

RESUMEN

El frío es uno de los estreses abióticos más importantes, afecta severamente al crecimiento y desarrollo de las plantas, y limita su distribución geográfica. Puesto que el estrés por frío, por salinidad y por sequía solapan algunos de sus mecanismos moleculares de respuesta, se usó una biblioteca de ADNc de remolacha (*Beta vulgaris*) generada con hojas de plantas sometidas a estrés salino, para tratar de identificar genes de tolerancia a estrés por frío mediante su sobreexpresión en levadura. De este modo se identificó, entre otros, el gen *CRIO4* cuya caracterización ha sido el trabajo de esta tesis. *CRIO4* codifica una proteína tipo Sec14, y es ortólogo a la familia *PATL* de *Arabidopsis thaliana* y tiene un dominio conservado con *SEC14* y la familia *SFH* de levadura. La sobreexpresión de *CRIO4* confiere a las células de levadura la capacidad de crecer a temperaturas bajas y tolerancia a tunicamicina (inhibidor de la glicosilación de proteínas). El análisis *in silico* de la secuencia de *CRIO4* confirma diversos motivos y dominios conservados en la proteína que parecen dirigir su función hacia el tráfico vesicular, y revela múltiples potenciales sitios de fosforilación en *CRIO4* sugiriendo una posible función en señalización. El dominio Sec14 es un dominio de unión y transferencia de fosfolípidos, y los resultados obtenidos indican que *CRIO4* establece unión con fosfatidilinositol y fosfatidiletanolamina. *CRIO4* no complementa la función de Sec14p de levadura, y esto podría ser debido a la falta de afinidad de *CRIO4* por fosfatidilcolina. En levadura, el transporte de triptófano es el mayor factor limitante para el crecimiento a temperaturas bajas. Los resultados del ensayo de coexpresión de *CRIO4* con *TAT2* (una permeasa de alta afinidad para triptófano) en levadura mostrados en esta tesis, parecen indicar una estimulación del transporte de Tat2p hacia la membrana plasmática por parte de *CRIO4*, que podría devenir en una absorción de triptófano mejorada, explicando así la mayor tolerancia a frío conferida por la sobreexpresión de *CRIO4* en levadura.

El estudio de localización subcelular ha mostrado que *CRIO4* está asociada a la membrana plasmática y en membranas intracelulares, formando parte de vesículas, lo que parece confirmar el papel de *CRIO4* en el tráfico intracelular, función que compartiría con sus ortólogos. El patrón de expresión de *CRIO4* en remolacha ha mostrado que *CRIO4* se expresa en todos los tejidos analizados, concentrándose su mayor expresión en hoja y raíz. También se ha mostrado que la expresión de *CRIO4* aumenta tras tiempos cortos de exposición a estrés por frío y estrés por calor.

Se han realizado estudios fenotípicos de diferentes líneas mutantes en genes *PATLs* de *Arabidopsis thaliana*, obteniéndose una gran variabilidad en los resultados que podría ser debida a la redundancia funcional entre los miembros de esta familia multigénica. También se han realizado estudios fenotípicos de líneas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* que sobreexpresan el gen *CRIO4*. Estas líneas muestran una mejoría en su crecimiento y desarrollo a temperaturas bajas, aumentando por tanto su tolerancia al estrés por frío. Además, la expresión de *CRIO4*, en las líneas transgénicas de *A. thaliana*, aumenta considerablemente

tras el estrés por frío y tras un choque térmico, observándose en este último caso, acúmulos de CRI04 a lo largo de toda la célula.

El reciclaje intracelular de PIN2, indicador de la respuesta gravitrópica, se ve afectado por la disminución de la temperatura. Los resultados obtenidos en esta tesis parecen indicar que la sobreexpresión de *CRIO4* reactiva el transporte intracelular de PIN2 bajo estrés por frío, lo que implicaría que su fenotipo está relacionado con el tráfico de auxinas.