

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>Sacharomyces 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. Tratamiento 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>sielF5A</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 biotiniladas.....	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

Índice