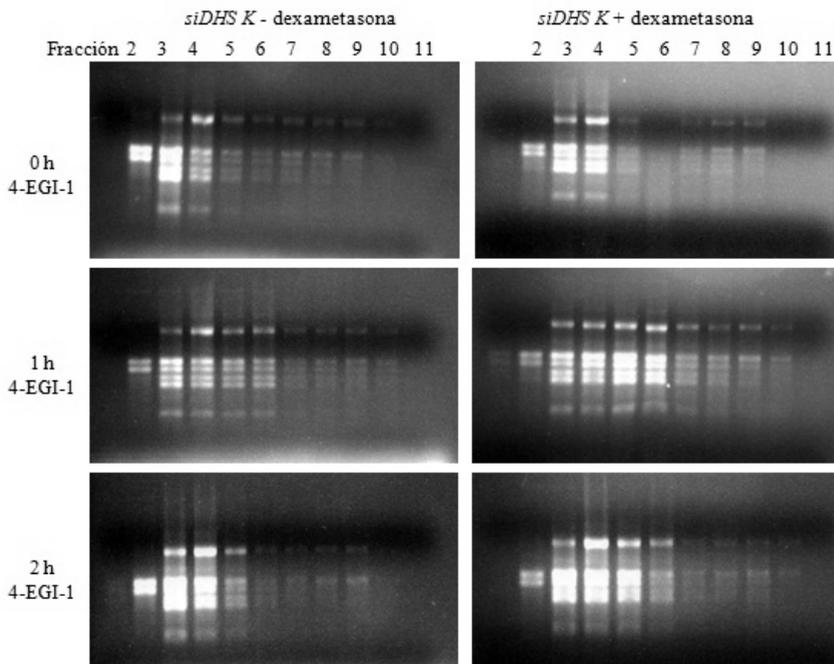


Figura 75. Continúa en la página siguiente.

Figura 75. ARN extraídos y separados en un gel de agarosa, de las fracciones de cada uno de los gradientes obtenidos tras el análisis de polisomas de *A. thaliana*, de las muestras *siDHS K* tratadas con o sin dexametasona, e incubadas 0, 1 y 2 horas con 4-EGI-1.

2. Listado de acrónimos y abreviaturas.

1D-E: Electroforesis SDS-PAGE monodimensional.

2D-E: Electroforesis SDS-PAGE bidimensional.

ABA: Ácido abscísico.

ABT: *Agarose Bead Technologies*.

ACC: Ácido 1-Aminociclopropano-1-Carboxílico.

ACL5: ACAULIS5.

ADC: Arginina Descarboxilasa.

ADNc: ADN complementario.

ADNp: ADN plasmídico.

AHA: L-Azidohomoalanina.

AHP6: *Arabidopsis Phosphotransfer Protein 6*.

AIH: Agmatina iminohidrolasa.

AOBS: *Acousto-Optical Beam Splitter*.

AP2: APETALA 2.

ARNi: ARN de interferencia.

ARNm: ARN mensajero.

ARNsi: ARN pequeño de interferencia.

ARNt: ARN de transferencia.

BA: Benziladenina.

BiFC: Complementación Bimolecular de la Fluorescencia.

BSA: *Bovine Serum Albumin*.

Anexo

CATMA: *a Complete Arabidopsis Transcriptome Microarray.*

CBGP: Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas.

CEVd: Viroide *Citrus exocortis*.

CHAPS: Sulfonato de 3-[(3-colamidopropil)-dimetilamonio]-1-propano.

ChIP: *Chromatin Immunoprecipitation.*

CHIP: Proteína de unión C-terminal de la Hsc70.

CHO: Células de ovario de hámster chino.

CIAP: *Calf Intestinal Alkaline Phosphatase.*

CIPF: Centro de Investigación Príncipe Felipe.

CK2: Proteína caseína quinasa 2.

CO: *CONSTANS.*

CPA: N-Carbamoilputrescina Aminohidrolasa.

CRE1: *Cytokinin Response 1.*

CRM1: *Chromosome Region Maintenance 1.*

C-terminal: Carboxilo terminal.

DAF-FM DA: 4-Amino-5-metilamino-2',7'-difluorofluoresceina diacetato.

DAO: Diamino Oxidasa.

DAPI: *4',6-Diamidino-2-Phenylindole.*

DHS: Desoxihipusina Sintasa.

DIA: *Differential In-gel Analysis.*

DIAPH3: *Diaphnous Homolog 3.*

DIGE: *Differential In Gel Electrophoresis.*

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle Medium.*

DMSO: Dimetilsulfóxido.

DOC: Deoxicolato de sodio.

Anexo

DOHH: Desoxihipusina Hidroxilasa.

DRFs : *Diaphanous-Related Formins*.

DTE: Ditioneritritol.

DTSP: *Dithiobis(succinimidyl propionate)*.

DTT: Ditiontreitol.

EDTA: *Ethylenediaminetetraacetic Acid*.

eEF2: Factor de elongación de la traducción eucariótico 2.

EF-P: Factor de elongación P.

EGTA: *Ethylene Glycol Tetraacetic Acid*.

eIF5A: Factor de iniciación de la traducción eucariótico 5A.

ELF6: *Early Flowering 6*.

ERM: Ezrina/Radixina/Moesina.

ESI-MS: Espectrometría de masas tras ionización por electroespray.

FA: Formaldehído.

FB₁: Fumonisina B₁.

Fdw: *Forward*.

FH2: *Formin Homology-2*.

FHOD1: *Formin Homology Domain-containing protein 1*.

FLC: *Flowering Locus C*.

FMNL1: *Formin-Like 1*.

FT: *Flowering Locus T*.

GABA: Ácido gamma-aminobutírico.

G-actina: Actina monomérica globular.

GAPDH: Gliceraldehído-3-Fosfato Deshidrogenasa.

GC7: N1-Guanil-1,7-Diaminoheptano.

Anexo

GCxGC/TOF-MS: *Two-Dimensional Gas Chromatography with Time-of-Flight Mass Spectrometer*.

GDB: *GTPase Binding Domain*.

GFP: Proteína fluorescente verde.

GI: GIGANTEA.

GST: Glutación S-Transferasa.

GUS: gen de la β -glucuronidasa.

H3: Histona 3.

HRP: *Horseradish Peroxidase*.

Hsp90: *Heat shock protein 90*.

Hyp: Hipusinada.

IBMCP: Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas.

IEE: Isoelectroenfoque.

IFN α : Interferón- α .

iNOS: Óxido nítrico sintasa inducible.

IPTG: Isopropil- β -D-1-Tiogalactopiranosido.

Jmj: *Jumonji*.

LB: *Left border*.

LB: *Loading Buffer*.

LB: Luria-Bertani o alternativamente *Lysogeny Broth*.

LC-MS: Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas.

LCS: *Leica Confocal Software*.

LIC: *Ligation-Independent Cloning*.

LUC: Luciferasa.

m/z: Relación masa/carga.

Anexo

MALDI-TOF-MS: *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometer.*

MAPK: Proteína quinasa activada por mitógeno.

mRFP: *monomeric Red Fluorescence Protein.*

MS: Murashige & Skoog.

mTn: *mouse Talin.*

NAD: Nicotinamida Adenina Dinucleótido.

NGD: *No-Go mRNA Decay.*

NIB: *Nuclear Isolation Buffer.*

NLB: *Nuclear Lysis Buffer.*

NMD: *Nonsense-Mediated mRNA Decay.*

NO: Óxido nítrico.

NSD: *Non-Stop mRNA decay.*

N-terminal: Amino terminal.

OD600: *Optical Density 600 nm.*

ODC: Ornitina Descarboxilasa.

ORF: *Open Reading Frame.*

PA: Poliamina.

PABP: Proteínas de unión a la cola poli(A).

PAGE: Gel de electroforesis de poliacrilamida.

PAO: Poliamino Oxidasa.

PatMatch: *Pattern Matching.*

PBS: *Phosphate-Buffered Saline.*

PCR: *Polymerase Chain Reaction.*

PEG: Polietilenglicol.

Anexo

Pgk1: *Phosphoglycerate kinase 1*.

pI: punto Isoeléctrico.

PIC: *Protease Inhibitor Cocktail for bacterial cells*.

PIN: PIN-FORMED.

PIPES: *1,4-piperazinediethanesulfonic acid*.

PIR: *Protein Informatic Resource*.

PKC: Proteína quinasa C.

PMSF: *Phenylmethylsulfonyl Fluoride*.

PSB: *Percoll Solution Buffer*.

PVDF: Fluoruro de polivinilideno.

RB: *Right Border*.

Rev: *Reverse*.

RIP: *RNA Immunoprecipitation*.

RNPm: Partículas ribonucleoproteicas.

RT-qPCR: *Reverse Transcriptase quantitative PCR*.

SAM: S-Adenosilmetionina.

SAM: *Shoot Apical Meristem*.

SAMdc: S-Adenosilmetionina descarboxilada.

SAMDC: S-Adenosilmetionina descarboxilasa.

SAXS: Estudios de dispersión de rayos X de ángulo pequeño.

SCSIE: Central de Soporte a la Investigación Experimental.

SDS-PAGE: Electroforesis PAGE con dodecil sulfato sódico.

SELEX: *Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment*.

SGD: *Saccharomyces Genome Database*.

Sitio A: Sitio Aminoacil.

Anexo

Sitio E: Sitio de salida.

Sitio P: Sitio Peptidil.

SMART: *Switching Mechanism At the 5' end of the RNA Transcript*.

SMZ: SCHLAFMÜTZE.

SnRK: *Snf1-Related-Kinase*.

SNZ: SCHNARCHZAPFEN.

SPDS: Espermidina sintasa.

SPMS: Espermina sintasa.

Stub1: Proteína 1 con homología a STIP1 y con un dominio “U-box”.

T.N.: Toda la Noche.

TAIR: *The Arabidopsis Informatic Resource*.

TBE: Tris, Borato, EDTA.

TBS: *Tris-Buffered Saline*.

TCA: Ácido tricloroacético.

TCS: *True Confocal Scanning*.

TEs: *Traqueary Elements*.

TRITC: *Tetramethyl-rhodamine B isothiocyanate*.

TSPMS: Termoespermina sintasa.

uORFs: *upstream ORFs*.

UPV: Universidad Politécnica de Valencia.

UTR: Regiones no traducibles.

UV: Luz ultravioleta.

UV: Universidad de Valencia.

VIH-1: Virus de la Inmunodeficiencia Humana 1.

VIN: Neoplasia intra-epitelial de vulva.

Anexo

w/v: Relación peso/volumen.

WB: *Western Blot*.

YFP: *Yellow Fluorescence Protein*.

YPD: *Yeast extract-Peptone-Dextrose*.

