

Identificación y caracterización de *PpeIF5A*: un gen inducido por estrés térmico en *Physcomitrium patens*

Tutora: Alexandra Castro

Tesina de grado-Licenciaturaen Bioquímica 2020 Laboratorio de Biología Molecular Vegetal.



UNIVERSIDAD

URUGUAY

DE LA REPÚBLICA



Agradecimientos

En primer lugar, me gustaría agradecer a mi tutora Alexandra quien supo ser una referente, siempre guiándome, incentivándome y apoyándome en este afán de aportar al conocimiento a través del camino de la ciencia. También me gustaría hacer una mención especial a Luciana, quien además de ayudarme, responder y acompañarme en todas mis curiosidades, se transformó en una gran amiga y compañera de laboratorio. Otra persona que me gustaría destacar en estos agradecimientos es a Sabina, por ser una jefa generosa, y brindarme la posibilidad de integrarme al laboratorio. Finalmente quiero agradecer a todos los integrantes del BMV por alegrar cada día de trabajo y ser un grupo de referencia.

Como una mención especial me gustaría destacar a mis padres, Graciela y Enrrique, quienes siempre me apoyaron y brindaron herramientas para cada una de mis decisiones, acompañando mis deseos y permitiéndome crecer.

A mis amigos y hermanos, Maite y Pablo, quienes siempre estuvieron y fueron mis hombros de apoyo, un eterno agradecimiento. Al Tarra, y el histórico grupo de Hashomer, a los amigos que me fue dando la vida, el liceo y la facultad, a mis compañeras y amigas de casa, y a todos los que están desde la distancia, muchas gracias.

PD: También me gustaría mencionar al COVID-19, ya que su presencia determinó el confinamiento que me permitió finalizar mis estudios en el 2020

Índice

Re	sum	en		1			
1.	In	trod	ucción	2			
	1.1	P	hyscomitrium patens como modelo de estudio	2			
	1.2	E	strés térmico por altas temperaturas	3			
	1.3	Fa	actores de iniciación de la traducción 5A	6			
	1.4	e	IF5A en plantas	8			
	1.5	A	ntecedentes	10			
2.	O	bjeti	vos	12			
3.	Es	trate	egia experimental	12			
4.	Μ	ater	iales y métodos	13			
	4.1	N	1aterial vegetal y condiciones de cultivo	13			
	4.	1.1	Physcomitrium patens	13			
	4.	1.2	Arabidopsis thaliana y Nicotiana benthamiana	13			
	4.2	A	nálisis de expresión frente a diversos estímulos de estrés por qRT-PCR	13			
	4.3	C	epas y cultivos de microorganismos	14			
	4.5	V	ectores y construcciones génicas	14			
	4.	5.1	.1 Clonado de la secuencia codificante del gen <i>PpeIF5A</i> en el vector de entrada pEN 14				
	4. pk	5.2 (7FW	Subclonado de la secuencia codificante del gen <i>PpeIF5A</i> en el vector binario VG2.0	16			
	4.	5.3	Subclonado de la secuencia codificante del gen <i>PpeIF5A</i> en el vector binario pUB-	Dest 18			
	4.6	Т	ransformación de células quimiocompetentes de Escherichia coli	18			
	4.7	Т	ransformación de células electrocompetentes de Agrobacterium tumefaciens	19			
	4.8	A	groinfiltración de hojas de Nicotiana benthamiana	20			
	4.9	V	isualización de PpelF5A-GFP por microscopía confocal	20			
	4.10	Т	ransformación estable de Arabidopsis thaliana	20			
	4.11	С	hequeo de transformantes estables de Arabidopsis thaliana	21			
	4.12	0	Obtención de ADN plasmídico				
	4.13	E	Electroforesis de ADN en geles de agarosa22				
	4.14	R	ecuperación de ADN a partir de gel de agarosa	22			
	4.15	0	btención de ADN genómico a partir de material vegetal	22			
	4.16	R	eacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR) y a tiempo final	22			
	4.17	A	nálisis de los datos	24			

	4.17	.1	Estudios in silico	4			
4.17.2		.2	Análisis de secuencias nucleotídicas y aminoacídicas2	5			
	4.17	.3	Análisis in silico de perfiles de expresión2	5			
5.	Resu	ultado	os y discusión2	6			
5.	1	Aline	eamiento de secuencias y análisis filogenético2	6			
5.	2	La se	ecuencia del gen PpeIF5A, su homólogo y su región promotora2	9			
5.3 Ana 34		Anál 34	isis del perfil de expresión de PpeIF5A durante el desarrollo y en condiciones de estrés				
5.	4	Gen	eración de construcciones génicas para la caracterización funcional del PpeIF5A3	8			
	5.4.1	1	Clonado de la secuencia codificante en el vector de entrada pENTR2B3	8			
	5.4.2 (pK7	2 'eiF5 <i>i</i>	Generación de una construcción para la expresión de el gen <i>PpeIF5A</i> fusionado a GFF A:GFP)4	, 0			
5.	5	Loca	alización subcelular de la proteína codificada por el gen PpeIF5A4	1			
5.	6	Expr	resión heteróloga del gen PpeIF5A en Arabidopsis thaliana4	3			
5.	7	Posi	bles moléculas dianas o blancos traduccionales del PpeIF5A4	4			
6.	Cond	clusic	ones y perspectivas4	8			
7.	7. Referencias						
8 An	iexo .		5	7			
8.	1 Tab	olas y	figuras suplementarias5	7			
8.	2 Abr	revia	ciones6	0			

Resumen

El aumento de la temperatura global es uno de los principales factores que amenazan la producción agrícola impactando sobre la economía y la seguridad alimentaria. En este contexto, el estudio y compresión de los fenómenos de adaptación al hábitat terrestre desarrollados por los organismos vegetales, pueden ser claves en el desarrollo de estrategias biotecnológicas para hacer frente a esta situación. Los musgos (briofitas) fueron los primeros organismos vegetales en colonizar el medio terrestre. Dada su posición filogenética basal en la escala evolutiva de las plantas, el estudio de las respuestas adaptativas y de defensa desarrolladas por las briofitas puede brindar información sobre mecanismos de protección frente a situaciones ambientales extremas, muchas veces compartidos con las plantas vasculares.

Estudios previos del Laboratorio de Biología Molecular Vegetal, donde se analizó el perfil transcripcional del musgo *Physcomitrium patens* (*P. patens*) en respuesta al estrés por altas temperaturas, identificaron que el *PpeIF5A*, un factor de iniciación de la traducción eucariota, se induce fuertemente por calor. Este factor está altamente conservado en todos los organismos eucariotas y es la única proteína reportada hasta el momento que presenta el aminoácido hipusina, producto de una modificación postraduccional sobre una lisina conservada.

Mediante este trabajo se pretende contribuir al conocimiento sobre la función del gen *PpeIF5A* de *P. patens* durante el desarrollo y en respuesta a factores de estrés ambiental. . A través de estudios *in silico,* se determinó que el *PpeIF5A* se expresa en todos los tejidos del musgo durante su desarrollo. Además se evaluó el perfil de expresión de este gen por PCR en tiempo real frente a diversos factores de estrés, encontrándose que los tratamientos con ácido abscísico, calor, deshidratación y ácido salicílico inducen su expresión.

Con el fin de dilucidar el rol fisiológico de PpeIF5A, se generó una construcción génica para determinar la localización subcelular de este factor tanto a través de ensayos de expresión transitoria en *Nicotiana benthamiana* como transformación estable en *Arabidopsis thaliana*. Estos resultados evidenciaron que PpeIF5A presenta una localización núcleo-citoplasmática. Finalmente, se desarrolló una construcción que permitirá estudiar el efecto de la expresión constitutiva del gen *PpeIF5A* en *Arabidopsis*.

1. Introducción

La contaminación ambiental y el cambio climático exacerban el impacto del estrés biótico y abiótico en el crecimiento y desarrollo de plantas. Sin embargo, los organismos vegetales han desarrollado sofisticados mecanismos que les permiten aclimatarse y adaptarse a una amplia variedad de señales medioambientales. Cambios a nivel fisiológico, celular y molecular permiten a estos organismos sobreponerse a las condiciones adversas (Blanco et al., 2009; Fang et al., 2015). Si bien estas presiones medioambientales forman parte del desarrollo evolutivo de los organismos vegetales, el aumento de temperatura se presenta como uno de los principales desafíos tanto a largo como a corto plazo. Diversos estudios afirman que el cambio climático implica un calentamiento global acompañado de una mayor frecuencia de fenómenos meteorológicos extremos y violentos (Alexander, 2016). El Panel Intergubernamental del Cambio Climático mostró que en la última década la temperatura media en la superficie cultivable fue 1.5 ºC más alta que la observada un siglo atrás y se estima que estas temperaturas seguirán en aumento 0.3 ºC década a década. En este contexto, comprender las estrategias moleculares que les permiten a las plantas sobreponerse a las condiciones ambientales fluctuantes, resulta de suma relevancia, constituye un enorme desafío y ha sido de gran interés para para un gran número de científicos en las últimas décadas (Ahuja et al., 2010).

1.1 Physcomitrium patens como modelo de estudio

En la literatura podemos encontrar gran variedad de estudios realizados en plantas vasculares, donde se detallan las vías de transducción de señales y la activación de los mecanismos de tolerancia al estrés térmico. En el caso de los musgos, la información es escasa.

Los musgos pertenecen al grupo de las briófitas, divergieron de las plantas vasculares hace aproximadamente 400 millones de años, siendo los primeros organismos vegetales en colonizar el medio terrestre. Actualmente su distribución en el mundo es muy amplia, y se han reportado más de 10.000 especies diferentes (Schaefer y Zryd, 2001). Si bien muchos procesos biológicos como la respuesta a hormonas y estímulos ambientales resultan similares entre briofitas y plantas vasculares, la morfología y el ciclo de vida mantienen una marcada diferencia (Nishiyama *et al.*, 2003). Es así que las briofitas carecen de tejido vascular y órganos definidos, y en su lugar poseen estructuras más primitivas llamadas filoides, rizoides y cauloides. Su adaptación al hábitat terrestre se basa casi exclusivamente en la tolerancia al estrés, y logran sobrevivir a ciclos de deshidratación y rehidratación, sobreponiéndose al daño oxidativo que estas situaciones generan (Renzaglia *et al.*, 2002). Debido a su antigüedad y a la posición filogenética basal que ocupan, las briofitas se presentan como un laboratorio vivo, donde se puede examinar aspectos fundamentales de la evolución de las plantas (Schaefer, 2002).

El musgo *Physcomitrium patens* (*P. patens*), previamente conocido como *Physcomitrella patens*, pertenece a las briofitas. A pesar de contar con millones de años de evolución independiente, es un organismo modelo a la hora de estudiar procesos biológicos en plantas terrestres (Knight *et al.*, 2009). Su ciclo de vida se basa en una alternancia generacional, predominando la fase gametofítica (haploide) sobre la esporofítica (diploide). Esta característica particular es propia de las briofitas, y es otra cualidad que las diferencia de las plantas vasculares.

El desarrollo del musgo *P. patens* comienza con la germinación de una meiospora, que da lugar a una estructura filamentosa llamada protonema, la cual representa el gametofito juvenil. El protonema presenta un crecimiento bidimensional y está constituido por dos tipos de filamentos, el cloronema y el caulonema. El cloronema se encuentra formado por células con un gran número de cloroplastos y tiene un ciclo de 24 horas, mientras que el caulonema posee células con pocos cloroplastos y se divide con mayor rapidez. A partir de los filamentos del caulonema se desarrolla una yema, la cual marca el comienzo del crecimiento tridimensional y la formación del gametofito adulto. Este último se encuentra formado por un vástago fotosintético, estructuras reproductivas (arquegonias y anteridios), hojas y rizoides. El esporofito se forma a partir del cigoto y es dependiente del gametofito, en su interior alberga las esporas que luego serán liberadas y permitirán el comienzo del ciclo nuevamente (Figura 1) (Cove *et al.*, 2000, Reski *et al.*, 1998).

Una de las ventajas que presenta este organismo modelo, es su predominancia del estado haploide; este facilita el *screening* de los mutantes y agiliza considerablemente el trabajo. Además, posee un ciclo de vida corto, una gran capacidad de regeneración, una morfología simple y facilidad para ser cultivado *in vitro* (Schween *et al.*, 2003). Su genoma ha sido totalmente secuenciado, siendo el mismo de dominio público y organizado en 27 cromosomas (Rensing *et al.*, 2008). Así mismo, al menos el 13% de las secuencias encontradas correspondiente con genes en el musgo, son denominados genes huérfanos. Esto significa que no tienen homólogos en otros genomas publicados y su función aún sigue siendo desconocida (Zimmer *et al.*, 2013).

1.2 Estrés térmico por altas temperaturas

Un incremento por encima de la temperatura óptima de crecimiento, es un factor de estrés abiótico capaz de inducir cambios morfológicos, fisiológicos y bioquímicos (Schoffl *et al.*, 1998; Fragkostefanakis *et al.*, 2016). Una respuesta ampliamente observada en los organismos vegetales frente al aumento de temperatura, es la disminución de la síntesis proteica general, acompañada de la transcripción y traducción de proteínas específicas (Renault *et al.*, 2006). Existen numerosos estudios que demuestran que la síntesis proteica es uno de los blancos principales en la regulación

celular de plantas sometidas a estrés térmico. Sin embargo, son escasos los trabajos que profundizan en los mecanismos moleculares que gobiernan la traducción génica es estas condiciones; la gran mayoría se centran en el análisis de cambios a nivel de la transcripción (Baena-González, 2010; Muñoz y Castellano, 2012).



Figura 1. Ciclo de vida de *P. patens*. El desarrollo del musgo *P. patens* comienza con la germinación de una espora, que da lugar al gametofito juvenil (haploide), llamado protonema. El protonema presenta un crecimiento bidimensional y está compuesto por una red filamentosa de células, cloronema y caulonema. El cloronema se encuentra formado por células con un gran número de cloroplastos y tiene un ciclo de división cada 24 horas. El caulonema posee células con pocos cloroplastos y se divide más rápidamente. El desarrollo de una yema a partir de los filamentos del caulonema marca el comienzo del crecimiento tridimensional y la formación del gametofito adulto. Este último se encuentra formado por un vástago fotosintético, estructuras reproductivas (arquegonias y anteridios), hojas y rizoides. El esporofito (diploide) se forma a partir del cigoto y es dependiente del gametofito. En su interior alberga las esporas que luego serán liberadas y permitirán el comienzo del ciclo nuevamente (Cove *et al.*, 2000, Reski *et al.*, 1998). Figura modificada de Lang *et al.*, 2018.

Cuando el aumento de temperatura es moderado, se desencadena en las plantas una cascada de señales que activan la expresión de ciertos genes, disminuye las de otros y provocan la síntesis de proteínas particulares. Estas últimas se encuentran vinculadas a la estabilización estructural de otras proteínas y enzimas (Iba, 2002), a la protección del aparato fotosintético y a la estabilidad de las membranas (Wang *et al.*, 2004; Wahid *et al.*, 2007). Además, las plantas sintetizan una serie de enzimas antioxidantes y detoxificantes que tienen como objetivo atenuar el daño causado por las especies reactivas de oxígeno (ROS), los productos de la fotorespiración y los subproductos de alteraciones metabólicas necesarias para el reciclaje de proteínas (Almeselmani *et*

al., 2006). Todos estos mecanismos iniciados a nivel celular como respuesta al estrés, requieren que los organismos vegetales manejen de manera sumamente eficiente sus recursos energéticos, y la regulación de la síntesis proteica es un elemento clave en este proceso (Baena-González, 2010). Estudios recientes han demostrado que la regulación postranscripcional de genes, específicamente a nivel de la traducción de ARNs mensajeros (ARNm), es crucial en la respuesta adaptativa a distintos factores de estrés abiótico, entre ellos las altas temperaturas y el déficit hídrico (Floris *et al.*, 2009).

En eucariotas, el proceso de traducción puede dividirse en tres etapas: iniciación, elongación y terminación. Evidencias experimentales proponen como principal blanco de la regulación de la síntesis proteica, a la etapa de iniciación de la traducción. En condiciones fisiológicas, la gran mayoría de los ARNm inician la traducción a través de un mecanismo canónico dependiente de la estructura cap (7-metil guanosina). La misma, ubicada en el extremo 5' de los ARNm es reconocida por el factor de iniciación de la traducción eIF4E (eIF: eukaryotic initiation factors), que interactúa y recluta otros factores de iniciación de la traducción, lo cual finalmente desencadena el posicionamiento del ribosoma sobre el ARNm y el inicio de la traducción (Muñoz y Castellano, 2012). Sin embargo, en condiciones de estrés abiótico, esta iniciación de la traducción canónica se ve obstaculizada por diferentes mecanismos que afectan principalmente la actividad de los factores de iniciación (Holcik y Sonenberg, 2005). Por otro lado, en plantas sometidas a factores de estrés abióticos y bióticos se han observado mecanismos de iniciación de la traducción independientes de la estructura cap. En el maíz, los transcriptos que codifican para la alcohol deshidrogenasa ADH1 y la proteína de choque térmico HSP101, se traducen de manera independiente de la estructura cap en raíces privadas de oxígeno (Mardanova et al., 2008) y durante el estrés por altas temperaturas (Dinkova, 2005), respectivamente. Los mecanismos de traducción cap independientes conocidos hasta el momento son los mediados por IRES (Internal Ribosome Entry Sites) o CITEs (Cap-Independient Traslational Enhancers). En los IRES, el ribosoma es reclutado directamente a la región 5' UTR de los ARNm, sin la necesidad de reconocimiento de la estructura cap por parte del factor eIF4E (Pelletier et al., 1998). Por otro lado, en los CITEs puede reclutarse el ribosoma directamente o puede reclutarse el eIF4E y eIF4G juntos, pero siempre sin la necesidad de la estructura cap (Muñoz y Castellano, 2012). Con el correr de los años, la actividad IRES y CITEs se ha descrito en un número cada vez mayor de transcriptos celulares, incluyendo algunos que codifican para factores de iniciación de la traducción, factores de transcripción, proteínas homeóticas y proteínas de supervivencia. La presencia de estos IRES y CITEs permite la traducción eficiente de ARNm en condiciones donde la iniciación de la traducción cap dependiente se encuentra seriamente comprometida o inhibida, como es el caso del estrés abiótico (Komar y Hatzoglou, 2011). Además, es sabido que las plantas poseen características de traducción particulares, como la existencia de isoformas de los factores elF4E y elF4G, donde su presencia y ausencia se correlacionan con diferentes tipos de estrés (Mayberry *et al.*, 2009).

Todas estas evidencias experimentales ponen de manifiesto la importancia de la regulación de la síntesis proteica, y en especial el inicio de la traducción, en la capacidad de adaptación de los organismos vegetales a las diferentes condiciones de estrés, y a las altas temperaturas en particular. La existencia de un nivel adicional de regulación de la expresión génica, específico de plantas, resulta sumamente interesante y relevante a la hora de comprender los mecanismos que estos organismos desarrollan en pro de su supervivencia.

1.3 Factores de iniciación de la traducción 5A

Los factores de iniciación de la traducción eucariotas (eIF) consisten en varias subfamilias filogenéticas que participan en el inicio de la síntesis proteica. La iniciación de la traducción del ARNm es un proceso complejo, que consta de varias etapas y requiere el ensamblaje de las subunidades ribosomales, algunos de los eIF, el ARNt iniciador unido al ARNm y GTP como fuente de energía (Mayberry *et al.*, 2009). Se han identificado más de 40 subfamilias de eIF en especies de plantas y animales, y sin embargo solo algunos de ellos se han caracterizado funcionalmente. Además se ha visto que los eIF se encuentran involucrados en varios aspectos del crecimiento y desarrollo de plantas, así como en la resistencia a enfermedades y factores de estrés abiótico (Shopan *et al.*, 2020).

El factor de iniciación de la traducción 5A (eIF5A) se ha encontrado en todos los organismos eucariotas y se encuentra sumamente conservado tanto estructural como funcionalmente. Es sintetizado como un precursor inactivo que luego de una modificación postraduccional denominada hipusinación pasa a encontrarse en su forma activa (Feng et al., 2007). La hipusinación consiste en la formación del inusual aminoácido hipusina, a partir de una modificación sobre un grupo amino de una lisina altamente conservada, presente en el factor eIF-5A (Xu et al., 2011). La hipusina fue descubierta a partir de extractos de cerebro bovino en 1971 por Shiba y sus colaboradores (Shiba et al., 1971), y hasta el momento no se ha reportado su presencia en ninguna otra proteína (Xu et al., 2011). Su formación requiere dos pasos enzimáticos secuenciales, la primera reacción limitante es reversible y se da partir de la desoxihipusina sintasa (DHS). Dicha reacción consiste en la deshidrogenación de la espermidina y el consecuente corte y transferencia del grupo 4-aminobutilo al residuo conservado de lisina, generando el intermediario desoxihipusina. La segunda reacción es irreversible y se da a partir de la desoxihipusina hidroxilasa (DOHH). Esta enzima, hidroxila el intermediario desoxihipusina generando el residuo de hipusina, completando así la maduración y la activación del factor eIF5A (Figura 2). Tanto el sistema enzimático de modificación del eIF5A así como el propio factor de traducción, están sumamente conservados en todos los eucariotas (Park,

6

2006). Estudios provenientes de células HeLa han llevado a la caracterización de diferentes isoformas del eIF5A. La proteoforma mayoritaria correspondía a un 95% del total de la proteína y se trataba de aquella con el residuo K50 hipusinado y el extremo N-terminal acetilado. Todas aquellas proteoformas minoritarias (5%) presentaban la incorporación de un grupo acetilo adicional en una lisina específica (posición K47), diferenciándose entre ellas por presentar el residuo blanco de hipusinacion (K50) hipusinado, desoxihipusinado o sin modificar. Además, la proteoforma mayoritaria fue encontrada tanto en fracciones nucleares como en citoplasmáticas, mientras que las minoritarias únicamente fueron halladas en fracciones nucleares (Klier *et al.*, 1995). Estudios posteriores basados en ensayos inmunohistoquímicos, también en células HeLa, encontraron que la proteoforma hipusinada se localizaba fundamentalmente en el citoplasma, mientras que la no hipusinados eran rápidamente acetilados (K47) (Lee *et al.*, 2009). Posteriormente y en concordancia, se constató que la hipusinación provoca una fuerte desacelitalción en la lisina K47, lo cual pone de manifiesto la posible interacción entre estas dos modificaciones y cómo esto podría determinar la localización subcelular del factor eIF5A (Ishfaq, 2012).



Figura 2. 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 aminobutilo 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 tomada de Belda, 2014.

La función celular precisa del eIF5A, aún no se encuentra totalmente descripta. Inicialmente fue identificado como un factor de iniciación de la traducción, aunque posteriormente estudios en levaduras permitieron constatar que también participa activamente de la elongación de la traducción (Zuk y Jacobson, 1998). En mamíferos, se lo relacionan con la formación del primer

enlace peptídico en el inicio de la traducción, y se ha visto además que este factor se encuentra relacionado a procesos de proliferación celular y apoptosis (Chatterjee *et al.*, 2006), viabilidad celular y crecimiento celular (Park *et al.*, 2010). Por otro lado, se ha constatado su implicancia en la formación de complejos de ribonucleoproteínas como los cuerpos P y los gránulos de estrés (Li *et al.*, 2010) así como en el transporte núcleo-citosol de ARNm específicos (Zanelli y Valentini, 2007). Más precisamente, el eIF5A parece contribuir a la síntesis proteica translocando selectivamente subconjuntos específicos de ARNm desde el núcleo al citoplasma para su traducción, actuando como una proteína de transporte (Xu *et al.*, 2011). Por otro lado, se ha observado que este factor se encuentra íntimamente vinculado a la traducción de proteínas con prolinas consecutivas. De hecho, se ha demostrado tanto *in vitro* como *in vivo* que eIF5A es necesario para la traducción de estas proteínas, ya que la presencia de al menos 3 prolinas consecutivas en la secuencia primaria, causa el estancamiento del ribosoma (Figura 3) (Gutierrez *et al.*, 2013).



Figura 3. Modelo representando el estancamiento del ribosoma ante secuencias que codifican al menos tres prolinas consecutivas. Las di-prolinas del péptido en síntesis se encuentran en el ARNt del sitio P y el Pro-ARNtPro en el sitio A del ribosoma. La entrada de eIF5A en el sitio E del ribosoma posiciona el 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 tomada de Belda, 2014.

1.4 eIF5A en plantas

Al igual que en el resto de los organismos, en las plantas el eiF5A también se encuentra altamente conservado. Si bien es necesario profundizar los estudios dedicados a comprender sus funciones, al parecer tiene un rol esencial en el crecimiento y desarrollo de organismos vegetales, además de ser un factor clave en el control de los procesos de proliferación y senescencia celular. Se han aislado un gran número de isoformas de distintas especies, destacándose una gran conservación entre las mismas, 80-97% de identidad a nivel de secuencia aminoacídica. La existencia de varias isoformas de este factor podría deberse a una especialización funcional de cada una de ellas,

contribuyendo a la respuesta de los organismos vegetales frente a condiciones ambientales específicas o situaciones fisiológicas determinadas (Thompson *et al.*, 2004). Si bien se han identificado diferentes isoformas de este factor en plantas, hasta el momento la gran mayoría de los organismos posee una única isoforma para la enzima DHS, que al igual que el eIF5A, se encuentra altamente conservada entre las especies vegetales, 70-90% (Wang *et al.*, 2001).

En plantas específicamente, se ha visto que el eIF5A participa en la regulación de la síntesis proteica (iniciación, elongación y terminación) y en el recambio y metabolismo del ARNm. A través de la modulación de estos procesos influye en el crecimiento de la hoja y raíz, rendimiento de la semilla, senescencia de la flor y el fruto y muerte celular programada (Wang et al., 2003; Xu et al., 2011). Además, se ha visto que este gen se encuentra implicado en la respuesta de los organismos vegetales a diferentes tipos de estrés abiótico, como por ejemplo las altas temperaturas. Plantas de Arabidopsis thaliana (A. thaliana) que sobreexpresan el eIF5A de Rosa chinensis, mostraron mayor resistencia a calor, estrés oxidativo y estrés osmótico, en relación a las plantas salvajes (Xu et al., 2011). También se ha visto que plantas de A. thaliana transgénicas que sobreexpresan eIF5A de la remolacha azucarera, exhibieron una mayor tolerancia a diferentes concentraciones de NaCl (Rausell et al., 2003). Sumado a esto, el eIF5A de A. thaliana influye en la sensibilidad de esta planta al cadmio, al afectar la captación, acumulación y el proceso de desintoxicación de este metal en la planta (Xu et al., 2015) y se ve involucrado en la tolerancia a bajas concentraciones de hierro (Lan et al., 2011). En arroz se ha reportado que el estrés por sal y metales pesados induce la expresión de genes eIF5A, sugiriendo que los mismos podrían encontrarse implicados en la tolerancia a dichas formas de estrés (Chou et al., 2004). Otros estudios recientes realizados sobre Petunia, demuestran que al menos una de las isoformas del eIF5A presente en dicha planta, se encuentra íntimamente involucrado en el desarrollo del cloroplasto, siendo relevante en la conformación del fotosistema I y II y la membrana tilacoidal (Liu et al., 2019).

En plantas, existen diferencias en cuanto a la cantidad de isoformas del eIF5A, sus respectivas funciones y patrones de expresión. En tabaco (*Nicotiana plumbaginifolia*) se han identificado dos isoformas, NeIF5A1 expresada preferentemente en tejidos fotosintéticos, y NeIF5A2 expresada constitutivamente en toda la planta (Chamot y Kuhlemeier, 1992). Estudios realizados en tomate (*Solanum lycopersicum*), permitieron identificar cuatro isoformas del eIF5A (SleIF5A1-4). Además, se observó que la expresión de DHS y de eIF5A se incrementa durante la senescencia natural de hojas y frutos, y en respuesta al estrés por deshidratación y bajas temperaturas (Wang *et al.*, 2001). En *A. thaliana*, se expresan tres isoformas de eIF5A (AteIF5A1-3). A través de diferentes experimentos se constató que *AteIF5A1* se expresaba en tejidos senescentes, que *AteIF5A2* lo hacía en tejidos que habían sido dañados mecánicamente, y que *AteIF5A3* se expresaba en tejidos con división celular activa (Thompson *et al.*, 2004). Al igual que para tomate, se pudo observar que los

9

niveles de enzima DHS así como del factor eIF5A (concretamente AteIF5A1) incrementan su expresión durante la senescencia natural de las hojas. Por otro lado, diversos estudios proponen que AteIF5A2 cumple un rol fundamental en el proceso de muerte celular programada (Hopkins *et al.*, 2008; Feng *et al.*, 2007) mientras que AteIF5A3 se encuentra íntimamente relacionada al crecimiento de la planta. Una sobreexpresión constitutiva de AteIF5A3 en líneas transgénicas de *A. thaliana*, generó plantas más vigorosas, con un aumento en el crecimiento vegetativo y reproductivo y un incremento en la producción de semillas. También se constató que esta isoforma se encuentra involucrada en la regulación de las respuestas frente al estrés osmótico y la falta de nutrientes (Ma *et al.*, 2010).

Si bien existen numerosos estudios que intentan caracterizar la función del eIF5A, tanto en plantas como en el resto de los organismos eucariotas, todavía se manejan muchas teorías que deben ser profundizadas. Los mecanismos que regulan la expresión de este gen así como su función dentro de la célula son en gran medida desconocidos. Ya que tanto el propio el eIF5A así como la ruta de hipusinacion se encuentran sumamente conservados en todos los organismos eucariotas, resulta sumamente interesante comprender en profundidad su función y mecanismos que gobiernan su expresión.

1.5 Antecedentes

Estudios previos realizados por el Laboratorio de Biología Molecular Vegetal en los cuales se analizó el perfil transcripcional del musgo *P. patens* en respuesta al estrés por altas temperaturas, pusieron en evidencia la inducción de varios genes que codifican para factores de iniciación de la traducción, entre ellos el gen *PpeIF5A* (Tabla 1).

Tal como fue mencionado anteriormente, estudios realizados en plantas vasculares revelan la presencia de varios genes que codifican para proteínas del tipo eIF5A, las cuales aparentemente cumplen funciones diferentes durante el desarrollo así como en el estrés. El genoma de *P. patens* contiene un único gen eIF5A con expresión reportada, por lo que resulta de gran interés desde el punto de vista evolutivo determinar si dicho gen cumple una función similar a lo observado en plantas vasculares o por contrario tiene un rol específico durante el desarrollo y/o en el estrés.

Además, un gen homólogo en soja (Glyma.02G203700) fue identificado por el grupo de investigación de nuestro laboratorio, en el marco de un proyecto conjunto con el Laboratorio de Bioquímica de la Facultad de Agronomía. El objetivo de dicho proyecto era la identificación de genes candidatos a aumentar la resistencia al estrés hídrico en plantas. Este gen fue inicialmente aislado de un genotipo de soja resistente a la sequía, y fue seleccionado por las características de su secuencia y su particular patrón de expresión. Se observó que el mismo presentaba una cierta expresión basal

en plantas sin estrés, mientras que en respuesta a sequía su expresión se inducía tanto en plantas resistentes como en plantas susceptibles.

En base a los antecedentes del grupo de investigación y de los datos aportados por la literatura, este trabajo se propone profundizar en el análisis funcional de *PpeIF5A*.

Tabla 1 Genes expresados diferencialme	nte en teiidos de P <i>naten</i> s	en resnuesta a estrés nor	altas temneraturas
Tabla 1. Genes expressions uncrenelatine	nic ch icjiuos uc i i putens	ch icspacsta a cstics poi	antas temperataras

elFs	Homólogo en A.	Función	Especie	Referencia	Fold
	thaliana				change
elF5A	AT1G69410.1	Senescencia. Tolerancia al estrés osmótico y a la deprivación	Tomate Arabidopsis	Wang et al., 2001; Thompson et al 2004	5.6
		de nutrientes. Muerte celular programada	Arabidopsis	Ma et al., 2010	
		inducida por patógenos. Termotolerancia y la	Arabidopsis	Hopkins et al., 2008	
		resistencia al estrés oxidativo y osmótico.	Rosa	Xu <i>et al.,</i> 2011	
elF4E	AT4G18040.1	Crecimiento vegetal.	Tabaco	Combe <i>et al.,</i> 2005	2.7
		Resistencia al virus de la mota venosa del chile	Capsicum	Hwang <i>et al.,</i> 2009	
elF4A	AT3G13920.1	Crecimiento y desarrollo	Brachypodium	Vain <i>et al.,</i> 2011.	2.1
		Tolerancia al estrés salino	Tabaco	Sahoo <i>et al.,</i> 2012	
elF2	AT5G20920.2		Physcomitrium		3.1
elF3C	AT3G56150.2		Physcomitrium		2.0
elF3B	AT5G25780.1		Physcomitrium		2.2
elF2B	AT1G53880.1		Physcomitrium,		4.1

2. Objetivos

El objetivo general de este trabajo es evaluar el posible rol del gen PpeiF5A en la tolerancia al estrés térmico y a otros tipos de factores de estrés abiótico en plantas. Para ello se establecieron los siguientes objetivos específicos.

 Estudiar el perfil de expresión del gen *PpeIF5A* durante el desarrollo y frente a diversos estímulos de estrés.

2. Determinar la localización subcelular de la proteína codificada por el gen *PpeIF5A* mediante expresión transitoria y estable.

3. Generar construcciones que permitan determinar el efecto de la expresión heteróloga del gen *PpeIF5A* en *Arabidopsis thaliana*.

3. Estrategia experimental

Con el objetivo de analizar el perfil de expresión del gen *PpeIF5A* en *P. patens*, se realizaron tratamientos a diferentes tiempos con potenciales factores de estrés y se cuantificó los niveles de expresión mediante PCR en tiempo real.

Paralelamente, con el fin de profundizar en el rol funcional del *PpeIF5A*, se generaron herramientas que permitan evaluar el efecto de la expresión heteróloga de este gen en *A. thaliana*, así como determinar la localización subcelular del producto proteico mediante ensayos de expresión transitoria y estable en plantas *A. thaliana*.

En un futuro se realizarán estudios fenotípicos de las líneas obtenidas en condiciones normales y de estrés. Esta etapa del proyecto escapa al contenido de este trabajo debido a limitaciones temporales, pero serán realizadas en el marco de estudios de posgrado.

4. Materiales y métodos

4.1 Material vegetal y condiciones de cultivo

4.1.1 *Physcomitrium patens*

Se utilizó el musgo *Physcomitrium patens (P. Patens)* Grandsen tipo salvaje (Schaefer *et al.*, 1991). Los cultivos vegetales en estado de protonema, fueron mantenidos y subcultivados *in vitro* en placas de Petri con medio sólido Hoagland's BCDAT CaCl2 (1,6 g/L Hoagland's, 1 mM MgSO₄, 1,8 mM KH₂PO₄ pH 6,5, 10 mM KNO₃, 45 µM FeSO₄, 1 mM CaCl₂, 4 mM tartrato de amonio, 10 g/L agar) sobre discos de celofán, según fue descrito por Ashton y Cove (1977). En el caso de las colonias, las mismas se dividen y transfieren a placas de Petri conteniendo medio sólido Hoagland's sin celofán. Los musgos fueron crecidos a 22°C con un fotoperíodo de 16 horas luz/8 horas oscuridad y con un régimen de fotones de 90-150 µmol.m⁻².s⁻¹. La micropropagación del material vegetal se realizó con material estéril y en condiciones asépticas.

4.1.2 Arabidopsis thaliana y Nicotiana benthamiana

Las semillas de *A. thaliana* (Col-O) y *N. benthamiana* se esterilizaron durante 15 minutos en una solución 7% de hipoclorito de sodio + 0,05% Tween-20 y se lavaron cuatro veces durante 5 minutos con agua destilada. Posteriormente se traspasaron a placas de Petri estériles con medio de cultivo Murashige-Skoog (2,4 g/L Murashige & Skoog, 5 g/L de sacarosa, 0,5 g/L ácido monohydrate 2-ethanesufonic [MES], 10% agar, pH 5,7). Las plantas fueron crecidas a 22-24^oC con un fotoperíodo de 16 horas luz (120 µmol.m⁻².s⁻¹) y 8 horas oscuridad. En el caso de *A. thaliana* las semillas fueron estratificadas en heladera a 4^oC durante 48 horas antes de ser sometidas a condiciones de crecimiento. Catorce días después, las plantas fueron transferidas a macetas con turba y crecidas en cámara de crecimiento con 120 µmol fotones m⁻²s⁻¹ de intensidad lumínica y un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad a 25^oC y 50% de humedad relativa. Como solución de riego se utilizó agua destilada, suplementando con fertilizante Hakaphos Rojo (Compo Expert) 2 g/L tres veces a la semana.

4.2 Análisis de expresión frente a diversos estímulos de estrés por qRT-PCR

Colonias de *P. patens* cultivadas en las condiciones descritas en la sección 4.1 fueron sometidas a diferentes tratamientos durante 4 y 24 horas. Estos tratamientos consistieron en: ácido abscísico (ABA), 50 μ M; manitol (Mntl), 500 mM; cloruro de sodio (NaCl), 300 mM; ácido salicílico (SA), 0,5 mM; ditiotreitol (DTT), 10 mM; alta temperatura, 37°C; luz fuerte (SL) 200 μ mol fotones m².s⁻¹; deshidratación. Una vez transcurrido el tiempo (4 o 24 hs) se procedió a la extracción de ARN.

La misma fue realizada con el kit *RNeasy Plant Mini Kit* (Qiagen, Hilden, Germany) de acuerdo a las especificaciones sugeridas por el proveedor. Posteriormente se realizó la síntesis de ADN copia (ADNc) a partir de 2 µg del ARN total de cada tratamiento. Para dicha síntesis se utilizó el kit *QuantiNova Reverse Transcription* (RT) (Qiagen, Hilden, Germany). Finalmente el ensayo de qPCR fue realizado en un equipo *Applied Biosystems StepOne real-time PCR* en un volumen final de 10 µL utilizando: 5 µL de SYBR Green PCR Master mix (2X), 0,5 µM de cada uno de los cebadores (primers) y 2 µL de molde (ADNc) en una dilución 1/10. La secuencia de los primers así como el programa utilizado se detallan en la Tabla 2. La cantidad de transcripto cuantificada para el gen de interés se normalizó en relación al gen de ubiquitina ligasa E3, el cual presenta expresión constitutiva (Le Bail *et al.*, 2013). La eficiencia de amplificación en las diferentes combinaciones de primers, fue en todos los casos mayor a 90%. La expresión relativa se calculó utilizando el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak y Schmittgen, 2001).

4.3 Cepas y cultivos de microorganismos

4.3.1 Escherichia coli

Para las transformaciones se utilizaron células competentes de la cepa Top10 de *Escherichia coli* (*E. coli*) y para la replicación del vector pENTR2B de Invitrogen se utilizó la cepa DB3.1. Ambas cepas fueron incubadas en medio Luria-Bertani (1% bacto-triptona, 0,5 % extracto de levadura, 1% NaCl) líquido o sólido (LB 1,5% agar) suplementado con el antibiótico correspondiente para cada transformación, a 37°C, toda la noche y con agitación constante (180 rpm) en el caso de cultivo líquido.

4.3.2 Agrobacterium tumefaciens

Para transformación vegetal se utilizó la cepa C58C1 de *Agrobacterium tumefaciens* (*A. tumefaciens*) resistente a carbenicilina (Cb, 100 mg/ml) y rifampicina (Rf, 100 mg/ml). Las bacterias fueron incubadas en medio YEP (1% bacto-triptona, 1% extracto de levadura, 0,5% NaCl) líquido o sólido (LB 1,5% agar) a 28°C durante 48 horas con agitación constante (en el caso de cultivo líquido) y el agregado de los antibióticos de los antibióticos correspondientes.

4.5 Vectores y construcciones génicas

4.5.1 Clonado de la secuencia codificante del gen *PpelF5A* en el vector de entrada pENTR2B

La secuencia codificante del gen *PpeIF5A* con y sin su codón de terminación fue clonada en el vector pENTR2B de Invitrogen. Dentro del mismo cada secuencia clonada se encuentra flanqueada por los sitios attL1 y attL2, los cuales brindan la posibilidad de recombinación sitio específica por la

tecnología Gateway. El vector de entrada pENTR2B además posee un gen de resistencia al antibiótico kanamicina (neomicina fosfotransferasa, *nptII*), que permite seleccionar las bacterias transformadas.



Figura 4. Mapa del vector de clonado pENTR2B de Invitrogen. Se destacan los siguientes elementos: sitios attL1 y attL2, brindan la posibilidad de recombinación sitio específica por la tecnología Gateway con los sitios attR1 y attR2 respectivamente; gen de resistencia al antibiótico kanamicina (neomicina fosfotransferasa, *nptll*), permite selección de las bacterias transformadas; origen de replicación (pUc Ori), posibilita la replicación del plásmido en la bacteria en alto número de copias; terminadores de la transcripción (rrnB T1 y rrnB T2), impiden la transcripción del gen clonado, la cual en caso de efectuarse podría resultar tóxica para las bacterias transformadas; gen CcdB, promueve la muerte celular al codificar para una proteína inhibidora de la girasa bacteriana.

La región codificante del gen *PpeIF5A* con y sin su codón de terminación fue amplificada a partir de ADNc de *P. patens* utilizando la polimerasa *Phusion HF* (Thermo Cat. F530l). Dichas reacciones fueron llevadas a cabo en un volumen final de 50 µL de acuerdo a las especificaciones sugeridas por el proveedor: buffer Phusion 1X, 200 µM dNTPs, 0,5 µM de cada uno de los primers, 0,02 U de polimerasa y 1 µL de ADNc como molde. Tanto el primer directo (*forward*) así como el reverso (*reverse*) fueron diseñados para contener los sitios de restricción correspondientes a las enzimas *Bam*HI y *Not*I respectivamente permitiendo el clonado direccional de la secuencia de interés en el vector pENTR2B. Se diseñaron primers reverse que permiten la amplificación de la secuencia codificante del gen *PpeIF5A* con y sin su codón de terminación. La secuencia de dichos primers así como el programa utilizado se detallan en la Tabla 3.

Para ambos productos de amplificación se procedió de la misma manera. El producto de PCR fue analizado en gel de agarosa 1% y el fragmento del tamaño esperado se purificó a partir del

mismo utilizando columnas de extracción comerciales (Qiagen Cat. 27106). Posteriormente, tanto el vector pENTR2B así como el producto de PCR fueron sometidos a una doble digestión con las enzimas *Bam*HI y *Not*I. Para dichas digestiones se utilizó: 3µg de ADN plasmídico o producto de PCR y 10 U de cada una de las enzimas (*Bam*HI y *Not*I) en buffer NEB 3.1 1X. Las digestiones fueron incubadas a 37°C por 3-4 horas. Luego de la digestión, el vector pENTR2B fue analizado por electroforesis en gel de agarosa 1% con el objetivo de identificar y purificar la banda correspondiente al vector sin el gen letal ccdB. La purificación fue realizada con columnas de extracción comerciales (Qiagen Cat. 27106). Por otro lado, el producto de PCR luego de la digestión también fue purificado utilizando columnas comerciales.

La concentración de ADN plasmídico así como del producto de PCR, ambos digeridos, fue obtenida utilizando un Nano Drop (Thermo) y chequeada a través de gel de agarosa 1%. La reacción de ligación entre el vector pENTR2B y el producto de PCR fue realizada en un volumen final de 20µL, en una relación molar vector:fragmento de 5:1. Se colocaron 75 ng de vector y 15 ng de inserto en buffer de ligación 1X junto con 1 U de T4 ADN ligasa (Invitrogen). Se incubó durante a 22°C.

Una vez transcurrida la ligación, se inactivó la ligasa 10 min a 70°C y se procedió a transformar células quimiocompetentes *E.coli* Top10. Los transformantes fueron seleccionados en medio LB suplementado con kanamicina (Kan) 50µg/mL. La presencia del inserto fue chequeada por PCR a partir de colonia utilizando la polimerasa Taq (NEB, Cat. M0267). La secuencia de los primers utilizados así como el programa se detallan en la Tabla 3. Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa 1%. Los clones positivos para pENTR2B-eiF5A:GFP (sin stop) y pENTR2B-eiF5A fueron confirmados por secuenciación (Instituto Pasteur de Montevideo). Se guardó un stock de las bacterias recombinantes (500 µL de cultivo líquido) en glicerol 30% a -80°C para ser utilizado en los ensayos posteriores.

4.5.2 Subclonado de la secuencia codificante del gen *PpelF5A* en el vector binario pK7FWG2.0

Para determinar la localización subcelular del producto proteico codificado por el gen PpeIF5A se utilizó el vector binario pK7FWG2.0 (Karimi et al., 2002). Este vector permite fusionar la proteína fluorescente GFP (Green Fluorescent Protein) al extremo carboxilo terminal de la proteína de interés mediante la tecnología Gateway (Manual Gateway, Catalogo no. 12535-019). La expresión de la proteína de fusión en plantas es constitutiva y se encuentra bajo control del promotor CaMV35S. Este vector confiere resistencia a kanamicina en plantas (neomicina fosfotransferasa, nptII) y a espectinomicina (aminoglicosido adenililtransferasa) en bacterias. Tanto la secuencia de interés fusionada con GFP así como el gen de resistencia a kanamicina se encuentran flanqueados por los bordes derecho e izquierdo del T-ADN (RB y LB).



Figura 5. Mapa del vector binario de pK7FWG2.0. Se destacan los siguientes elementos: promotor del virus del mosaico de coliflor (p35S), permite la expresión constitutiva del gen de interés; terminador del virus del mosaico de coliflor (T35S), finaliza la transcripción del gen de interés; *Green Fluorescent Protein* (Egfp), proteína fluorescente fusionada al extremo carboxilo terminal de la proteína de interés; gen de resistencia al antibiótico espectinomicina (aminoglicosido adenililtransferasa, Sm/SpR), permite selección de las bacterias transformadas; gen de resistencia al antibiótico Kanamicina (neomicina fosfotransferasa, *nptII*), permite selección de las plantas transformadas; sitios attR1 y attR2, brindan la posibilidad de recombinación sitio específica por la tecnología Gateway con los sitios attL1 y attL2 respectivamente; gen CcdB, promueve la muerte celular al codificar para una proteína inhibidora de la girasa bacteriana; borde derecho y borde izquierdo (RB, LB), permiten la transferencia del T-ADN mediada por *A. tumefaciens*.

En el vector pENTR2B, la secuencia de interés (*PpeIF5A*) se encuentra flanqueada por los sitios attL1 y attL2, los cuales se recombinan con los sitios attR1 y attR2 respectivamente en el vector de destino pK7FWG2,0. La recombinación se llevó a cabo en un volumen final de 10 µL de acuerdo a las especificaciones sugeridas por el proveedor: enzima LR clonasa II 1X (Invitrogen Cat. 11791020), 150 ng del vector de destino (pK7FWG2.0) y 100 ng vector de entrada Pentr2B-eiF5A:GFP. Se incubó a 25°C durante toda la noche. Una vez transcurrido el tiempo de incubación se agregó 1 µL de proteinasa K y se incubó durante 10 minutos a 37°C para inactivar la clonasa. La mezcla obtenida fue utilizada para transformar células quimiocompetentes de la cepa Top10 de *E. coli*. Los transformantes fueron seleccionados en medio LB suplementado con espectinomicina 50 µg/mL. Las colonias obtenidas fueron chequeadas por PCR a partir de colonia utilizando la polimerasa Taq (NEB, Cat. M0267). La secuencia de los primers utilizados así como el programa se detallan en la Tabla 3. Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa 1%.

4.5.3 Subclonado de la secuencia codificante del gen PpelF5A en el vector binario pUB-Dest

Para evaluar el efecto de la expresión heteróloga del gen *PpeIF5A* en *A. thaliana* se clonó la secuencia de interés en el vector binario pUB-dest (Grefen *et al.*, 2010) mediante la tecnología Gateway (referencia de manual de Gateway). Este vector permite la expresión de la proteína de manera constitutiva, bajo el control de un promotor de ubiquitina de *A. thaliana*. Este vector confiere resistencia a glufocinato de amonio en plantas (fosfinotricina acetiltransferasa, *BAR*) y a espectinomicina (aminoglicosido adenililtransferasa) en bacterias. Tanto la secuencia de interés así como el gen de resistencia a glufocinato se encuentran flanqueados por los bordes derecho e izquierdo del T-ADN (RB y LB).

En el vector pENTR2B, la secuencia de interés (*PpeIF5A* con stop) se encuentra flanqueada por los sitios attL1 y attL2, los cuales se recombinan con los sitios attR1 y attR2 respectivamente en el vector de destino pUB-dest. La recombinación fue llevada a cabo en las mismas condiciones descritas anteriormente para el vector pK7FWG2,0 pero utilizando como vector de destino el pUB-dest y como vector de entrada la construcción pENTR2B-eiF5A. La mezcla obtenida fue utilizada para transformar células quimiocompetentes de la cepa Top10 de *E. coli*. Los transformantes fueron seleccionados en medio LB suplementado con espectinomicina 50 µg/mL. Las colonias obtenidas fueron chequeadas por PCR de colonia utilizando la polimerasa Taq (NEB, Cat. M0267). La secuencia de los primers utilizados así como el programa se detallan en la Tabla 3. Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa 1%.

4.6 Transformación de células quimiocompetentes de Escherichia coli

Se transformaron células quimiocompetentes de la cepa Top10 de de *E. coli* generadas en el laboratorio de Biología Molecular Vegetal (Hanahan, *et al.*, 1991). Para dicha transformación se colocaron 50 µL de células quimiocompetentes junto con 5 µL de la reacción de ligación o de la reacción de recombinación dependiendo el caso. La mezcla fue incubada en hielo durante 30 minutos y luego se realizó un shock térmico a 42ºC durante 60 segundos. Posteriormente se volvió a colocar la mezcla en hielo por dos minutos y pasados los mismos se agregaron 250 µL de medio LB precalentado para inmediatamente incubar las células a 37ºC durante una hora con agitación constante. Finalmente se sembró el cultivo en placas de LB sólido suplementadas con el antibiótico correspondiente según cada construcción y se incubaron a 37ºC durante toda la noche.



Figura 6. Mapa del vector binario de pUB-dest. Se destacan los siguientes elementos: promotor de poliubiquitina 10 de *A. thaliana* (pUBQ10), permite la expresión constitutiva del gen de interés; terminador del virus del mosaico de coliflor (T35S), finaliza la transcripción del gen de interés; gen de resistencia al antibiótico espectinomicina (aminoglicosido adenililtransferasa, Sm/SpR), permite selección de las bacterias transformadas; gen de resistencia al herbicida glufocinato de amonio (fosfinotricina acetiltransferasa, *BAR*), permite selección de las plantas transformadas; sitios attR1 y attR2, brindan la posibilidad de recombinación sitio específica por la tecnología Gateway con los sitios attL1 y attL2 respectivamente; gen CcdB, promueve la muerte celular al codificar para una proteína inhibidora de la girasa bacteriana; borde derecho y borde izquierdo (RB, LB), permiten la transferencia del T-ADN mediada por *A. tumefaciens.*

4.7 Transformación de células electrocompetentes de Agrobacterium tumefaciens

Tanto para transformación estable *en A. thaliana* así como expresión transitoria en hojas de *N. benthamiana* se transformaron células de *A. tumefaciens* electrocompetentes de la cepa C58C1 (Deblaere *et al.*, 1985), generadas en el laboratorio de Biología Molecular Vegetal. Para ello se agregaron 2 μ L de la reacción de recombinación a 50 μ L de células electrocompetentes. Las mismas fueron electroporadas utilizando un electroporador *Gene Pulser XcellTM* (Bio-Rad) en las siguientes condiciones: voltaje de 2500 V, capacitancia de 25 μ F, resistencia de 200 Ω y un pulso de 3,5 ms. Posteriormente se agregaron 200 μ L de medio YEP y se incubó durante una hora a 30°C con agitación constante. Finalmente se sembró el cultivo en placas con medio LB sólido suplementado con rifampcina 100 μ g/mL y espectinomicina 100 μ g/mL y se incubaron a 28°C durante dos días. Las colonias obtenidas fueron chequeadas por PCR de colonia utilizando la polimerasa Taq (NEB, Cat. M0267). La secuencia de los primers utilizados así como el programa se detallan en la Tabla 3. Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa 1%.

4.8 Agroinfiltración de hojas de Nicotiana benthamiana

La expresión transitoria en hojas de *N. benthamiana* se realizó por medio de agroinfiltración. Dicha técnica consiste en introducir en el apoplasto (espacio extracelular) de las hojas un cultivo de *A. tumefaciens* conteniendo un plásmido con la construcción de interés (pK7FWG2-eIF5A).

Para llevar a cabo la agroinfiltración, se inocularon 5 mL de medio YEP (suplementado con rifampcina 100 µg/mL y espectinomicina 100 µg/mL) a partir de una estría fresca del cultivo de *A. tumefaciens* obtenidas en la sección 4.7). El mismo se incubó a 28°C durante dos días con agitación constante. Posteriormente se centrifugaron los 5 mL de cultivo a 5000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente. El pellet fue resuspendido en 1 mL buffer de infiltración (50 mM de MES, 2mM de Na,PO,, 0.5 % glucosa y 100 µM acetosiringona) y centrifugado nuevamente en las mismas condiciones. Se repitió este paso una vez más. Finalmente se diluyó la suspensión bacteriana en buffer de infiltración hasta alcanzar una DO₆₀₀ de 0,1. Previo a la infiltración se pulverizaron las plantas con agua destilada y se colocaron bajo luces para que los estomas se abrieran. Las infiltraciones se realizaron con jeringas de 5 mL sin aguja, presionando sobre el revés de las hojas. Se realizaron 3 o 4 infiltraciones por construcción. Las plantas infiltradas fueron incubadas por dos días en condiciones óptimas de crecimiento.

4.9 Visualización de PpelF5A-GFP por microscopía confocal

Para la observación de la fluorescencia en las hojas de *N. benthamiana* se cortaron trozos pequeños e irregulares de las hojas infiltradas y se colocaron en un portaobjeto. Luego se montaron con glicerol al 10% y cubrieron con un cubreobjeto. Se recurrió al servicio del microscopio confocal de la Unidad de Biología Celular del Instituto Pasteur de Montevideo. Las longitudes de onda utilizadas para la observación de GFP fueron 488 nm para la excitación y 500 nm para la emisión.

4.10 Transformación estable de Arabidopsis thaliana

Las plantas fueron crecidas en las condiciones descritas en la sección 4.1.2 Para cada construcción se sembraron al menos cuatro macetas con tres plantas de *A. thaliana* en cada una. Se cortaron las inflorescencias primarias y cuando se alcanzó un estado en que las plantas presentaron una mayoría de botones florales, se procedió a la transformación por inmersión floral (Clough y Bent, 1998). Para ello se inocularon 500 mL de medio YEP (suplementado con 100 µg/mL de rifamicina y 100 µg/mL espectinomicina), con estrías frescas del cultivo de *A. tumefaciens* conteniendo un plásmido con la construcción de interés (pK7F-eIF5A pUB-dest-eiF5A). Se incubó a 28 ºC con agitación constante durante toda la noche. Posteriormente se centrifugó el cultivo a 5000 rpm. durante 10 minutos a temperatura ambiente. El pellet fue resuspendido en buffer de

infiltración (½ MS, 5 % sacarosa, 0,05 % Silwett L-77) obteniendo una DO₆₀₀ mayor a 2.0. Las plantas se sumergieron en esta mezcla durante algunos segundos y se envolvieron en bolsas de nylon para prevenir la evaporación del inóculo. Al día siguiente se transfirieron a condiciones normales de crecimiento. Se realizó un seguimiento de las plantas inoculando los nuevos botones florales que fueron surgiendo (cada 5 días a partir de la primera inoculación por inmersión). Para estas inoculaciones se depositó la suspensión bacteriana detallada anteriormente sobre cada botón floral (Martinez *et al.,* 2004). Una vez cosechadas las semillas, se sembraron en medio MS pH 5.7 suplementado con 100 μg/mL de kanamicina en el caso de las plantas transformadas con pK7-eiF5A o 100 μg/mL glufocinato de amonio (nombre comercial BASTA) en el caso de las transformadas con pUB-dest-eiF5A. Doce días después, las plantas que sobrevivieron fueron transferidas a maceta y se cosecharon las semillas para la siguiente ronda de selección.

4.11 Chequeo de transformantes estables de Arabidopsis thaliana

Las semillas cosechadas a partir de transformaciones realizadas sobre plantas de *A. thaliana* con las construcciones pK7-eiF5A ó pUB-dest-eiF5A fueron cultivadas según lo descrito en la sección 4.1.2. Una vez crecidas se procedió a verificar que dichas plantas se encuentren transformadas con la construcción de interés. En el caso de las plantas de *A. thaliana* transformadas con la construcción pUB-dest-eiF5A se realizó una extracción de ADN a partir del material vegetal como se describe en la sección 4.15 y se verificó por PCR la presencia del inserto (secuencia codificante PpeIF5A) utilizando la polimerasa Taq (NEB, Cat. M0267). La secuencia de los primers utilizados así como el programa se detallan en la Tabla 3. Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa 1%. Para verificar la presencia de la construcción pK7-eiF5A, las plantas candidatas fueron observadas en un estereoscopio de fluorescencia (AXIO ZOOM. V16 de Zeiss) el cual permite visualizar la emisión de fluorescencia de la proteína GFP.

4.12 Obtención de ADN plasmídico

El ADN plasmídico fue obtenido a partir de cultivos bacterianos líquidos de 5 mL crecidos en medio LB junto con el antibiótico correspondiente. Los mismos fueron incubados a 37ºC durante toda la noche, con agitación constante y obtenidos a partir de una colonia aislada. El ADN plasmídico fue extraído utilizando el kit comercial QIAprep Spin Miniprep (QIAGEN, Hilden, Alemania) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

4.13 Electroforesis de ADN en geles de agarosa

Las corridas electroforéticas de ADN se realizaron en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio (BrEt, 0.5 μ g/mL) utilizando buffer TAE 1X (40 mM Tris-Acetato, 1 mM EDTA). Todas las muestras fueron sembradas con buffer de carga 6x (glicerol 30%, azul de bromofenol 0.25% y azul de xilencianol 0.25%). El marcador de peso molecular utilizado para estimar el tamaño y la concentración de ADN presente en la muestra fue el ADN del fago λ digerido con la enzima *Pst*I.

4.14 Recuperación de ADN a partir de gel de agarosa

La recuperación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa fue realizada utilizando el kit comercial QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden, Alemania).

4.15 Obtención de ADN genómico a partir de material vegetal

La obtención de ADN genómico se realizó macerando 1-3 g de tejido vegetal en nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino. Luego se resuspendió en una solución con 15 mL de buffer de extracción (100 mM Tris-HCl pH 8.0, 50 mM EDTA pH 8.0, 500 mM NaCl, 10 mM β -mercaptoetanol) y 1 mL SDS 20%, con agitación suave. Acto seguido se incubó a 65°C por 15 min. Posteriormente se agregaron 5 mL de KAc 5M, se mezcló y se incubó a 0°C durante 30 min. Una vez finalizado dicho periodo se centrifugó a 5000 rpm durante 40 min. El sobrenadante se traspasó a otro tubo a través de una gasa y se le agregaron 10 mL de isopropanol, se mezcló y se incubó a -20°C durante 30 min. A continuación se centrifugó 40 min a 7500 rpm en frío, se lavó con 1 mL EtOH 70%, se centrifugó nuevamente 5 min a 5000 rpm y se dejó secar el pellet. Consecutivamente se resuspendió el pellet en 450 μ L de buffer TE (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0] y 50 μ L NaCl 3 M) y se incubó a 37°C durante 30 min con 2 μ L RNAsa. Posteriormente se extrajo una vez con un volumen de fenol y dos veces con un volumen de cloroformo. Luego se precipitó el ADN con 0,8 volúmenes de isopropanol, se centrifugó durante 1 min, se lavó el pellet con EtOH 70% y se dejó secar. Finalmente se resupendió el ADN en 100 μ L H₂O.

4.16 Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR) y a tiempo final

La reacción de qPCR fue realizada utilizando un equipo *Applied Biosystems StepOne real-time PCR*. Los primers y el programa utilizados se detallan en la Tabla 2. Todas las reacciones de PCR fueron realizadas utilizando un termociclador Veriti (Applied Biosystem). Los primers y programas utilizados se detallan en la Tabla 3.

Tabla 2. Primers y condiciones de q-PCR

#	Nombre Identificador	Secuencia	Aplicación	Programa PCR
	F- Pp3c13_15620	TGGGAAGAAGCTCGAGGATA	Análisis de	1- 95 ºC, 5 min 2- 40 ciclos:
1	R- Pp3c13_15620 R	GCAGATCGTCTTTGGTGACA	PCR del gen PpelF5A.	95ºC, 15 s; 60 ºC, 30 s.
2	F-Pp3c2_6770	AGGCAGACGTGGGTACTTGA	Análisis de expresión por q-	1- 95 ºC, 5 min 2- 40 ciclos:
	R-Pp3c2_6770	CATTAATCATCAGGCAGGCATA	PCR del gen de referencia ELF-1α	95ºC, 15 s; 60 ºC, 30 s.

Tabla 3. Primers y condiciones de PCR

#	Nombre	Secuencia	Aplicación	Programa PCR
	Identificad	or	1	
	FwBamHI- eiF5A	ATggatccTCATGTCTGACGACGAGC	1- 98 °C, 30 2- 5 ciclos: 98°C, 10 s; 48 °C s; 72 °C, 1 mir	
3	RvNotl- eiF5A:GFP	CGAGTgcggccgcTTGTTCCTGCCGCCGAT	de terminación	3- 30 ciclos: 98 ºC, 10 s; 58 ºC, 30 s; 72 ºC, 1 min. 4- 72 ºC, 4 min.
	FwBamHI- eiF5A	ATggatccTCATGTCTGACGACGAGC	Amplificación 1- 98 ºC, 3 Amplificación 2- 5 ciclo PpelF5A con 98ºC, 10 s; 48 codón de s; 72 ºC, 1 n	
	RvNotl- eiF5A	CGAGTgcggccgcTTCCCTCTCTACGCTGGA	terminación	3- 30 ciclos: 98 ºC, 10 s; 58 ºC, 30 s; 72 ºC, 1 min. 4- 72 ºC, 4 min.
5	FwBamHI- eiF5A	nHI- ATggatccTCATGTCTGACGACGAGC A. tumefaciens transformadas cou	Chequeo de células de E. coli y A. tumefaciens	1- 95 °C, 5 min 2- 5 ciclos: 95°C, 30 s; 48 °C, 30 s; 72 °C, 1 min.
	RvNotl- eiF5A	CGAGTgcggccgcTTCCCTCTCTACGCTGGA	las construcciones pK7FWGF2-eIF5A y pUBDEST-eIF5A	95 ºC, 30 s; 58 ºC, 30 s; 72 ºC, 1 min. 4- 72 ºC, 5 min.
6	F- Pp3c13_15 620	TGGGAAGAAGCTCGAGGATA	Chequeo de plantas de A. thaliana transformadas con	1- 95 ºC, 5 min 2- 30 ciclos:
	R- Pp3c13_15 620R	GCAGATCGTCTTTGGTGACA	las construcciones pK7FWGF2-eIF5A y pUBDEST-eIF5A	s; 72 ºC, 1 min. 3- 72 ºC, 5 min.

4.17 Análisis de los datos

4.17.1 Estudios in silico

Se seleccionaron 13 organismos para construir las hipótesis filogenéticas de las secuencias peptídicas de eIF5A, tomando representantes de diferentes grupos dentro del clado Viridiplantae, incluyendo especies de interés agronómico como organismos modelo (Tabla 4). Utilizando BLASTP de NCBI y BLASTP de la base de datos Phytozome (<u>http://phytozome.net</u>) se realizaron búsquedas en estos organismos de secuencias homólogas a la secuencia peptídica de PpeIF5A de *P. patens*. El programa MEGA versión 6.0 (Kumar *et al.*, 2001) fue utilizado para editar las secuencias y para hacer los análisis filogenéticos por el método *Neighbor-Joining* (NJ) (Saitou y Nei, 1987), usando la corrección de Poisson en el caso de las secuencias aminoacídicas. Los valores de Bootstrap se calcularon para 1000 réplicas. Para obtener un árbol filogenéticos más consistente y que presente raíz, se adicionó al análisis la secuencias peptídicas correspondiente al homólogo en *Mus musculus* (ratón).

Especie	Número de secuencias eIF5A	Grupo taxonómico superior	Abreviación
Chlamydomonas reinhardtii	1	Clorofitas	CrelF5A
Ostreococcus lucimarinus	1	Clorofitas	OleIF5A
Micromonas sp. RCC299	1	Clorofitas	Mspel5A
Volvox carteri	1	Clorofitas	VceIF5A
Physcomitrium patens	2	Briofitas	PpelF5A
Sphagnum fallax	4	Briofitas	SfeIF5A
Selaginella moellendorffii	1	Licopodiofitas	SmelF5A
Arabidopsis thaliana	3	Angiospermas	AtelF5A
Glycine max	10	Angiospermas	GmelF5A
Solanum lycopersicum	6	Angiospermas	SleIF5A
Rosa chinensis	2	Angiospermas	RcelF5A
Orysa sativa	2	Angiospermas	OselF5A
Eucalyptus grandis	4	Gimnospermas	EgelF5A

Tabla 4. Especies y número de secuencias utilizadas en el análisis filogenético de secuencias eIF5A

4.17.2 Análisis de secuencias nucleotídicas y aminoacídicas

La secuenciación de los distintos vectores generados fue realizada en el Servicio de secuenciación de la Unidad de Biología Molecular del Instituto Pasteur de Montevideo. Las secuencias obtenidas fueron comparadas con la base de datos Phytozome (<u>http://phytozome.net</u>) y con la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov</u>).

4.17.3 Análisis in silico de perfiles de expresión

El análisis del perfil de expresión del gen *PpeIF5A* de *P. Patens* durante el desarrollo se obtuvo a partir de experimentos de microarreglos depositados en la base de datos *P. patens* eFP la Universidad de Toronto (<u>bar.utoronto.ca/efp_physcomitrella/cgi-bin/efpWeb.cgi</u>, (Ortiz-Ramírez *et al.*, 2016).

5. Resultados y discusión

El gen *PpeIF5A* (Pp3c13_15620) fue identificado en nuestro laboratorio a través de un estudio transcriptómico realizado sobre plantas salvajes de *P. patens*. La expresión de PpeIF5A se induce en los tejidos de *P. patens* en respuesta al tratamiento con altas temperaturas

La secuencia aminoacídica deducida corresponde a una proteína de 17 KDa, identificada como un factor de iniciación de la traducción perteneciente a la familia de los 5A. El genoma de *P. patens* contiene el gen homólogo Pp3c12_3540 (PpeIF5A2) con 45,3% de similitud de secuencia a nivel de aminoácidos aunque sin expresión reportada. El ortólogo más cercano en *A. thaliana* es el gen *AteIF5A1* (AT1G69410), con el cual comparte 84% de identidad de secuencia. Asimismo, *A. thaliana* presenta dos genes parálogos, *AteIF5A2* (AT1G13950) y *AteIF5A3* (AT1G26630), con 82% y 80% de identidad de secuencia a nivel aminoacídico con la proteína codificada por el *PpeIF5A* respectivamente. Según el recurso *Conserved Domains* de NCBI toda la secuencia primaria de la proteína es reconocida como un único dominio de tipo eIFf5A.

5.1 Alineamiento de secuencias y análisis filogenético

Estudios previamente realizados destacan como elemento sumamente conservado en los eucariotas el sistema enzimático que permite la hipusinación del eIF5A, así como al propio factor de traducción (Park, 2006). Si bien existen gran cantidad de trabajos dedicados al estudio de esta proteína así como a la ruta de hipusinación y las enzimas que participan en la misma, la gran mayoría no se centran en organismos vegetales, y cuando lo hacen son dedicados a las plantas vasculares. Debido a esta situación no existe prácticamente información disponible sobre este gen en *P. patens*.

Con el objetivo de indagar en la filogenia del PpeIF5A, se construyó un árbol filogenético con las proteínas predichas para los genes ortólogos y sus respectivos homólogos al PpeIF5A en otras especies vegetales y no vegetales. El mismo fue realizado utilizando el software MEGA6 mediante el método de *neighbour joining*, usando el recurso Muscle para alinear las secuencias seleccionadas (Figura 7).

Al analizar la Figura 7 podemos observar que la proteína codificada por el *PpeIF5A* se encuentra agrupada junto con las correspondientes al eIF5A de *Sphagnum fallax* (*S. fallax*), y separada de aquellas provenientes de plantas vasculares (traqueofitas). Este resultado es esperable teniendo en cuenta el desarrollo evolutivo de los organismos vegetales y el hecho de que *S. fallax es* otra especie de briofita. Sin embargo y en contraste con *P. patens, fallax* tiene cuatro eIF5A y según los datos disponibles en Phytozome todos presentan expresión reportada y serían proteínas funcionales.



Figura 7. Árbol filogenético de los elF5A. Se muestran las relaciones filogenéticas entre las proteínas elF5A de las siguientes especies: *Physcomitrella patens* (Pp), *Sphagnum falax* (Sf), *Arabidopsis thaliana* (At), *Solanum lycoperscum* (SI), *Glycine max* (Gm), *Eucalictus grandis* (Eg), *Oryza sativa* (Os), *Rosa chinensis* (Rc), *Chlamydomonas reinhardtii* (Cr), *Ostreococcus lucimarinus* (OI), *Volvox carteri* (Vc), *Micromonas sp* (Msp) y *Mus musculus* (Mm). El árbol fue construido utilizando el software MEGA6 mediante el método de neighbour joining, usando el recurso Muscle para alinear las secuencias seleccionadas. Se utilizó el modelo poisson y un valor de boostrap de 1000. Los identificadores o números de acceso de Genebank de las proteínas utilizadas en la construcción del árbol pueden verse en la figura suplementaria 1.

Al analizar el grupo de algas (clorofitas), antecesores evolutivos de las briofitas, observamos que todas ellas poseen un único eIF5A. Lo mismo se observa para *Selaginella*, una de las primeras plantas vasculares en aparecer, y filogenéticamente ubicada entre las briofitas y las plantas vasculares más recientes en la escala evolutiva (Ferrari *et al.*, 2020). Esto nos indica que no todos los

organismos vegetales tienen más de una proteína del tipo eIF5A, y el caso de Physcomitrium no es tan particular si se tiene en cuenta el desarrollo evolutivo de las plantas en su conjunto. Por lo general las plantas vasculares presentan más de un eIF5A funcional, y esta observación concuerda con estudios previos donde se menciona que estos organismos han sufrido, duplicaciones completas de sus genomas y por tanto un aumento de la ploidía. Este aumento generó una gran cantidad de genes repetidos, que muchas veces debido a las presiones evolutivas se diferenciaron funcionalmente, otorgando a los organismos vegetales la capacidad de colonizar y adaptarse a diferentes ambientes (Hanson et al., 2001). Por otro lado, y alejado del reino vegetal, se encuentran el eIF5A proveniente de ratón, resultado también esperable teniendo en cuenta la relación evolutiva de dicho organismo con las plantas. Finalmente la proteína predicha para el Pp3c12 3540 se encuentra alejada de todos los organismos y agrupada con otra proveniente de Glycine max (soja). Si bien este resultado puede resultar llamativo, al indagar en estas dos secuencias notamos que ambas son muy cortas y no poseen todos los elementos conservados presentes en el resto de los eIF5A (Figura Suplementaria 1). Además, y acorde a los datos de Phytozome, ambas secuencias no presentan expresión reportada. Esto nos permite suponer que quizás nos encontremos frente a dos pseudogenes, aunque sería necesario realizar otros estudios para afirmar con mayor certeza esta suposición.

Por otro lado, y con el fin de analizar los elementos conservados que presentan las secuencias proteicas codificadas por genes eIF5A, se realizó un alineamiento de secuencias aminoacídicas de diferentes especies utilizando el recurso ClustalW. Complementariamente se realizó un logo de la estructura primaria de los eIF5A en diferentes especies utilizando el recurso weblogo (https://weblogo.berkeley.edu/) y el alineamiento entre las posiciones 30 y 130 (Figura 8).

Tal como se observa en la Figura 8, la conservación del factor de traducción eIF5A a lo largo de la evolución eucariota, es evidente. Especies sumamente distantes en términos evolutivos presentan un 100% de homología en la lisina blanco de hypusinación así como en su entorno y en gran parte de su secuencia. Esto queda en evidencia tanto en el alineamiento como en el logo, donde esta región se puede observar como un sector de las proteínas sumamente conservado. Además, estos resultados concuerdan con la premisa de estudios previos donde se destaca la hipusinación como una modificación esencial, o al menos de suma relevancia, para la maduración del factor eIF5A (Rossi *et al.,* 2014). A su vez, pone de manifiesto la importancia que la ruta de hipusinación tiene en la naturaleza y a lo largo de la evolución. Se ha observado además, que la hipusinacion de la lisina 54 en el eiF5A provoca una fuerte desacetilación de la lisina 51, la cual fue acetilada previamente. Una posible interacción entre ambas modificaciones postraduccionales podría determinar la localización subcelular de esta proteína (Ishfaq *et al.,* 2012). Si bien este último estudio fue realizado sobre células de mamíferos, al observar el alineamiento (Figura 8) vemos como

dicha lisina, al igual que la 54, se encuentra sumamente conservada en las diferentes especies vegetales. Esto nos permite especular que quizás esta modificación post traduccional también sea parte de la maduración del eIF5A en plantas y se trate de un nivel de regulación post traduccional que limita la disponibilidad de proteína activa dentro de los diferentes compartimientos celulares.



В

RKNGXJVIKGRPCKVVEVSTSKTCKHCHAKCHEVGIDIFTGKKLEDIVPSSHNCDVPHVGRJDVQLIDIGEDGEVSLLTENGGTKDDLBLPTOPILLGGIK

Figura 8. A) Alineamiento de secuencias aminoacídicas del eIF5A en diferentes especies. El alineamiento fue construido utilizando el recurso ClustalW. Se detalla el nombre de la especie, la abreviación utilizada en la figura y el número de accesión en Genebank. Para la especie *Sphagnum fallax* se detalla el número de identificación en Phytozome. *Physcomiltrella patens* (PpeIF5A, XP_024392872), *Sphagnum fallax* (SfeIF5A, Sphfalx0019s0024.1), *Rosa chinensis* (ABM53472), *Solanum Lycopersicum* (SIeIF5A, NP_001234715.1), *Oryza sativa* (OseIF5A, AF094773), *Glycine max* (GmeIF5A, NP_001235981.2), *Eucalyptus grandis* (EgeIF5A, XP_010037186.1), *Arabidopsis thaliana* (AteIF5A (AAD39281), *Caenorhabditis elegans* (CeeIF5A, P34563), *Mus musculus* (MmeIF5A-1, BC008093) y *Homo sapiens* (HseIF5A, AH0088). Se destaca en celeste la lisina blanco de la hipusinación y en naranja la lisina blanco de desacetilación. **B) Logo de la estructura primaria de los eIF5A en diferentes especies.** El logo fue construido utilizando el recurso weblogo (https://weblogo.berkeley.edu/) y el alineamiento entre las posiciones 30 y 130. Las lisinas blanco de hipusinación y de desacetilación se indican con asteriscos celeste y naranja, respectivamente.

5.2 La secuencia del gen PpeIF5A, su homólogo y su región promotora

Cuando analizamos la secuencia nucleotídica de *PpeIF5A* y su gen homólogo, observamos múltiples diferencias entre ambas secuencias (Figura 9). Para comenzar, y como fue mencionado anteriormente, Pp3c12_3540 no presenta expresión reportada mientras que Pp3c13_15620 sí. Por otro lado, al analizar la estructura de Pp3c12_3540 no se identifican regiones reguladoras UTR y tampoco la presencia de exones e intrones claramente identificados. Sin embargo, su secuencia proteica predicha se encuentra conformada por fragmentos correspondientes a la secuencia

codificante de Pp3c13_15620, lo cual es denominado por el Phytozome como un único exón (Figura 9, Figura Suplementaria 1).



Figura 9. Esquema de la organización de la secuencia genómica de los elF5A de *P. patens*. El gen Pp3c13_15620 presenta la estructura de intrones y exones señalada en la Tabla1 y presenta asimismo regiones 5' y 3' UTR, mostrado una estructura génica funcional. El gen Pp3c12_3540 solamente conserva homología con regiones exónicas dePp3c13_15620 y no presenta regiones 5' y 3' UTR.

Otra observación destacable, es que Pp3c12_3540 no presenta en la predicción de su secuencia proteica la lisina blanco de acetilación/desacetilación, y el entorno que rodea a la lisina blanco de hipusinación no se encuentra tan conservado como para los eIF5A analizados en el alienamiento (Figura 8, Figura Suplementaria 1). Si bien hasta el momento no se encuentran disponibles estudios en *P. patens* que nos permitan afirmar que no existe un mecanismo de compensación de este gen frente a la eliminación de Pp3c13_15620, es de esperar que esto no ocurra ya que Pp3c12_3540 carece de gran parte de los elementos conservados que hasta el momento se entienden como esenciales para la maduración de los eIF5A. Quizás el musgo pueda sobreponerse a la eliminación de Pp3c13_15620 pero a priori no esperamos que sea a través de una compensación por el aumento en la expresión de Pp3c12_3540.

Otra observación que condice con esta suposición surge al comparar las secuencias y estructuras de los genes Pp3c12_3540 y Pp3c13_15620 de *P. patens* con su homólogo y sus respectivos parálogos en *A. thaliana,* donde los tres genes identificados como perteneciente a la familia de los 5A son funcionales (Thompson *et al.,* 2004). La cantidad de intrones y exones así como el tamaño de la secuencia codificante son similares para el Pp3c13_15620 y los tres genes de *A. thaliana,* mientras que Pp3c12_3540 claramente se aleja de estos valores. Finalmente al contrastar el porcentaje de identidad de secuencia de los 5 genes, observamos la misma tendencia (Tabla 5). Este análisis nos permite especular que Pp3c12_3540 podría ser un pseudogen mientras que Pp3c13_15620 sería funcional.

Además, basados en la alta identidad de secuencia, podríamos extrapolar algunas de las funciones observadas en los genes de eiF5A de *A. thaliana* al *PpeIF5A* de *P. patens*. En *A. thaliana*, se ha observado que estos genes se encuentran vinculados a procesos de senescencia, muerte celular programada, crecimiento y a la respuesta frente a estrés abiótico (Hopkins et al., 2008; Feng et al., 2007; Thompson et al., 2004; Ma *et al.*, 2010), por lo cual estos procesos serían buen punto de partida para comenzar a profundizar en las funciones que cumple PpeIF5A dentro del musgo. De todas formas, es necesario tener en cuenta que nos referimos a plantas totalmente diferentes y que a pesar de la alta conservación de este factor, no necesariamente las funciones observadas en una planta se reproduzcan fielmente en la otra.

_		-				
Identificador Phytozome	Cromosoma	Número de intrones	Número de exones	Longitud de secuencia genómica (pb)	Longitud de secuencia codificante	Identidad de secuencia
Pp3c13_15620	13	3	4	2015	486	100%
Pp3c12_3540	12	0	1	315	315	45,3%
AT1G69410	1	3	4	1185	477	84%
AT1G13950	1	4	5	1292	477	82%
AT1G26630	1	4	5	1548	480	80%

Tabla 5. Organización de la secuencia genómica de elF5As de P. patens y A. thaliana

Diversos estudios afirman que el estrés provocado por altas temperaturas desencadena, entre otras respuestas moleculares, la modificación de la expresión génica. Estos cambios en la expresión de ciertos genes confieren a la planta la capacidad de responder apropiadamente al estrés, brindándole la posibilidad de sobrevivir en condiciones hostiles para su desarrollo (Priya *et al.*, 2019). Dado que se encuentra disponible un genoma de referencia de *P. patens*, es posible realizar estudios *in silico* de regiones potencialmente reguladoras en los genes de interés. Siguiendo esta línea, se llevó a cabo un análisis de la región de 1500 pb corriente arriba del codón de inicio de la traducción del gen *PpeIF5A*. Para ello se utilizó la base de datos PLACE y PlantPAN 3.0 donde se identificaron diversos elementos en cis que podrían encontrarse implicados en la regulación de la expresión génica. Entre las secuencias identificadas, se destacan los elementos MYB, bHLH, Dof, ABRE, TCA, NAC, WRKY y HSF (Figura 10).

Los dominios de unión al ADN bHLH (*basic helix–loop–helix*) se encuentran relacionados a factores de transcripción muchos de los cuales se encuentran vinculados con la respuesta a diferentes tipos de estrés abiótico, así como a eventos claves en el desarrollo y crecimiento de organismos vegetales (Carretero-Paulet *et al.,* 2010). Los elementos MYB son un subgrupo dentro de

los bHLH, y se destacan por interactuar con factores de transcripción participantes en las vías de activación dependientes de ABA. Además, estudios recientes en P. patens en que analizan la expresión diferencial de un subgrupo de factores de transcripción MYB en respuestas al estrés por calor, sugirien que los mismos podrían desempeñar un rol relevante en dicho proceso (Pu et al., 2020). Los elementos Dof se encuentran involucrados en diversos procesos fundamentales en plantas vasculares, incluidas las respuestas a luz y fitohormonas, así como en la maduración y germinación de las semillas. Estudios realizados sobre P. patens relacionan estos elementos al crecimiento de filamentos dependiente de nutrientes (Sugiyama et al., 2012) así como a la respuesta por estrés salino, que a su vez sería mediada por ABA (Richardt et al., 2009). En relación a los dominios de unión al ADN ABRE (ABA-responsive element), los mismos se destacan por verse involucrados directamente a factores de transcripción que participan en las vías de activación dependientes de ABA, donde no es requerida la síntesis de nuevas proteínas. En P. patens se ha visto que estas rutas se activan en el tejido vegetativo como mecanismo de sobrevivencia frente al estrés por déficit hídrico (Yotsui et al., 2013). Los TCA son elementos involucrados en la respuestas al SA (Hazra et al., 2019), el cual regula diversos procesos moleculares relacionados con la tolerancia a factores de estrés bióticos y abióticos, así como el desarrollo de los organismos vegetales. Por otro lado, los factores de transcripción con dominio de unión al ADN denominado NAC, también se encuentran involucrados en la regulación del desarrollo y crecimiento de plantas. Si bien nos referimos a una de las familias más grande de factores de transcripción en organismos vegetales, donde los miembros son tanto estructural como funcionalmente diversos, muchos de estos se han relacionado a funciones reguladoras dentro de las respuestas a estrés biótico y abiótico (Chakraborty et al., 2019). La familia de factores de transcripción WRKY conforma un grupo de proteínas de unión al ADN principalmente específicas de plantas y algas. Diversos estudios afirman que estos factores de transcripción cumplirían un rol fundamental en la defensa frente al estrés biótico y abiótico, así como también en el desarrollo y metabolismo secundario de organismos vegetales. Un estudio realizado sobre el promotor de eIF5A de Tamarix androssowii (una especie de arbusto) demuestra que este gen se encuentra involucrado en la tolerancia al estrés abiótico y su expresión sería regulada por un factor de transcripción de tipo WRKY (Wang et al., 2012). Finalmente, los HSF o HSE son dominios de unión al ADN que interactúan con los factores de transcripción de choque térmico (HSF, heat shock factors). Estos factores regulan la expresión de aquellos genes que codifican para proteínas de choque térmico, las cuales son sintetizadas frente a condiciones extremas de temperatura como mecanismo de supervivencia celular. Los HSF son el principal mecanismo de regulación eucariota para este tipo de proteínas sumamente conservadas a lo largo de la evolución (Wang et al., 2009).

Este análisis nos permite afirmar no solo que la región promotora de *PpeIF5A* posee dominios de unión al ADN que podrían verse involucrados en la regulación de la expresión génica, sino que los mismos se correlacionan con la evidencia experimental de nuestro laboratorio; la cual constató un perfil de inducción frente a condiciones de estrés térmico por altas temperaturas. Asimismo, muchos de los elementos encontrados se vinculan con la expresión de genes relacionados con la tolerancia a diversos tipos de estrés abiótico así como al desarrollo y crecimiento de organismos vegetales. Además y continuando con el hecho de que este gen se encuentra fuertemente conservado a lo largo de la evolución, es de destacar que los elementos en cis observados en la región promotora de *PpeIF5A* se encuentran presentes en los promotores de genes elFs de arroz (*O. sativa*) (Saidi y Hajibarat, 2020) y quizás en los de muchas otras especies vegetales.



Figura 10. Análisis *in silico* **de elementos de la región promotora del gen Pp3c13_15620.** Se analizó una región de 1500 pb hacia el 5' del codón de inicio del gen Pp3c13_15620 utilizando el recurso web PlantPAN 3.0 (<u>http://plantpan.itps.ncku.edu.tw/</u>).

Si bien el estudio *in silico* de la región promotora del gen *PpeIF5A* nos muestra diversos dominios de unión al ADN que podrían verse involucrados en la regulación de la expresión génica, otro posible mecanismo de control surge a la hora de analizar la presencia y ubicación de las islas CpG dentro de la región promotora. Estas regiones se caracterizan por ser ricas en los nucleótidos citosina y guanina (>60% de GC) y se encuentran presentes en un (50-70%) de los promotores de genes eucariotas. Si bien existen otras regiones del genoma con alto contenido de G+C, estas islas tienen la peculiaridad de encontrarse en su gran mayoría no metiladas y por ende asociarse a una cromatina transcripcionalmente activa. Estudios realizados sobre promotores de mamíferos asociados a islas CpG sugieren que estos genes presentan múltiples sitios para el inicio de la transcripción dispersos a lo largo de la isla, lo cual contrasta con aquellos genes carentes de este elemento, donde el sitio de inicio de la transcripción suele ser único y asociado a cajas TATA. Este tipo de promotores, que poseen mayor cantidad de sitios de inicio de la transcripción, se asocian a la expresión de genes no tejido específicos y a otro nivel de regulación según el transcripto formado (Carninci *et al.*, 2006). Estudios en plantas de arroz sugieren que existe una correlación directa entre

genes que no se expresan en un tejido específico y promotores asociados a islas CpG, lo cual concuerda con lo constatado en mamíferos y lo observado para el *PpeIF5A* (Ashikawa, 2002). También se menciona que los promotores asociados a islas CpG frecuentemente poseen un carácter bidireccional (Trinklein *et al.*, 2004), produciendo una transcripción divergente constante, que bajo la ausencia de señales precisas que permitan la elongación, da lugar a transcritos de pequeño tamaño. Estos muchas veces hibridan en la región solapante abriendo una puerta a otro posible nivel de regulación de la expresión génica del *PpeIF5A* (Core *et al.*, 2008).

Comprendiendo que la proteína producida por *PpeIF5A* puede verse involucrada en diversos procesos celulares, diferentes tejidos y bajo diferentes condiciones, es de esperar que la regulación de su expresión génica sea plástica y que variados mecanismos de regulación interactúen entre sí para controlar cuándo y en qué nivel se encuentra disponible la proteína.

5.3 Análisis del perfil de expresión de PpeIF5A durante el desarrollo y en condiciones de estrés

Utilizando la herramienta informática eFP Browser (http://bar.utoronto.ca/efp_ physcomitrella/cgi-bin/efpWeb.cgi) se extrajo información sobre el perfil de expresión del PpeIF5A así como de su gen homólogo en los diferentes tejidos de *P. Patens* durante el desarrollo (Figura 11).

Al observar la Figura 11 podemos constatar que el *PpeIF5A* presenta expresión reportada en los diferentes tejidos del musgo durante el desarrollo. Esto concuerda con lo reportado tanto para mamíferos como para plantas vasculares, donde se destaca al eIF5A como un factor íntimamente involucrado en procesos de proliferación y diferenciación celular en etapas tempranas del desarrollo (Thompson *et al.*, 2004). También aquí queda en evidencia que bajo condiciones controladas de crecimiento (25 °C, 16 horas de luz y 50% de humedad) no existe expresión reportada para el gen parálogo al *PpeIF5A* (Pp3c12_3540). Esta última observación reafirma y concuerda la teoría de que podríamos encontrarnos frente a pseudogen en el caso del Pp3c12_3540.



Figura 11. Valores de expresión para los genes elF5A de P. patens en diferentes tejidos y etapas del desarrollo. Los valores fueron obtenidos a partir de datos de microarreglos en la base de datos eFP Browser (http://bar.utoronto.ca/efp_physcomitrella/cgi-bin/efpWeb.cgi). A) Datos para el gen Pp3c13_15620 (PpeIF5A). B) Datos para el gen Pp3c12_3540. A la izquierda se observa una escala a color de valores relativos de expresión. Se observa que el gen Pp3c13_15620 muestra niveles de expresión elevados en diferentes tejidos y etapas del desarrollo, mientras que el gen Pp3c12_3540 no se expresa en las condiciones analizadas

Para caracterizar funcionalmente el rol de *PpeiF5A* se analizó el patrón de expresión de este gen mediante PCR en tiempo real (qPCR). Como se observa en la Según los resultados obtenidos (Figura 12), el gen *PpeIF5A* presenta un perfil de inducción a las 4 horas de exposición del musgo a

un estrés térmico de 37 ºC. Luego de transcurridas 24 horas, estos niveles de expresión descienden, pero aun así siguen siendo elevados en relación a la muestra control. Esto condice con lo observado al analizar los datos transcriptómicos obtenidos en nuestro laboratorio y los elementos en cis encontrados en la región promotora. Un estudio realizado en el 2011 muestra que plantas de A. thaliana transgénicas, transformadas de tal forma que sobreexpresan el eIF5A de Rosa chinensis, presentan fenotipos con mayor resistencia a calor que aquellas plantas no transgénicas (Xu et al., 2011). Los resultados de este estudio refuerzan la idea de que *eIF5A* se encuentra involucrado en la respuesta al estrés por altas temperaturas en plantas. Por otro lado, en nuestro estudio el estrés osmótico ocasionado por el manitol no parece generar cambios relevantes en los niveles de expresión del PpeIF5A. Sin embargo, sería interesante producir este tipo de estrés a través de otros compuestos (como pueden serlo el PEG) y/o en otras condiciones, ya que trabajos anteriores han reportado que eIF5A se encuentra involucrado en las respuestas desencadenadas por el estrés osmótico en plantas (Xu et al., 2011). En el caso de los tratamientos con SA, ABA, NaCl y deshidratación, se observa que a las 4 horas la expresión del *PpeIF5A* se reprime, para luego a las 24 horas inducirse, excepto para el tratamiento con NaCl donde retorna al mismo nivel. Esto también coincide con los dominios de unión al ADN encontrados en la región promotora del PpeIF5A, donde elementos vinculados a las rutas metabólicas del ABA, SA y a la respuesta a deshidratación y estrés salino se hacen presentes. Podríamos además suponer, que estos tratamientos generan respuestas más progresivas que el calor, y a las 4 horas de establecidos los mismo las células aún se encuentran realizando una re programación de su expresión génica, mientras que a la 24 horas la respuesta se encuentra completamente montada. Esto podría explicar la tendencia observada en la expresión de PpeIF5A frente a estos tratamientos. También se ha visto que plantas de P. patens son capaces de tolerar una desecación completa si son previamente tratadas con ABA (Oldenhof et al., 2006). Esta tolerancia inducida por la hormona se ve altamente vinculada a la expresión de genes relacionados al estrés (Li et al., 2006), como podría serlo PpeIF5A y donde sería coherente observar la misma tendencia en su expresión, bajo tratamientos de deshidratación o con ABA. En relación al estrés salino, sería conveniente seguir profundizando y al igual que para el Manitol, cambiar condiciones del tratamiento. Existen estudios en plantas vasculares que reportan una inducción de genes eIF5A durante estrés salino (Chou et al., 2004) y sería pertinente evaluar con mayor profundidad qué ocurre en el musgo.

En relación al tratamiento con DTT, un agente reductor por excelencia que ataca los puentes di sulfuros de las proteínas y provoca que las mismas se plieguen incorrectamente, se observa que la expresión relativa del *PpeIF5A* disminuye tanto a las 4 como a las 24 horas. Esto podría indicarnos que este gen no se encuentra directamente involucrado en la respuesta al estrés generado por este agente y que la célula prioriza la síntesis de otros elementos. De todas formas, sería necesario

36

profundizar en este mecanismo para poder afirmar con mayor certeza esta teoría, sobre todo al observar el marcado perfil de represión de la expresión génica. En SL también se observa una marcada disminución de la expresión del *PpeIF5A* pero luego de las 24 horas. En principio, podríamos suponer algo similar a lo expuesto para DTT en cuanto a lo que la célula prioriza, pero al igual que en ese caso es necesario profundizar los estudios y comprender mejor las respuesta del musgo frente a este tipo de estrés.

Finalmente, los mecanismos de recuperación frente a condiciones de estrés son particularmente relevantes en *P. patens* al igual que en otros musgos, a tal punto que muchas veces son denominamos plantas de resurrección (Ruibal *et al.*, 2013). Esto nos permite considerar que la idea de evaluar niveles de expresión de este gen en el proceso de recuperación (2 a 17 días después, dependiendo el tratamiento) sería pertinente e interesante, dado que nos referimos a una proteína íntimamente vinculada al proceso de traducción dentro de la célula.



Figura 12. Expresión del gen Pp3c13_15620 en respuesta a estímulos. Plantas de P. patens WT de 20 días fueron tratadas con ditiotritol (DTT, estrés reductivo), ácido abscísico (ABA) 50 μ M, ácido salicílico (SA) 0.5 mM, luz fuerte (SL, strong light; 200 μ mol m-2 s-1), manitol (Mntl) 500 mM (estrés osmótico), NaCl 300 mM (estrés salino), deshidratación y heat shock (37 °C). Se tomaron muestras a las 4 y las 24 horas de comenzado el tratamiento. Se representan valores de expresión relativa de las plantas tratadas vs. plantas sin tratar. Se expresan valores promedio \pm desvío estándar de tres réplicas biológicas. El factor de elongación 1 α (Pp3c2_6770) fue utilizado como control interno.

5.4 Generación de construcciones génicas para la caracterización funcional del PpeIF5A

Con el fin de determinar la localización subcelular de la proteína codificada por el gen *PpeIF5A* así como para evaluar el efecto de su expresión heteróloga en *A. thaliana*, se procedió a la generación de una construcción que permitiera expresar una proteína de fusión PpeIF5A:GFP (pK7-eiF5A:GFP) y otra construcción para la expresión constitutiva del gen (pUB-DEST-eiF5A). Para ello, la estrategia seguida fue extraer ARN a partir de tejidos de *P. patens* sometidos a estrés térmico, amplificar la región codificante del *PpeIF5A*, clonar dicha secuencia en un vector de entrada compatible con el sistema Gateway (pENTR2B) y transferir a dos vectores binarios, pK7FWG2 y pUB-DEST (Figura 13).



Figura 13. Esquema del vector de entrada y de las construcciones finales. A. La secuencia codificante (CDS) para el gen Pp3c13 15620 con y sin su codón de terminación fue clonada en el vector pENTR2B entre los sitios de restricción BamHI y Notl. En este vector, la CDS queda flanqueada por los sitios attL1 y attL2, lo que permite el subclonado en vectores para la expresión vegetal mediante tecnología Gateway. B. La CDS conteniendo el codón de terminación, fue recombinada utilizando la clonasa LR en el vector pUB-DEST. En este vector, la CDS queda bajo el control de un promotor de ubiquitina 10 de A. thaliana (PUB10), lo que determina su expresión constitutiva en planta. Este vector contiene asimismo un cassette de resistencia a glufosinato de amono (BAR) para la selección de las plantas transgénicas. El gen de interés y el gen de resistencia a herbicida están flanqueados por los bordes derecho e izquierdo, lo que permite la transformación mediada por A. tumefaciens. La construcción contiene un gen de resistencia a espectinomicina para la selección en bacteria. C. La CDS careciendo el codón de terminación, fue recombinada en el vector pK7FWGF2. En este vector, la CDS queda en marco con la secuencia de la proteína fluorescente verde (GFP) lo que permite realizar estudios de localización subcelular de la proteína. La proteína de fusión eIF5A-GFP queda bajo el control de un promotor constitutivo CaMV35. Este vector contiene asimismo un cassette de resistencia a kanamicina (KanR) para la selección de las plantas transgénicas. La construcción contiene un gen de resistencia a espectinomicina para la selección en bacteria.

5.4.1 Clonado de la secuencia codificante en el vector de entrada pENTR2B

Clonado de la secuencia codificante en el vector de entrada pENTR2BA partir de los datos de secuencia del gen, se diseñaron *primers* específicos que flanquean la región codificante de la secuencia de ARNm del gen *PpeIF5A* de manera tal de no incluir el codón de terminación y conservar el marco de lectura con la proteína GFP. A estos *primers* se les añadieron sitios de reconocimiento para las enzimas de restricción *Bam*HI, en el caso del primer directo, y *Not*I, en el caso del reverso

Figura Suplementaria 2. La selección de dichas enzimas fue realizada teniendo en cuenta los sitios de restricción de los plásmidos a utilizar, y considerando que estos sitios no se encontraran presentes en la secuencia codificante del *PpeIF5A*.

Una vez obtenido el producto de PCR, se procedió a digerir el mismo así como al vector de entrada pENTR2B con las enzimas de restricción seleccionadas. Esto permitió linealizar el vector, liberar el gen letal, y crear los *overhangs* necesarios para que la ligación de la secuencia codificante dentro del vector tuviera la orientación adecuada. Posteriormente, y con el objetivo de cuantificar la cantidad de vector y de inserto digerido, se corrió ambos fragmentos en un gel de agarosa 1% (Figura 14).



Figura 14. Cuantificación del vector de entrada (pENTR-2B) y del producto de PCR de *PpeiF5A* digeridos. Tanto el vector pENTR2B como el producto de PCR del PpeIF5A fueron digeridos con las enzimas *Bam*HI y *Not*I. Luego de la purificación del vector carente del gen letal ccdB, ambos productos fueron corridos en un gel de agarosa 1% para su cuantificación. Se indica el marcador de peso molecular (ADN del fago lambda digerido con la enzima *Pst*I, λpstI).

El producto de PCR se ligó en el vector de entrada pENTR-2B y la mezcla de ligación fue utilizada para transformar células quimiocompetentes de *E. coli*. A partir de las colonias obtenidas, se seleccionaron 8 de los clones resistentes a kanamicina y se realizó PCR de colonia con el fin de verificar la presencia del inserto. Los productos obtenidos fueron corridos en un gel de agarosa 1%.

Además se confirmó la presencia del inserto y que se encontrara en fase con la secuencia de la proteína GFP mediante la secuenciación automática del ADN plasmídico, utilizando el servicio de secuenciación del IP de Montevideo (como se describe en la sección 4.9 de materiales y métodos). Para ello se utilizó un *primer* específico que se une a la secuencia de GFP en el vector pK7FWG2. (Figura Suplementaria 2).

De todos los clones positivos, se eligió uno y se le realizó una minipreparación de ADN plasmídico, obteniéndose la construcción pENTR-eiF5A:GFP. Posteriormente se guardó un stock de

las bacterias recombinantes en glicerol 40% a -80°C para ser utilizado en los ensayos posteriores. Cabe destacar que todo el procedimiento antes mencionado fue realizado de igual manera para la secuencia codificante del *PpeIF5A* con codón stop. La diferencia en ese proceso radica en el diseño del primer reverso en la PCR inicial, que en ese caso si incluye en codón stop (Figura Suplementaria 2). El producto de la ligación del vector con la secuencia codificante que contiene el codón stop fue la construcción pENTR-eiF5A.

5.4.2 Generación de una construcción para la expresión de el gen *PpelF5A* fusionado a GFP (pK7eiF5A:GFP)

Luego de confirmar la presencia del inserto en el vector de entrada pENTR2B se realizó la recombinación del mismo con el vector de destino pK7FWG2 mediante la tecnología Gateway (tal como se describe en la sección 4.5.2 de materiales y métodos). Este vector nos permite fusionar la proteína GFP a nuestra proteína de interés y visualizar su localización dentro de la célula. La GFP (*Green Fluorescent Protein*) es una proteína reportera que permite su fácil detección gracias a su capacidad de emitir fluorescencia en la zona del espectro visible.

La mezcla de recombinación fue utilizada para transformar células quimiocompetentes de *E.coli*. A partir de las colonias obtenidas, se seleccionaron 4 clones resistentes a espectinomicina y se realizó PCR de colonia, con el fin de verificar la presencia del inserto. Los productos obtenidos fueron visualizados en gel de agarosa 1%. En las 4 colonias analizadas se logró identificar la presencia del inserto en el vector pK7FWG2 (Figura 15A), ya que se observa una única banda del tamaño esperado, aproximadamente 480 pb.

Se eligió uno y se le realizó una minipreparación de ADN plasmídico, obteniéndose la construcción pK7eiF5A:GFP. Esta construcción fue utilizada para transformar células de *A. tumefaciens* electrocompetentes según lo descrito en la sección 4.7 de materiales y métodos. Para confirmar la presencia del vector binario dentro de las células, se realizó PCR de colonia de 6 clones de igual manera a lo descripto para *E. coli.* Todos los clones resultaron positivos (Figura 15B), por lo cual se seleccionó uno de ellos y se almacenó en glicerol a -80 °C para ser utilizado en ensayos posteriores.



Figura 15. Pasos de clonado en el vector pK7FWGF2. A. Tras la recombinación LR en el vector de destino pK7FWGF2 y la transformación de células competentes, las colonias obtenidas fueron chequeadas por PCR en las condiciones indicadas en la Tabla 1. Se muestran los productos de amplificación para cuatro clones (1-4) con los respectivos controles negativo (-) y positivo (+). **B.** La construcción pK7FWGF2-PpeIF5A fue utilizada para transformar células de *A. tumefaciens* electrocompetentes. Las colonias obtenidas fueron chequeadas por PCR para confirmar la presencia del *PpeIF5A*. Se muestran los productos de amplificación para cuatro colonias (1-6) con los respectivos controles negativo (-) y positivo (+). Se indica el marcador de peso molecular (λpst).

5.5 Localización subcelular de la proteína codificada por el gen PpelF5A

Para analizar la localización subcelular de la proteína codificada por el *PpeIF5A*, se realizaron ensayos de expresión transitoria por agroinfiltración en hojas de *N. benthamiana*. Las mismas fueron infiltradas con la cepas de *A. tumefaciens* transformadas con la construcción pK7eiF5A:GFP según el procedimiento descrito en la sección 4.7 (materiales y métodos). Para la observación de la fluorescencia en las regiones agroinfiltradas se utilizó el servicio del microscopía confocal de la Unidad de Biología Celular del Instituto Pasteur de Montevideo (Figura 16).



Figura 16. Localización subcelular de *PpeIF5A.* Expresión transitoria por agroinfiltración de hojas de *N. benthamiana* para determinar la localización subcelular de la proteína PpeIF5A fusionada con GFPLa señal de fluorescencia fue observada mediante microscopía confocal 48 h luego de la infiltración. **A.** Señal de la GFP. **B.** Campo claro. **C.** A y B solapadas.

Según nuestro ensayo de expresión transitoria (Figura 16), la localización de esta proteína es tanto nuclear como citoplasmática. Esto se corresponde con estudios previos, donde se destaca que la localización de este factor varía entre estos dos compartimientos, y que la diferencia en su distribución se puede distinguir una vez que se analizan las diferentes isoformas. Se ha observado que la proteína hipusinada tiene una localización primordialmente citoplasmática, mientras que la no hipusinada se localiza fundamentalmente en el núcleo. Además, los precursores no hipusinados son rápidamente acetilados en la lisina 47 (Lee *et al.*, 2009). Posteriormente, se constató además que la hipusinación provoca una fuerte desacelitalción en la lisina K47, lo cual pone de manifiesto la posible interacción entre estas dos modificaciones postraduccionales como determinantes de la localización subcelular del factor eIF5A (Ishfaq, 2012).

A través del recurso web NLS mapper (<u>http://nls-mapper.iab.keio.ac.jp/cgi-bin/NLS Mapper y.cgi</u>) se buscaron señales de localización nuclear en la secuencia de la proteína codificada por el *PpelF5A*, y no se encontró ninguna bien definida. Esto concuerda con lo reportado para mamíferos, donde se observó que elF5A carece de una señal de importación nuclear convencional, pero experimentos realizados sobre el elF5A truncado y etiquetado con GFP, sugieren que los 19 residuos N-terminales son los responsables de la localización nuclear de elF5A (Parreiras-E-Silva *et al.*, 2007).

Con el fin de profundizar en los estudios de localización subcelular de esta proteína, se realizó una transformación estable en plantas de *A. thaliana* con la construcción pK7eiF5A:GFP. Dicho procedimiento se describe en la sección 4.10 de materiales y métodos. Las semillas obtenidas en la primera generación fueron germinadas en medio en MS con agregado de kanamicina, y aquellas plantas que germinaron en estas condiciones fueron observadas en un estereoscopio de fluorescencia con el fin de confirmar que efectivamente expresaran GFP (Figura 17).



Figura 17. *A. thaliana* **establemente transformada con pK7eiF5A:GFP.** Expresión estable de la proteína eIF5A1 fusionada a GFP en plantas de *A. thaliana* transformadas mediante *floral dip*. Las plantas de la generación TO fueron germinadas en medio MS con agregado de kanamicina. La señal de fluorescencia fue observada mediante microscopía de fluorescencia. Las plantas en las que se observó señal fluorescente, fueron transferidas a macetas con turba para generar la siguiente generación.

Se seleccionaron 10 plantas que expresan GFP, y se planea a futuro realizar ensayos de localización subcelular bajo condiciones de estrés térmico.

Sería pertinente diseñar experimentos que nos permitan determinar la distribución de las isoformas de este factor, y observar si su ubicación se modifica bajo condiciones de estrés térmico en P. patens. Estudios sobre A. thaliana han demostrado que las plantas tratadas durante tres horas con ABA, presentan una mayor proporción de proteína no hipusinada que aquellas no tratadas (Belda-Palazón et al., 2016). Por otro lado, en mamíferos se ha visto que la proteína exógena de eIF5A fusiona a GFP o marcada con FLAG tenía una acumulación mayor en núcleo, y en su gran mayoría no se encontraba hipusinada. Esto se modificaba al introducir el sistema de hipusinación junto con la proteína, donde se veía una mayor cantidad del factor hipusinado. Para explicar estos resultados, los autores proponen que el sistema de hipusinación endógeno, no es capaz de hipusinar el exceso de proteína sintetizado al introducir un eIF5A exógeno y por lo mismo la mayor parte de la proteína se encontraba no hipusinada y en el núcleo (Lee et al., 2009). Además, se ha observado que muchas veces las proteínas de fusión a GFP, se separan y la GFP migra hacia núcleo, por lo cual sería necesario realizar un ensayo que nos permita diferenciar cuánto de lo observado en dicho compartimiento celular es nuestra proteína fusionada a GFP. Todos estos aspectos deben ser tenidos en cuenta a la hora de analizar los resultados obtenidos en esta técnica, y teorizar sobre la localización subcelular de esta proteína.

5.6 Expresión heteróloga del gen PpeIF5A en Arabidopsis thaliana

Con el objetivo de estudiar el efecto de la expresión heteróloga del gen *PpeIF5A* en *A*. *thaliana,* se transformaron plantas de manera estable con la construcción pUB-DEST-eiF5A. El procedimiento se detalla en la sección 4.10 de materiales y métodos. Las semillas obtenidas en la primera generación fueron germinadas en medio en MS suplementado con BASTA (glufosinato de amonio) y posteriormente transferidas a turba, según se describe en la sección 4.1 de materiales y métodos. Aquellas plantas que germinaron en estas condiciones se les realizaron extracciones de ADN y fueron analizadas con el fin de comprobar que efectivamente incorporaron la construcción. La presencia de la construcción en las plantas transformadas fue chequeada por PCR, y el fragmento amplificado fue la secuencia codificante del gen *PpeIF5A* (Figura 18).

Tal como se observa en la Figura 18, se identificaron 5 plantas (2a, 3, 4a, 5 y 8b) que muestran haber incorporado la construcción pUB-DEST-eiF5A. Las semillas obtenidas a partir de estas plantas fueron almacenadas y serán utilizadas para ensayos posteriores. Las plantas que incorporaron la construcción no mostraron ningún fenotipo particular y los niveles expresión del *PpeIF5A* no fue evaluado en dichas plantas.



Figura 18. Chequeo de las líneas T1 de *A. thaliana* transformadas con la construcción pUB-DEST-eiF5A. Se realizaron extracciones de ADN genómico de las plantas resistentes a glufosinato de amonio y se realizaron PCRs para confirmar la presencia del PpeIF5A como se describe en la Tabla 1. Las plantas 2a, 3, 4a, 5, 6, 7, 8b, 8c, 9a, 9b y 10 produjeron los amplicones esperados. Se muestran los respectivos controles negativo (-) y positivo (+). Se indica el marcador de peso molecular (λPst I).

5.7 Posibles moléculas dianas o blancos traduccionales del PpeIF5A

Tal como fue mencionado anteriormente, se ha constatado que el eIF5A de mamíferos se encuentra involucrado en la síntesis de proteínas con prolinas consecutivas. De hecho, se ha visto que es necesario para la traducción de estas proteínas, ya que ante la presencia de al menos 3 prolinas consecutivas en la secuencia primaria, el ribosoma se estanca (Gutierrez *et al.*, 2013). Con el objetivo de analizar posibles moléculas de diana que podrían encontrarse interactuando con el eIF5A *de P. patens,* se analizaron los datos transcriptómicos obtenidos nuestro laboratorio. Se filtraron los genes que presentan un perfil de inducción frente estrés por altas temperaturas, al igual que el *PpeIF5A*, y dentro de ellos se separaron aquellos que codifican para proteínas con al menos 3 prolinas consecutivas. Dentro de este grupo, se subdividieron según la cantidad de prolinas que presentaba el motivo presente en la proteína y se analizaron los genes correspondientes. En la siguiente Tabla 5 se exponen los genes seleccionados durante este trabajo que se inducen frente al estrés por altas temperaturas y presentan al menos 4 prolinas consecutivas. Si se incluyen los genes que codifican para proteínas con al menos tres prolinas consecutivas se obtienen 429 genes.

Al observar la Tabla 5 podemos constatar que los genes con mayor *fold change* son de función desconocida. Como ya hemos mencionado, al menos el 13% de las secuencias correspondientes con genes en el musgo, son denominados genes huérfanos y hasta el momento su

función permanece desconocida (Zimmer et al., 2013). Podríamos especular que quizás algunos de estos genes que se inducen fuertemente en el musgo frente a estrés por altas temperaturas, poseen al menos cuatro prolinas consecutivas y son de función desconocida, dependen del PpeIF5A para su traducción y sería interesante profundizar en la función que cumplen dentro del musgo. Por otro lado, otra proteína que podemos encontrar en la Tabla 5 es una perteneciente a la familia de las HSP 70, típicas proteínas de la respuesta al estrés térmico. Sería interesante evaluar si efectivamente el PpeIF5A influye en su traducción y en ese caso cuál sería el mecanismo por lo cual lo logra. También se observan algunas proteínas del tipo forminas. Esta familia presente en eucariotas se encuentra íntimamente vinculadas a la nucleación de los filamentos de actina del citoesqueleto (Chesarone et al., 2009). Podríamos pensar que el elF5A de *P. patens* al expresarse fuertemente en condiciones de desarrollo, como ya se observó previamente en este trabajo, puede encontrarse modulando la traducción de estas proteínas sumamente importantes para el establecimiento del citoesqueleto celular, y por ende para la proliferación y diferenciación de las células. Se ha demostrado tanto en Drosophila, como en levaduras y en mamíferos, que el eIF5A se encuentra íntimamente involucrado en regulación de la traducción de proteínas con prolinas consecutivas requeridas para la nucleación de los filamentos de actina, regulando de esta manera los procesos del citoesqueleto (Muñoz-Soriano *et al.*, 2017).

Además de las antes mencionadas, en la Tabla 6 podemos encontrar una gran variedad de proteínas que se inducen frente al estrés por altas temperaturas y que poseen al menos 4 prolinas consecutivas, y serían aún más si consideráramos las que tienen 3 prolinas consecutivas. Esto pone de manifiesto la necesidad de realizar ensayos que nos permitieran evaluar con mayor profundidad la función celular del *PpeIF5A* y sus posibles moléculas dianas o blancos de su acción dentro de la célula.

Tabla 6. Posibles moléculas dianas de PpeF5A obtenidas a partir de datos transcriptómicos con al menos 4 prolinas consecutivas

ID Phytozome	Prolinas	Fold change	Función reportada
Pp3c4_17990V3.3	9	5.1	51 kDa subunit of complex I
Pp3c22_3520V3.6	8	2.2	RING/U-box superfamily protein
Pp3c21_3570V3.1	6	18.0	Función desconocida
Pp3c21_3610V3.1	6	15.6	Función desconocida
Pp3c21_3531V3.1	6	13.4	Función desconocida
Pp3c17_19320V3.1	6	9.3	Rhodanese/Cell cycle control phosphatase superfamily protein
Pp3c14_20840V3.6	6	8.6	Cox19-like CHCH family protein
Pp3c25_11150V3.2	6	3.1	Heavy metal transport/detoxification superfamily protein
Pp3c5_22590V3.11	6	3.1	Función desconocida
Pp3c27_5800V3.3	6	2.9	translocase of outer membrane 20 kDa subunit 3
Pp3c22_5270V3.2	6	2.1	Función desconocida
Pp3c26_11270V3.1	5	4.2	FRIGIDA-like protein
Pp3c14_17980V3.1	5	3.5	tryptophan synthase beta type 2
Pp3c14_1820V3.1	5	3.4	
Pp3c8_4500V3.2	5	3.3	AT-hook motif nuclear-localized protein 1
Pp3c1_600V3.1	5	2.8	SCAR homolog 2
Pp3c13_1340V3.4	5	2.4	Función desconocida
Pp3c8_4500V3.4	5	2.2	AT-hook motif nuclear-localized protein 1
Pp3c5_9110V3.1	4	7.9	Función desconocida
Pp3c23_15670V3.5	4	5.8	formin homolog 6
Pp3c21_20770V3.1	4	4.6	NAD(P)-linked oxidoreductase superfamily protein
Pp3c2_27810V3.1	4	3.8	cytochrome P450, family 710, subfamily A, polypeptide 1
Pp3c15_8210V3.2	4	3.7	3\'-5\' exonuclease domain-containing protein / K homology domain-containing protein / KH domain-containing protein
Pp3c17_1620V3.1	4	3.2	TBP-associated factor 15B
Pp3c4_16470V3.1	4	3.2	Función desconocida
Pp3c3_12270V3.2	4	3.1	Función desconocida
Pp3c12_4420V3.1	4	3.1	Formin Homology 14
Pp3c23_15670V3.3	4	3.1	formin homology 1

Pp3c25_9610V3.2	4	3.0	Función desconocida
Pp3c1_7800V3.1	4	3.0	ethylene responsive element binding factor 1
Pp3c2_27810V3.2	4	2.9	cytochrome P450, family 710, subfamily A, polypeptide 1
Pp3c3_19905V3.1	4	2.9	Función desconocida
Pp3c7_26460V3.4	4	2.7	Heat shock protein 70 (Hsp 70) family protein
Pp3c24_5800V3.22	4	2.7	homolog of yeast autophagy 18 (ATG18) H
Pp3c19_21450V3.3	4	2.7	Función desconocida
Pp3c5_8240V3.3	4	2.6	STRUBBELIG-receptor family 8
Pp3c19_19350V3.1	4	2.6	Core-2/I-branching beta-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase family protein
Pp3c11_7230V3.1	4	2.6	alfin-like 3
Pp3c11_7600V3.1	4	2.4	Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin superfamily protein
Pp3c8_21390V3.4	4	2.4	U2 small nuclear ribonucleoprotein A
Pp3c12_3430V3.1	4	2.4	TBP-associated factor 15B
Pp3c18_1260V3.5	4	2.	Rubisco methyltransferase family protein
Pp3c22_1760V3.1	4	2.3	GC-rich sequence DNA-binding factor-like protein with Tuftelin interacting domain
Pp3c25_2770V3.1	4	2.2	Función desconocida
Pp3c8_14980V3.4	4	2.2	Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily protein
Pp3c13_5410V3.9	4	2.2	Función desconocida
Pp3c1_2400V3.1	4	2.2	Función desconocida
Pp3c11_15430V3.2	4	2.2	Phosphatidic acid phosphatase (PAP2) family protein
Pp3c7_26020V3.1	4	2.2	alfin-like 3
Pp3c11_15430V3.6	4	2.1	Phosphatidic acid phosphatase (PAP2) family protein
Pp3c2_15931V3.1	4	2.0	RNA polymerase III RPC4
Pp3c23_21450V3.3	4	2.0	Integrase-type DNA-binding superfamily protein
Pp3c1_41270V3.2	4	2.0	Función desconocida

6. Conclusiones y perspectivas

En este trabajo se estudió en detalle el gen *PpeIF5A* de *P. patens* que codifica para un factor de iniciación de la traducción del tipo 5A.

Mediante ensayos de RT-qPCR, fue posible determinar el perfil de expresión del gen frente a diversos estímulos de estrés. Se observó un perfil de inducción frente a los tratamientos con ABA, SA, calor y deshidratación, y un perfil de represión frente a DTT y SL. Se generaron construcciones para determinar la localización subcelular del producto del gen elF5A mediante expresión transitoria, así como evaluar el efecto de la expresión heteróloga de PpelF5A en *A. thaliana*. Se obtuvo una construcción para la expresión de *PpelF5A* fusionado con GFP, bajo el control de n promotor constitutivo y se llevaron adelante ensayos de expresión transitoria en *N. benthamiana*, determinando que la PpelF5A presenta una localización subcelular nuclear y citoplasmática. Utilizando esta misma construcción, se generaron plantas transgénicas de *A. thaliana* con el fin de evaluar efectos de relocalización subcelular en respuesta al estrés.

Por otra parte, se generó una construcción para evaluar el efecto de la expresión heteróloga del gen *PpeIF5A* en *A. thaliana* y se transformaron plantas de manera estable. La presencia del transgen fue confirmada en todos los casos, y las líneas transgénicas serán fenotipadas a la brevedad.

Por otro lado, a través de un procesamiento de los datos transcriptómicos obtenidos en condiciones de estrés térmico en nuestro laboratorio, fue posible proponer potenciales blancos e interactores para la proteína codificada por el *PpeIF5A*. Todos estos resultados nos permiten afirmar que los objetivos planteados para este trabajo fueron cumplidos.

Como perspectivas a futuro, sería pertinente continuar con el análisis fenotípico de las líneas transgénicas obtenidas en condiciones normales y de estrés. En relación a la localización subcelular, se ha creado una construcción que permite la expresión de la proteína PpeIF5A:GFP en la que la lisina blanco de hipusinación fue modificada. Se planea generar otras construcciones en las que la lisina blanco de acetilación/desacetilacion también esté mutada. Estas construcciones serán utilizadas para transformar plantas tanto de manera transitoria como estable y evaluar la influencia de estas mutaciones en la localización subcelular de la proteína en condiciones normales y de estrés térmico.

Dentro de las perspectivas planteadas se generarán construcciones para la producción de mutantes *knock-out* y sobreexpresantes de este gen en *P. patens*. Las líneas transgénicas generadas serán evaluadas en condiciones normales de crecimiento así como en estrés. Finalmente, se llevarán

adelante ensayos de inmunoprecipitación con anticuerpos anti-PpeIF5A para poder determinar experimentalmente interactores de este factor.

A partir de lo analizado y observado durante este trabajo podemos concluir que es necesario seguir profundizando en el rol de *PpeIF5A* en *P. patens*, así como en las funciones que cumplen los factores de iniciación de la traducción de la familia 5A en plantas. A priori, podríamos pensar que un elemento tan conservado a lo largo de la evolución debe verse involucrado en procesos de suma relevancia para los organismos y sería interesante seguir aportando al conocimiento sobre ello, en especial en plantas. Si bien se ha descrito en mamíferos que una de las funciones de este factor es el transporte de ARNm específicos desde el núcleo al citoplasma, aún sigue siendo una interrogante cuál es la función de este factor dentro del núcleo, y cómo sus peculiares modificaciones postraduccionales determinan su ubicación dentro de la célula.

Por último, la caracterización funcional de genes involucrados en la resistencia al estrés por altas temperaturas es de gran interés biotecnológico, ya que en el caso de los organismos vegetales pueden ser utilizados para el desarrollo de genotipos con mayor estabilidad de rendimiento frente a altas temperaturas.

7. Referencias

Ahuja, I., de Vos, R. C., Bones, A. M., & Hall, R. D. (2010). Plant molecular stress responses faceclimatechange.Trendsinplantscience,15(12),664–674.https://doi.org/10.1016/j.tplants.2010.08.002.

Alexander, L. V. (2016). Global observed long-term changes in temperature and precipitation extremes: A review of progress and limitations in IPCC assessments and beyond. *Weather and Climate Extremes*, *11*, 4-16.

Almeselmani, M., Deshmukh, P. S., Sairam, R. K., Kushwaha, S. R., & Singh, T. P. (2006). Protective role of antioxidant enzymes under high temperature stress. *Plant science : an international journal of experimental plant biology*, *171*(3), 382–388. https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2006.04.009.

Ashikawa I. (2002). Gene-associated CpG islands and the expression pattern of genes in rice. *DNA* research : an international journal for rapid publication of reports on genes and genomes, 9(4), 131–134. https://doi.org/10.1093/dnares/9.4.131.

Baena-González E. (2010). Energy signaling in the regulation of gene expression during stress. *Molecular plant*, *3*(2), 300–313. https://doi.org/10.1093/mp/ssp113.

Belda-Palazón, B., Almendáriz, C., Martí, E., Carbonell, J., & Ferrando, A. (2016). Relevance of the Axis Spermidine/eIF5A for Plant Growth and Development. Frontiers in plant science, 7, 245. https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00245.

Blanco, F., Salinas, P., Cecchini, N. M., Jordana, X., Van Hummelen, P., Alvarez, M. E., & Holuigue, L. (2009). Early genomic responses to salicylic acid in Arabidopsis. *Plant molecular biology*, *70*(1-2), 79–102. https://doi.org/10.1007/s11103-009-9458-1.

Carninci, P., Sandelin, A., Lenhard, B., Katayama, S., Shimokawa, K., Ponjavic, J., Semple, C. A., Taylor, M. S., Engström, P. G., Frith, M. C., Forrest, A. R., Alkema, W. B., Tan, S. L., Plessy, C., Kodzius, R., Ravasi, T., Kasukawa, T., Fukuda, S., Kanamori-Katayama, M., Kitazume, Y., ... Hayashizaki, Y. (2006). Genome-wide analysis of mammalian promoter architecture and evolution. *Nature genetics*, *38*(6), 626–635. https://doi.org/10.1038/ng1789.

Carretero-Paulet, L., Galstyan, A., Roig-Villanova, I., Martínez-García, J. F., Bilbao-Castro, J. R., & Robertson, D. L. (2010). Genome-wide classification and evolutionary analysis of the bHLH family of transcription factors in Arabidopsis, poplar, rice, moss, and algae. *Plant physiology*, *153*(3), 1398–1412. https://doi.org/10.1104/pp.110.153593.

Chakraborty, R., & Roy, S. (2019). Evaluation of the diversity and phylogenetic implications of NAC transcription factor members of four reference species from the different embryophytic plant groups. *Physiology and molecular biology of plants : an international journal of functional plant biology*, *25*(2), 347–359. https://doi.org/10.1007/s12298-018-0581-9.

Chamot, D., & Kuhlemeier, C. (1992). Differential expression of genes encoding the hypusinecontaining translation initiation factor, eIF-5A, in tobacco. *Nucleic acids research*, *20*(4), 665–669. https://doi.org/10.1093/nar/20.4.665.

Chatterjee, I., Gross, S. R., Kinzy, T. G., & Chen, K. Y. (2006). Rapid depletion of mutant eukaryotic initiation factor 5A at restrictive temperature reveals connections to actin cytoskeleton and cell cycle

progression. *Molecular genetics and genomics : MGG*, 275(3), 264–276. https://doi.org/10.1007/s00438-005-0086-4.

Chesarone, M. A., & Goode, B. L. (2009). Actin nucleation and elongation factors: mechanisms and interplay. Current opinion in cell biology, 21(1), 28–37. https://doi.org/10.1016/j.ceb.2008.12.001.

Chou, W. C., Huang, Y. W., Tsay, W. S., Chiang, T. Y., Huang, D. D., & Huang, H. J. (2004). Expression of genes encoding the rice translation initiation factor, eIF5A, is involved in developmental and environmental responses. *Physiologia plantarum*, *121*(1), 50–57. https://doi.org/10.1111/j.0031-9317.2004.00292.x.

Cove, D. (2000) The Moss, Physcomitrella patens. *Journal Plant Growth Regulation* **19**, 275–283. https://doi.org/10.1007/s003440000031.

Deblaere, R., Bytebier, B., De Greve, H., Deboeck, F., Schell, J., Van Montagu, M., & Leemans, J. (1985). Efficient octopine Ti plasmid-derived vectors for Agrobacterium-mediated gene transfer to plants. *Nucleic acids research*, *13*(13), 4777–4788. https://doi.org/10.1093/nar/13.13.4777.

Dinkova, T. D., Zepeda, H., Martínez-Salas, E., Martínez, L. M., Nieto-Sotelo, J., & de Jiménez, E. S. (2005). Cap-independent translation of maize Hsp101. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, *41*(5), 722–731. https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02333.x.

Fang, Y., & Xiong, L. (2015). General mechanisms of drought response and their application in drought resistance improvement in plants. *Cellular and molecular life sciences : CMLS, 72*(4), 673–689. https://doi.org/10.1007/s00018-014-1767-0.

Ferrari, C., Shivhare, D., Hansen, B. O., Pasha, A., Esteban, E., Provart, N. J., Kragler, F., Fernie, A., Tohge, T., & Mutwil, M. (2020). Expression Atlas of Selaginella moellendorffii Provides Insights into the Evolution of Vasculature, Secondary Metabolism, and Roots. The Plant cell, 32(4), 853–870. https://doi.org/10.1105/tpc.19.00780.

Feng, H., Chen, Q., Feng, J., Zhang, J., Yang, X., & Zuo, J. (2007). 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 physiology*, *144*(3), 1531–1545. https://doi.org/10.1104/pp.107.098079.

Floris, M., Mahgoub, H., Lanet, E., Robaglia, C., & Menand, B. (2009). Post-transcriptional regulation of gene expression in plants during abiotic stress. *International journal of molecular sciences*, *10*(7), 3168–3185. https://doi.org/10.3390/ijms10073168.

Fragkostefanakis S, Mesihovic A, Hu Y, Schleiff E. Unfolded protein response in pollen development and heat stress tolerance. *Plant Reprod*. 2016;29(1-2):81-91. doi:10.1007/s00497-016-0276-8.

Gateway[®] Technology. A universal technology to clone DNA sequences for functional analysis and expression in multiple systems. Catalog no. 12535-019.

Grefen, C., Donald, N., Hashimoto, K., Kudla, J., Schumacher, K., & Blatt, M. R. (2010). A ubiquitin-10 promoter-based vector set for fluorescent protein tagging facilitates temporal stability and native protein distribution in transient and stable expression studies. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, *64*(2), 355–365. https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2010.04322.x.

Gutierrez, E., Shin, B. S., Woolstenhulme, C. J., Kim, J. R., Saini, P., Buskirk, A. R., & Dever, T. E. (2013). eIF5A promotes translation of polyproline motifs. *Molecular cell*, *51*(1), 35–45. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.04.021.

Hanahan, D., Jessee, J., & Bloom, F. R. (1991). Plasmid transformation of Escherichia coli and other bacteria. *Methods in enzymology*, 204, 63–113. https://doi.org/10.1016/0076-6879(91)04006-a.

Hanson, L., McMahon, K. A., Johnson, M., & Bennett, M. D. (2001). First Nuclear DNA C-values for 25 Angiosperm Families. Annals of botany, 87(2), 251–258. https://doi.org/10.1006/anbo.2000.1325.

Holcik, M., & Sonenberg, N. (2005). Translational control in stress and apoptosis. *Nature reviews. Molecular cell biology*, *6*(4), 318–327. https://doi.org/10.1038/nrm1618.

Hopkins, M. T., Lampi, Y., Wang, T. W., Liu, Z., & Thompson, J. E. (2008). Eukaryotic translation initiation factor 5A is involved in pathogen-induced cell death and development of disease symptoms in *Arabidopsis*. *Plant physiology*, *148*(1), 479–489. https://doi.org/10.1104/pp.108.118869.

Iba K. (2002). Acclimative response to temperature stress in higher plants: approaches of gene engineering for temperature tolerance. *Annual review of plant biology*, *53*, 225–245. https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.53.100201.160729.

Ishfaq, M., Maeta, K., Maeda, S., Natsume, T., Ito, A., & Yoshida, M. (2012). Acetylation regulates subcellular localization of eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF5A). FEBS letters, 586(19), 3236–3241. https://doi.org/10.1016/j.febslet.2012.06.042.

Karimi, M., Inzé, D., & Depicker, A. (2002). GATEWAY vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation. *Trends in plant science*, *7(5)*, *193–195*. https://doi.org/10.1016/s1360-1385(02)02251-3.

Klier, H., Csonga, R., Joäo, H. C., Eckerskorn, C., Auer, M., Lottspeich, F., & Eder, J. (1995). Isolation and structural characterization of different isoforms of the hypusine-containing protein eIF-5A from HeLa cells. *Biochemistry*, *34*(45), 14693–14702. https://doi.org/10.1021/bi00045a010.

Knight, C., Perroud, P. F., Cove, D. The moss Physcomitrella patens. Annual Plant Reviews, 36, doi: 10.1093/aob/mcp228.

Komar, A. A., & Hatzoglou, M. (2011). Cellular IRES-mediated translation: the war of ITAFs in pathophysiological states. *Cell cycle (Georgetown, Tex.), 10*(2), 229–240. https://doi.org/10.4161/cc.10.2.14472.

Lan, P., & Schmidt, W. (2011). The enigma of eIF5A in the iron deficiency response of Arabidopsis. *Plant signaling & behavior*, *6*(4), 528–530. https://doi.org/10.4161/psb.6.4.14747.

Le Bail, A., Scholz, S., & Kost, B. (2013). Evaluation of reference genes for RT qPCR analyses of structure-specific and hormone regulated gene expression in *Physcomitrella patens* gametophytes. *PloS one*, *8*(*8*), *e70998*. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070998.

Lee, S. B., Park, J. H., Kaevel, J., Sramkova, M., Weigert, R., & Park, M. H. (2009). The effect of hypusine modification on the intracellular localization of eIF5A. *Biochemical and biophysical research communications*, *383*(4), 497–502. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.04.049.

Li, C. H., Ohn, T., Ivanov, P., Tisdale, S., & Anderson, P. (2010). eIF5A promotes translation elongation, polysome disassembly and stress granule assembly. PloS one, 5(4), e9942. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009942.

Liu, J., Chang, X., Ding, B., Zhong, S., Peng, L., Wei, Q., Meng, J., & Yu, Y. (2019). PhDHS Is Involved in Chloroplast Development in Petunia. *Frontiers in plant science*, *10*, 284. https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00284.

Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods (San Diego, Calif.)*, 25(4), 402–408. https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262.

Ma, F., Liu, Z., Wang, T. W., Hopkins, M. T., Peterson, C. A., & Thompson, J. E. (2010). Arabidopsis eIF5A3 influences growth and the response to osmotic and nutrient stress. *Plant, cell & environment*, *33*(10), 1682–1696. https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2010.02173.x.

Mardanova, E. S., Zamchuk, L. A., Skulachev, M. V., & Ravin, N. V. (2008). The 5' untranslated region of the maize alcohol dehydrogenase gene contains an internal ribosome entry site. *Gene*, 420(1), 11–16. https://doi.org/10.1016/j.gene.2008.04.008.

Martinez-Trujillo, M., Limones-Briones, V., Cabrera-Ponce, J.L. et al. (2004) Improving transformation efficiency of Arabidopsis thaliana by modifying the floral dip method. *Plant Molecular Biology Reports 22, 63–70*. https://doi.org/10.1007/BF02773350.

Mayberry, L. K., Allen, M. L., Nitka, K. R., Campbell, L., Murphy, P. A., & Browning, K. S. (2011). Plant cap-binding complexes eukaryotic initiation factors eIF4F and eIFISO4F: molecular specificity of subunit binding. *The Journal of biological chemistry*, *286*(49), 42566–42574. https://doi.org/10.1074/jbc.M111.280099.

Muñoz, A., & Castellano, M. M. (2012). Regulation of Translation Initiation under Abiotic Stress Conditions in Plants: Is It a Conserved or Not so Conserved Process among Eukaryotes?. *Comparative and functional genomics*, 2012, 406357. https://doi.org/10.1155/2012/406357.

Muñoz-Soriano, V., Domingo-Muelas, A., Li, T., Gamero, E., Bizy, A., Fariñas, I., Alepuz, P., & Paricio, N. (2017). Evolutionary conserved role of eukaryotic translation factor eIF5A in the regulation of actin-nucleating formins. Scientific reports, 7(1), 9580. https://doi.org/10.1038/s41598-017-10057-y.

Nishiyama, T., Fujita, T., Shin-I, T., Seki, M., Nishide, H., Uchiyama, I., Kamiya, A., Carninci, P., Hayashizaki, Y., Shinozaki, K., Kohara, Y., & Hasebe, M. (2003). Comparative genomics of Physcomitrella patens gametophytic transcriptome and Arabidopsis thaliana: implication for land plant evolution. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 100(13), 8007–8012. https://doi.org/10.1073/pnas.0932694100.

Oldenhof, H., Wolkers, W. F., Bowman, J. L., Tablin, F., & Crowe, J. H. (2006). Freezing and desiccation tolerance in the moss *Physcomitrella patens*: an in situ Fourier transform infrared spectroscopic study. *Biochimica et biophysica acta*, *1760*(8), 1226–1234. https://doi.org/10.1016/j.bbagen.200603.025.

Ortiz-Ramírez, C., Hernandez-Coronado, M., Thamm, A., Catarino, B., Wang, M., Dolan, L., Feijó, J. A., & Becker, J. D. (2016). A Transcriptome Atlas of Physcomitrella patens Provides Insights into the Evolution and Development of Land Plants. *Molecular plant*, *9*(2), 205–220. https://doi.org/10.1016/j.molp.2015.12.002.

Parreiras-E-Silva, L. T., Gomes, M. D., Oliveira, E. B., & Costa-Neto, C. M. (2007). The N-terminal region of eukaryotic translation initiation factor 5A signals to nuclear localization of the protein. Biochemical and biophysical research communications, 362(2), 393–398. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.07.185.

Park M. H. (2006). The post-translational synthesis of a polyamine-derived amino acid, hypusine, in the eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF5A). *Journal of biochemistry*, *139*(2), 161–169. https://doi.org/10.1093/jb/mvj034.

Pelletier, J., & Sonenberg, N. (1988). Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA. *Nature*, *334*(6180), 320–325. https://doi.org/10.1038/334320a0.

Priya, M., Dhanker, O. P., Siddique, K., HanumanthaRao, B., Nair, R. M., Pandey, S., Singh, S., Varshney, R. K., Prasad, P., & Nayyar, H. (2019). Drought and heat stress-related proteins: an update about their functional relevance in imparting stress tolerance in agricultural crops. TAG. Theoretical and applied genetics. Theoretische und angewandte Genetik, 132(6), 1607–1638. https://doi.org/10.1007/s00122-019-03331-2.

Pu, X., Yang, L., Liu, L., Dong, X., Chen, S., Chen, Z., Liu, G., Jia, Y., Yuan, W., & Liu, L. (2020). Genome-Wide Analysis of the MYB Transcription Factor Superfamily in *Physcomitrella patens*. *International journal of molecular sciences*, *21*(3), 975. https://doi.org/10.3390/ijms21030975.

Rausell, A., Kanhonou, R., Yenush, L., Serrano, R., & Ros, R. (2003). The translation initiation factor eIF1A is an important determinant in the tolerance to NaCl stress in yeast and plants. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, *34*(3), 257–267. https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2003.01719.x.

Rensing, S. A., Lang, D., Zimmer, A. D., Terry, A., Salamov, A., Shapiro, H., Nishiyama, T., Perroud, P. F., Lindquist, E. A., Kamisugi, Y., Tanahashi, T., Sakakibara, K., Fujita, T., Oishi, K., Shin-I, T., Kuroki, Y., Toyoda, A., Suzuki, Y., Hashimoto, S., Yamaguchi, K., ... Boore, J. L. (2008). The *Physcomitrella* genome reveals evolutionary insights into the conquest of land by plants. *Science (New York, N.Y.)*, *319*(5859), 64–69. https://doi.org/10.1126/science.1150646.

Rensing, S. A., Rombauts, S., Van de Peer, Y., & Reski, R. (2002). Moss transcriptome and beyond. *Trends in plant science*, 7(12), 535–538. https://doi.org/10.1016/s1360-1385(02)02363-4.

Reski, R. (1998). *Physcomitrella* and *Arabidopsis*: the David and Goliath of reverse genetics. Trends in plant science, 3(6), 209-210. https://doi.org/10.1016/S1360-1385(98)01257-6.

Richardt, S., Timmerhaus, G., Lang, D., Qudeimat, E., Corrêa, L. G., Reski, R., Rensing, S. A., & Frank, W. (2010). Microarray analysis of the moss Physcomitrella patens reveals evolutionarily conserved transcriptional regulation of salt stress and abscisic acid signalling. *Plant molecular biology*, *72*(1-2), 27–45. https://doi.org/10.1007/s11103-009-9550-6.

Rossi, D., Kuroshu, R., Zanelli, C. F., & Valentini, S. R. (2014). eIF5A and EF-P: two unique translation factors are now traveling the same road. *Wiley interdisciplinary reviews. RNA*, *5*(2), 209–222. https://doi.org/10.1002/wrna.1211.

Saidi, A., Hajibarat, Z. (2020). In-silico analysis of eukaryotic translation initiation factors (eIFs) in response to environmental stresses in rice (*Oryza sativa*). *Biologia*, https://doi.org/10.2478/s11756-020-00467-1.

Saitou, N., & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Molecular biology and evolution, 4(4), 406–425. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454.

Schaefer, D. G., & Zrÿd, J. P. (2001). The moss *Physcomitrella patens*, now and then. *Plant physiology*, *127*(4), 1430–1438.

Schaefer D. G. (2002). A new moss genetics: targeted mutagenesis in Physcomitrella patens. *Annual review of plant biology*, *53*, 477–501. https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.53.100301.135202.

Schöffl, F., Prändl, R., & Reindl, A. (1998). Regulation of the heat-shock response. *Plant physiology*, *117*(4), 1135–1141. https://doi.org/10.1104/pp.117.4.1135.

Schween, G., Hohe, A., Koprivova, A., & Reski, R. (2003). Effects of nutrients, cell density and culture techniques on protoplast regeneration and early protonema development in a moss, Physcomitrella patens. *Journal of plant physiology*, *160*(2), 209–212. https://doi.org/10.1078/0176-1617-00855.

Shiba, T., Mizote, H., Kaneko, T., Nakajima, T., & Kakimoto, Y. (1971). Hypusine, a new amino acid occurring in bovine brain. Isolation and structural determination. *Biochimica et biophysica acta*, 244(3), 523–531. https://doi.org/10.1016/0304-4165(71)90069-9.

Shopan, J., Liu, C., Hu, Z., Zhang, M., & Yang, J. (2020). Identification of eukaryotic translation initiation factors and the temperature-dependent nature of *Turnip mosaic virus* epidemics in allopolyploid *Brassica juncea*. *3 Biotech*, *10*(2), 75. https://doi.org/10.1007/s13205-020-2058-0.

Spring, C., Protoc, H. & Lb, R., 2006. LB (Luria Bertani) liquid medium. Cold Spring Harbor Protocols, 2006(1), p.pdb.rec8141- pdb.rec8141.

Sugiyama, T., Ishida, T., Tabei, N., Shigyo, M., Konishi, M., Yoneyama, T., & Yanagisawa, S. (2012). Involvement of PpDof1 transcriptional repressor in the nutrient condition-dependent growth control of protonemal filaments in *Physcomitrella patens*. *Journal of experimental botany*, *63*(8), 3185–3197. https://doi.org/10.1093/jxb/ers042.

Thompson, J. E., Hopkins, M. T., Taylor, C., & Wang, T. W. (2004). Regulation of senescence by eukaryotic translation initiation factor 5A: implications for plant growth and development. *Trends in plant science*, *9*(4), 174–179. https://doi.org/10.1016/j.tplants.2004.02.008.

Trinklein, N. D., Aldred, S. F., Hartman, S. J., Schroeder, D. I., Otillar, R. P., & Myers, R. M. (2004). An abundance of bidirectional promoters in the human genome. Genome research, 14(1), 62–66. https://doi.org/10.1101/gr.1982804.

Wahid A. (2007). Physiological implications of metabolite biosynthesis for net assimilation and heatstress tolerance of sugarcane (Saccharum officinarum) sprouts. *Journal of plant research*, *120*(2), 219–228. https://doi.org/10.1007/s10265-006-0040-5.

Wang, T. W., Lu, L., Wang, D., & Thompson, J. E. (2001). Isolation and characterization of senescence-induced cDNAs encoding deoxyhypusine synthase and eucaryotic translation initiation factor 5A from tomato. *The Journal of biological chemistry*, *276*(20), 17541–17549. https://doi.org/10.1074/jbc.M008544200.

Wang, T. W., Lu, L., Zhang, C. G., Taylor, C., & Thompson, J. E. (2003). Pleiotropic effects of suppressing deoxyhypusine synthase expression in Arabidopsis thaliana. *Plant molecular biology*, *52*(6), 1223–1235. https://doi.org/10.1023/b:plan.0000004332.80792.4d.

Wang, W., Vinocur, B., Shoseyov, O., & Altman, A. (2004). Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends in plant science*, *9*(5), 244–252. https://doi.org/10.1016/j.tplants.2004.03.006.

Wang, C., Zhang, Q., & Shou, H. X. (2009). Identification and expression analysis of OsHsfs in rice. *Journal of Zhejiang University. Science. B*, *10*(4), 291–300. https://doi.org/10.1631/jzus.B0820190.

Wang, F., Hou, X., Tang, J., Wang, Z., Wang, S., Jiang, F., & Li, Y. (2012). A novel cold-inducible gene from Pak-choi (Brassica campestris ssp. chinensis), BcWRKY46, enhances the cold, salt and dehydration stress tolerance in transgenic tobacco. *Molecular biology reports*, *39*(4), 4553–4564. https://doi.org/10.1007/s11033-011-1245-9.

Xu, X. Y., Ding, Z. J., Chen, L., Yan, J. Y., Li, G. X., & Zheng, S. J. (2015). An eukaryotic translation initiation factor, AteIF5A-2, affects cadmium accumulation and sensitivity in Arabidopsis. *Journal of integrative plant biology*, *57*(10), 848–858. https://doi.org/10.1111/jipb.12329.

Xu, J., Zhang, B., Jiang, C., & Ming, F. (2011). RceIF5A, encoding an eukaryotic translation initiation factor 5A in Rosa chinensis, can enhance thermotolerance, oxidative and osmotic stress resistance of Arabidopsis thaliana. Plant molecular biology, 75(1-2), 167–178. https://doi.org/10.1007/s11103-010-9716-2.

Yotsui, I., Saruhashi, M., Kawato, T., Taji, T., Hayashi, T., Quatrano, R. S., & Sakata, Y. (2013). ABSCISIC ACID INSENSITIVE3 regulates abscisic acid-responsive gene expression with the nuclear factor Y complex through the ACTT-core element in *Physcomitrella patens*. *The New phytologist*, *199*(1), 101–109. https://doi.org/10.1111/nph.12251.

Zanelli, C. F., & Valentini, S. R. (2007). Is there a role for eIF5A in translation?. *Amino acids*, *33*(2), 351–358. https://doi.org/10.1007/s00726-007-0533-0.

Zimmer, A. D., Lang, D., Buchta, K., Rombauts, S., Nishiyama, T., Hasebe, M., Van de Peer, Y., Rensing, S. A., & Reski, R. (2013). Reannotation and extended community resources for the genome of the non-seed plant Physcomitrella patens provide insights into the evolution of plant gene structures and functions. *BMC genomics*, *14*, 498. https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-498.

Zuk, D., & Jacobson, A. (1998). A single amino acid substitution in yeast eIF-5A results in mRNA stabilization. *The EMBO journal*, *17*(10), 2914–2925. https://doi.org/10.1093/emboj/17.10.2914.

8 Anexo

8.1 Tablas y figuras suplementarias

Tabla suplementaria 1. Nombres y números de acceso de las proteínas utilizadas en el análisis filogenético.

	Identificador Phytozome/
Nombre utilizado en árbol filogenético	Número de accesión Genebank
At eIF5A1	AT1G69410
At eIF5A2	AT1G13950
At eIF5A3	AT1G26630
CreIF5A	Cre02.g097400.t1.2
EgelF5A1	Eucgr.B00553
EgelF5A2	Eucgr.C00350
EgelF5A3	Eucgr.G02468
EgelF5A4	Eucgr.K02493
GmeIF5A1	Glyma.01G054000
GmeIF5A2	Glyma.02G112400
GmeIF5A3	Glyma.02G203700
GmeIF5A4	Glyma.04G165500
GmeIF5A5	Glyma.05G024200
GmeIF5A6	Glyma.06G197300
GmeIF5A7	Glyma.17G103100
GmeIF5A8	Glyma.17G074100
GmeIF5A9	Glyma.18G192700
GmelF5A10	Glyma.18G192600
GmelF5A11	Glyma.17G074100
MmeIF5A	AAH08093.1
MspeIF5A	92746
OselF5A1	LOC_Os03g55150
OseIF5A2	LOC_Os07g02210
OseIF5A3	LOC_Os07g13230
OseIF5A4	LOC_Os07g40580
OseIF5A5	LOC_Os12g32240
OleIF5A	13807
PpeIF5A2	Pp3c12_3540V3
PpeIF5A	Pp3c13_15620V3
RceIF5A1	ABC70326.1
RceIF5A2	ABM53472.1
SleIF5A1	Solyc07g005560
SleIF5A2	Solyc03g115650
SleIF5A3	Solyc05g006890
SleIF5A4	Solyc12g010060
SleIF5A5	Solyc01g011000
SleIF5A6	Solyc04g005510

SfeIF5A1	Sphfalx0000s0077
SfeIF5A2	Sphfalx0018s0239
SfeIF5A3	Sphfalx0019s0024
SfeIF5A4	Sphfalx0093s0085
VceIF5A	Vocar.0012s0091



Figura suplementaria 1. Alineamiento de secuencias aminoacídicas completas **de potenciales pseudogenes de** *P. patens* **y** *G. max.* **con PpelF5A**. Se utilizó el software Mega versión 6.0 Los guiones indican ausencia de aminoácido en esa posición. El sombreado oscuro indica identidad de secuencia \ge 95% y el más claro, elevada similitud.

$\sum D = 2 - 1 2$	15620	1	Chr12	.112///71	11216105	forward
CARCCCC				.11344471.	.11340405	
GATCGGGA	ACCGTCGAA	ACCGAGGTGGTG	AATCGACGGCC.	ACTGCGTCCC		GTGGAGGAGCCTCA
GCATCCAG	GCCAGGC	TCTAGATCCGGT	GCCCTAAAACA	AGCCCCATCG	GGACCGTCGAGG	AAAGAATCGGACGA
CGGAGGGC		GGCGAAGGGGGG	GAAGC'I'AGAAC	AGTGGCTCTA	TGCCGCCAGCGA	AGTATCTTGAGGAG
AGGACCGC	CTGCAACC	CTATTCCCCTCC	CTCGCTACTTC	TCTTCCTCCC	TCTCTGTCTCGC	CTCTGCTGCTGTGT
TCAGGCGI	CAGGGAAG	GAAAGGAGAGAGA	GACCCACTCTC	TTTCGGTTCG	GTTTGGGCCTGT	GGTTGCTGCTCATT
GCCTGGTC	CGTCTTTG	CTAGCCACACGCC	CTTTTCAA <u>TCA</u>	TGTCTGACGA	CGAGC ¹ ACCAAT	ICGAGTCCAAGGCC
GACGCCGG	GAGCGTCCA	AGACTTACCCCC	AGCAGGCCGGA	ACCATACGCA	AGGGCGCGCACC	TTGTCATCAAGCAG
AGGCCCTC	GCAAG <mark>GTA</mark>	GCATATACCCTA	GCGACCGTGGT	CCTTTGTTTC	GAAATTTTGGCT	CTGGAGGATTAGTT
GTGGTCCC	CCCCCTCTA	AGAGCGTGTTTTI	GTTATTTTCGA	GATGTGGGGT	TTGATGTAGCTC	AAATCTGGCGAGAG
TCGTTTTA	GTTAGTT	TTCCTCTTCTC	TTGATTTTTCT	CCACGGAATG	TATGGGTTCTCG	TTATTCTCCTTATT
TTTCTCCI	GTGTGGT	AGGCATAGTCTTO	GTATGATGCGA	CGATGTGCGT	ATTTTTACGATG	TGTCTTAGGGTTAC
ATGGGTAA	ATTAGGAG	GTTTTTTTGTAT	GTCTAGGTCAT	GTCGTGGAGC	TGCTCTCTGCTA	ATGGAATGACATGG
GTAGGTCI	TAGTCCT	CACAGTAGTGTC	TCTCTCACGCC	CTAGCCGCTA	.CGATGCGTTTCT	TGGATTTCTCAAGA
CGACCCAG	GCTGCGCC	GCTGGGATATTI	TCTGACACTTA	CTCCTGATAC	ATTACAGGTTGT	CGAAGTGTCTACTT
CGAAGACI	GGGAAGC	ACGGTCACGCCAA	GTGCCACTTCG	TCGCAATCGA	TATCTTCAC TGG	GAAGAAGCTCGAGG
ATA ⁴ TTGT	TCCGTCTT	CTCACAATTGTG	ATGTAAGATAC	CTTCACTAGC	CGTCCATCATGT	GTGTCATCGATTTG
AATTTCAT	GTATCGA	ACTCCCCTGTI	CTCATTCTGGA	CTTTGTTAAC	TTGCGTAAAATA	TGGTGTGCAG <mark>GTTC</mark>
CTCATGTA	ATCTCGTT	CTGATTACCAGCI	CATTGACATCT	CTGAGGATGG	ATTCGTAAGTAA	CCTATTCTAATCAC
ACATTTAT	TCGCCGT	GCGTTCAATCG	ATAGTGCTCAA	AGGATTGTAG	TTGTGAACACTG	TAGTCTGAGATATG
CCAATGTT	TTGTCCA	GTGAGTCTTCTC	ACTGAAAATGG	TGTCACCAAA	GACGATCTGC⁵G	CCTGCCCACCGACG
AGGGCCTC	CCTGACGCA	GATAAGGGATGO	ATTTGCCGAAG	GCAAGGATCT	TGTAGTGACTGT	TATGTCTGCTATGG
GAGAGGAG	GCAGATTG	CGGCTCTGAAGGA	TATCGGCGGCA	GGAACAA ² CT	AAACTCTATTAT	CACAAATCCAGCGT
AGAGAGG	CAA ³ AATGT	CACAGTTTAATG	ATGTTTTCATA	TTTGGCACTG	TGGCCCACGATG	TGTTATGTCATAGC
TGATAATZ		GAGCTTTGTGGA	CAATGCTTCAG	TGTGCGACTC	TAAATGTTCATT	TTCTGCCTCGATGG
GAAGGGAZ		сттатасастся сттатасастся		TCGTGAGAGG	TGACAAGACTCG	TGGTGTCGACAATA
ACCTGAAT		TGGGTAAAAAA	AGAGCCCTATA	TGACGCGTTT		TTGGAACTATGGAT
TTUTUTUUU	LILL GCGGL	TITOICCCAGIGG	WITTTIGTTIMI	CIOINICCAIC	THITCOLLOCATOL	TCOULTINGG

¹ FwBamHI-eiF5A	5'-ATggatccTCATGTCTGACGACGAGC-3'
² RvNotI-eiF5A:GFP	5'-CGAGTgcggccgc <mark>TTGTTCCTGCCGCCGAT</mark> -3'
³ RvNotI-eiF5A	5'-CGAGTgcggccgc TTCCCTCTCTACGCTGGA -3'
⁴ F-Pp3c13_15620	5'- TGGGAAGAAGCTCGAGGATA -3'
⁵ R-Pp3c13_15620R	5'- <u>GCAGATCGTCTTTGGTGACA</u> -3'

Figura suplementaria 2. Secuencia genómica de PpelF5A. En verde y rosa se muestran las regiones 5'y 3'UTR respectivamente: en azul los exones y en negrita los codones de inicio y terminación, y subrayado se indican los sitios de hibridación de los primers.

		10 		20 .	3() • • • • •	40 		50 	.	60 	7 • • • •	0 • • • •	80 <u>.</u>		90
2B-GFP_2Brev														ATAC	GCAAGGG	C 12
PpeIF5A	ATGTCI M S	GACGACO D D	GAGCAC E H	CAATTC Q F	GAGTCCA E S	AAGGCCO K A	D A	GGAGCO G A	STCCAA S K	GACTTA T Y	CCCCC. P	AGCAGG Q Q	CCGGAZ A G	ACCATACO T I I	GCAAGGO R K O	90 (c) ;
	1	100	I	110	120		130		140	1	.50	16	0	170	1	.80
2B-GFP_2Brev	GCGCAC	CTTGTC	ATCAAG	CAGAGG	CCCTGC	AAGGTT	GTNGAA	GTGTC	'ACT'TN	GAAGA	TGGGA	AAGCAC	GGTCA	CGCCAAG	IGCCACI	102
PpeIF5A	GCGCAC A H	CTTGTC	ATCAAG I K	CAGAGG Q R	P C	AAGGTT(K V	GTC <mark>GAA(</mark> V E	U S	T <mark>ACTT</mark> C T S	GAAGAO K 1	TGGGA G	<mark>а-</mark> GCAC к н	GGTCA G H	A K	C H	n 179 F
		190 		200 .	210) .	220 		230 	2 .	240	25 	0 	260 	2	270
2B-GFP_2Brev	CGTCGC	AATCGA1	PATCTT	CACTGG	GAAGAA	GCTNGA	GGATAT'	IGTTCO	CGTCTT	CTCACA	ATTGT	GATGIT M F	CCTCA: L 1	IGTATCIO 4 Y L	V L	A 192
PpeIF5A	CGTCGC V A	AATCGAI I D	I F	CACTGG T G	GAAGAAO K K	GCTCGA0 L E	D I	V I	Sercera S	CTCACA S H	ATTGT N C	GATGIT D V	P H	V S	R S	A 269 D
	1	280	1	290	300		310		320	3	30	34	0	350	3	60
2B-GFP_2Brev	TTACCA	GCTCATT	IGACAT	CTCTGA	GGATGG	ATTCGT	GAGTCT	TCTCAC	CTGAAA	ATGGT	TCACC.	AAAGAC	GATCT	GCGCCTG	CCCACCO	A 282
PpeIF5A	TTACCA Y Ç	GCTCATT	IGACAT D I	CTCTGA S E	GGATGGA D G	F V	SAGTCT S L	ICTCAC L 1	CTGAAA F E	ATGGTO N G	V T	AAAGAC K D	GATCT(D L	R L	P T	A 359 D
		370		380	390	C	400		410	4	20	43	0	440	4	50
2B-GFP_2Brev	CGAGGO	CCTCCTC	GACGCA	GATAAG	GGATGG	ATTTGC	CGAAGG	CAAGGA	ATCTTC	IVACII(C/	ACTGTT	ATGTCT	GCTAT	GGAGAG	GAGCAGA	 17 372
PpeIF5A	CGAGGG E G	CCTCCTO L L	T Q	GATAAG I R	GGATGG D G	F A	CGAAGG E G	CAAGGA K I	ATCTTG	V V	ACTGTT. T V	ATGTCT M S	GCTAT(A M	GGGAGAG G E	GAGCAGA E Q	n 449 I
		460		470	480		490		500	5	510	52	0	530	5	40
2B-GFP_2Brev	TGCGGC	TCTGAAC	GATAT	CGGCGG	CAGGAA	CAACCG	GCCGCA	CTCGA	GATATC	TAGACO	CAGCT	TTCTTG	TACAA	AGTTGGC	ATTATAA	G 462
PpeIF5A	TGCGGC A A	TCTGAAG L K	GATAT D I	CEECEE G G	CAGGAAO R N	CAAC <mark>TAI</mark> N *	A									- 486
		550		560	570	5	580									
2B-GFP_2Brev	AAAGCA	TTGCTT	ATCAAN	. TTGTTG	CAACGA	ACAGGT	 CACTAT(. CAGTCA	510							
PpeIF5A									- 486							

Figura Suplementaria 3. Secuenciación automática de la construcción pENTR2B-eiF5A:GFP. Alineamiento de la secuencia obtenida por secuenciación con la secuencia de la CDS de *PpeIF5A*. En rojo se muestra el codón STOP. (Alineamiento realizado con el programa Mega versión 6.0).

8.2 Abreviaciones

ABA	Ácido abscísico
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN copia
ARN	Ácido desoxirribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ARNt	ARN de transferencia
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BrEt	Bromuro de Etidio
CITEs	Cap-Independient Traslational Enhancers
DHS	Desoxihipusina Sintasa
DOHH	Desoxihipusina Hidroxilasa
dNTPs	Desoxinucleóotidos
DO ₆₀₀	Densidad Óptica a 600 nanómetros
DTT	Ditiotreitol
E. coli	Escherichia coli
elF	Eukaryotic initiation factors
GFP	Green Fluorescent Protein
GTP	Guanosina trifosfato
IRES	Internal Ribosome Entry Sites
LB	Medio de cultivo Luria Bertani
MES	Ácido 2-(N-morfolino) etanosulfónico
Mntl	Manitol
MS	Medio de cultivo Murashige y Skoog
NJ	Neighbor-Joining
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa

P. patens	Physcomitrium patens
rpm	revoluciones por minuto
SA	Ácido salicílico
SL	luz fuerte
T-ADN	ADN de transferencia
UTR	Región no traducida
YEP	Yeast Extract Peptone