



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

“Estudio de la proteína de *splicing*, SC35, durante el estrés abiótico en *Arabidopsis thaliana*”

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área de Ciencias Biológicas

Lic. Luciana Marina Castro

Directora: Dra. María Agustina Mazzella

Consejero de Estudios: Dr. Guillermo Alonso

Lugar de Trabajo: Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular “Dr. Héctor Torres” (INGEBI).

Buenos Aires, 25 de Agosto 2023

Índice

Índice	2
Resumen	4
Abstract.....	5
Agradecimientos.....	6
Abreviaturas	7
1. Introducción.....	8
1.1 Crecimiento y desarrollo en <i>Arabidopsis</i>	8
1.2 Percepción de las señales lumínicas.....	10
1.2.1 Los fotorreceptores	10
1.2.2 El cloroplasto: sensor de señales lumínicas.....	10
1.3 Niveles de regulación por la luz.....	11
1.3.1 Regulación de la transcripción	11
1.3.2 Regulación del procesamiento de ARNm	12
1.3.3 Regulación de la traducción	14
1.3.4 Regulación postraduccional. Fosforilación	15
1.4 Factores de Splicing en <i>Arabidopsis thaliana</i>	18
1.4.1 Proteínas SR y el estrés abiótico.....	20
1.4.2 Factor de splicing SC35.....	21
1.5 Proteínas de la familia eIF4A.....	22
2. Hipótesis y objetivos	25
3. MATERIALES Y MÉTODOS	26
3.1 Material vegetal	26
3.1 Estudio <i>in silico</i> del gen SC35.....	26
3.2 Condiciones de crecimiento de las plantas	27
3.3 Ensayos de biología molecular	27
3.3.1 Genotipificación de plantas mutantes por inserción de T-ADN.....	27
3.4. Generación de plantas transgénicas	30
3.4.1 Clonado por recombinación <i>Gateway</i>	30
3.4.2 Conservación de cepas bacterianas	33
3.5 Obtención de plantas transgénicas.....	34
3.5.1 Transformación de plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	34
3.5.2 Selección de plantas transgénicas.....	34

3.6 Medición del largo de hipocotilo y ángulo del gancho apical	35
3.8. Ensayos fisiológicos	35
3.8.1 Ensayo de estrés por alta temperatura	35
3.8.2. Ensayo de estrés por baja temperatura	35
3.8.3 Ensayo de estrés salino.....	36
3.8.4 Estadística en ensayos fisiológicos y de oscuridad.....	36
3.9 Microscopía Confocal	37
3.9.1 Cuantificación intensidad de fluorescencia.....	37
4. Resultados	37
4.1 Estudio <i>in silico</i> de SC35	37
4.2 SC35 se expresa en tejido etiolado.....	42
4.2.1 Las plantas transgénicas p35S:SC35::YFP no presentan fenotipo en oscuridad	43
4.3 Las plantas transgénicas p35S:SC35:YFP presentan fenotipos defectuosos durante el desarrollo en luz	44
4.4 Localización subcelular de SC35	52
4.5 Estudio de la respuesta de plantas sobreexpresantes de SC35 al estrés abiótico	54
4.6 La sobreexpresión de SC35 unida a la secuencia 3'UTR presenta defectos durante la escotomorfogénesis.....	57
4.7 Caracterización funcional de las proteínas EIF4A1 y EIF4A2 en oscuridad	60
5. Discusión	65
6. Referencias	72
Anexo	88

Resumen

Investigaciones previas del laboratorio muestran que una breve exposición a la luz blanca en plántulas etioladas alteran el estado de fosforilación de algunas proteínas, en un proceso independiente de la vía clásica que involucra a los fotorreceptores principales (*phyA*, *phyB*, *cry1* y *cry2*). Tres de estas proteínas captaron nuestra atención particular: SC35, eIF4A1 y eIF4A2. SC35 es un miembro de la familia de proteínas reguladoras del *splicing* llamadas proteínas SR (ricas en serina y arginina) y presente en tejidos verdes. Dado que el mecanismo de *splicing* alternativo, contribuye a la versatilidad de la regulación génica y la adaptación a los cambios ambientales, estas resultan cruciales. Sin embargo, dada la redundancia funcional inherente en esta familia, el impacto específico de SC35 sigue siendo incierto. Para abordar esto, generamos plantas transgénicas con un promotor constitutivo para analizar su función. Mostramos que el transcrito de SC35 se encuentra presente en plántulas etioladas, aunque no observamos cambios en el largo del hipocotilo o apertura del gancho apical cuando en condiciones de oscuridad. La señal de YFP de las líneas p35:SC35:YFP se localizó en el núcleo, y los niveles del transgen se correlacionan con fenotipos con hojas senescentes y menor área de la roseta en condiciones de luz continua y fotoperíodos cortos. Frente a varios tipos de estrés abiótico, las plantas sobreexpresantes de SC35 no presentaron diferencias comparadas con las WT. También generamos dos líneas transgénicas de SC35 junto con su secuencia 3'UTR, que mostraron fenotipos opuestos a las líneas sobreexpresadas de SC35 sin la secuencia 3'UTR. Las líneas p35S:SC35::YFP+3'UTR crecidas en condiciones de oscuridad exhibieron hipocotilos más cortos y mantuvieron su gancho apical más cerrado en comparación con el WT. Además, mostraron un desarrollo fenotípicamente normal en plantas adultas. Estos resultados sugieren que la secuencia no codificante 3'UTR sería importante para la función de SC35 en plantas. Por otro lado, el análisis de los mutantes de *eIF4A1* mostró una reducción en la elongación del hipocotilo en oscuridad que no puede ser explicada totalmente por un retraso en el tiempo de germinación. Estas observaciones destacan las diferencias en los roles de estas proteínas pertenecientes a familias con alto grado de redundancia y abren nuevas vías para futuras investigaciones sobre el desarrollo de las plantas. **Palabras clave:** Arabidopsis, *splicing* alternativo, SC35, eIF4A.

Abstract: Splicing factor, SC35, study under abiotic stress in *Arabidopsis thaliana*

Previous research made in the laboratory show that a brief exposure of etiolated plants to white light can alter the phosphorylation status of some proteins by using a different pathway from the classic one that involves the main photoreceptors (phyA, phyB, cry1 y cry2). Three of these proteins caught our attention: SC35, eIF4A1 and eIF4A2. SC35 is a member of the splicing regulatory family called SR (rich in serine and arginine), and it is present in green tissue. These proteins are very important because alternative splicing is a mechanism that regulates the genetic versatility and the adaptation to changing environments. Even though this family has functional redundancy, the precise impact caused by SC35 remains uncertain. In order to analyze its function we generated transgenic plants with a constitutive promoter. We demonstrated that the SC35 transcript is present in etiolated plants even though we could not see any changes on the hypocotyl length or the hook opening grown in darkness conditions. The YFP signal of p35S:SC35:YFP lines, localized inside the nucleus and high levels of the transgene generates adult plants with senescent leaves and smaller rosette area grown under continuous light and short day photoperiod. Under different types of abiotic stress, these transgenic plants that overexpress SC35, did not have a significant difference compared to WT plants. Also, we generated two transgenic lines of SC35 with its 3'UTR sequence that showed the opposite phenotype to the lines that did not have this last sequence. The p35S::YFP:SC35+3'UTR lines, grown under dark conditions showed shorter hypocotyls and closed apical hooks, compared to WT plants. Moreover, they had a normal phenotypic development in adult plants. These results suggest that the 3'UTR sequence may be important for SC35 function in plants. On the other hand, mutant plants of *eif4a1* showed short hypocotyls when grown in dark conditions that cannot be totally explained by a retarded germination time. These observations highlight the differences in the functions of these proteins that belong to families with a high degree of redundancy and opens new ways to future research in plant development

Key Words: Arabidopsis, alternative splicing, SC35, eIF4A.

Agradecimientos

Agradezco en primer lugar a Jesús, mi fé en Él me mantiene y me da fuerza todos los días.

Agradezco a mi directora, la Dra. María Agustina Mazzella, quien me abrió las puertas de su laboratorio, me dio esta gran oportunidad de comenzar una carrera científica y me transmitió todo su conocimiento. Gracias por animarme a seguir a pesar de las frustraciones casi cotidianas y por ayudarme, guiarme en cada momento y poner todo tu esfuerzo en la realización de esta tesis.

Agradezco a mi compañera Denise Arico, quien me enseñó todo en el laboratorio, me ayudó cuando no sabía qué hacer, me aconsejó y siempre estuvo atenta a cada necesidad. Ha sido para mí una gran compañera y amiga, sé que un día la voy a ver ganando los premios que se merece como la gran científica que es.

Agradezco al Intituto (INGEBI-CONICET) y quienes lo conforman, ha sido mi segunda casa durante 4 años. A la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires.

También agradecer a todos los miembros del grupo: Jorge, Mari, Franco, Diego, Laura, Julián Ana, Sofi, Flor, Fran, Noe y Nati, fue un privilegio para mi haber trabajado y compartido estos años junto a ustedes, gracias por su cariño y ayuda constante.

Agradecer también a mis compañeros de laboratorio por todos los días de trabajo compartidos que se volvían fácilmente en momentos de mucha diversión y risas: Esteban, Flor, Eva, Cristian, Carol, Marina, Fede Alfano, Fede Mirkin, Cata, Marce, Fer, Euge, Caro, Mauro y Vero.

Nunca me van a alcanzar las palabras para agradecer a mi papá y a mi mamá en primer lugar, que lo dan todo por mí. Mi familia, Bettina, Javier, Helena, Evangelina, Guillermo, Norma, Hilma, Nely, Gisel, Mario, Kevin y Michael, en todos los momentos buenos y malos siempre juntos, los amo.

Abreviaturas

PHYA-PHYE, PHYTOCHROME

CRY1-CRY3, CRYPTOCHROME

PHOT1-PHOT2, PHOTOTROPIN

miARN, microARN

COP1, CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC 1

HY5, ELONGATED HYPOCOTYL 5

PIFs, *PHYTOCHROME INTERACTING FACTORS*

NMD, NONSENSE MEDIATED DECAy

ARNm, ARN mensajero

ARN pol II, ARN polimerasa II

YFP, Yellow Fluorescent Protein

SC35, Serine/Arginine Splicing Factor

eIF, "eukaryotic INTERACTION FACTOR"

HFR1, LONG HYPOCOTYL IN FAR RED

LC-MS/MS, espectrometría de masa

GO *term*, GENE ONTHOLOGY

snARN, small nuclear ARNs

RRM, RNA recognition motifs

RS, Arginine/Serine Rich Domain

CDK-A, CYCLIN DEPENDENT KINASE A

PCR, POLYMERASE CHAIN REACTION

Blast, Basic Local Alignment Search Tool

1. Introducción

Los organismos fotosintéticos necesitan energía solar para generar alimento. A través de la fotosíntesis los organismos fotoautótrofos utilizan la luz solar como fuente de energía y la transforman en compuestos orgánicos (Stirbet *et al.*, 2020; Eberhard *et al.*, 2008). La energía almacenada en estos compuestos puede ser usada posteriormente para llevar a cabo procesos metabólicos necesarios para su crecimiento, desarrollo y supervivencia. Los cambios abióticos a los que están expuestas las plantas son de vital importancia debido a su significativo impacto en los procesos antes mencionados. Estos cambios pueden incluir factores como la temperatura, la luz, la disponibilidad de agua, los nutrientes del suelo, la salinidad, el pH y la presencia de sustancias tóxicas. Durante el estrés abiótico, las plantas pueden alterar su patrón de crecimiento y modificar la distribución de recursos (Gong *et al.*, 2020). En este contexto, la luz juega un papel crucial, ya que la calidad, la intensidad y la duración de la misma pueden influir en la respuesta de las plantas al estrés (Gavassi *et al.*, 2017; D'amico-Damião *et al.*, 2015). El estudio de los cambios abióticos en las plantas es fundamental para comprender cómo interactúan las plantas con su entorno y cómo se adaptan a condiciones desfavorables. Esta comprensión tiene aplicaciones en la ecología vegetal, la agricultura, la conservación de la biodiversidad y la respuesta al cambio climático.

1.1 Crecimiento y desarrollo en *Arabidopsis*

Arabidopsis thaliana es una planta herbácea que es considerada un organismo modelo para el estudio de la genética, biología molecular y fisiología vegetal ya que presenta un pequeño genoma distribuido en 5 cromosomas, se pueden alcanzar hasta 6 generaciones en condiciones de laboratorio en un año y existen disponibles para la comunidad científica una gran variedad de herramientas genéticas y moleculares (Meinke *et al.*, 1998).

Una de las etapas más críticas en la vida de una planta ocurre luego de la germinación, cuando la misma necesita alcanzar su estado autotrófico antes de agotar la

reserva de nutrientes presentes en la semilla (Bewley *et al.*, 2013; Mansfield & Briarty, 1996). Una planta que germina en oscuridad (etirolada) utiliza las reservas energéticas almacenadas en el endosperma para lograr el objetivo de alcanzar la luz (Tabeta *et al.*, 2022; Han & Yang, 2015). Así estas plántulas presentan un hipocotilo que crece rápidamente, la formación de un gancho apical que protege al meristema del daño mecánico durante la emergencia y cotiledones muy pequeños sin clorofila (Vandenbussche *et al.*, 2005; Sullivan & Deng, 2003). Una vez que la plántula ha alcanzado la luz, se reduce drásticamente la tasa de elongación del hipocotilo, se abre el gancho apical, se expanden los cotiledones y se desarrollan los cloroplastos donde se pone en funcionamiento la maquinaria fotosintética (Arsovski *et al.*, 2012). Una vez que la plántula superó esta etapa, el crecimiento de la planta de *Arabidopsis* se puede dividir en: desarrollo de las hojas, crecimiento de la roseta, surgimiento de las inflorescencias, floración, madurez de las silicuas y senescencia (Figura 1) (Boyes *et al.*, 2001).

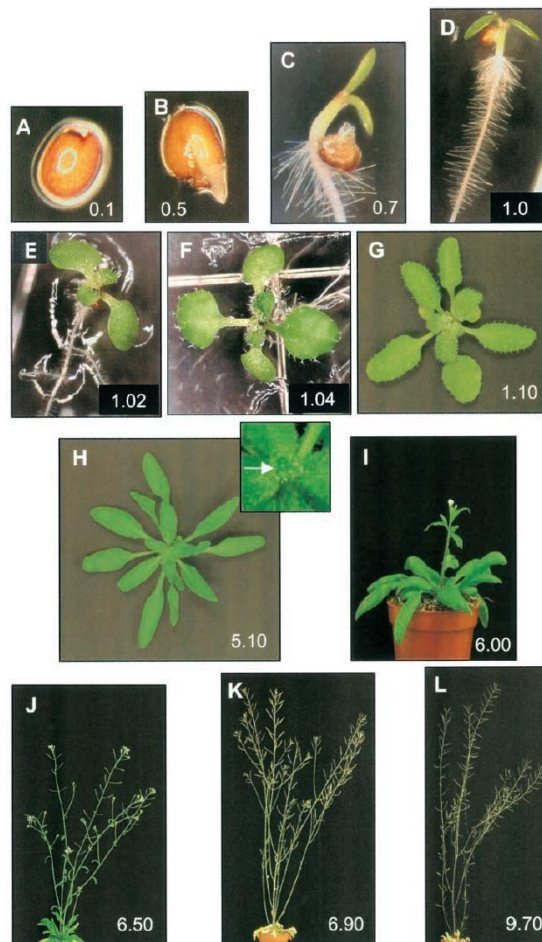


Figura 1.- Etapas del desarrollo de Arabidopsis. Etapa 0.1, imbibición (A); etapa 0.5, emergencia de la radícula (B); etapa 0.7, emergencia del hipocotilo y los cotiledones (C); etapa 1.0, apertura de los cotiledones (D); etapa 1.02, dos hojas en la roseta (E); etapa 1.04, cuatro hojas en la roseta (F); etapa 1.10, diez hojas en la roseta (G); etapa 5.10, primordios florales visibles (indicados con flecha) (H); etapa 6.00, apertura de la primer flor (I); etapa 6.50, floración media (J); etapa 6.90, floración completa (K); etapa 9.70, senescencia y cosecha de semillas (L). Adaptado de Boyes *et al.*, 2001.

1.2 Percepción de las señales lumínicas

1.2.1 Los fotorreceptores

La intensidad, calidad, dirección y duración de la luz son variables monitoreadas por las plantas para poder tener un óptimo desarrollo. La longitud de onda que pueden percibir las plantas abarca desde 280 nm a 750 nm, es decir dentro del espectro de luz visible y de la luz UV-B y UV-A (Fankhauser & Christie, 2015; Kami *et al.*, 2010) Los fotorreceptores son capaces de percibir la luz a diferentes longitudes de onda. En *Arabidopsis thaliana* existen cinco clases de fotorreceptores: los fitocromos (cinco genes *PHYA-PHYE*) que sensan la luz roja y roja lejana ($\lambda=600-700$ nm; $\lambda=700-800$ nm, respectivamente); los criptocromos (tres genes, *CRY1-CRY3*) que absorben la luz UVA/azul, las fototropinas (dos genes *PHOT1* y *PHOT2*), la familia de los fotorreceptores zeitlupe (*ZTL*, *FKF1* y *LKP2*) que sensan la luz UV-A/azul ($\lambda = 315-400$ nm); y el fotorreceptor de luz UV-B ($\lambda= 280-315$ nm) “*UV RESISTANCE LOCUS 8*” (*UVR8*) (Paik & Huq, 2019). Estos fotorreceptores regulan el desarrollo integral de la planta en cada etapa de su crecimiento.

1.2.2 El cloroplasto: sensor de señales lumínicas

Si bien la percepción de la luz a través de los fotorreceptores es la vía de señalización más conocida e importante de las plantas, existen otras vías de percepción y señalización. La conversión de la energía lumínica en energía química tiene lugar en organelas especializadas como los cloroplastos específicamente en la membrana tilacoidal a través de la acción de proteínas y pigmentos (Kirchhoff, 2019). El complejo antena es el involucrado en capturar la luz y pasarla a los centros de reacción. En un estudio reciente se encontró que altas intensidades de luz están involucradas en la

regulación de los miARN en *Arabidopsis* a través de señales que se originaron en el fotosistema II (Brzyżek *et al.*, 2022).

Los cloroplastos se consideran orgánulos semiautónomos ya que poseen ADN, ARN y ribosomas con los que pueden sintetizar proteínas (Sugita & Sugiura, 1996). Sin embargo, la información genética contenida en el cloroplasto es insuficiente para sintetizar todas las proteínas requeridas por el orgánulo y la mayoría son codificadas a partir de ADN nuclear, sintetizadas en el citosol y finalmente transportadas hacia el cloroplasto. A este fenómeno se lo llama control anterógrado (Griffin & Toledo-ortiz, 2022). Asimismo, han evolucionado mecanismos de regulación retrógrada, a través de los cuales el cloroplasto puede modular la expresión de genes nucleares que codifican para proteínas de localización plastídica, mediante el envío de señales que ejercen un control de la transcripción a distintos niveles de una red de señales retrógradas, interactuando también con otras vías de señalización celular (Yurina, 2020). Este mecanismo sucede principalmente cuando la planta se encuentra ante algún tipo de estrés tanto biótico como abiótico (Zhao *et al.*, 2019; Sun & Guo, 2016; Kwon *et al.*, 2013; Maruta *et al.*, 2012), así, el cloroplasto funciona como un sensor capaz de dirigir el control de la célula para modificar su crecimiento y desarrollo. Por otro lado, análisis de microarreglos de ARN mostraron que el impacto de las señales redox proveniente de los cloroplastos sobre la expresión de genes nucleares para proteínas plastídicas sería independiente de la vía de fotorreceptores (Fey *et al.*, 2005).

1.3 Niveles de regulación por la luz

Como se mencionó anteriormente, la percepción de la luz induce una serie de cambios fisiológicos y morfológicos que son ejecutados por las proteínas. En este sentido, la luz regula la abundancia y diversidad de las mismas desde la expresión del gen que las codifica, el transcripto que lleva la información y la traducción de las mismas. Además, la luz regula la actividad de las proteínas sintetizadas a través de diferentes modificaciones postraduccionales.

1.3.1 Regulación de la transcripción

La percepción de la luz por los fotorreceptores (principalmente phyA, phyB y cry1) produce su activación y relocalización al núcleo (Kircher *et al.*, 1999). Una vez allí se

produce la desrepresión de dos vías de la fotomorfogénesis, la primera involucra a la proteína COP1 (CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC 1), una E3 ubiquitin ligasa que ubiquitina a los factores de transcripción positivos para la fotomorfogénesis como HY5 (ELONGATED HYPOCOTYL 5) para ser degradados en oscuridad por el sistema del proteosoma 26S (Ma *et al.*, 2002; Osterlund *et al.*, 2000). La otra vía involucra una familia de factores de transcripción llamados PIFs (PHYTOCHROME INTERACTING FACTORS) que inducen la expresión de genes involucrados en el crecimiento en oscuridad y reprimen la expresión de genes inductores de la fotomorfogénesis (Wang *et al.*, 2022). Tanto los PIFs como HY5 compiten por las mismas secuencias G *box* de los promotores (Toledo-Ortiz *et al.*, 2014). Los fotorreceptores activos en el núcleo disminuyen los niveles de los PIFs y median la translocación de COP1 hacia el citoplasma (Podolec & Ulm, 2018; Osterlund & Deng, 1998). Así, la luz libera los factores de transcripción positivos de la fotomorfogénesis como HY5 de ser degradados, y libera los sitios en los promotores G *box* para que se expresen los genes involucrados en la fotomorfogénesis (Lee *et al.*, 2007; Ang *et al.*, 1998). De esta manera, se produce una reprogramación masiva de la transcripción afectando alrededor del 30% de los genes (Tepperman *et al.*, 2004; Tepperman *et al.*, 2001).

1.3.2 Regulación del procesamiento de ARNm

Una de las contribuciones más importantes a la ciencias biológicas lo constituyó el denominado Dogma Central de la Biología Molecular, según el cual *“la información genética puede ser transferida entre los ácidos nucleicos, y a partir de ácidos nucleicos a proteínas, incluyendo la replicación del ADN, transcripción de ARN y la traducción a proteína expresada en el fenotipo”* (Crick, 1970). Según este dogma cada uno de los genes que forman parte del ADN codifica la producción de una única proteína a través del flujo irreversible ADN, ARN, proteína. Sin embargo, este dogma fue cuestionado y reestructurado con nuevos conocimientos. Con el advenimiento de la secuenciación de los genomas se encontraron datos que no podían ser explicados por el dogma. Por ejemplo, el número de proteínas en el ser humano son unas veinte veces mayores que el número de genes (Wilhelm *et al.*, 2014). La información genética contenida en el ADN no se copia directamente a las proteínas, sino que, como dice el dogma, lo hace a través de un mensajero, el ARN. Este proceso de transmisión genética, sin embargo, puede dar

lugar a más de una secuencia diferente de ARN, proceso que se conoce como “*splicing* alternativo” Este mecanismo hace posible que un único gen pueda dar lugar a diferentes mensajeros y proteínas (Modrek & Lee, 2002).

En los eucariotas, el ARNm pasa por un proceso de maduración. El precursor de ARNm, llamado pre-mARN sufre por un lado el agregado de un capuchón o *cap* en el extremo 5' de un nucleótido de GTP modificado, y por otro lado un corte en el extremo 3' del transcripto con el agregado de varios nucleótidos de adenina, llamado proceso de poliadenilación. Finalmente, durante el *splicing* algunas secciones del transcripto (intrones) son removidos y las secciones restantes (exones) se vuelven a unir. Algunos genes sufren *splicing* alternativo lo que conduce a diferentes ARNm maduros a partir del mismo precursor de ARN. Así, este procesamiento de ARN puede generar diferentes variables proteicas con diferentes funciones (Kelemen *et al.*, 2013). Los cuatro mayores tipos de *splicing* alternativo son: retención de intrón, exón cassette, dador alternativo y aceptor alternativo. Pero además el *splicing* alternativo puede disminuir la expresión de un gen por la generación de isoformas de proteínas truncadas gatillando la degradación mediada por codones de terminación prematuros o NMD (del inglés, *non-sense mediated decay*) (Drechsel *et al.*, 2013; Kalyna *et al.*, 2012). Particularmente en plantas, el *splicing* alternativo es muy común afectando entre un 60 y 80 % de los genes multiexónicos (Zhang *et al.*, 2017; Marquez *et al.*, 2012).

La transcripción del ADN es realizada por la enzima ARN Pol II que forma un precursor de ARN. Evidencias moleculares, bioquímicas y genéticas mostraron que la tasa de elongación de la ARN Pol II es mayor en plantas que fueron expuestas a la luz comparadas con aquellas que permanecieron en oscuridad (Herz *et al.*, 2019). Este mecanismo sirve de control para las decisiones de las diferentes variantes por *splicing* y muestra el acoplamiento estrecho que existe entre transcripción y *splicing*. Se ha demostrado que la luz induce el *splicing* alternativo, de manera dependiente o independiente de los fotorreceptores (Cheng & Tu, 2018). En Arabidopsis, los fitocromos regulan el *splicing* alternativo (Shikata *et al.*, 2014) y esto mismo se observó para *Physcomitrella patiens* (Shih *et al.*, 2019; Wu *et al.*, 2014). Además, se han identificado numerosos factores de *splicing* que interaccionan directamente con los fitocromos (Xin *et al.*, 2017; Shikata *et al.*, 2012). Por otro lado, varias proteínas involucradas en el

procesamiento de los precursores de ARN sufren *splicing* alternativo en diferentes condiciones lumínicas como consecuencia de señales retrógradas desde el cloroplasto. Un ejemplo de esto lo constituyen los estudios sobre la proteína de unión al ARN, RS31 (Serine/Arginine rich factor 31). Se demostró que la luz, a través de una señal generada en el cloroplasto, altera las proporciones de los tres mensajeros obtenidos a partir del *splicing* alternativo de este gen. El *splicing* alternativo de RS31 ante condiciones de luz y oscuridad, no se vió afectado en mutantes de fitocromos y criptocromos descartando así la regulación de la señalización por luz a través de las vías de fotorreceptores (Petrillo *et al.*, 2014).

1.3.3 Regulación de la traducción

Una vez que el ARN mensajero llega al citoplasma el mismo es traducido en ribosomas. La traducción de las proteínas está regulada en tres fases: iniciación, elongación y terminación. El proceso de iniciación es el nivel más importante de la regulación durante este proceso. Las plantas tienen particularidades entre los eucariotas y específicamente el hecho de que sean fotoautótrofas y sésiles ha contribuido al desarrollo de sofisticados mecanismos que ajustan la traducción a sus características particulares, generando un espectro amplio de respuestas al medio ambiente (Browning & Bailey-Serres, 2015). El número estimado de factores de iniciación eIF, (del inglés *eukaryotic initiation factor*) en eucariotas está por arriba de los 16 y pueden estar formadas por una subunidad o formar parte de un complejo con varias subunidades. Se distinguen con números al grupo que pertenecen (*i.e.*, eIF2,3,4) con letras romanas mayúsculas el subgrupo dentro de un grupo (*i.e.*, eIF2A, eIF2B) y con letras griegas las subunidades (eIF2 α), (Hernández & Vazquez-Pianzola, 2005; Browning, 2004).

La iniciación de la traducción de un mensajero de ARN en el citosol utiliza el *cap* 5'm7GpppN y la cola de 3'-poly(A) junto con los eIFs que reconocen específicamente las características del inicio de la traducción. Con la asistencia de eIF4A, eIF4B, eIF4G, eIF1 y eIF1A el ribosoma comienza el escaneo desde el extremo 5'UTR y en sentido 5'-3' hasta identificar el codón de iniciación AUG (Merchante *et al.*, 2017). La dinámica de la traducción de los mensajeros citosólicos fue investigada en plantas de *Arabidopsis* crecidas bajo diferentes ciclos de luz y oscuridad (Liu *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2003). Luego de una hora de tratamientos de oscuridad se observó una reducción de los niveles de

polisomas (conjunto de ribosomas asociados a una molécula de ARN para realizar la traducción simultánea de una misma proteína) en un 17 %, consistente con una inhibición en la iniciación de la traducción de proteína. Esta inhibición fue revertida luego de una re-iluminación durante 10 min. Este estudio identificó cerca de 1600 mensajeros de ARN que fueron diferencialmente traducidos en respuesta a la luz (Juntawong & Bailey-Serres, 2012). En el mismo sentido, la luz aumenta la traducción de proteínas involucradas en la organización y función de los cloroplastos y esto se correlaciona con un mayor estatus energético de la célula bajo condiciones de luz (Chotewutmontri & Barkan, 2020; Jin *et al.*, 2018; Bruick & Mayfield, 1999). En el citoplasma el phyB interacciona con una proteína del tipo *zinc finger* que se une al extremo 5'UTR del mensajero de PORA (PROTOCHLOROPHYLLIDE REDUCTASE A) e inhibe la traducción del mismo de manera dependiente de la luz. Estos resultados ponen en evidencia que la luz, no solo actúa regulando la transcripción en el núcleo, sino que también regula la traducción de los mensajeros en el citosol (Paik *et al.*, 2012).

1.3.4 Regulación postraducciona. Fosforilación

La luz también es capaz de inducir cambios en la actividad de las proteínas a través de modificaciones post-traduccionales. Una de las modificaciones más estudiadas en respuesta a la luz ha sido la fosforilación de proteínas.

Existen varios reportes que evidencian que la luz regula el estado de fosforilación de proteínas, como fue descrito para los factores de transcripción HY5 (Hardtke *et al.*, 2000, HFR1 (LONG HYPOCOTYL IN FAR RED) (Duek *et al.*, 2004) y PIF3 (Al-sady *et al.*, 2006). Empleando técnicas de proteómica a gran escala, se identificaron cambios en el estado de fosforilación de varias proteínas en respuesta a la luz (Gao *et al.*, 2020; Ning *et al.*, 2015). Con el objetivo de identificar aquellas fosfoproteínas que sufren un cambio por la luz a corto plazo, e identificar si la señal lumínica era mediada por los cuatro fotorreceptores más importantes durante la desetiación, se llevó a cabo en el laboratorio un estudio de fosfoproteómica a gran escala (LC-MS/MS). Para esto se evaluaron 3 condiciones: plántulas de genotipo salvaje (WT del inglés *wild type*) que se desarrollaron 5 días en completa oscuridad; plantas WT que crecieron 5 d en oscuridad y fueron expuestas a 20 min de luz blanca previo a su cosecha; y plantas *phyA phyB cry1*

cry2 cuádruple mutantes cultivadas 5 días en oscuridad y sometidas al tratamiento de 20 min de luz blanca antes de su cosecha (Tesis Doctoral, Dra. Arico, 2020).

Como primer análisis se estudiaron las fosfoproteínas presentes en el tejido etiolado de *Arabidopsis*. En este tejido se identificaron 933 fosfoproteínas únicas (Arico *et al.*, 2021). Luego, se analizaron los GO terms (por *Gene Ontology*) enriquecidos en esta muestra (Arico *et al.*, 2021). Para ello se desarrolló una estrategia que consistió en confeccionar por primera vez un *set* de fosfoproteoma de referencia de *Arabidopsis* que incluía a todas las fosfoproteínas experimentalmente identificadas, más aquellas predichas y utilizar esa base de datos para comparar los *GO terms* enriquecidos en la muestra. Esta estrategia presenta la ventaja que permite identificar aquellos *GO terms* específicamente enriquecidos en una muestra de aquellos enriquecidos en el fosfoproteoma general (Arico *et al.*, 2021). La figura 2, muestra una representación gráfica de la similitud semántica entre los *GO terms* enriquecidos específicamente (CG2 y CG3) para la categoría de procesos biológicos, donde el diámetro del símbolo es directamente proporcional al porcentaje de los genes asociados a cada *GO term* que están presentes en la muestra del tejido etiolado (por ejemplo, si un dado *GO term* tiene 100 genes asociados del total del genoma, y 20 se encuentran en la muestra de estudio el porcentaje es 20%). La mayoría de los *GO terms* enriquecidos pero no específicos mostraron una proporción entre el 4 y 12% (Arico *et al.* 2021). Interesantemente, este porcentaje subió hasta el 48,5% para el *GO term* “regulación del *splicing* de ARNm, vía spliceosoma (GO: 0048024) y 42,5% para el *GO term* “regulación del *splicing* de ARN” (GO: 0043484) (Figura 2, Arico *et al.*, 2021). También se encontraron los términos “regulación del procesamiento del ARNm” (GO: 0050684) y “regulación de los procesos metabólicos del ARNm” (GO:1903311) los cuales mostraron un 38,6 y 29,5 % respectivamente de genes asociados (Arico *et al.*, 2021). También, aunque en menor medida encontramos enriquecidos los *GO terms* específicos para “procesos metabólicos del ARN” (GO: 0016071, 10,2%); y “procesos del ARN” (GO: 0006396, 8,7 %) (Figura 2).

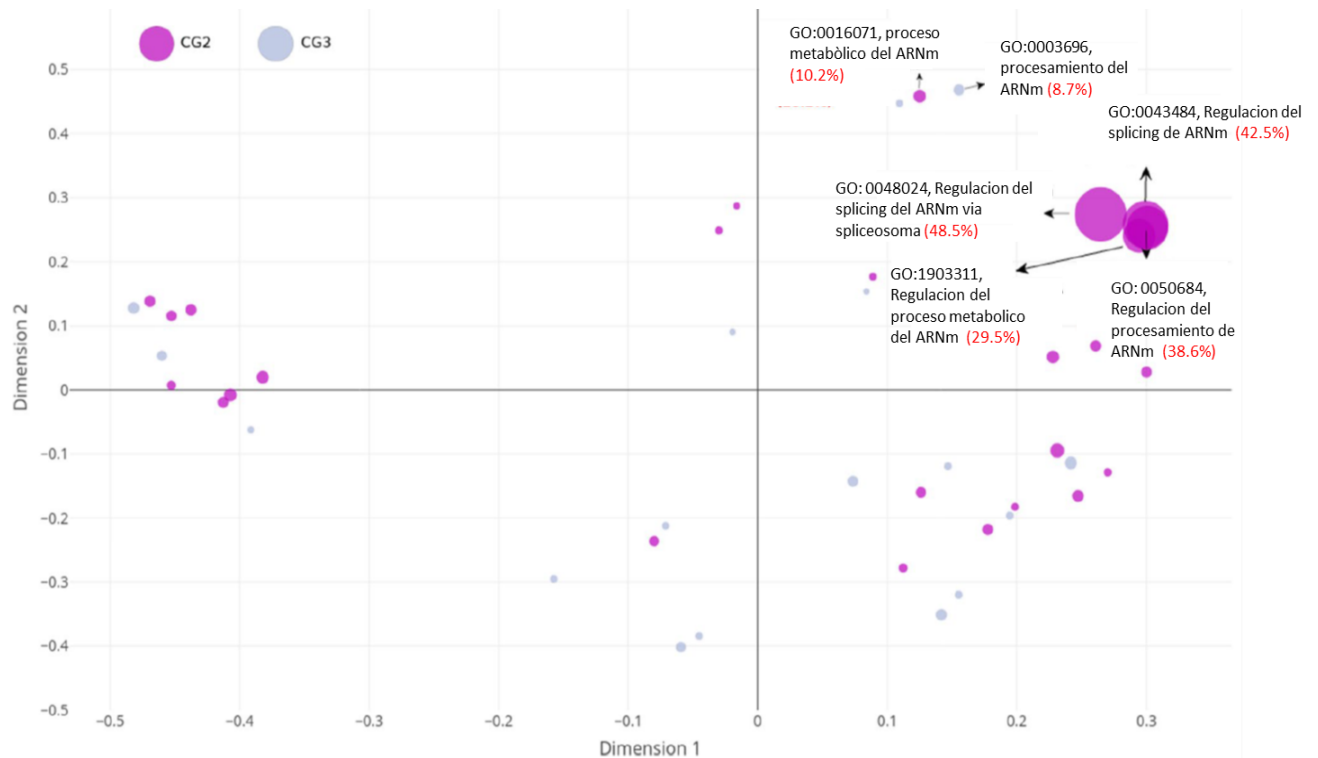


Figura 2.- Similitud semántica entre los *GO terms* específicos enriquecidos en procesos biológicos en tejido etiolado. El diámetro de los símbolos es directamente proporcional al porcentaje de los genes asociados al *GO term* presente en tejido de plántulas etioladas. Los grupos CG significan *Contrast Group*, estos fueron clasificados según el patrón de *heatmap* al que pertenecen dentro de la clasificación Procesos Biológicos y son los dos grupos en los que los *GO terms* fueron específicos para el tejido etiolado. Adaptado de Arico *et al.*, 2021.

Ochenta y un únicas fosfoproteínas fueron identificadas en estos 6 *GO terms* asociadas a los procesos de ARN y *splicing* presentados en la figura 2. En el mismo sentido y con el mismo análisis encontraron el *GO term* “unión al ARN” (GO:0003729, 16%) para la categoría de función molecular y “complejo spliceosomal” (GO: 0005681, 16,4%) para la categoría de componentes celulares (Arico *et al.*, 2021). Estos resultados sugieren que la fosforilación de factores de *splicing* está sobrerrepresentada en plantas que crecen en completa oscuridad (Arico *et al.* 2021). Interesantemente, algunos de estos factores cambiaron su patrón de fosforilación luego de 20 min de luz y será detallado más adelante.

1.4 Factores de Splicing en *Arabidopsis thaliana*

El *splicing* alternativo es catalizado por el spliceosoma, un complejo formado por pequeñas ribonucleoproteínas nucleares (del inglés *small nuclear RNAs, snRNAs*) y proteínas. Los miembros de la familia SR (Serine/Arginine rich factors, proteínas ricas en serina y arginina) son factores no snARN que forman parte del spliceosoma. Estos factores de *splicing* presentan uno o dos dominios N-terminales de reconocimiento de motivos de ARN (RRM, *RNA recognition motifs*) y un extremo C-terminal rico en argininas/serinas (dominio RS) que puede ser reversiblemente fosforilado (Kumar *et al.*, 2022; Zhang *et al.*, 2020). La unión de las proteínas SR al pre-ARNm se da a través de este dominio N-terminal que reconocen secuencias específicas en los exones. Por otro lado, el dominio RS está involucrado en la interacción proteína-proteína que promueve el reclutamiento de los componentes de la maquinaria de *splicing* cerca de los sitios de *splicing* (Shen *et al.*, 2004).

Las proteínas SR de *Arabidopsis* forman parte de una familia muy conservada de proteínas de unión al ARN. En plantas son capaces de restablecer el *splicing* en células HeLa deficientes en proteínas SR sugiriendo que el mecanismo de *splicing* está conservado en plantas y metazoos (Duque, 2011). Sin embargo, existen diferencias que los caracterizan. Por ejemplo, los intrones de plantas suelen ser más cortos y ricos en uracilo y suelen sufrir un *splicing* inadecuado en extractos de animales. De la misma manera, los intrones de origen animal no pueden ser correctamente procesados en las plantas (Wiebauer *et al.*, 1988; Van Santen & Spritz, 1987). Esto sugiere que el reconocimiento de los intrones en las plantas sería diferente. De hecho, la familia de proteínas SR ha sido muy extendida en las plantas identificando 24 miembros en arroz (Iida & Go, 2006) y 18 en *Arabidopsis* (Zhang *et al.*, 2020; Barta *et al.*, 2010) versus 12 miembros en humanos (Krainer, 2010).

En *Arabidopsis* la familia de proteínas SR puede ser dividida en 6 subfamilias como se muestra en la figura 3. Las subfamilias SR, RSZ y SC son ortólogos de mamíferos mientras que las subfamilias RS, RS2Z y SCL son específicas de plantas (Duque, 2011). Las proteínas de *splicing* se localizan en su mayoría formando agregados en el núcleo llamados *speckles* (Fang & Hearn, 2004) y en menor medida en el nucleoplasma. En cuanto a sus patrones de expresión se ha observado una gran diversificación espacio temporal.

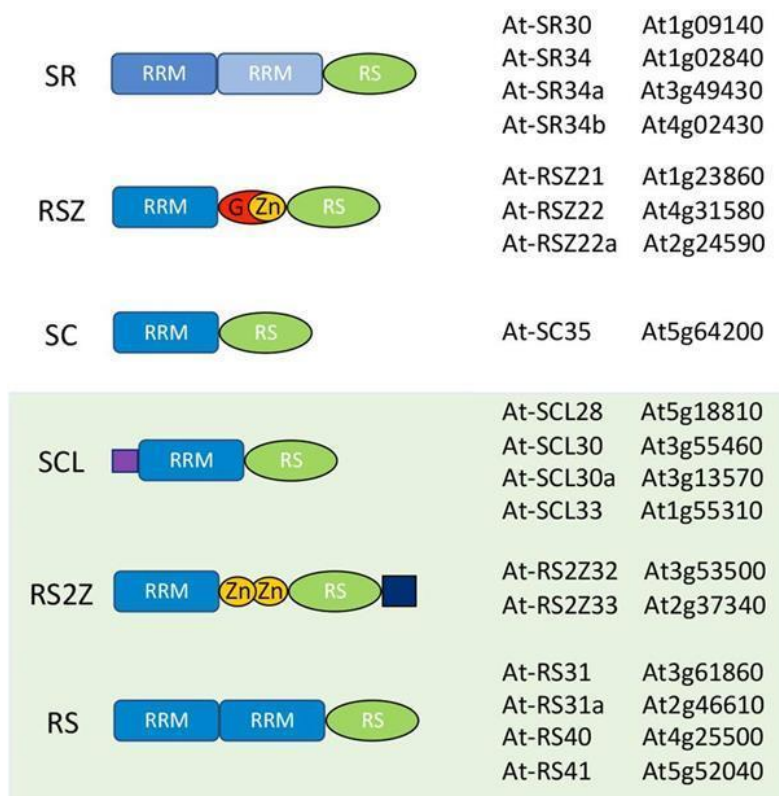


Figura 3.- Subfamilia de proteínas SR presentes en *Arabidopsis thaliana*. Las subfamilias SR, RSZ y SC, son ortólogas de humanos mientras que las subfamilias SCL, RSZ2 y RS pertenecen al reino de las plantas exclusivamente (recuadro verde). RRM: *RNA Recognition Motif*; RS: *Arginine/Serine Rich Domain*; En las columnas de la derecha se detalla el nombre de cada proteína con sus respectiva identificación. Adaptado de Melo *et al.*, 2020.

Interesantemente 7 genes que codifican para proteínas SR fueron encontrados en el fosfoproteoma etiolado de *Arabidopsis*: *SR34*, *RSZ22a*, *SC35*, *SCL30*, *RSZ233*, *RS31*, *RS40* y *RS41* (Arico *et al.*, 2021) de los cuales *SCL30*, *RSZ233*, *RS31*, *RS40* y *RS41* se encuentran entre los 10 genes SR específicos de plantas, sugiriendo que el mecanismo molecular de las proteínas SR en tejidos etiolados sería específico.

Yan *et al.* analizaron el fenotipo de 17 mutantes simples en proteínas SR crecidas bajo condiciones lumínicas de día largo (16 horas de luz/8 horas oscuridad): *scl28*, *scl30*, *scl30a*, *scl33*, *sc35*, *sr30*, *sr34*, *sr34a*, *sr34b*, *rs31*, *rs31a*, *rs40*, *rs41*, *rsz21*, *rsz22*, *rsz232*, y *rsz233*. Bajo estas condiciones no se observó ningún fenotipo poniendo en evidencia la alta redundancia de esta amplia familia de proteínas durante el desarrollo. Luego, obtuvieron las plantas cuádruple mutantes *sr* (*sr34 sr34a sr34b sr30*) y *rs* (*rs31 rs31a rs40 rs41*) y la quintuple mutante *rsz-rs2* (*rsz21 rsz22 rsz22a rsz232 rsz233*).

Nuevamente, ninguna de estas mutantes mostró fenotipo durante el desarrollo. La quintuple mutante de las subfamilias *sc35 scl* (*scl28 scl30 scl30a scl33 sc35*) sí mostró un fenotipo durante el desarrollo y será detallada más adelante (Yan *et al.*, 2017).

La función de las proteínas SR ha sido mucho menos estudiada en plantas comparadas con sus homólogos en animales (Jin, 2022; Chaudhary *et al.*, 2019). La sobreexpresión de *atSRp30* afecta no solo el *splicing* sino también el crecimiento de las plantas resultando en un retraso de la floración, reducción de la dominancia apical y flores y rosetas más grandes (Lopato *et al.*, 1999). Por otro lado, la sobreexpresión de *RS2Z33* produce mayor cantidad de embriones, cotiledones e hipocotilos más anchos, fenotipos alterados en los pelos radiculares, tricomas y mayor tamaño celular (Kalyna & Lopato, 2003). Así, la estrategia de utilizar plantas que sobreexpresan una determinada proteína SR permitió asignarle funciones enmascaradas en el estudio con mutantes.

1.4.1 Proteínas SR y el estrés abiótico

Tanto los niveles de expresión como el *splicing* de la familia de genes SR experimentan cambios ante distintos tipos de estrés (Kim & Kim, 2020). Existe evidencia que ante un estrés térmico de alta temperatura, los genes que codifican proteínas SR en *Arabidopsis* atraviesan distintos tipos de *splicing* alternativo mostrando una coordinación entre la regulación a nivel del *splicing* del pre-ARNm durante la respuesta al estrés térmico. Varios genes SR como *SR34*, *SR34a*, *RSZ22*, y *RSZ22a* sufren *splicing* alternativo constitutivo bajo un estrés térmico severo lo cual indica que el spliceosoma aún continúa en funcionamiento a pesar del estrés extremo (Ling *et al.*, 2021).

Mediante un análisis de RT-PCR en genes SR de *Arabidopsis*, se observó que los niveles de transcritos de *SCL33*, estaban reprimidos bajo estrés salino y de temperatura, así como también bajo el agregado de la fitohormona de ácido abscísico (ABA) (Yang *et al.*, 2022; Laloum *et al.*, 2021). Otro ejemplo es el de la proteína *SR45a* que inhibe la tolerancia a estrés salino en *Arabidopsis* interactuando con la proteína *CBP20* (CAP BINDING PROTEIN 20) de unión al *cap* de ARN y regula el *splicing* alternativo de transcritos involucrados en la respuesta a altas concentraciones de sal (Li *et al.*, 2021). Además, la expresión de *atSR45a* es inducida por la alta radiación de luz y el tratamiento

con alta concentración de sal, mientras que ante bajas temperaturas la expresión disminuye (Tanabe *et al.*, 2007).

La importancia y función de las proteínas de *splicing* en respuesta al estrés abiótico también se observó en otras especies como arroz, nabo (*Brassica rapa*) y mandioca (*Manihot esculenta*) (Butt *et al.*, 2022; Gu *et al.*, 2020; Yoon *et al.*, 2018).

1.4.2 Factor de splicing SC35

De las 81 fosfoproteínas relacionadas al procesamiento del ARN hallados en el tejido etiolado (Arico *et al.*, 2021), el factor de *splicing* SC35 fue el único que mostró una defosforilación diferencial luego de un pulso de 20 minutos de luz blanca, y cuya defosforilación fue independiente de la presencia de phyA, phyB, cry1 y cry2 (Figura 4).

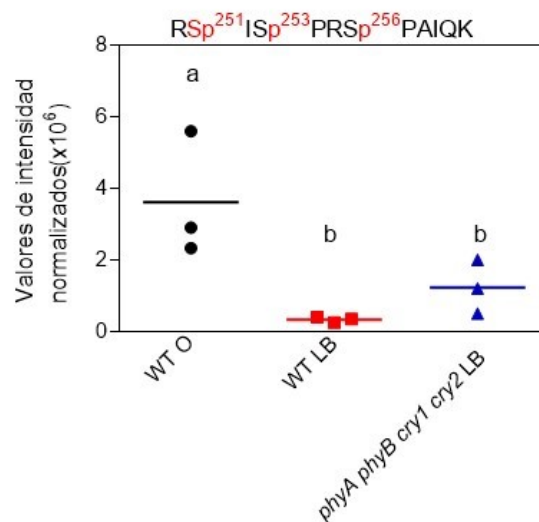


Figura 4.- SC35 se defosforila en luz. Valores de intensidades normalizados de la señal obtenidos por espectrometría de masa para la isoforma fosforilada del fosfopéptido de SC35 (n=3). (Tomados de datos de Tesis doctoral de Arico 2020. O: oscuridad; LB: 20 minutos de luz blanca).

Estudios con plantas transgénicas que portan la construcción de las secuencias regulatorias río arriba del gen SC35 fusionado al gen reportero *GUS* mostraron expresión del reportero en plántulas, hojas, silicuas e inflorescencias (Figura 5, A). Ensayos realizados con expresión transitoria de la proteína SC35 en plantas de tabaco mostraron que la localización de SC35 sería en el núcleo y formando *speckles* (Figura 5, B).

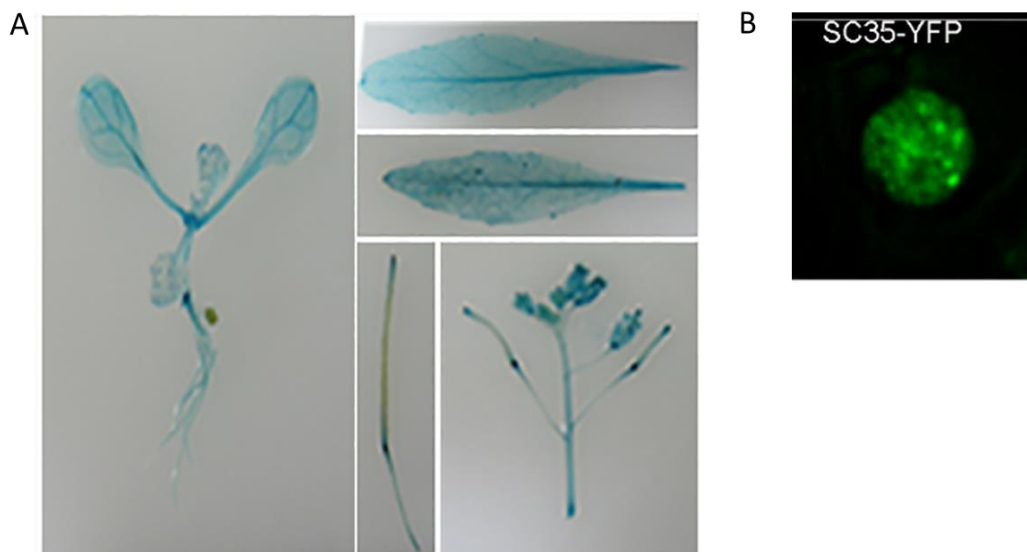


Figura 5.- SC35 tiene expresión ubicua en plantas de Arabidopsis y se localiza en núcleo. Actividad del reportero GUS en plantas transgénicas pSC35::GUS en *Arabidopsis thaliana* (A). Localización subcelular de pSC35::YFP mediante expresión transitoria en hojas de tabaco. Se evidencia la localización subcelular en *speckles* en el núcleo (B) (tomado de Yan *et al.*, 2017).

Como se mencionó en secciones previas, estudios realizados con mutantes simples *sc35* o *sc-like* en *Arabidopsis* no mostraron un fenotipo en el crecimiento o desarrollo de la planta (Yan *et al.*, 2017). Sin embargo, en plantas quintuple mutantes de las proteínas SC35 y SC35-like (SCL) (*scl28 scl30 scl30a scl33 sc35*) se observó un tiempo de floración tardío, hojas aserradas, raíces acortadas y posicionamiento de silicuas aberrante, denotando la redundancia de función entre estos factores de *splicing* (Yan *et al.*, 2017). Dado que los estudios del rol de SC35 durante el desarrollo de las plantas son relativamente escasos, y no se conoce el efecto de la fosforilación por luz decidimos estudiar el rol de esta proteína SR durante el desarrollo.

1.5 Proteínas de la familia eIF4A

Además de SC35, dos proteínas de la misma familia involucradas en la iniciación de la traducción de proteínas, aumentaron su fosforilación en respuesta a la luz y de forma independiente de los fotorreceptores. Ellas fueron eIF4A1 (por *Eukaryotic initiation factor 4A1*) y eIF4A2 (por *Eukaryotic initiation factor 4A2*) cuyas fosforilaciones fueron significativamente mayores al exponerse a la luz (Figura 6) (Tesis Doctoral Arico, 2020).

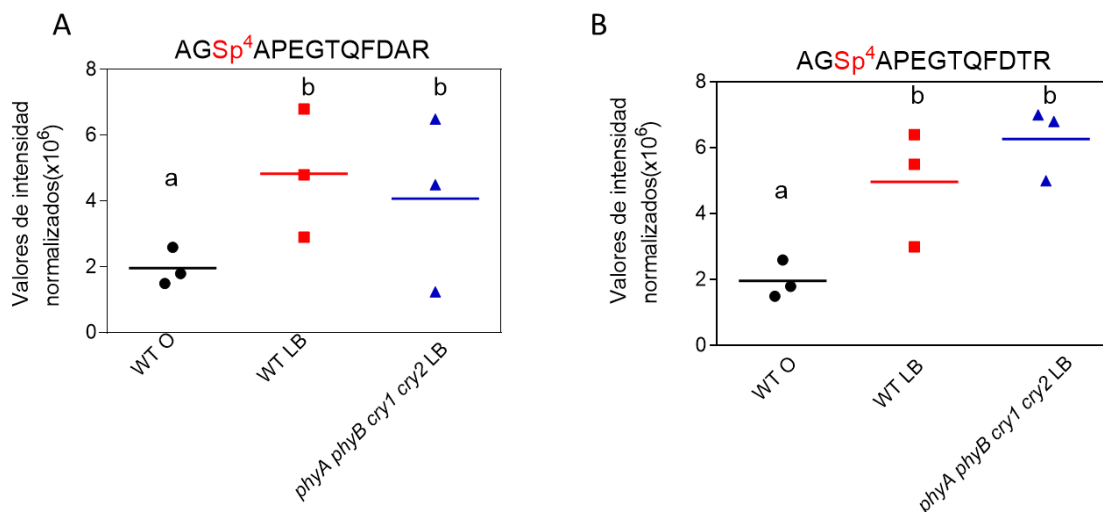


Figura 6.- eIF4A1 y eIF4A2 se fosforilan en luz. Valores de intensidad normalizados de la señal obtenidos por espectrometría de masa para las isoformas fosforiladas de los fosfopéptidos de eIF4A1 (A) y eIF4A2 (B). (Tomados de datos de Tesis Doctoral, Arico 2020).

eIF4A1 y eIF4A2 pertenecen a la familia de proteínas ARN helicasas de tipo DEAD-box y tienen entre un 90-95% de identidad en sus secuencias (Nielsen & Trachsel, 1988). Estas están involucradas en la separación de ARN doble cadena, en los rearrreglos estructurales del ARN y la unión de complejos ARN-proteína, en diferentes etapas del metabolismo del ARN como puede ser, por ejemplo, la traducción y el *splicing* del ARN (Andreou & Klostermeier, 2013). Debido a que estas dos proteínas tienen una secuencia muy similar entre ellas, no podemos decir con total certeza que en el estudio del fosfoproteoma hayan aparecido fosfopéptidos de ambas o si los fosfopéptidos pertenecen a una sola de estas proteínas, es por esto que decidimos estudiar y evaluar ambas.

Tanto eIF4A1 como eIF4A2, funcionan en un complejo de proteínas que pertenecen al sistema de iniciación de la traducción. eIF4E interactúa con el 5' *cap* del ARNm y se une a la eIF4G, cuya función es de andamiaje, la cual une el complejo helicasa eIF4A/eIF4B. La eIF4A, una proteína prototipo de la gran familia de helicasas, abre estructuras secundarias de la región 5'UTR y se recluta la unidad 43S ribosomal de

preiniciación para buscar un codón de iniciación (Dobrikov *et al.*, 2014; Andreou & Klostermeier, 2013; Bush *et al.*, 2009). En mamíferos, eIF4A1 se expresa mayormente en células en desarrollo mientras que eIF4A2 se expresa en células quiescentes. Además, poseen funciones celulares diferentes ya que eIF4A2 no rescata el fenotipo deficiente de eIF4A1 (Andreou & Klostermeier, 2013).

En plantas, ambas proteínas tienen patrones de expresión similares tanto en la raíz como en meristema apical. Las mutantes *eif4a1* tienen un fenotipo en el que los óvulos se abortan debido a una coordinación defectuosa entre el tamaño de la célula y del órgano femenino durante el desarrollo del óvulo y poseen un retraso en el crecimiento vegetativo lo que indicaría que el meristema apical se encuentra aletargado por el bajo nivel de eIF4A1. Por otro lado, las raíces de estas plantas mutantes son más cortas y con pocas raíces laterales, y se encontró que la progresión del ciclo celular estaba afectada en raíces y por ende la homeostasis del tamaño celular en ese tejido (Bush *et al.*, 2015).

eIF4A1 puede ser fosforilado en tres fosfopéptidos y eIF4A2 en cuatro fosfopéptidos, durante el comienzo de la fase mitótica, por la Cdk-A (*cyclin-dependent kinase A*) y frente a un estrés térmico o hipoxia (Bush *et al.*, 2016; Webster *et al.*, 1991). Además, se vió que eIF4A1 y eIF4A2 pueden ser fosforilados en hojas maduras y puede estar regulada por la luz y la oscuridad (Jossier *et al.*, 2013).

SC35 y eIF4A1 y 2 fueron las proteínas base de este estudio ya que los factores de *splicing* y de iniciación de la traducción son claves en la regulación de la expresión genética. Además, existen muy pocas evidencias de sus funciones, principalmente por la dificultad de trabajar con proteínas pertenecientes a una familia funcionalmente redundante como estas. Por lo tanto, decidimos comenzar con la caracterización de estas proteínas generando plantas sobreexpresantes. También nos propusimos estudiar el efecto de las fosforilaciones en estas proteínas mediante estudios con plantas transgénicas. Cuando comenzamos el clonado de estas versiones comenzó el aislamiento social obligatorio con lo que pude retomar los clonados en marzo de 2022, sumado a que solo tuve 4 años de beca en lugar de 5, que finalizó en marzo 2023 por lo que estas plantas no se encuentran finalizadas para su estudio.

2. Hipótesis y objetivos

Objetivo General:

El objetivo general del trabajo es estudiar la participación de proteínas de unión al ARN e iniciación de la traducción durante el desarrollo de Arabidopsis y su participación frente a condiciones de estrés.

Hipótesis:

Una hipótesis asociada a este objetivo fue que la proteína de *splicing* SC35 participa en la modulación del crecimiento y desarrollo en Arabidopsis y que modulan la respuesta al estrés abiótico. Como segunda hipótesis planteamos que SC35 se expresa en tejido etiolado y podría tener una función en las respuestas típicas de la escotomorfogénesis. Nuestra tercera hipótesis se basa en que la secuencia 3'UTR del gen SC35 puede modular la estabilidad de sus transcritos y su función. Como cuarta hipótesis planteamos que las proteínas eIF4A1 y eIF4A2 tienen un rol en etapas tempranas del desarrollo de Arabidopsis.

Objetivos Específicos:

1. Investigar la participación del factor de *splicing* SC35 en etapas tempranas del desarrollo de Arabidopsis;
2. Investigar la participación del factor de *splicing* SC35 en etapas tardías del desarrollo de Arabidopsis;
3. Estudiar la participación del factor de *splicing* SC35 en diferentes tipos de estrés abiótico;
4. Evaluar el rol de la secuencia 3'UTR de SC35;
5. Estudiar la participación de dos proteínas involucradas en la iniciación de la traducción eIF4A1 y eIF4A2 en etapas tempranas del desarrollo de Arabidopsis.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Material vegetal.

Este trabajo se realizó en plantas de la especie *Arabidopsis thaliana*. Se utilizaron semillas de ecotipo Columbia. Las líneas mutantes por inserción de T-ADN fueron obtenidas del *Arabidopsis Biological Resource Center* (ABRC, Ohio, EE.UU). Estas fueron *sc35* (SALK_033824), *eif4a1* (SALK_201518) y *eif4a2* (SALK_051038).

Las líneas transgénicas estables generadas en esta tesis fueron las siguientes (más adelante se detalla el procedimiento por el cual fueron obtenidas):

- *p35S::YFP* (pH35GS)

- *p35S::SC35::YFP* (líneas independientes 1, 2 y 3) (plásmido: pH35GY)

- *p35S::YFP::SC35+3'UTR* (líneas independientes 1 y 2) (plásmido: pH35YG)

- *p35S::EIF4A2-YFP* (línea independiente 1) (pH35GY)

Los vectores pH35GY y pH35YG se describen en (Kubo *et al.*, 2005).

3.1 Estudio *in silico* del gen *SC35*

Para la construcción del *heatmap* de expresión del gen *SC35* en el transcriptoma de plántulas etioladas, se bajaron los datos provistos por 6 ensayos realizados por: Michaelis *et al.*, 2019, Hartmann *et al.*, 2016, Pérez-Martín *et al.*, 2021, Pfeiffer *et al.*, 2014, Liu *et al.*, 2021 y Li *et al.*, 2020.

El análisis filogenético de las secuencias proteicas se llevó adelante con el software MegaX. Se utilizó el método de “*Maximum likelihood*”, con 100 réplicas de *bootstrap*. Se compilaron datos de RNAseq de plántulas de *Arabidopsis* crecidas en oscuridad desde *Gene Expression Omnibus* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>). Los valores expresados como RPKM/FPKM fueron transformados en TPM según las siguientes ecuaciones:

$$TPM = \frac{\text{counts / largo transcripto}}{\sum (\text{counts / largo transcripto})} * 10^6 \quad \text{ó} \quad TPM = \frac{RPKM}{\sum RPKM} * 10^6$$

Para cada gen se promedió el valor de TPM de las distintas réplicas de cada tratamiento/set de datos. El valor de *fold* se calculó según la siguiente ecuación:

$$Fold = \frac{\text{máx}(TPM_{\text{tratamiento}}; 1)}{\text{máx}(TPM_{\text{control}}; 1)}$$

3.2 Condiciones de crecimiento de las plantas.

La esterilización de semillas de los genotipos WT, mutantes y transgénicas se realizó durante 2 hs en una atmósfera de Cl₂ generada a partir de la adición de 2,5 ml de HCl 37% a 75 ml de una solución de NaClO (lavandina comercial de 44 g/l). Luego, se sembraron en condiciones de esterilidad, cajas de Petri con medio basal *Murashige & Skoog* (MS) 0,5X y pH 5,75. Estas fueron mantenidas en oscuridad a 4°C durante 2 días para reducir la dormición de las semillas (estratificación). Una vez realizado esto, se indujo la germinación mediante un pulso de luz blanca durante 2 hs a 22°C y, luego de 24 hs de oscuridad a 22°C, se expusieron a luz continua (100 μm m⁻²s⁻¹) o permanecieron en oscuridad y bajo fotoperiodo día corto, según el experimento (se detallará en cada caso).

3.3 Ensayos de biología molecular.

3.3.1 Genotipificación de plantas mutantes por inserción de T-ADN

Para verificar los genotipos de las plantas mutantes por inserción de T-ADN (*sc35*, *elf4a1* y *elf4a2*) y así seleccionar las plantas homocigotas mutantes se siguieron los protocolos que se describen a continuación.

3.3.1.1 Extracción de ADN genómico de plantas de Arabidopsis

Se cortó una hoja de una planta con 6 o más hojas en su roseta y se homogeneizó en un microtubo de 1,5 ml con un émbolo de cabeza cónica. Se agregaron 300 µl de *buffer* de lisis al homogenato y se continuó homogeneizando brevemente. Las muestras se incubaron a 65°C durante 10 min y luego se dejaron antes del agregado de 300 µl de cloroformo. Las muestras se agitaron por inversión 5-10 veces y se centrifugaron 5 min a 10.000 *g*. Se tomaron 200 µl de los sobrenadantes, se transfirieron a tubos nuevos conteniendo 200 µl de isopropanol y nuevamente se mezclaron por inversión. Las muestras se centrifugaron por 10 min a 10.000 *g*. Los sobrenadantes se descartaron y los pellets se lavaron con 500 µl de etanol 70%. Para eliminar el etanol, las muestras se centrifugaron 5 min a 10.000 *g* y los sobrenadantes se descartaron con pipeta automática. Los pellets se dejaron secar a temperatura ambiente antes del agregado de agua. Las muestras se conservaron a – 20 °C.

➤ *Buffer* de lisis: 2% Bromuro de hexadeciltrimetilamonio, 1% polivinil pirrolidona, 100 mM Tris-HCl pH 8, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA.

3.3.1.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

A partir del ADN genómico extraído de las plantas a genotipificar, se realizaron amplificaciones de fragmentos de los genes de interés mediante la técnica de PCR utilizando la polimerasa Taq (Invitrogen, California, USA). Se diseñaron dos oligonucleótidos iniciadores o *primers* específicos para la secuencia flanqueante a la inserción. Para determinar la presencia del alelo WT (sin la inserción) o mutante (con la inserción) se efectuaron dos reacciones de PCR en paralelo. La primera reacción con los *primers* LP + RP genera una banda en plantas WT y heterocigotas. La segunda reacción con los *primers* RP + LBa1 o LBb1.3, genera una banda de peso molecular menor que la de LP + RP en plantas homocigotas mutantes y heterocigotas. La estrategia de genotipificación está basada en signal.salk.edu/tdnaprimers.2.html.

3.3.1.3 Electroforesis en geles de agarosa.

Para la separación y visualización de los ácidos nucleicos (ARN, ADN y ADNc) se realizaron electroforesis en geles de agarosa 1-1,5 % en TAE 1X conteniendo bromuro de etidio 0,5

µg/ml. Las muestras de ADN se sembraron con *Buffer* de siembra 6x. En el caso de ARN, se preparó una mezcla de ARN:*Buffer*:formamida en relación 1:1:1. Las corridas se realizaron a 80 V constante en TAE 1X.

➤ *Stock* de TAE 50X: 242 g de Tris Base, 57,1 ml de ácido acético glacial y 100 ml de EDTA 0,5 M pH 8 en 1 L de agua destilada. Para preparar los geles y llevar adelante las corridas, el *buffer* se diluyó 50 veces.

➤ *Buffer* de siembra 6x: Azul de bromofenol (BPB) 0,25% (p/v), xilencianol 0,25% (p/v) y glicerol 30% (v/v) en agua.

3.3.1.4 Extracción de ARN con *Kit* QIAGEN y síntesis de ADNc

Las plántulas fueron cosechadas, congeladas en N₂ líquido y pulverizadas con mortero. Para cada muestra se partió de 200 mg de material vegetal. La extracción de ARN se llevó a cabo usando el *RNeasy Plant Mini Kit* (QIAGEN, Alemania) siguiendo las instrucciones de los fabricantes. Se corroboró la integridad del ARN por gel de agarosa y se estimó su concentración por absorción de UV a 260 y 280 nm utilizando un *Nanodrop*. Para la síntesis de ADNc se utilizaron 2 µg de ARN previamente tratados durante 15 min con DNasa RQ1 RNasa-Free (Promega, Madison, WI, USA). La transcripción reversa se llevó a cabo con 2 µg de ARN para cada muestra en un volumen total de 20 µl de reacción utilizando *primers* oligodT y la enzima *Super-Script IV* siguiendo las instrucciones del fabricante (Invitrogen).

Las muestras se guardaron a -80°C hasta el momento de su uso.

3.4.1.5 Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR)

A partir de ADNc sintetizado de ARN de plántulas etioladas, WT y *sc35*, se amplificó un fragmento de 300 pb utilizando la polimerasa Taq y como control de expresión del gen se amplificó el mismo fragmento pero con un intrón en su secuencia. Para esto se diseñaron dos oligonucleótidos iniciadores específicos de una breve secuencia del gen. Luego, se realizó una PCR en el termociclador Bio-Rad (*T100 Thermal Cycler*) para finalmente chequear el resultado en un gel de agarosa 1% con las especificaciones mencionadas anteriormente.

3.4. Generación de plantas transgénicas

3.4.1 Clonado por recombinación *Gateway*.

Los clonados realizados se basaron en el locus completo de *SC35*, *eIF4A1*, *eIF4A2* y el gen de *SC35* con su región 3'UTR en el vector pENTR-D-TOPO (en los sitios NotI y Ascl). Una vez obtenidas las construcciones de interés, se generaron vectores binarios por recombinación *Gateway*[®] con la enzima LR recombinasa basado en el protocolo propuesto por los fabricantes (*Invitrogen, California, USA*). Los vectores de entrada pENTR-D-TOPO se recombinaron con los vectores de destino binarios pH35GY, pH35YG y pH35GS.

3.4.1.1 Amplificación de secuencias por PCR.

Las secuencias de *SC35*, *SC35+3'UTR*, *EIF4A1* y *EIF4A2*, se amplificaron con la enzima polimerasa Q5 (*New England Biolabs, Massachusetts, USA*), de acuerdo al protocolo sugerido por el fabricante y con los buffers suministrados. En cada reacción se utilizaron 30-100 ng de ADN como molde, 1X buffer, 0.5 μ M de cada *primer*, 200 μ M dNTPs totales (50 μ M de cada uno) y 1 unidad de ADN polimerasa Q5, en 50 μ l de volumen de reacción. El protocolo de PCR fue de 3 min a 95°C (desnaturalización inicial), seguidos de 35 ciclos 30 seg a 95°C, 30 seg a la temperatura de annealing para cada par de *primers* (T_a), 30 seg/kB a 72°C y una extensión final de 5 min a 72°C. Para el cálculo de la T_a , en todos los casos se calculó la temperatura de melting (T_m) de cada primer utilizando el sitio web idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer y se utilizó una T_a 5°C menor que la del primer con menor T_m . Los productos de PCR se analizaron por electroforesis.

3.4.1.2 Restricción de insertos y vectores.

Los productos de PCR y vector pENTR-D-TOPO fueron digeridos con las enzimas de restricción NotI-HF y Ascl (*New England BioLabs*), siguiendo las condiciones sugeridas por los fabricantes. Los vectores de clonado digeridos fueron además tratados con la enzima fosfatasa alcalina termosensible TSAP siguiendo las instrucciones del fabricante (*Promega, Madison, WI, USA*). La TSAP remueve el grupo 5'-fosfato del ADN, impidiendo su recircularización y religación.

3.4.1.3. Purificación de insertos y vectores.

Los productos de PCR y vectores digeridos se identificaron por electroforesis en gel de agarosa en buffer TAE 1X. Las bandas correspondientes al peso deseado se cortaron del gel de agarosa con hoja de bisturí y el ADN se purificó utilizando el *kit* comercial *QIAEXII Gel Extraction Kit* (QIAGEN, Alemania) de acuerdo al protocolo del fabricante.

3.4.1.4 Ligaciones inserto - vector.

Las secuencias amplificadas por PCR y los productos de restricción (insertos o vectores) purificados fueron ligados con la enzima T4 ligasa (*Promega, Madison, WI, USA*). Se utilizaron de 20 a 100 ng de vector en reacciones molares inserto:vector 3:1 para las 3 construcciones. Se utilizaron 10 unidades de enzima en un volumen final de reacción de 10 µl. Las reacciones se incubaron a 4°C durante toda la noche.

3.4.1.5 Transformación de células electro-competentes.

Se utilizaron 50 µl de bacterias electrocompetentes (*E. coli* cepa DH10β) y 1 o 2 µl de muestra de ADN por cada transformación. Se mezclaron las bacterias y el ADN y se traspasó a una cubeta de electroporación de 0,1 cm de paso, previamente enfriada. La cubeta se colocó en el electroporador *Micro pulser* (*Bio-Rad, California, USA*) y se dio un pulso a 1,8 kV. Inmediatamente se agregó 250 µl de SOC (2% peptona, 0,5% extracto de levadura, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂ y 20 mM glucosa), las bacterias se resuspendieron suavemente y se incubaron durante 1 hora a 37°C. Luego, se rastrillaron 50 y 100 µl de la solución bacteriana en placas de Petri con LB conteniendo 1% de agar (LB agar) y el agente selectivo requerido en la concentración adecuada.

Los cultivos líquidos de *E. coli* se incubaron a 37°C en medio LB (peptona de carne 10 g/l, extracto de levadura 5 g/l, y NaCl 5 g/l) con agitación a 250 revoluciones por minuto (rpm). Los cultivos sólidos se realizaron en medio LB agar en cajas de Petri. De acuerdo con la resistencia conferida por cada vector, el medio de cultivo se suplementó con kanamicina (50 mg/l) y espectinomicina (100 mg/l).

3.4.1.7 Confirmación de clones positivos.

Se analizaron al menos 10 colonias de las placas de transformación mediante PCR. Como muestra de ADN se repicó con palillo cada colonia dentro de cada reacción de PCR (colony

PCR). Se utilizó la enzima Taq Polimerasa Recombinante (Invitrogen, Brasil) y los mismos primers específicos indicados para amplificar el inserto. Las condiciones de reacción fueron 1X *buffer* (conteniendo 1.5 mM MgCl₂ final), 0.5 μM de cada primer, 200 μM dNTPs totales (50 μM de cada uno) y 1 unidad de Taq, en 15 μl de volumen de reacción. El protocolo de PCR fue de 5 min a 95°C (desnaturalización inicial), seguidos de 35 ciclos 30 seg a 95°C, 30 seg a la Ta específica para cada par de primers, 1 min/kB a 72°C y una extensión final de 10 min a 72°C.

3.4.1.8. Purificación de plásmidos a partir de colonias bacterianas (Miniprep).

Las colonias que contenían las construcciones apropiadas se repicaron en medio fresco para purificar los plásmidos que portaban. Los cultivos se incubaron durante 16 horas a 37°C en un tubo de 15 ml tipo Falcon con 4 ml de medio LB líquido suplementado con el antibiótico correspondiente. Al día siguiente, los cultivos se centrifugaron a temperatura ambiente durante 10 minutos a 3500 g. El pellet de células fue resuspendido en 100 μl de solución GTE (50 mM glucosa; 25 mM Tris-Cl, pH 8; 10 mM EDTA) y se dejó reposar durante 5 minutos a temperatura ambiente. Luego se agregaron 200 μl de solución de lisis (0,2 N NaOH; 1 % P/V de dodecilsulfato sódico), preparada inmediatamente antes de ser utilizada. Se mezcló por inversión y se incubó en hielo durante 5 minutos. Una vez transcurrido el tiempo se agregaron 150 μl de solución de neutralización (acetato de potasio 5M pH 4,8), se mezcló por inversión y se incubó en hielo durante 5 minutos. Transcurrido el tiempo de incubación, se centrifugó a 10.000 g durante 3 minutos para sedimentar los restos celulares y el ADN no plasmídico. Se tomaron 400 μl del sobrenadante y se transfirieron a un tubo de microcentrífuga limpio, se agregó 1 μl de enzima ARNasa A (20 ng/ml) y se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos. A continuación, se precipitó el ADN con 0,8 ml de etanol 96% y se incubó durante 2 minutos a temperatura ambiente. Luego se centrifugó durante 10 min a 10.000 g. Se descartó el sobrenadante, se lavó el sedimento con 1 ml de etanol 70 % y se centrifugó nuevamente la muestra durante 1 minuto a 10.000 g. El sobrenadante se descartó y el pellet se dejó secar a 37°C durante 10 minutos. Una vez seco, se resuspendió el pellet en 50 μl de agua, obteniendo entonces una solución de ADN plasmídico purificado.

Tanto para los clonados como para la confirmación de las construcciones, se corroboró la presencia de los insertos de interés mediante la digestión con las mismas

enzimas de restricción previamente utilizadas para el clonado y electroforesis en geles de agarosa 1%.

3.4.1.9 Secuenciación de las construcciones plasmídicas.

Una vez obtenidos los plásmidos y chequeados por *colony*PCR y corte por restricción, se corroboró la secuencia de los insertos de interés mediante secuenciación en *Macrogen Inc.*, Corea del Sur. Los análisis de secuencias obtenidas se realizaron utilizando el sitio web *BLAST* (*Basic Local Alignment Search Tool*) (blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi).

3.4.2 Conservación de cepas bacterianas.

En el caso de clones bacterianos positivos, se mezcló en un tubo Eppendorf un volumen de cultivo crecido durante toda una noche con una solución de glicerol estéril, hasta alcanzar una concentración final de 10-20% de glicerol. Los stocks bacterianos se guardaron a -80°C.

3.4.2.1. Cepas y condiciones de cultivo de *Agrobacterium tumefaciens*.

Se utilizaron las cepas EHA105 o GV3101 de *Agrobacterium tumefaciens* para transformar *Arabidopsis thaliana*. GV3101 tiene resistencia genómica a rifampicina y gentamicina. Los cultivos de *A. tumefaciens* se realizaron en medio LB suplementado con rifampicina (50 mg/l) y los antibióticos correspondientes a los vectores de interés en presencia de gentamicina (30 mg/l). Los cultivos se incubaron a 28°C con agitación (250 rpm) durante toda la noche.

3.4.2.2 Transformación de bacterias *Agrobacterium tumefaciens*.

Una alícuota de 1,5 ml de cultivo de *A. tumefaciens* crecido toda la noche a 28°C en medio LB suplementado con los respectivos antibióticos fue centrifugado durante 5 min a 2.800 g. El pellet fue lavado con 1 ml de agua estéril. La centrifugación y lavado se repitió sucesivamente con 500 µl y 250 µl de agua. Luego de una última centrifugación, se resuspendió en 150 µl de agua. Se transfirieron 50 µl de bacterias y 1-2 µl de ADN a una cubeta de electroporación. La electroporación se llevó a cabo en un electroporador Micro pulser (Bio-Rad, California, EE.UU.) y se aplicó un pulso de 2,5 kV con capacitancia

de 25 μ F y una resistencia de 600 Ω . A continuación se adicionó 1 ml de medio LB, se lo pasó a un microtubo de 1,5 ml y se incubó durante dos horas a 28°C. Transcurrida la incubación se realizó una centrifugación de 5 minutos a 2.800 g a temperatura ambiente, el pellet de células se resuspendió en 100 μ l de medio LB y finalmente se sembró en placas de medio LB sólido que contenían 50 mg/l de rifampicina, 30 mg/l de gentamicina y el antibiótico específico según la resistencia que confiere el vector. Las placas se incubaron durante dos días a 28°C.

3.5 Obtención de plantas transgénicas.

3.5.1 Transformación de plantas de *Arabidopsis thaliana*.

La transformación de plantas de *A. thaliana* se realizó mediante la técnica de “floraldip”. Se cultivaron bacterias *A. tumefaciens* transformadas con los distintos plásmidos binarios en 5 ml de LB líquido con los antibióticos adecuados a 28°C durante dos días. Se agregó 1 ml de este cultivo a 100 ml de medio LB líquido con los antibióticos correspondientes, y se incubó a 28°C por una noche, hasta llegar a una DO600 cercana a 2. Se cosecharon las células por centrifugación a 5.000 g durante 7 minutos a temperatura ambiente y se resuspendieron en un medio con 5 % (p/v) sacarosa, 5 mM MgCl₂ y 0.05% (v/v) de Silwet L-77. Las inflorescencias de plantas de *A. thaliana* regadas el día anterior fueron sumergidas en la suspensión de células durante 30 segundos. Luego de escurrir el exceso de medio de cultivo, se colocaron las plantas en posición horizontal dentro de bolsas plásticas para conservar la humedad. Luego de 24 horas se sacaron de las bolsas y se prosiguió con el cultivo en la cámara de crecimiento hasta la maduración de las semillas.

3.5.2 Selección de plantas transgénicas.

Las líneas transgénicas que portan construcciones en los plásmidos, pH35GY, pH35YG y pH35GS fueron seleccionadas en placas de MS 0.5X con agar 0,8% y el antibiótico Higromicina 50 mg/l. Las líneas independientes obtenidas fueron confirmadas mediante la visualización de señal de YFP en el microscopio en su segunda generación T2 y se llevaron a homocigosis hasta llegar a la generación T3.

3.6 Medición del largo de hipocotilo y ángulo del gancho apical

Tanto la medición del largo de hipocotilo como del ángulo del gancho apical se realizó utilizando el programa *Image J (Fiji)*. En particular el gancho apical se midió realizando el trazo de dos líneas que formaban un ángulo entre el extremo del hipocotilo y el extremo de los cotiledones para luego obtener el dato del ángulo de forma automática.

3.7 Cuantificación del área de roseta

Mediante el uso de la herramienta *ImageJ(Fiji)* se analizaron fotos aéreas de plantas crecidas en tierra de los distintos genotipos utilizados para los ensayos de evaluación de fenotipo. Se aplicó la herramienta *ROI (REGION OF INTEREST)* marcando cada roseta y calculando de forma automática el área de las mismas. Cada medición representa una réplica biológica.

3.8. Ensayos fisiológicos.

3.8.1 Ensayo de estrés por alta temperatura

Para medir el largo de hipocotilo y de raíz, las semillas (genotipos especificados en cada experimento) fueron sembradas en placas de Petri cuadradas de 12x12 cm, con MS 0,5X y 0,8% de agar, para luego mantenerlas durante 3 días a 4°C en completa oscuridad. Se realizó un pulso de luz blanca para inducir la germinación, se guardaron en oscuridad (envueltas en papel aluminio) verticalmente a 22 °C. Pasado un día, se colocaron las placas en el tratamiento a 30°C, tanto en luz como en oscuridad y luego de 7 días se midieron los hipocotilos de 10 plántulas de cada genotipo en cada placa y se calculó la media, las cuales se consideraron una réplica biológica cada una, repitiendo este procedimiento como mínimo 3 veces.

3.8.2. Ensayo de estrés por baja temperatura

Para medir el largo de raíz a baja temperatura, se sembraron semillas (genotipos especificados en cada experimento) en placas de Petri cuadradas de 12x12 cm, con MS

0,5X y 0,8% de agar para luego guardarlas 2 días a 4°C en oscuridad. Se realizó un pulso de luz blanca para inducir la germinación, se guardaron en oscuridad (envueltas en papel aluminio) verticalmente a 22 °C. Pasado un día, se colocaron las placas en la cámara de cultivo a 22°C bajo luz continua durante 5 días. Una vez transcurrido este tiempo se colocó la mitad de las muestras en una cámara con luz continua a 0°C durante 5 días más, realizando previamente una marca del largo de raíz previo al tratamiento. Tanto a 22° como a 0°C, se midió el largo de la raíz, post-tratamiento, de 10 plántulas de cada genotipo en cada placa y se calculó la media, las cuales se consideraron una réplica biológica cada una, repitiendo este procedimiento como mínimo 3 veces.

3.8.3 Ensayo de estrés salino

Para los ensayos de largo de hipocotilo y raíz frente a estrés salino, se sembraron semillas (de los genotipos especificados en cada experimento) en cajas de Petri con MS 0,5X con agar 0,8 %, para después mantenerlas durante 3 días a 4°C en completa oscuridad. Luego del pulso de luz blanca para inducir la germinación, se guardaron en oscuridad (envueltas en papel aluminio) a 22 °C. Al cabo de 5 días de oscuridad, se traspasaron 10 plántulas de cada genotipo a hacia placas de Petri cuadradas de 12x12cm, con MS 0,5x, 0,8% agar y NaCl 0, 50mM, 100mM y 150mM. Se midieron el largo del hipocotilo y de la raíz en 10 plántulas de cada genotipo en cada placa y la media de dichas mediciones se consideró una réplica biológica. Cada tratamiento se realizó como mínimo por triplicado.

3.8.4 Estadística en ensayos fisiológicos y de oscuridad

Los datos se analizaron mediante t-test o Análisis de la Varianza (ANOVA) de 1 o 2 factores según corresponda (se indica en cada experimento), seguidos de la prueba a posteriori de Tuckey para comparaciones múltiples. La homocedacea de los datos se comprobó mediante la prueba de Levene's y la Normalidad se ensayó mediante la Prueba Shapiro-Wilks modificada. El análisis estadístico de los resultados fue realizado usando el programa *GraphPad Prism* versión 6.00 (*GraphPad Software*, La Jolla California, EE.UU.). Los resultados obtenidos en todos los experimentos se muestran como media \pm error

estándar. En los casos donde se evaluaron las desviaciones de frecuencias esperadas, se utilizó la prueba χ^2 .

3.9 Microscopía Confocal.

Los análisis de localización subcelular de las proteínas de fusión SC35-YFP y YFPSC35+3'UTR fueron realizadas con el microscopio confocal Leica SPE. Parámetros de configuración: Láser de excitación: 488nm. Longitud de onda de emisión: 530nm. Objetivos de inmersión en aceite: 40X/AN 0.8, (AN es la apertura numérica). Ganancia: 750-850. Las imágenes se tomaron en dos canales: uno para la detección de la señal YFP y el otro para la detección de DAPI, que se excita con láser de 488nm y se detecta en una ventana de 600 a 700 nm. En los casos que se realizó la adquisición de imágenes en XYZ (*stack*), se tomaron 30 secciones consecutivas cada 1,5 μ m.

3.9.1 Cuantificación intensidad de fluorescencia

Para medir la intensidad de fluorescencia de los núcleos que expresan SC35 junto al tag de YFP, se utilizó el programa *ImageJ (Fiji)* en el cual se procesaron las imágenes de la siguiente forma: en primer lugar se generó una máscara binaria con el propósito de marcar el contorno de cada núcleo. Para esto se aplicó un filtro gaussiano para remover el ruido. Una vez terminada la máscara se aplica el análisis de partículas para delimitar cada núcleo que será incluido en el ROI manager para cuantificar la fluorescencia de YFP.

4. Resultados

4.1 Estudio *in silico* de SC35.

De acuerdo al estudio realizado por Yan *et al.*, 2017, SC35 se expresa en tejidos verdes. Por otro lado, en el trabajo realizado por Arico *et al.*, 2021 se detectó la presencia de la fosfoproteína de SC35 en tejido etiolado (Figura 4). Teniendo en cuenta que no hay reportes de la expresión de SC35 en tejido etiolado decidimos como primera aproximación realizar un estudio *in silico* de su expresión con los datos disponibles en el *ePlant Browser* de la Universidad de Toronto (<http://bar.utoronto.ca/eplant/>). Según este sitio, SC35 presenta una expresión ubicua y se encuentra mayormente expresado en el meristema apical tanto vegetativo como reproductivo, así como también, en semillas

secas y embebidas por 24hs (Figura 7). Este último dato apoya la idea de que SC35 se expresaría también en tejido etiolado.

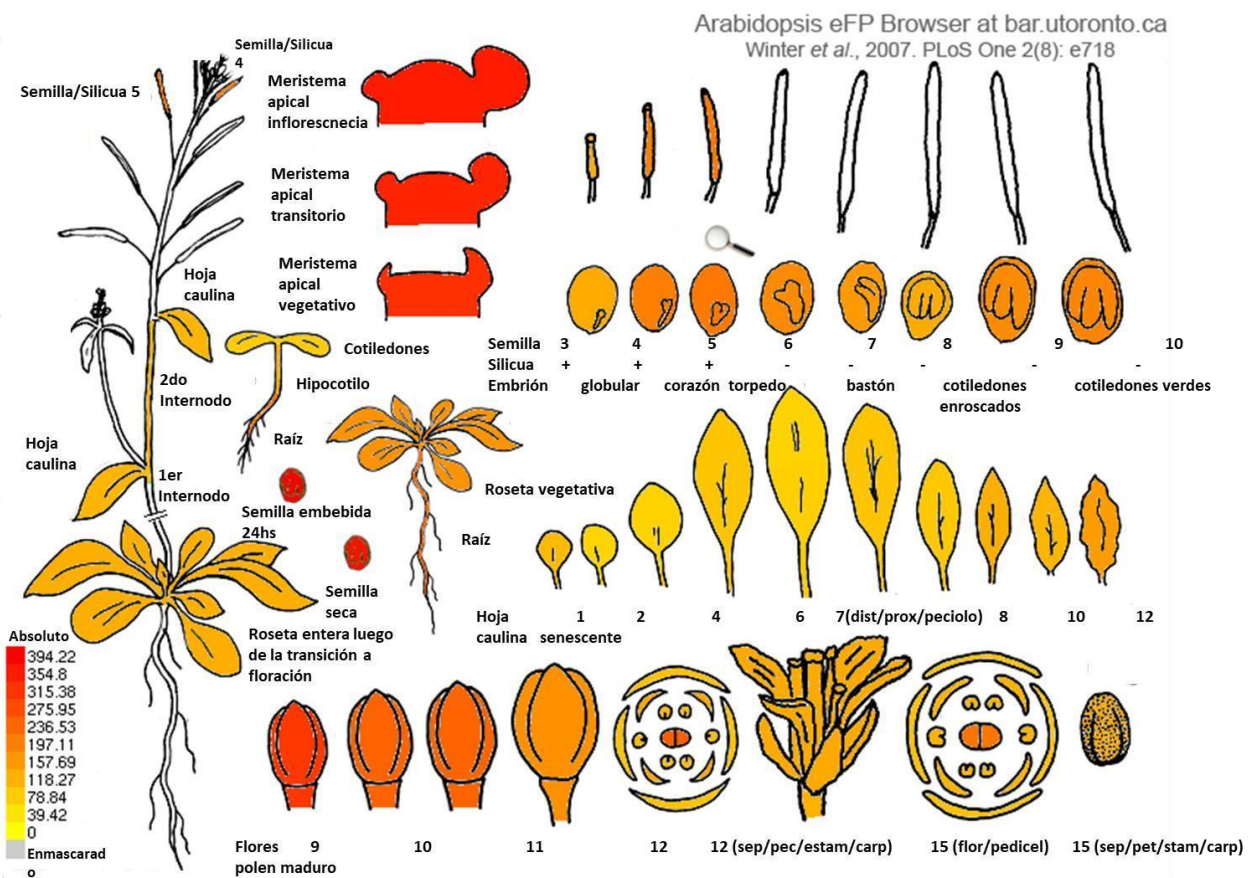


Figura 7.- Nivel de expresión del gen SC35 (At5g64200) en *Arabidopsis thaliana* (Datos tomados de Affymethrix ATH1 array). SC35 se expresa en casi la totalidad de las estructuras que conforman la planta. Sin embargo, en meristema apical y semillas se registraron los niveles más altos de expresión del gen. La coloración roja indica mayor número de lecturas.

Con el objetivo de obtener más información sobre la expresión de SC35 en condiciones de oscuridad, realizamos un análisis *in silico* utilizando datos públicos de tejido etiolado. En particular, examinamos los niveles de transcripto, proteína y fosfoproteína de SC35. Los niveles de expresión del transcripto SC35 y las cuatro proteínas más similares (*SC-like*) se analizaron a partir de datos de ARNseq, obtenidos de plantas WT crecidas durante 3 o 4 días en oscuridad (Pérez-Martín *et al.*, 2021; Liu *et al.*, 2021; Xu *et al.*, 2020; Michaelis *et al.*, 2019; Hartmann *et al.*, 2016; Pfeiffer *et al.*, 2014). La

figura 8 muestra que los niveles de expresión de *SCL30* fueron los más prominentes en condiciones de oscuridad, mientras que los de *SC35* y *SCL33* fueron moderados.

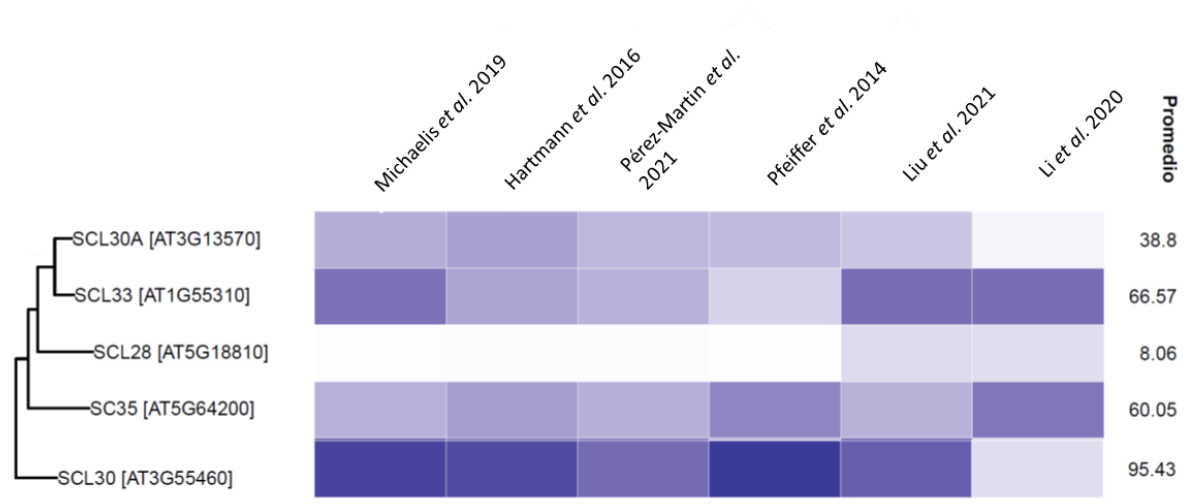


Figura 8.- Heatmap de los niveles de expresión de los transcritos de los genes de la familia SC y SCL en plántulas etioladas. El heatmap se realizó en base a los datos de ARN seq disponibles en Michaelis *et al.* 2019; Hartmann *et al.* 2016; Pérez-Martín *et al.* 2021; Pfeiffer *et al.* 2014; Liu *et al.* 2021; Li *et al.* 2020, sobre plántulas etioladas de *Arabidopsis*. *SCL30* mostró los niveles más altos de expresión mientras que *SC35* y *SCL33* presentaron niveles de abundancia medios.

Luego analizamos los niveles de expresión a nivel de proteína en 3 proteomas publicados de plántulas WT crecidas por 3 a 4 días en condiciones de oscuridad (Zander *et al.*, 2020; Kruse *et al.*, 2017; Reichel *et al.*, 2016). Tanto *SCL30* como *SCL30A* fueron detectadas en los 3 proteomas disponibles (Figura 9). *SC35* fue detectada con valores medios solo en uno de ellos (Figura 9, B) (Reichel *et al.*, 2016). Interesantemente, este proteoma fue realizado sobre el método de “captura del interactoma del ARNm” desarrollado para identificar la porción de los proteomas celulares unidos al ARN poliadenilado. En concordancia con la baja expresión de *SCL28* a nivel de transcripción (Figura 8), tampoco se detectó a nivel de proteína en ninguno de los proteomas (Figura 9).

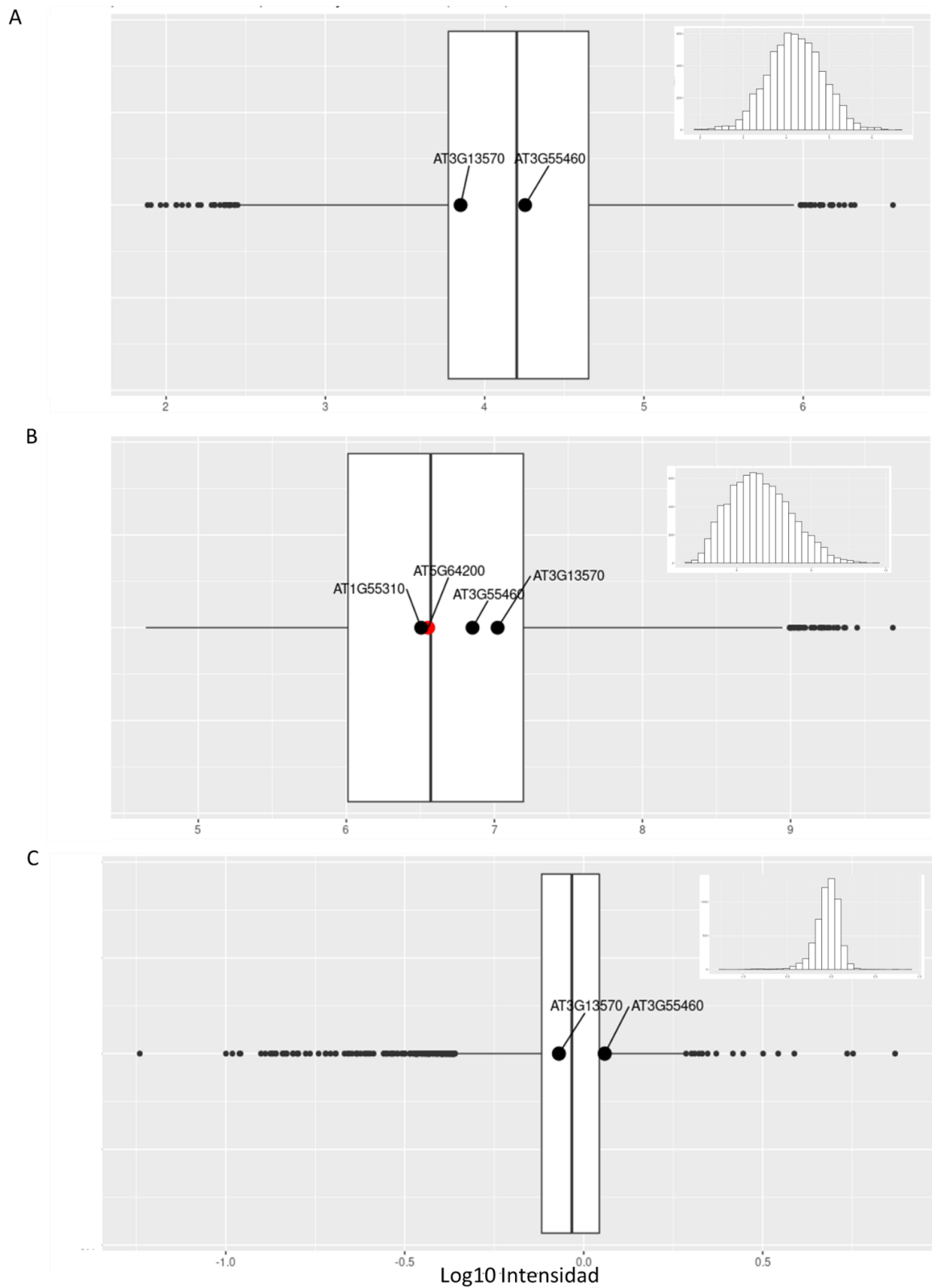
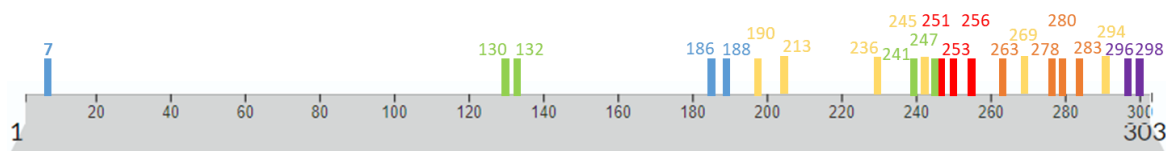


Figura 9.- Expresión de proteínas de la familia SC y SCL en tres proteomas de plántulas salvajes crecidas en oscuridad. Representación gráfica de la mediana y el rango intercuartílico para los proteomas realizado por Kruse *et al.*, 2017 (A), Reichel *et al.*, 2016 (B) y Zander *et al.*, 2020 (C). La línea central del rectángulo representa la mediana (50% de los datos), la línea de la izquierda el Q1 (25 % de los datos) y la línea de la derecha el Q3 (75% de los datos). Los puntos negros de los costados

representan los *outliers*. En negro y con una flecha se denotan las proteínas SC-like presentes, mientras que en rojo se denota a SC35. En el lado derecho superior de cada gráfico se muestra la distribución de la expresión de todas las proteínas para cada proteoma.

Sumado al reporte de Arico *et al.*, 2021, fosfopéptidos de SC35 también fueron detectados en otro experimento de fosfoproteómica disponible hasta la fecha realizado sobre plántulas de Arabidopsis crecidas por 3 días en oscuridad (Kruse *et al.*, 2017). Para realizar un estudio de los posibles sitios de fosforilación de SC35 buscamos en la base de datos UniProt (<https://www.uniprot.org/>) todos los sitios ya identificados experimentalmente como fosforilados para SC35, independientemente del tejido o tipo de experimento. También consideramos aquellos sitios predichos por el algoritmo utilizado por la base de datos. Los sitios de fosforilación encontrados para SC35 en Arico *et al.*, 2021 fueron también encontrados en un ensayo de fosfoproteómica sobre líneas de cultivo celulares de raíces de Arabidopsis (De La Fuente Van Bentem *et al.*, 2008) y en un estudio sobre hojas de plantas adultas (T. Wang *et al.*, 2023), pero no fue detectado en el experimento realizado sobre plántulas etioladas (Figura 10) (Kruse *et al.*, 2017). Estas diferencias podrían deberse a la variabilidad en la regulación de las fosforilaciones en SC35 en diferentes tejidos o condiciones experimentales.



Sitios de Fosforilación (Serinas)	Uniprot	Arico <i>et al.</i> 2021	De la Fuente <i>et al.</i> 2008	Kruse <i>et al.</i> 2017	Wang <i>et al.</i> 2023
<u>7</u> , 186, 188	☒				☒
130, 132, 241, 247				☒	
251, 253, 256		☒	☒		☒
263, 278, 280, <u>283</u>			☒		☒
296, 298			☒	☒	☒
190, 236, 245, 213, 269, 294					☒

Figura 10.- Sitios de fosforilación de la proteína SC35 predichos e identificados hasta el momento en Arabidopsis. Arriba se muestra un mapa y abajo una tabla con todos los sitios de fosforilación de SC35 inferidas por similitud utilizando Uniprot y hallados experimentalmente en: Arico *et al* 2021 (plantas de

Arabidopsis crecidas por 5 días en oscuridad); De la Fuente *et al.* 2008 (cultivos celulares de raíces de Arabidopsis crecidas por 5 días), Kruse *et al.*, 2017 (plantas de Arabidopsis crecidas por 5 días en oscuridad), y Wang *et al.* 2023 (Hojas de plantas de Arabidopsis crecidas durante 28 días). Las serinas subrayadas fueron las únicas que no se encontraron fosforiladas en el trabajo realizado por Wang *et al.* 2023.

Es importante destacar que el algoritmo de predicción de fosforilación solo pudo prever la presencia de 3 sitios, mientras que en la práctica se han descubierto experimentalmente numerosos sitios adicionales (Figura 10). Esto resalta las limitaciones ocasionales de dichos predictores. Además, en la actualidad, contamos con extensas bases de datos que recopilan experimentos de fosfoproteómica, lo que subraya la disponibilidad de información valiosa para complementar y mejorar la precisión de las predicciones.

En resumen, los estudios *in silico* sugieren que SC35 se expresa tanto a nivel de transcripto como de proteína en tejido etiolado. Además, se ha observado que SC35 puede ser fosforilada en diferentes residuos dependiendo del tipo de tratamiento y/o tejido.

4.2 SC35 se expresa en tejido etiolado

En base a los análisis *in silico*, decidimos corroborar la expresión del transcripto de SC35 en tejido de plantas crecidas en oscuridad mediante RT-PCR. En plántulas etioladas WT se observó una banda de 316 pb coincidente con el tamaño esperado para la amplificación del transcripto SC35 a partir del ADNc, que estuvo ausente en el mutante *sc35* (Figura 11). La presencia de una banda de 400 pb, que corresponde al tamaño esperado amplificada a partir del ADN genómico, indica que no hubo contaminación de ADN en la reacción (Calle 3). Este resultado sugiere que SC35 se expresaría en el tejido etiolado, lo cual nos motivó a estudiar el fenotipo en condiciones de oscuridad.

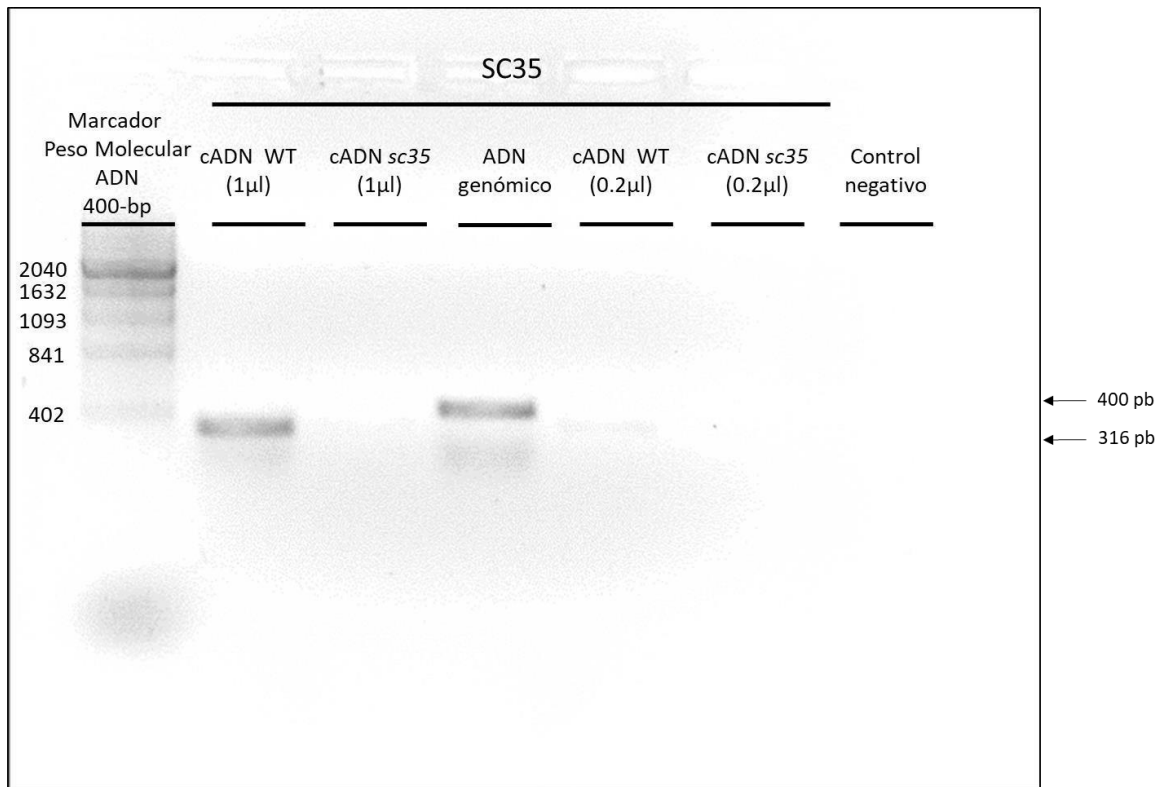


Figura 11.- El transcripto de SC35 se expresa en tejido etiolado. RT-PCR realizada en plantas etioladas de 5 días de crecimiento, WT y mutantes *sc35*. Como control interno se utilizó ADN genómico del genotipo WT y el control negativo sin ADN. Se realizó la RT-PCR con dos cargas distintas de ADNc 1 µl y 0.2 µl.

4.2.1 Las plantas transgénicas p35S:SC35::YFP no presentan fenotipo en oscuridad.

Para estudiar la posible función de SC35 generamos plantas transgénicas, ya que, como se expuso en la introducción existe una alta redundancia en esta familia de genes. Se generaron plantas de *Arabidopsis* que sobreexpresan SC35 como proteína de fusión a YFP bajo el control del promotor constitutivo 35S (p35S:SC35::YFP) y se obtuvieron 3 líneas independientes homocigotas (p35S:SC35::YFP.1; p35S:SC35::YFP.2 y p35S:SC35::YFP.3).

Dado que encontramos que SC35 se expresaría en tejido etiolado decidimos estudiar dos de las respuestas más importantes de las plantas en etiolación como son el crecimiento del hipocotilo y la formación del gancho apical. Se crecieron plántulas de las 3 líneas sobreexpresantes p35S:SC35::YFP, la línea *sc35* mutante y los controles durante

3 días en completa oscuridad y se midió el largo del hipocotilo y la apertura del gancho apical (Figura 12). La línea p35S:SC35::YFP.3 fue la única que mostró un hipocotilo significativamente más corto y el gancho apical más cerrado en comparación con las plántulas WT y el control p35S::YFP (Figura 12). No se observaron diferencias significativas entre las plántulas sc35 y el genotipo WT. Dado que una sola de las tres líneas obtenidas presentó un fenotipo, estas diferencias podrían atribuirse a una cuestión posicional de la transgénesis. Por otro lado, SC35 podría tener otra función en oscuridad no evaluada en esta tesis.

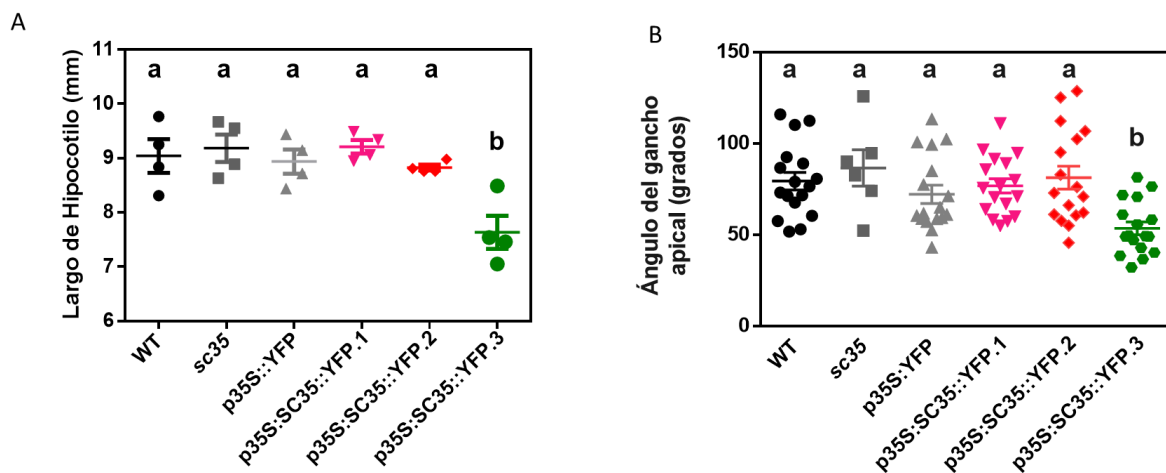


Figura 12.- Fenotipo de las líneas p35S:SC35::YFP en oscuridad. Plantas WT y líneas p35S:SC35::YFP.1, p35S:SC35::YFP.2 y p35S:SC35::YFP.3, crecidas durante 3 días en completa oscuridad. Largo de hipocotilo (A). Apertura del gancho apical (B). Los datos representan la media \pm error estándar de 4 o 17 repeticiones para el largo del hipocotilo o gancho apical respectivamente (cada repetición es la medición de al menos 10 plántulas). Análisis estadístico por ANOVA de 1 factor y comparaciones múltiples por test de Tuckey. Letras diferentes denotan diferencias estadísticas, p -valor<0.001.

4.3 Las plantas transgénicas p35S:SC35:YFP presentan fenotipos defectuosos durante el desarrollo en luz

Como expusimos en la introducción el rol de SC35 fue estudiado en mutantes múltiples debido a la alta redundancia de esta familia, pero no hay reportes del estudio con plantas sobreexpresantes. Plantas transgénicas tanto de las líneas p35S:SC35::YFP

como de la línea mutante *sc35*, fueron crecidas en luz continua y en fotoperíodo de día corto (8 horas luz/16hs oscuridad). Tanto la línea control *p35S:YFP* como el mutante *sc35*, no mostraron diferencias en el desarrollo comparados con el genotipo WT, mientras que las líneas *p35S:SC35::YFP* 1, 2 y 3 presentaron defectos en su crecimiento y desarrollo tales como hojas senescentes y rosetas más pequeñas en ambas condiciones lumínicas (Figura 14).

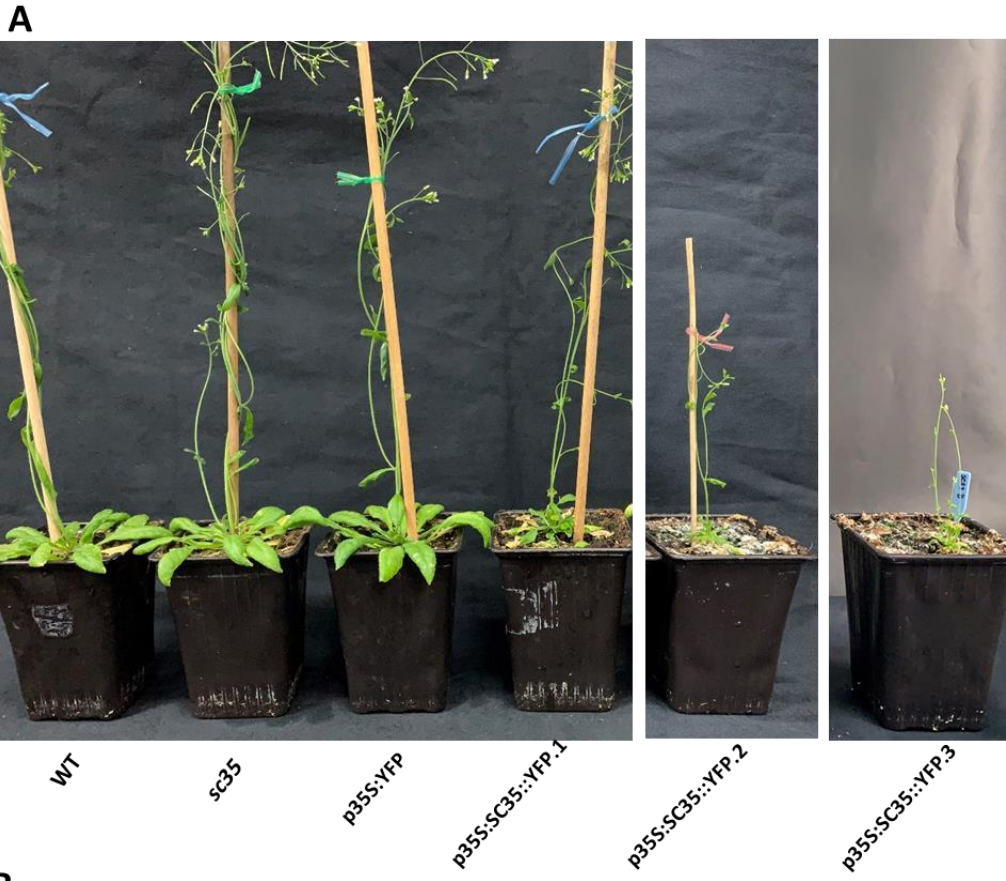


Figura 14.- Las plantas adultas que llevan el transgen *p35S:SC35::YFP* presentan fenotipos defectuosos. Foto representativa de los fenotipos más extremos de plantas sobreexpresantes de SC35, crecidas durante aproximadamente 60 días en luz blanca continua (A) o 90 días en fotoperíodo corto de luz blanca (8h luz/16 hs oscuridad) (B).

Sorpresivamente, observamos que no todos los individuos dentro de la misma línea presentaban un fenotipo defectuoso, sino que algunos se comportaban como una planta WT. La tabla 1 muestra la frecuencia de aparición de plantas con defectos en su desarrollo para cada línea *p35S:SC35::YFP*. Como esperábamos, ninguna de las plantas WT o controles *p35S:YFP* mostraron defectos. Las plantas transgénicas *p35S:SC35::YFP.2* fueron las que mostraron mayor frecuencia de plantas con fenotipo defectuoso, seguida por la línea *p35S:SC35::YFP.3* y en menor medida la *p35S:SC35::YFP.1*, en ambas condiciones lumínicas (Tabla 1).

Genotipo	WT	p35S: YFP	p35S:SC35::YFP.1	p35S:SC35::YFP.2	p35S:SC35::YFP.3
Luz continua	0 % (38)	0 % (35)	15,4% (26)	50% (28)	40% (45)
Fotoperíodo día corto	0% (27)	0% (24)	7,14% (14)	66,6% (18)	53,8% (13)

Tabla 1. Porcentaje de plantas que presentan un fenotipo defectuoso en el desarrollo en las 3 líneas de plantas *p35S:SC35::YFP*. Entre paréntesis se muestra el número total de plantas observadas en cada condición. Se consideró un fenotipo defectuoso a las plantas que presentaban hojas senescentes tempranas, con rosetas y hojas que presentaban deformaciones y clorosis.

Con el objetivo de caracterizar este fenotipo observado en las líneas sobreexpresantes de SC35, se midió el área de la roseta solo en las plantas transgénicas que presentaban dicho fenotipo. Las tres líneas sobreexpresantes, tanto en fotoperíodo largo como corto, mostraron un tamaño significativamente más pequeño de la roseta comparadas con los controles WT y *p35S:YFP* (Figura 15). Con el propósito de evaluar el momento del desarrollo en que aparecían los defectos, se crecieron plantas en ambas

condiciones lumínicas y se tomaron fotos en distintos estadios del desarrollo de cada planta (Figura 16). Los datos se muestran para la línea p35S:SC35::YFP.2 pero se obtuvieron resultados similares para las tres líneas. En el caso de las plantas que crecieron en luz continua se pudo observar el fenotipo a partir de los 15-20 días luego de su germinación, mientras que para las plantas crecidas en fotoperíodo corto, el fenotipo aberrante comenzó a observarse a los 33 días de haber germinado (Figura 16).

Estos resultados sugieren que la sobreexpresión de SC35 tiene un impacto negativo en el crecimiento y desarrollo en Arabidopsis. Además produce un progresivo desarrollo defectuoso principalmente en las hojas de la roseta, las cuales exhiben un proceso de senescencia más acelerado en comparación con las plantas salvajes.

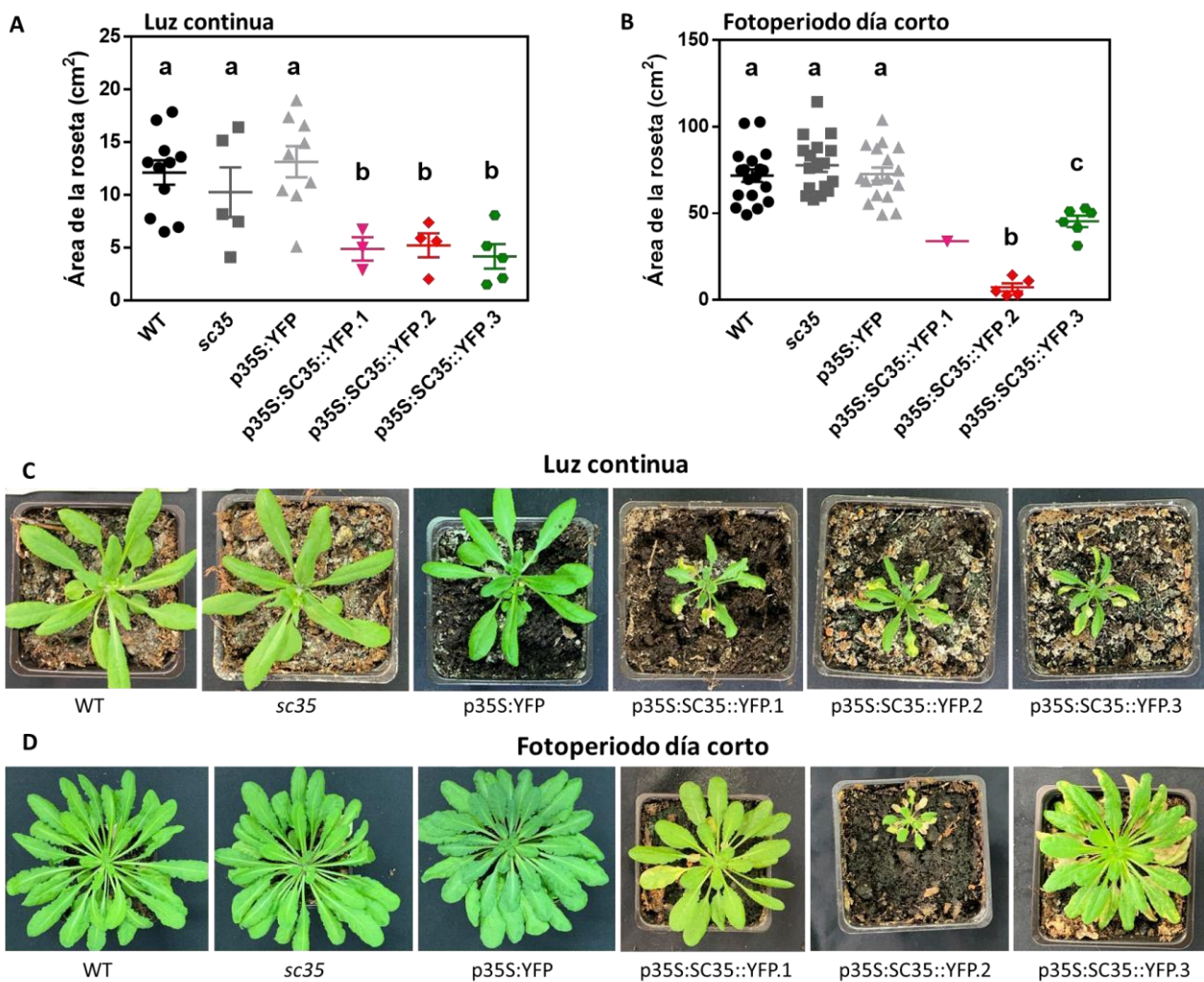


Figura 15.- Área de la roseta de plantas sobreexpresantes de SC35 que desarrollan un fenotipo aberrante. Área de roseta de plantas sobreexpresantes de SC35 crecidas durante 30 días bajo luz continua (A) o 70 días bajo fotoperiodo de día corto (8hs luz/16hs oscuridad) (B); Los datos representan la media \pm error estándar de entre 4 y 15 individuos, salvo para el genotipo p35S:SC35::YFP. 1 en fotoperiodo corto que solo contó con 1 individuo. Análisis estadístico por ANOVA de 1 factor y comparaciones múltiples por test de Tuckey. Diferentes letras denotan diferencias estadísticas p-valor < 0.001. Imágenes aéreas representativas de la roseta de las distintas líneas sobreexpresantes de SC35, crecidas en luz continua (C) y en fotoperiodo día corto (D).

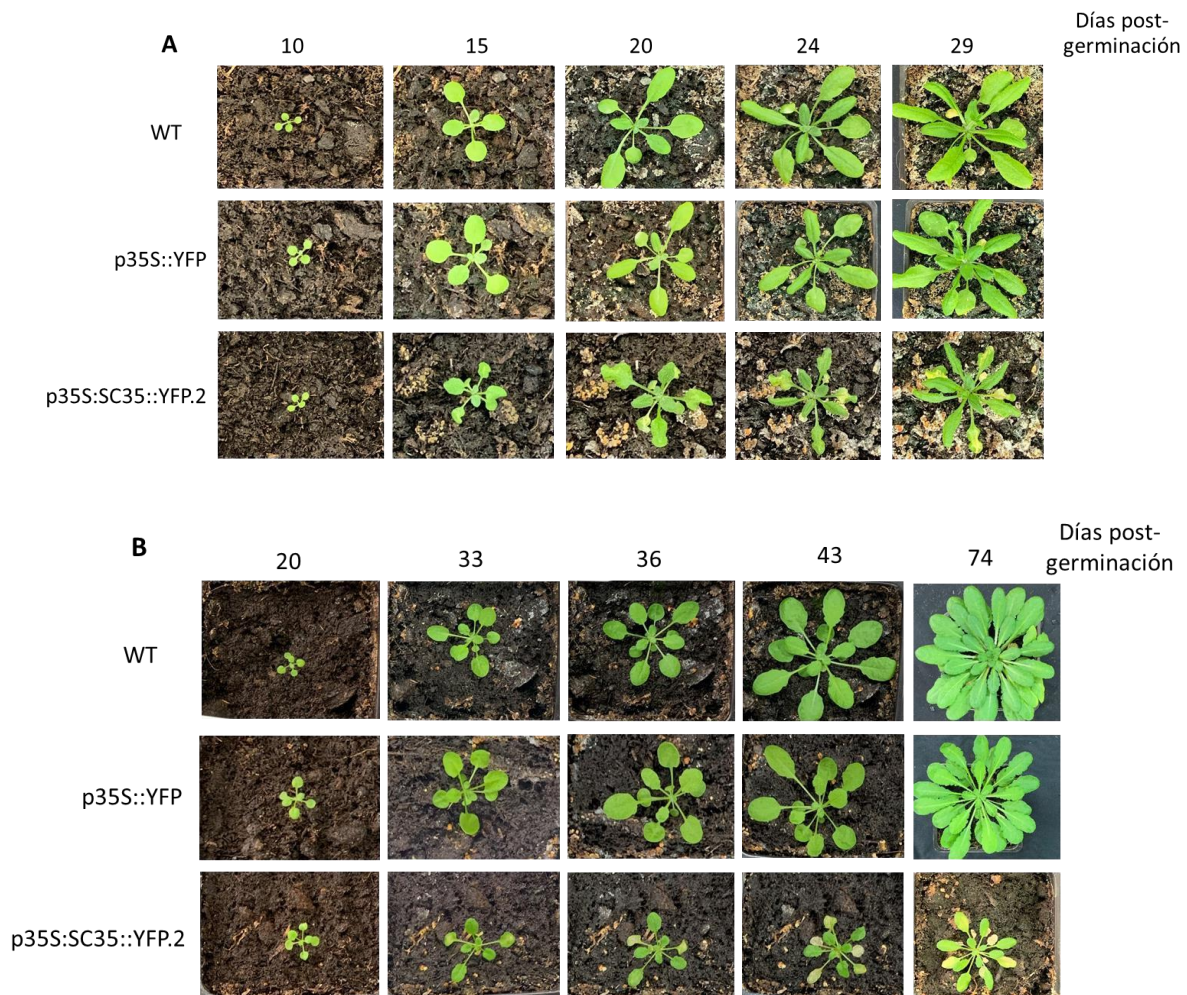


Figura 16.- Fotos representativas de plantas WT o sobreexpresantes p35S:SC35::YFP.2 crecidas en luz continua (A) o fotoperiodo corto (B). Plantas de los genotipos indicados fueron crecidas en tierra en luz continua (A) o fotoperiodo corto (B). Fotos tomadas a diferentes días de post

germinación. Luego de 20 días de crecimiento en luz continua o 33 días en fotoperiodo corto se puede observar la diferencia en el fenotipo de la roseta de la línea p35S:SC35::YFP.2 comparado con la planta WT o p35S:YFP.

Para corroborar si la aparición del fenotipo en plantas adultas estaba asociada a la expresión del transgén, cuantificamos la expresión del mismo por fluorescencia de YFP, mediante microscopía confocal, discriminando entre plantas con o sin fenotipo pertenecientes a las 3 líneas transgénicas p35S:SC35::YFP (Figura 17). Aquellas plantas que presentaban un fenotipo defectuoso mostraron valores significativamente más altos de intensidad de fluorescencia total e intensidad media por área de YFP, que las plantas sin fenotipo (Figura 17 A, B y C). Sorpresivamente, se encontraron varias plantas sin fenotipo y sin señal YFP (intensidad 0) para las 3 líneas (Figura 17 A, B y C). La señal de YFP medida en las plantas que presentaron fenotipo fueron similares para las 3 líneas (Figura 17, D).

Estos resultados muestran que las plantas que exhiben fenotipo mostraron una mayor expresión de la proteína YFP, es decir que la aparición del fenotipo se correlaciona con la expresión del transgén. Estos resultados respaldan la hipótesis de que la expresión excesiva de SC35 contribuye a la manifestación del fenotipo observado en las plantas adultas.

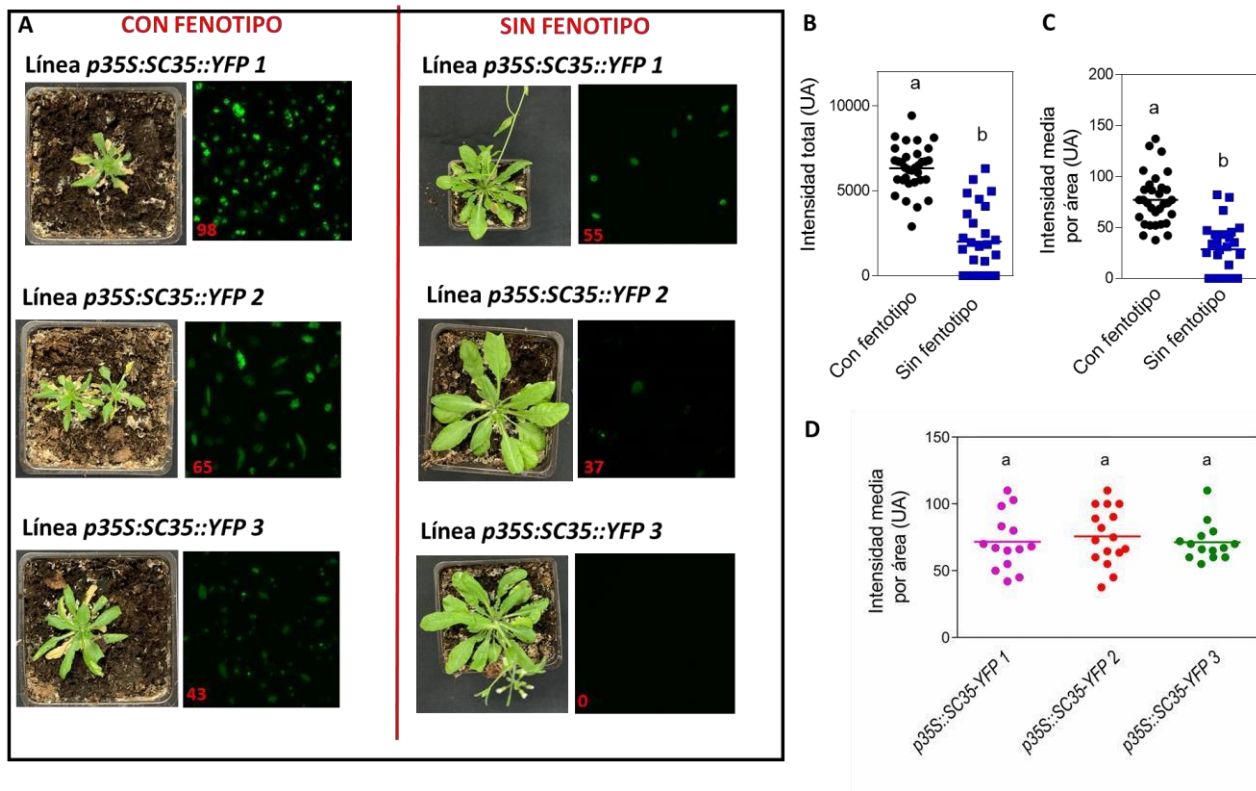


Figura 17.- La sobreexpresión de SC35 se correlaciona con el fenotipo del desarrollo defectuoso. Foto representativa de plantas con o sin fenotipo defectuoso en las líneas *p35S::S35-YFP.1, .2 y .3*. A la derecha una fotografía de las hojas tomadas con microscopio confocal. En rojo se muestra el valor de intensidad de fluorescencia de YFP media por núcleo (A). Valores de intensidad total (B) o intensidad media por núcleo (C) en unidades arbitrarias (UA) de fluorescencia de YFP para las plantas con fenotipo y sin fenotipo (de las 3 líneas) crecidas bajo luz continua. Valores de intensidad media por núcleo en UA de fluorescencia de YFP para las plantas solo con fenotipo de cada una de las 3 líneas (D). Los datos representan la media entre 14 y 16 plantas por genotipo, la fluorescencia en cada planta fue obtenida por el promedio de la señal en el primer par de hojas. Análisis estadístico por ANOVA de 1 factor y comparaciones múltiples por test de Tuckey. Diferentes letras denotan diferencias estadísticas p -valor < 0.001.

El hecho de que la expresión más baja de YFP se correlacionara con la ausencia del fenotipo defectuoso y la aparición de plantas sin señal despertó la duda de si estas líneas transgénicas podrían ser heterocigotas en lugar de homocigotas. Para corroborar entonces la selección de las plantas homocigotas originales, se volvió a realizar la selección con el antibiótico higromicina sobre la generación T4 de las 3 líneas. La tabla 2 muestra que en las tres líneas *p35S:SC35::YFP* la supervivencia de plántulas observadas

se desvía significativamente de las esperadas para una heterocigota, con casi la totalidad de supervivencia en el medio con antibiótico. Por otro lado, las frecuencias observadas de supervivencia de plántulas crecidas con antibiótico se ajustan a la distribución de plántulas homocigotas para el transgen *p35S::SC35::YFP* (Tabla 2)

Genotipo	Resistencia Observada ¹ resistente: sensible	Resistencia Esperada Heterocigota ² resistente: sensible	valor de χ^2 Heterocigosis	Resistencia Esperada Homocigota ³ resistente: sensible	valor de χ^2 Homocigosis
p35S::SC35YFP.1	138:6	108:36	25 (S)	144:0	6,2 (NS)
p35S::SC35YFP.2	134:6	105:35	24 (S)	140:0	6,1 (NS)
p35S::SC35YFP.3	140:5	112.5:37.5	27 (S)	145:0	5 (NS)

Tabla 2.- Prueba de χ^2 para la distribución de la resistencia a higromicina observada. Ho: la distribución de la supervivencia a la resistencia al antibiótico sigue la misma distribución que la distribución para una planta que porta la resistencia en heterocigosis. El valor de significancia rechaza la hipótesis nula. S (significativo), NS (No significativo).

¹ Supervivencia observada para plántulas crecidas durante al menos 8 días en medio con antibiótico higromicina.

² Supervivencia esperada para una planta que porta el transgen en heterocigosis.

³ Supervivencia esperada para una planta que porta el transgen en homocigosis.

Ninguna planta WT sobrevivió en medio suplementado con higromicina.

4.4 Localización subcelular de SC35.

Como expusimos en la introducción, SC35 es una proteína involucrada en el *splicing* alternativo. Estudios de sobreexpresión transitoria en plantas de tabaco

mostraron localización nuclear (Yan *et al.*, 2017), aunque no hay registros de la localización subcelular en plantas de *Arabidopsis* transformadas de forma estable.

Estudiamos la localización subcelular por microscopía confocal en las 3 líneas de p35S:SC35::YFP crecidas durante 3 días en oscuridad o 4 días en luz. La señal de YFP del control (p35S::YFP) se observó tanto en el núcleo como en citoplasma (Figura 13). Como esperábamos, la señal de YFP de las líneas p35S:SC35::YFP.1, 2 y 3 colocalizó con la señal de DAPI en el núcleo, en condiciones de oscuridad y luz (Figura 13). También, observamos que SC35 se acumula en el núcleo formando “*speckles*” como se reportó previamente (Yan *et al.*, 2017). Los *speckles* nucleares son regiones de almacenamiento y ensamblaje en donde los factores de *splicing* se sitúan cercanos a los sitios de transcripción activa (Spector & Lamond, 2011).

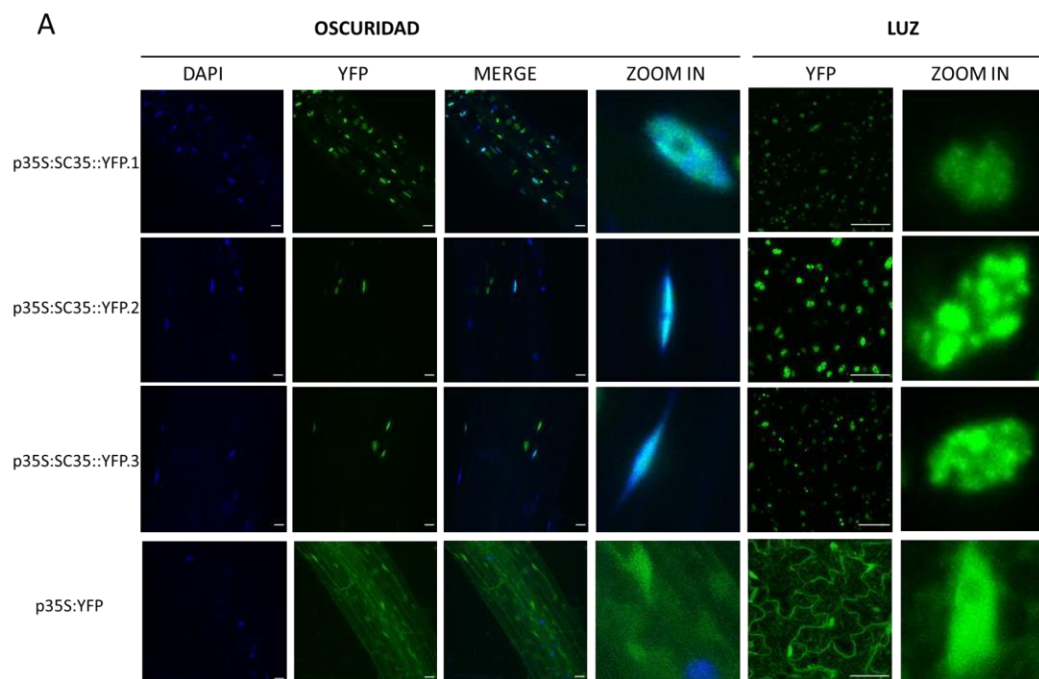


Figura 13.- SC35 se localiza en el núcleo formando *speckles*. Se observó la localización subcelular de SC35 de las 3 líneas sobreexpresantes, aunque sólo se pudo realizar la tinción con DAPI de los núcleos de plántulas crecidas en oscuridad. Las fotos tomadas en plántulas etioladas de 3 días son de hipocotilos y las fotos tomadas en plantas crecidas en luz durante 5 días son de hojas. La barra blanca corresponde a 50µm.

4.5 Estudio de la respuesta de plantas sobreexpresantes de SC35 al estrés abiótico.

Cómo se desarrolló en la introducción, el *splicing* alternativo de muchos genes puede variar ante un estrés abiótico, incluso de los mismos transcritos de distintos factores de *splicing*, como es el caso de SC35. Además, las evidencias indican que el *splicing* alternativo regula las respuestas al estrés abiótico (Laloum *et al.*, 2018; Yan *et al.*, 2012). Así, decidimos estudiar las líneas transgénicas de SC35 ante diferentes tipos de estrés abiótico.

Para ello, plantas sobreexpresantes de las 3 líneas independientes de SC35 fueron crecidas en luz continua ($100 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}^{-1}$) u oscuridad durante una semana a 30°C y a 22°C . La exposición a 30°C produjo un aumento en el alargamiento del hipocotilo en el genotipo WT, como se reportó previamente (Gray *et al.*, 1998). Las plantas sobreexpresantes respondieron de igual manera que el genotipo WT (Figura 18).

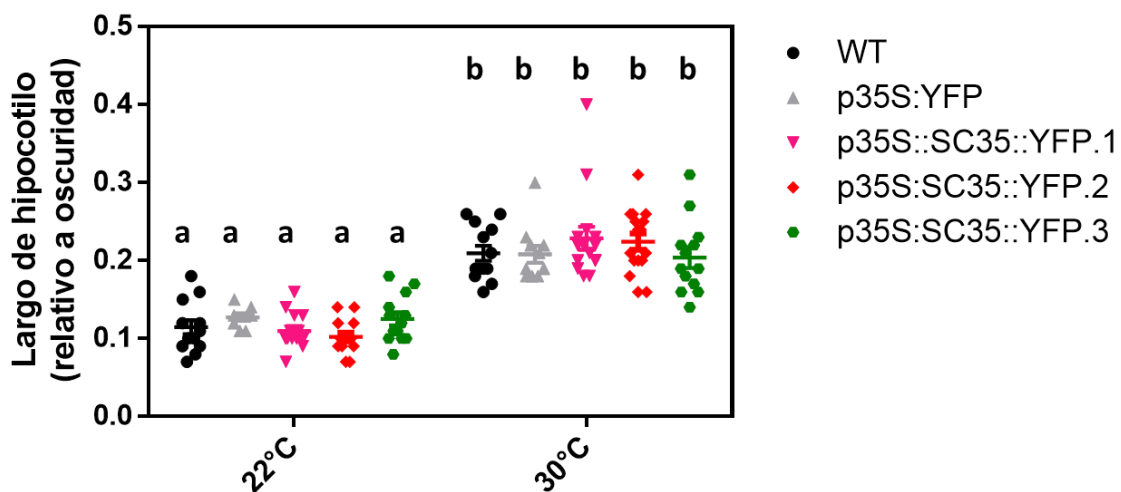


Figura 18.- Efecto de las altas temperaturas en la elongación del hipocotilo. Largo del hipocotilo de las líneas p35S:SC35::YFP.1, p35S:SC35::YFP.2 y p35S:SC35::YFP.3 expuestas a un tratamiento de 22°C o 30°C bajo luz continua durante 7 días. Se observó una diferencia significativa para todos los genotipos entre las plántulas crecidas a 22°C y las tratadas con 30°C . Los datos representan la media \pm error estándar de entre 11 y 17 repeticiones (cada repetición es la medición de al menos

10 plántulas). Análisis estadístico por ANOVA de 2 factores y comparaciones múltiples por test de Tuckey. Diferentes letras denotan diferencias estadísticas p -valor < 0.001.

Otro de los caracteres que se tuvo en cuenta a la hora de evaluar el efecto del estrés térmico, fue el largo de la raíz, la cual puede experimentar un arresto en su crecimiento, volumen, así como también un cambio en su arquitectura a largo plazo (Karlova *et al.* 2021; Franco *et al.* 2011). Estudiamos el largo de la raíz principal en plántulas expuestas tanto al estrés por calor (30°C) como al frío (0°C) (Figura 19). Tanto las altas temperaturas como las bajas temperaturas produjeron una disminución del largo de la raíz principal en el genotipo WT (Figura 19). La respuesta en el largo de raíz de plantas sobreexpresantes de SC35, fueron similares al WT frente al estrés tanto por frío como calor (Figura 19). El largo de raíz bajo condiciones control de la línea p35S:SC35::YFP.3 fue significativamente más corto que el control WT (Figura 19). Este resultado solo se pudo ver en una sola línea sobreexpresante (p35:SC35::YFP.3), en condiciones estándar de temperatura y bajo luz continua. Esta línea, fue la misma que presentó el hipocotilo más corto y el gancho apical más cerrado en oscuridad (Figura 12). Las demás líneas independientes no mostraron diferencia significativa en el largo de sus raíces ni para el tratamiento de frío ni de calor (Figura 19).

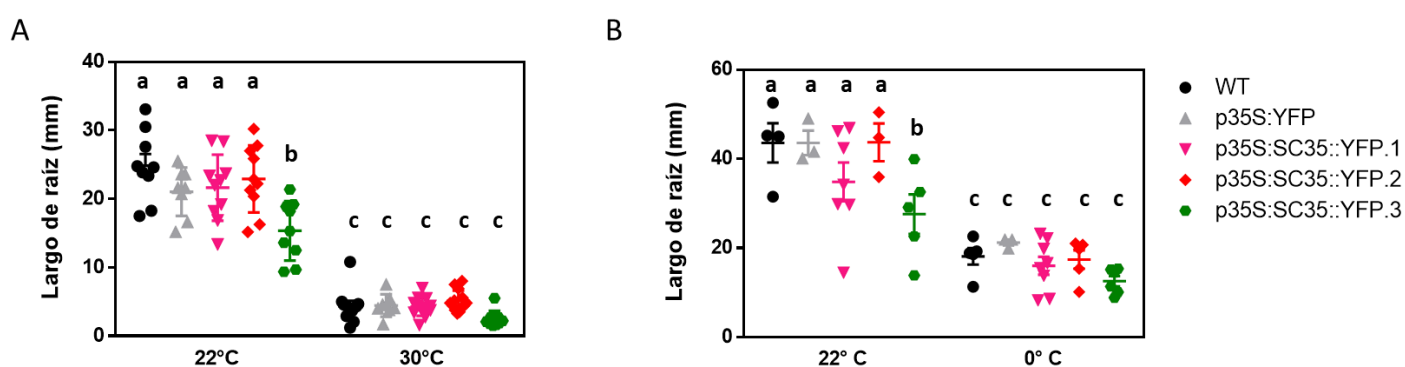


Figura 19.- Exposición de plantas transgénicas sobreexpresantes de SC35 a altas temperaturas (A) o bajas temperaturas (B). Largo de raíz de las líneas p35S:SC35::YFP.1, p35S:SC35::YFP.2 y p35S:SC35::YFP.3 crecidas a de 22°C (control), 30°C (A) o 0° C (con un previo crecimiento de 5 días a 22°C, ver MyM) (B), bajo luz continua durante 7 días. Los datos representan la media \pm error estándar de entre 4 y 11 repeticiones (cada repetición es la medición de al menos 10 plántulas). Análisis estadístico por ANOVA de 2 factores y comparaciones múltiples por test de Tuckey. Diferentes letras denotan diferencias estadísticas p -valor < 0.001.

Por otro lado, estudiamos el efecto del estrés salino en las líneas transgénicas. Para ello, se crecieron durante 5 días plántulas en un medio MS con 0, 50 mM, 100 mM y 150 mM de NaCl y se midió el largo de la raíz y del hipocotilo (Figura 20). A mayores concentraciones de NaCl, las plantas WT mostraron una reducción en el largo de la raíz (Figura 20, A) y del hipocotilo (Figura 20, C) como ya fue reportado anteriormente (Geng *et al.*, 2013). Sin embargo, la respuesta al estrés salino fue similar para todas las líneas sobreexpresantes (Figura 20 B y D).

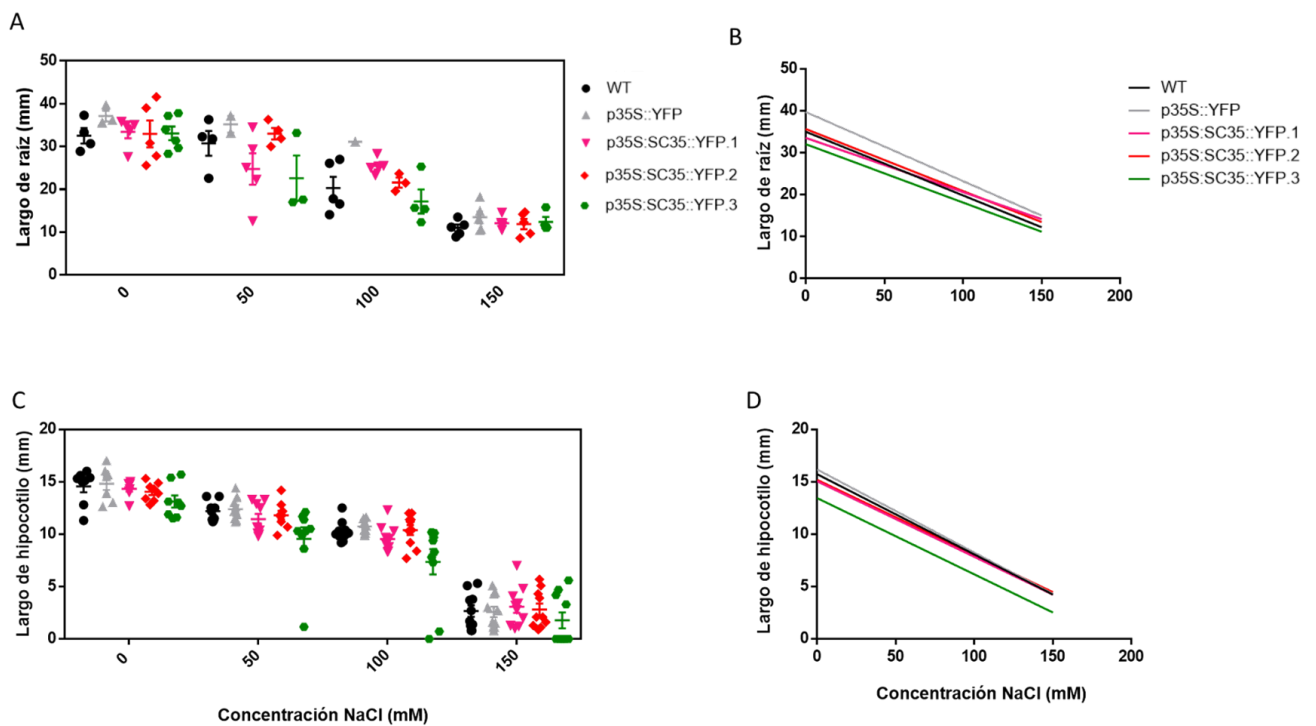


Figura 20.- Las plantas de líneas sobreexpresantes de SC35 no presentaron un fenotipo diferente ante un estrés salino comparado con plantas WT. Largo de raíz (A) y la pendiente de respuestas ante distintas concentraciones de NaCl (0, 50, 100 y 150 mM) (B). Largo de hipocotilo (C) y la pendiente de respuesta ante distintas concentraciones de NaCl (0, 50, 100 y 150 mM) (D) de las líneas p35S:SC35::YFP.1, p35S:SC35::YFP.2 y p35S:SC35::YFP.3 crecidas bajo luz continua durante 5 días. Los datos representan la media \pm error estándar de entre 4 o 6 repeticiones (cada repetición es la medición de al menos 10 plántulas). Análisis estadístico por ANOVA de 2 factores y comparaciones múltiples por test de Tuckey.

En conclusión, los resultados obtenidos de estos tratamientos de estrés abiótico (frío, calor y estrés salino) no mostraron diferencias significativas en ninguna de las líneas sobreexpresantes de SC35 para las respuestas medidas.

4.6 La sobreexpresión de SC35 unida a la secuencia 3'UTR presenta defectos durante la escotomorfogénesis

Las regiones 3'UTR poseen una gran variedad de elementos de regulación en *cis* directamente involucrados en la poliadenilación, estabilidad, transporte y traducción de los mensajeros de ARN, indispensables para alcanzar el nivel de expresión deseado en células eucariotas. Cuando el procesamiento de los pre-mensajeros no es correcto el mismo es degradado (Bernardes & Menossi, 2020). De esta manera, decidimos investigar cómo la inclusión de la secuencia 3'UTR influye en la función y localización de la proteína SC35. Para ello, obtuvimos 2 líneas independientes de plantas que sobreexpresan la secuencia codificante de SC35 junto con la secuencia del extremo 3'UTR (*p35S:YFP::SC35+3'UTR.1* y *p35S:YFP::SC35+3'UTR.2*).

Luego de 3 días de crecimiento en completa oscuridad, ambas líneas *p35S:YFP::SC35+3'UTR.1* y *p35S:YFP::SC35+3'UTR.2*, presentaron un hipocotilo significativamente más corto en comparación con las plantas WT. Además, el ángulo del gancho apical fue significativamente menor para ambas líneas (Figura 21).

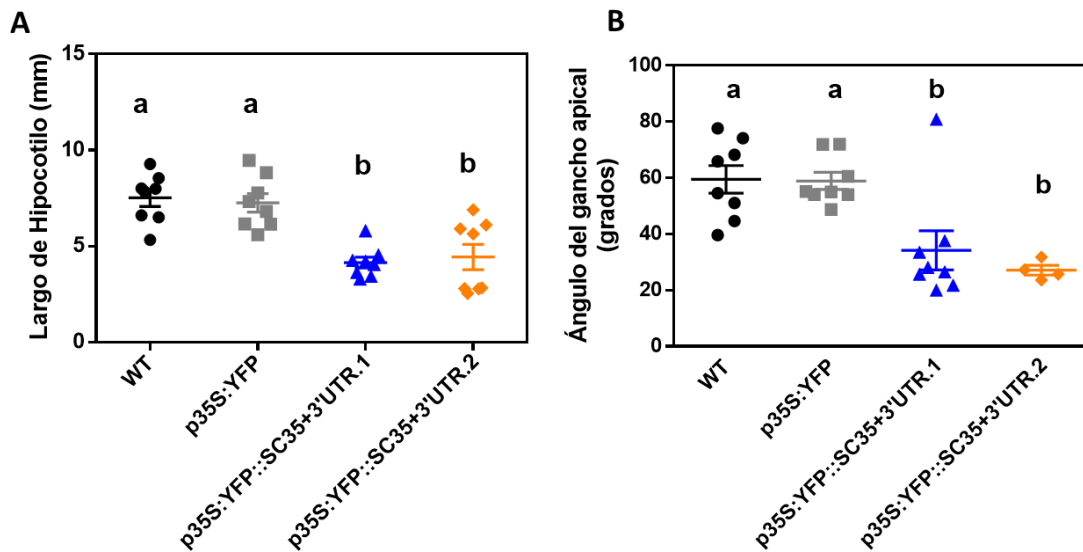


Figura 21.- Fenotipo de p35S:YFP::SC35+3'UTR en oscuridad. Plantas WT y líneas p35S:YFP::SC35+3'UTR.1, p35S:YFP::SC35+3'UTR.2 fueron crecidas durante 3 días en completa oscuridad. Se midió el largo de hipocotilo (A) y el ángulo del gancho apical (B). Los datos representan la media \pm error estándar de entre 4 y 8 repeticiones (cada repetición es la medición de al menos 10 plántulas). Análisis estadístico por ANOVA de 1 factor y comparaciones múltiples por test de Tuckey. Diferentes letras denotan diferencias estadísticas, p-valor<0.001.

Los resultados obtenidos revelaron que la sobreexpresión de SC35 en conjunto con la región 3'UTR tiene un impacto significativo en el crecimiento del hipocótilo y la formación del gancho apical durante la etiolación, a diferencia de la sobreexpresión de SC35 sin la secuencia reguladora.

Con el objetivo de analizar si la inclusión de la secuencia 3'UTR del gen en estas líneas provoca un cambio en la localización subcelular, se analizó el patrón de localización de la proteína YFP en las líneas transgénicas. Tanto en oscuridad como en luz ambas líneas mostraron localización en el núcleo (Figura 22). Utilizando el mismo microscopio usado para determinar la localización subcelular en las líneas p35S:SC35::YFP observamos que la formación de *speckles* parecía difusa en estas líneas (figura 22 A). Utilizando un microscopio de mayor resolución verificamos la presencia de estas estructuras en las líneas sobreexpresantes con y sin su secuencia 3'UTR, confirmando que los *speckles* se encuentran en todas las líneas sobreexpresantes. Estos resultados muestran que la

localización subcelular de SC35, así como la presencia de *speckles*, no son afectadas por la secuencia 3'UTR en las líneas sobreexpresantes estudiadas.

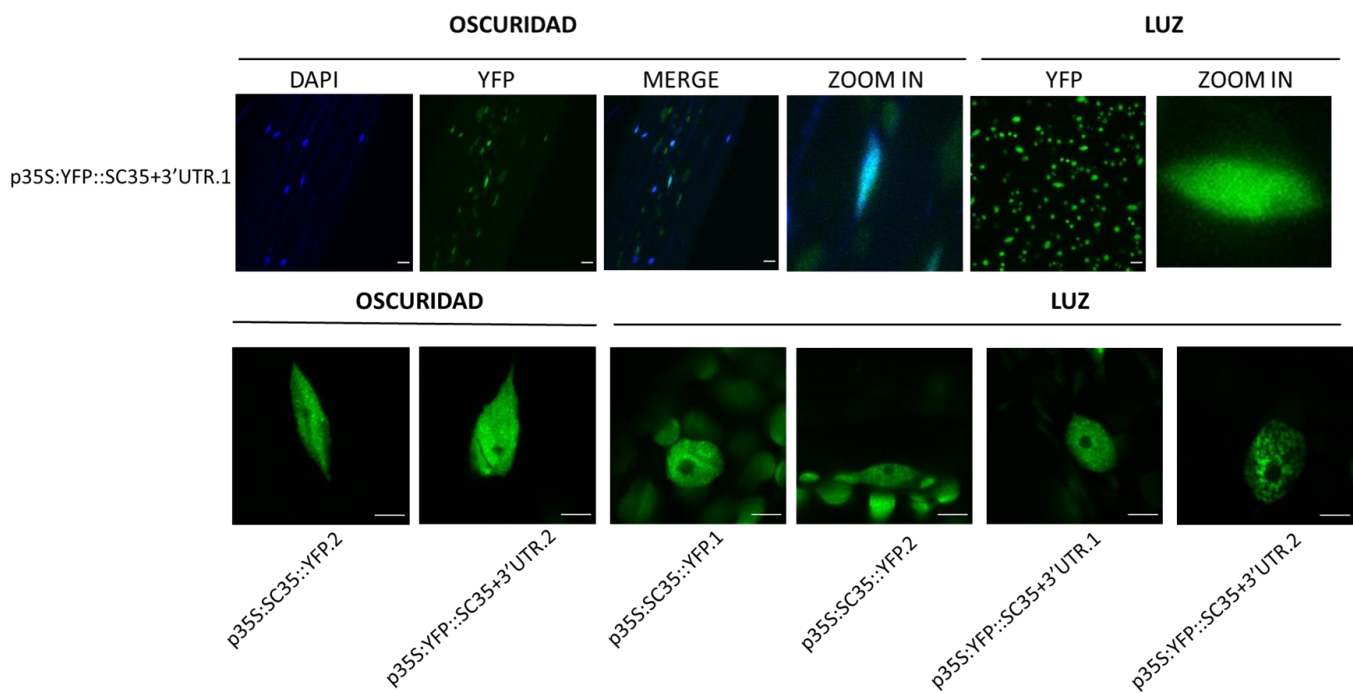


Figura 22.- Localización subcelular de p35S:YFP::SC35+3'UTR. Localización subcelular de p35S:SC35+3'UTR.1::YFP en plantas crecidas por 3 días en oscuridad o en luz continua (A). El color verde representa la fluorescencia de YFP, mientras que el color azul muestra la fluorescencia del marcador de núcleos DAPI. Imágenes tomadas con *airyscan* de núcleos de hojas de las líneas p35S:SC35::YFP 1 y 2 y p35S:YFP::SC35+3'UTR 1 y 2 de plántulas crecidas tanto en luz como en oscuridad durante 3 días (B). La barra blanca corresponde a 50μm.

Por último, pudimos observar que las plantas que expresan la construcción *p35S:YFP::SC35+3'UTR*, no mostraron un fenotipo defectuoso durante el desarrollo a diferencia de las plantas que portan la construcción *p35S:SC35::YFP* sin su secuencia 3'UTR (Figura 23).

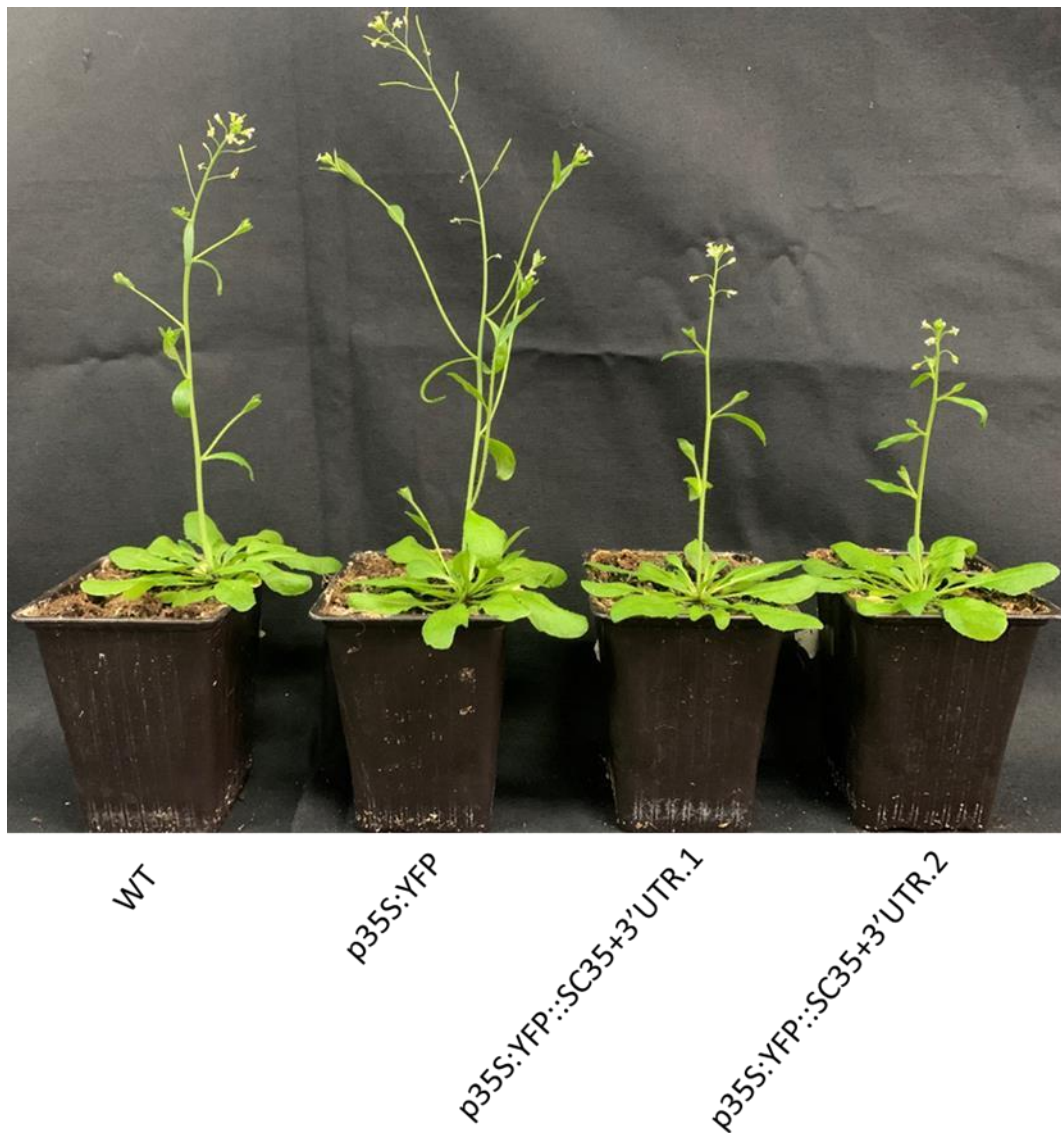


Figura 23.- Fenotipo de plantas adultas p35S:YFP::SC35+3'UTR. Las plantas que expresan el gen SC35 junto con su secuencia 3'UTR bajo el promotor constitutivo 35S, no presentaron un fenotipo de crecimiento defectuoso. Plantas crecidas bajo luz continua durante 30 días.

4.7 Caracterización funcional de las proteínas eIF4A1 y eIF4A2 en oscuridad

En base a los estudios previamente reportados de fosfoproteoma encontramos que eIF4A1 y eIF4A2 están presentes en tejido etiolado y se fosforilarían luego de 20 min de luz (Figura 6). Con el fin de caracterizar su fenotipo en oscuridad obtuvimos las líneas

mutantes y generamos las líneas transgénicas. Solo pudimos obtener plantas transformadas establemente y en homocigosis para eIF4A2.

Luego de 3 o 6 días de crecimiento en oscuridad el hipocotilo de las plantas mutantes *eif4a1* fueron significativamente más cortos que el WT (Figura 24, A), mientras que las mutantes *eif4a2* no mostraron diferencias en el largo del hipocotilo comparado con plantas WT, así como tampoco en las plantas sobreexpresantes de eIF4A2 (Figura 24, B). Con el propósito de prolongar el período de crecimiento en ausencia de luz y de determinar si las plantas mutantes lograban igualar la longitud del hipocotilo de las plantas WT, llevamos a cabo un experimento similar. No obstante, en esta ocasión, empleamos un medio enriquecido con sacarosa a lo largo de un lapso de 10 días. El hipocotilo de las mutantes *eif4a1* fueron también significativamente más cortos que el de las plantas WT en medio con sacarosa y luego de 10 días (Figura 24, C), mientras que el largo del hipocotilo de las plántulas *eif4a1* crecidas en luz no mostraron una diferencia significativa en comparación con las plántulas WT (Figura 25). Estos resultados indican que la ausencia de la proteína eIF4A1 afecta negativamente el crecimiento del hipocotilo en condiciones de oscuridad.

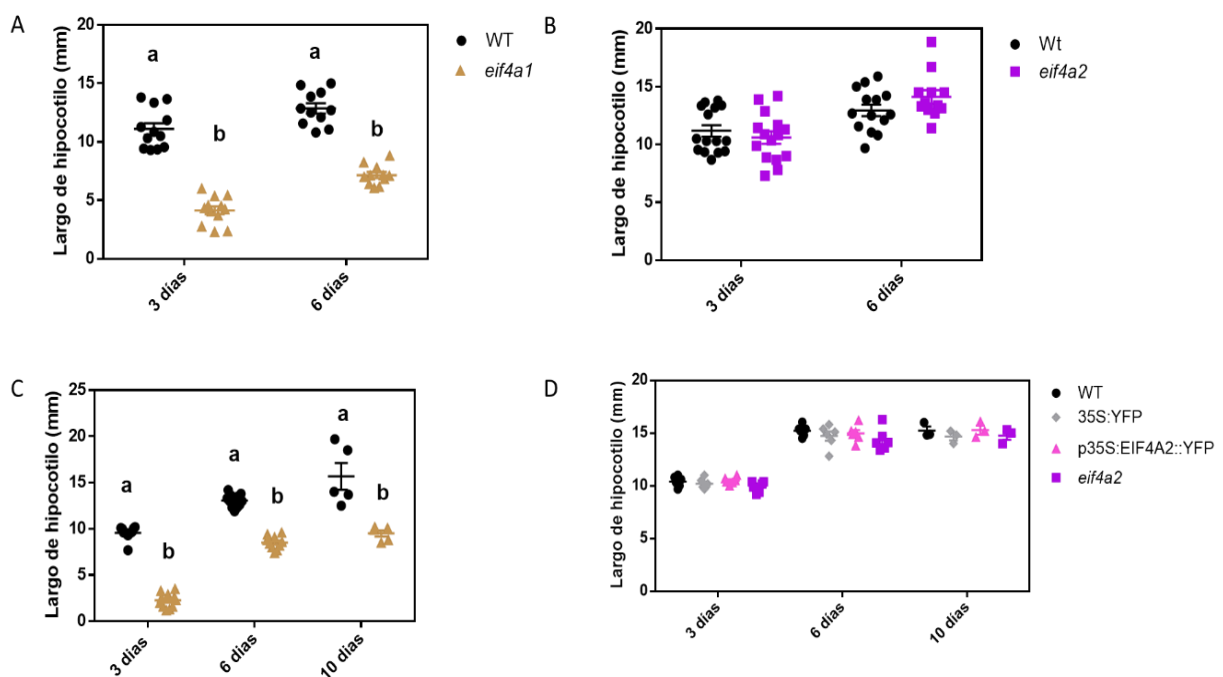


Figura 24.- EL Largo del hipocotilo de mutantes *eif4a1* es menor en oscuridad. Largo del hipocotilo del genotipo WT y de plántulas *eif4a1* (A) o *eif4a2* (B) crecidas durante 3 y 6 días de oscuridad; largo del hipocotilo del genotipo WT y de plántulas *eif4a1* en un medio enriquecido con sacarosa durante 3, 6 y 10 días de oscuridad(C); Largo de hipocotilo de plántulas del genotipo WT, p35S:YFP *eif4a2* y p35S:EIF4A2::YFP en un medio enriquecido con sacarosa durante 3, 6 y 10 días (D). Los datos representan la media \pm error estándar de entre 4 y 12 repeticiones (cada repetición es la medición de al menos 10 plántulas). Análisis estadístico por T-tests múltiples. Diferentes letras denotan diferencias estadísticas, p-valor<0.001.

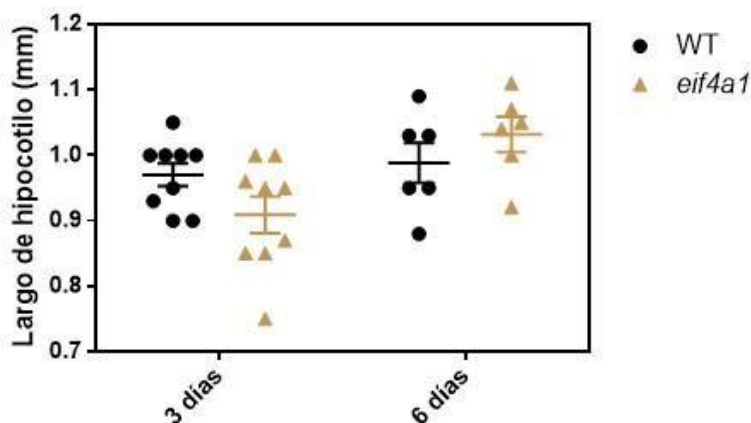
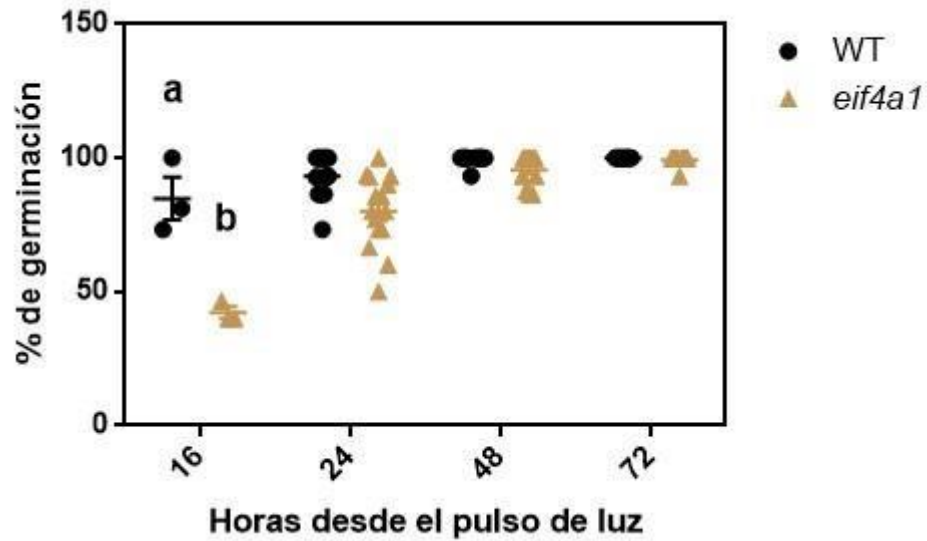


Figura 25.- Largo del hipocotilo de plantas *eif4a1* crecidas en luz. No se vió una diferencia significativa en el largo del hipocotilo de plantas crecidas durante 3 y 6 días de luz continua. Los datos representan la media \pm error estándar de entre 6 y 9 repeticiones (cada repetición es la medición de al menos 10 plántulas). Análisis estadístico por Anova de 1 factor.

Para evaluar si la disminución en el largo de hipocotilo en oscuridad era debido a un retraso en el tiempo de germinación medimos el porcentaje de semillas germinadas a 16, 24, 48 y 72 horas luego del pulso de luz. Luego de 16 horas post-pulso de luz, el porcentaje de semillas germinadas fué significativamente más bajo en semillas *eif4a1* comparadas con semillas WT (Figura 26).



A

B

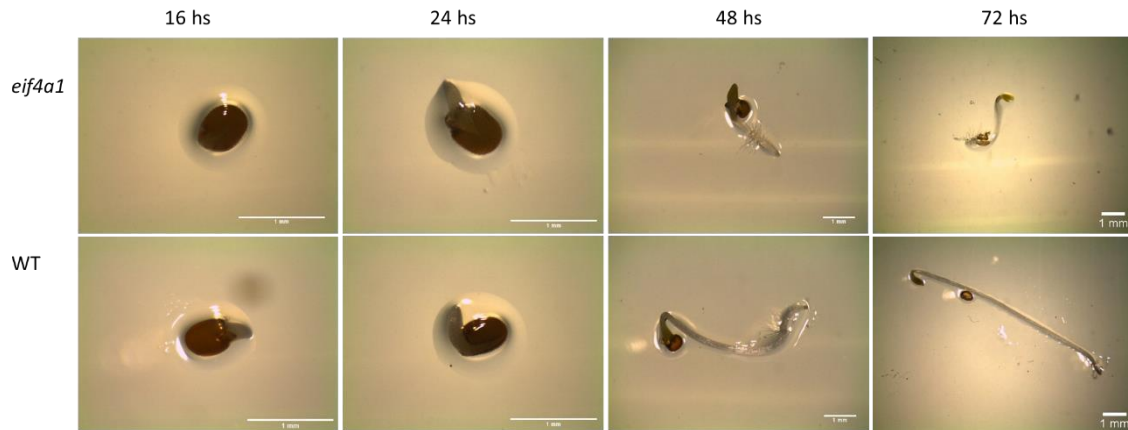


Figura 26.- Las mutantes *eif4a1* presentan menor porcentaje de germinación en etapas tempranas de la germinación. Se sembraron semillas de los genotipos WT y mutante *eif4a1*, las cuales fueron mantenidas durante 3 días a 4 °C en condiciones de oscuridad. Posteriormente, se les administró un pulso de 2 horas para inducir la germinación y se colocaron en una cámara a 22 °C. Se registró el porcentaje de germinación de las semillas a intervalos de 16, 24, 48 y 72 horas después del pulso de luz (A). Los datos representan la media \pm error estándar de entre 6 y 9 repeticiones (cada repetición es la medición de al menos 10 plántulas). Análisis estadístico por ANOVA de 1 factor. Diferentes letras denotan diferencias estadísticas, p -valor $<$ 0.001. Representación fotográfica de las plántulas de plantas *eif4a1* y WT a las 16, 24, 48 y 72 horas luego del pulso de luz (B).

Los resultados obtenidos revelan que el mutante *eif4a1* experimenta un retraso en la germinación sólo a las 16 horas después de haber recibido el pulso de luz, en comparación con el genotipo WT; ya que pasadas 24 horas, el porcentaje de germinación

se iguala entre ambos genotipos. No obstante, tras las 24 horas posteriores a la germinación, se observa un considerable decrecimiento en la longitud del hipocótilo de las mutantes *eif4a1* (ver Figura 26 B). Estos hallazgos sugieren que el retraso en el alargamiento del hipocotilo en el mutante *eif4a1* podría ser sólo parcialmente atribuido al retraso inicial en el proceso de germinación.

5. Discusión

El metabolismo del ARN engloba diversos procesos, que van desde su formación mediante la transcripción del ADN hasta su traducción en ribosomas. Estos procesos incluyen el procesamiento del ARN, el *splicing* del pre-ARNm, el transporte y, finalmente, la traducción. Todas estas etapas se llevan a cabo gracias a la acción de proteínas de unión al ARN, entre las cuales se puede mencionar la proteína SC35. Además, el ARN debe ser posteriormente traducido mediante un complejo proteico en el que están involucradas las proteínas eIF4A (Liu *et al.*, 2013).

En un estudio previo realizado en el laboratorio, se identificó el cambio en el estado de fosforilación de las proteínas SC35, eIF4A1 y eIF4A2 en condiciones de oscuridad luego de recibir un pulso de luz blanca de 20 minutos (Tesis Doctoral, Dra. Arico, 2020). Sin embargo, el hecho de que el cambio en el estado de fosforilación se observa tanto en las plántulas de WT (que poseen fitocromos y criptocromos funcionales) como en los cuádruples mutantes de fitocromos y criptocromos crecidos en luz sugiere que existen otras vías o mecanismos que estarían activando este cambio en la fosforilación. La vía de señales retrógradas del cloroplasto fue planteada como vía alternativa a la regulación de la expresión de las proteínas de *splicing* por luz independientemente de los fotorreceptores, sin embargo, una señal proveniente del cloroplasto no parecería ser una alternativa plausible ya que el tiempo de exposición a la luz, de solo 20 minutos, no sería suficiente para el desarrollo de cloroplastos (ArmaregoMarriott *et al.*, 2019). La existencia de otros fotorreceptores presentes en el cuádruple mutante como las fototropinas o los phyC/D/E podrían ser los canalizadores de esta señal lumínica que genera cambios en la fosforilación de las proteínas. Las fototropinas son capaces de autofosforilarse y actuar como quinasas de otras proteínas luego de 15 minutos de exposición a la luz azul (Takemiya *et al.*, 2013; Suetsugu & Wada, 2013; Briggs & Christie, 2002). Teniendo en cuenta que las fototropinas se encuentran asociadas a la membrana plasmática y a la membrana de cloroplastos, la señal podría indirectamente modificar el estado de fosforilación de SC35

(se localiza en el núcleo). Recientemente se encontró que en mutantes de la quinasa SRPKII (SR protein specific kinases) los niveles de fosforilación de SC35 se encuentran disminuidos, dentro de los cuales se encuentran la Ser 251, 253 y 256 (Wang *et al.*, 2023). Además, luego demostraron que SRPKII puede fosforilar a SC35 directamente. Es decir que, SRPKIII controlaría la fosforilación de SC35 al menos en plantas adultas. Hasta la fecha no se conoce si la luz afecta la actividad de esta quinasa.

Dado que no había evidencia sobre las funciones de SC35 ni de las proteínas eIF4A1 y eIF4A2 durante la escotomorfogénesis decidimos realizar un estudio más detallado en este estadio. Es importante mencionar que nuestro objetivo original también incluía el estudio de las posibles funciones de las fosforilaciones. Sin embargo, debido a que mi beca de doctorado fue de 4 años y a los efectos de la pandemia, no pude obtener todas las versiones fosfomiméticas y fosfonulas necesarias para llevar a cabo estos estudios.

Inicialmente, realizamos un análisis *in silico* que reveló la presencia del transcripto (Figura 8), la proteína (Figura 9) y una isoforma fosforilada de SC35 en plántulas etioladas (Figura 10). Además, mostramos que las proteínas de splicing estaban específicamente sobrerrepresentadas en el tejido etiolado, dentro de las cuales se encontró SC35 (Arico *et al.*, 2021). La presencia del transcripto en plantas etioladas fue confirmado mediante RTPCR, donde se amplificó la banda correspondiente a SC35 con el peso esperado (Figura 11). Para estudiar la función de SC35 optamos por un enfoque de sobreexpresión de proteínas, dado que SC35 pertenece a una familia altamente redundante en plantas. Al sobreexpresar SC35 bajo un promotor constitutivo, no observamos un efecto consistente en la longitud del hipocótilo ni en la apertura del gancho apical (Figura 12) en las tres líneas, las cuales son dos respuestas típicas durante la etiolación. Sin embargo, las dos líneas independientes que sobreexpresan SC35 junto con su secuencia reguladora 3'UTR exhibieron hipocótilos significativamente más cortos y ganchos apicales más cerrados en comparación con los controles (Figura 21). Cabe destacar que la línea p35S:SC35::YFP.3 mostró fenotipos en el largo del hipocotilo y la apertura del gancho apical (Figura 12) en línea con aquellos observados cuando se adiciona la secuencia reguladora 3' UTR (Figura 21). Este efecto solo se observó en una línea específica lo que sugiere, en principio, que sería debido a la inserción del transgen en esa línea. Como alternativa, la línea 3 podría

haber alcanzado un umbral particular de expresión para generar el efecto. Aunque los datos de expresión de SC35 mediante fluorescencia en la línea 3 no fueron diferentes a los de las otras dos líneas (Figura 17), sería necesario estudiar los niveles de la proteína SC35, por ejemplo, mediante *Western Blot*, para obtener una comprensión más completa. Nuestros resultados sugieren que la secuencia reguladora 3'UTR de SC35 podría desempeñar un papel crucial durante el desarrollo escotomorfogénico. En oscuridad SC35 sería un promotor de la inhibición del alargamiento del hipocotilo pero estaría involucrado en el mantenimiento del gancho apical más cerrado por lo cual no se clasificaría como una respuesta fotomorfogénica constitutiva. Estos resultados podrían ser el puntapié inicial para estudiar el rol de las proteínas de la familia SR durante la escotomorfogénesis ya que no existe evidencia previa sobre su rol y efecto en esta etapa del desarrollo de *Arabidopsis* ni de ninguna otra especie de planta. Por otro lado, el fenotipo de las plantas adultas también fue diferente en las plantas que sobreexpresan SC35 sin (Figura 14) o con la secuencia 3 UTR (Figura 23) cuando crecen en luz blanca continua.

La acumulación de SC35 en células de mamíferos conduce a la alteración del patrón de *splicing* alternativo y a la regulación negativa de los niveles de ARNm y la proteína (Sureau *et al.*, 2001). La autorregulación de la expresión de SC35 se lleva a cabo mediante la estimulación de eventos de *splicing* a través del NMD. Este proceso tiene un impacto en la región no traducida en el extremo 3' (3' UTR) del ARNm y en la estabilidad general del ARNm. La regulación por retroalimentación negativa de los factores de *splicing* parece ser un mecanismo de control común que regula los niveles de estos factores. Sin embargo, en el caso de las plantas, no se encuentran datos en la literatura que informen sobre esto, lo que hace que su estudio sea muy prometedor. La inclusión del extremo 3'UTR al locus completo de SC35 no generó cambios en la localización subcelular de la proteína ni en su capacidad de formar *speckles* (Figura 22), pero sí en los fenotipos tanto en luz como en oscuridad. La secuencia 3'UTR podría tener un impacto en la estabilidad o traducción del ARNm de SC35 y regular su expresión espacial y/o temporal durante el desarrollo que, a su vez, podría afectar los procesos de elongación del hipocótilo y, la apertura del gancho apical y desarrollo vegetativo.

En etapas del desarrollo más avanzadas nuestros resultados revelan que la sobreexpresión de la secuencia codificante de SC35 conduce a alteraciones en el crecimiento y desarrollo de las plantas. En particular, las tres líneas transgénicas que sobreexpresan SC35 mostraron una reducción en el tamaño de la roseta (Figura 15), y se observó una senescencia más temprana (Figuras 15 y 16). Los defectos pueden comenzar a observarse luego de 15-20 días post-germinación en condiciones de crecimiento de fotoperiodo largo o 33 días post germinación en fotoperiodo corto (Figura 16). Sin embargo, no todas las plantas transgénicas presentaron un fenotipo defectuoso (Tabla 1). Esta variabilidad fenotípica no se debió a que las plantas fueron heterocigotas para el transgén (Tabla 2), pero se correlacionó con los niveles de expresión del mismo (Figura 17). El mecanismo de retroalimentación negativa previamente descrito para SC35 en células de mamíferos podría explicar que algunas plantas de la misma línea transgénica p35S:SC35::YFP no presenten señal YFP (Sureau *et al.*, 2001). Alternativamente la falta de señal de YFP en algunas plantas de la misma línea transgénica p35S:SC35::YFP podría deberse a la variabilidad genética. Aunque se consideran genéticamente idénticas, podría existir variabilidad genética intrínseca en la población de plantas debido a mutaciones espontáneas o eventos de recombinación. Esto podría resultar en la pérdida de la expresión del gen de fusión SC35::YFP en algunas plantas.

Nuestros resultados indican que la sobreexpresión de SC35 puede tener efectos negativos en el crecimiento y desarrollo de las plantas. Esto podría deberse a la alteración en estas líneas en la regulación de los procesos de *splicing* alternativo del ARN de genes involucrados en la regulación del crecimiento y desarrollo de las plantas. Este fenotipo no se observó cuando se expresó SC35 junto a la secuencia 3'UTR ya que las plantas eran similares a las WT (Figura 23). Cuando se expresa SC35 junto con la secuencia 3' UTR, es posible que la presencia de esta secuencia influya en la estabilidad o la traducción del ARNm de SC35. Esto podría modular los efectos negativos de la sobreexpresión de SC35 en el crecimiento y desarrollo de las plantas, resultando en plantas similares al WT. Para el caso de la glutamina sintetasa de alfalfa la secuencia 3'UTR juega un rol en la represión del transcripto, acumulándose la proteína cuando su transgen está desprovisto de su secuencia 3'UTR (Ortega *et al.*, 2006). Los mecanismos exactos

detrás de las observaciones de SC35 y la secuencia 3'UTR requieren una investigación adicional.

Por otro lado, realizamos algunos ensayos para evaluar la resistencia a factores de estrés abiótico como el estrés salino y a baja y alta temperatura. Los resultados fenotípicos que obtuvimos con las líneas p35S:SC35::YFP no fueron significativamente distintos a las plantas WT. Como se expuso en la introducción los factores de *splicing* están involucrados en la regulación de diferentes tipos de estrés abiótico. Cabe mencionar que en esta tesis se realizaron experimentos en plántulas de hasta 7 días, tiempo insuficiente para revelar el fenotipo defectuoso. Si bien son resultados preliminares, algunas observaciones realizadas recientemente muestran que las líneas p35:35S::YFP no tienen señal de fluorescencia o solo estaría expresada en un órgano (un cotiledón, solo la raíz, etc) y con diferentes grados de intensidad. Es decir, que en el estadio del desarrollo en el que realizamos los experimentos, los efectos del mismo podrían estar enmascarados por la ausencia de expresión de SC35::YFP en algunas plantas. Sería interesante volver a realizar estos experimentos en plantas adultas cuyo fenotipo y señal de SC35::YFP pueda ser evaluada con anterioridad. Dado que la construcción del gen SC35 junto con su secuencia 3'UTR se obtuvo más tarde durante nuestra investigación no se logró alcanzar el objetivo de realizar estos ensayos para esas líneas que serán evaluadas en un futuro.

eIF4A es una DEAD *box helicase* de ARN que tiene un papel crucial en regular la iniciación de la traducción. Los resultados obtenidos en los experimentos realizados con las mutantes de *eif4a1* muestran que eIF4A1 estaría involucrada en la elongación del hipocotilo en oscuridad. Si bien los mutantes tienen un menor porcentaje de germinación luego de 16 horas de iniciado el pulso de luz, el hecho de que el porcentaje de germinación sea similar después de 24 horas indica que el mutante *eif4a1* es capaz de superar el retraso inicial y completar la germinación de manera similar a las plantas WT (Figura 26). A pesar de que la germinación fue exitosa, las plantas mutantes *eif4a1*, crecidas en oscuridad, alargan menos el hipocotilo en comparación con las plantas WT (Figura 25). Estos hallazgos sugieren que la disminución en el alargamiento del hipocotilo en el mutante *eif4a1* no se debe únicamente a un retraso en el proceso de germinación, sino

que también pueden estar involucrados otros mecanismos y regulaciones moleculares que afectan específicamente el crecimiento del hipocotilo en ausencia de la proteína eIF4A1. eIF4A1 es necesaria para el control del tamaño celular y su delección produce plantas con óvulos más pequeños y raíces más cortas así como plantas más pequeñas. El crecimiento del hipocotilo en oscuridad se debe principalmente al crecimiento celular por expansión de las células (Cosgrove, 1997), más que por división de las mismas. Las plantas mutantes en la subunidad alfa de la proteína G heterotrimérica de plantas (*gpa1*) son más petisas que el WT cuando crecen en oscuridad (Ullah *et al.*, 2006). Esto se debe a defectos en la proliferación celular, es decir, en la división celular. Los problemas en la proliferación celular pueden resultar en un menor número de células, lo que a su vez afecta el crecimiento y la longitud del hipocotilo en estas plantas mutantes. Para comprender mejor las causas precisas del efecto en el largo del hipocótilo por eIF4A, sería necesario llevar a cabo más ensayos. Estos ensayos podrían ayudar a distinguir si el impacto en la elongación del hipocótilo se debe a cambios en el tamaño individual de las células o a un retraso en el ciclo celular.

Se sabe que la CICLINA DEPENDIENTE DE QUINASA A (CDKA) fosforila a eIF4A1 y que la versión fosforilada de eIF4A1 (para la treonina 164) rescata el fenotipo de retraso del crecimiento de las raíces y rosetas de mutantes *elf4a1* mientras que la versión fosfomimética no complementa el fenotipo (Bush *et al.*, 2016). En este contexto sería interesante continuar con los experimentos de fosfomimética para los cambios en las fosforilaciones observadas (Figura 6).

Es interesante observar cómo, a pesar de la alta similitud proteica entre eIF4A1 y eIF4A2, los resultados de nuestra investigación sugieren que podrían tener funciones distintas, como la promoción del alargamiento del hipocotilo. Esto destaca la complejidad y la sutileza de los mecanismos moleculares de las plantas. A pesar de compartir una base estructural y de secuencia similar, es posible que estas dos proteínas tengan interacciones específicas con otros componentes celulares o estén reguladas de manera diferencial en ciertos contextos. Esto podría resultar en variaciones en sus funciones, incluso si sus roles generales están relacionados.

En conclusión, las proteínas que tienen un papel clave en el procesamiento y traducción del ARNm al ser mutadas o sobreexpresadas como en el caso de eIF4A1 y SC35,

respectivamente, afectan el crecimiento y desarrollo de las plantas. Aún resta saber qué genes son los que están siendo afectados por los cambios en la expresión de estas proteínas y cómo su fosforilación o desfosforilación modifica la activación de distintos procesos durante los eventos tempranos de desetiología y durante el desarrollo.

6. Referencias

Al-sady, B., Ni, W., Kircher, S., & Scha, E. (2006). *Photoactivated Phytochrome Induces Rapid*

PIF3 Phosphorylation Prior to Proteasome-Mediated Degradation Short Article. 2004, 439–446. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.06.011>

Andreou, A. Z., & Klostermeier, D. (2013). The DEAD-box helicase eIF4A: Paradigm or the odd one out? *RNA Biology*, 10(1), 19–32. <https://doi.org/10.4161/rna.21966>

Ang, L., Chattopadhyay, S., Wei, N., Oyama, T., Okada, K., Batschauer, A., & Deng, X. (1998). Molecular Interaction between COP1 and HY5 Defines a Regulatory Switch for Light Control of Arabidopsis Development. *Molecular Cell*, 1, 213–222.

Arico, D. S., Beati, P., Wengier, D. L., & Mazzella, M. A. (2021). A novel strategy to uncover specific GO terms / phosphorylation pathways in phosphoproteomic data in Arabidopsis thaliana. *BMC Plant Biology*, 1–13. <https://doi.org/10.1186/s1287002103377-9>

Armarego-Marriott, T., Kowalewska, Ł., Burgos, A., Fischer, A., Thiele, W., Erban, A., Strand, D., Kahlau, S., Hertle, A., Kopka, J., Walther, D., Reich, Z., Schöttler, M. A., & Bock, R. (2019). Highly resolved systems biology to dissect the etioplast-tochloroplast transition in tobacco leaves. *Plant Physiology*, 180(1), 654–681. <https://doi.org/10.1104/pp.18.01432>

Arsovski, A. A., Galstyan, A., Guseman, J. M., & Nemhauser, J. L. (2012). Photomorphogenesis. *American Society of Plant Biologists, The Arabidopsis Book*, 5. <https://doi.org/10.1199/tab.0147>

Banerjee, A. K., Lin, T., & Hannapel, D. J. (2009). Untranslated regions of a mobile transcript mediate RNA metabolism. *Plant Physiology*, 151(4), 1831–1843. <https://doi.org/10.1104/pp.109.144428>

Barta, A., Kalyna, M., & Reddy, A. S. N. (2010). Implementing a rational and consistent nomenclature for serine/arginine-rich protein splicing factors (SR proteins) in plants. *Plant Cell*, 22(9), 2926–2929. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.078352>

Bernardes, W. S., & Menossi, M. (2020). Plant 3' Regulatory Regions From mRNA Encoding Genes and Their Uses to Modulate Expression. *Frontiers in Plant Science*, 11(August),

- 1–20. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.01252>
- Bewley, J. D., Bradford, K. J., Hilhorst, H. W. M., & Nonogaki, H. (2013). Seeds: Physiology of development, germination and dormancy, 3rd edition. In *Seeds: Physiology of Development, Germination and Dormancy, 3rd Edition* (Vol. 9781461446). <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4693-4>
- Boyes, D. C., Zayed, A. M., Ascenzi, R., McCaskill, A. J., Hoffman, N. E., Davis, K. R., & Görlach, J. (2001). Growth stage-based phenotypic analysis of Arabidopsis: A model for high throughput functional genomics in plants. *Plant Cell*, *13*(7), 1499–1510. <https://doi.org/10.1105/tpc.13.7.1499>
- Briggs, W. R., & Christie, J. M. (2002). Phototropins 1 and 2: Versatile plant blue-light receptors. *Trends in Plant Science*, *7*(5), 204–210. [https://doi.org/10.1016/S13601385\(02\)02245-8](https://doi.org/10.1016/S13601385(02)02245-8)
- Browning, K. S. (2004). Plant translation initiation factors: It is not easy to be green. *Biochemical Society Transactions*, *32*(4), 589–591. <https://doi.org/10.1042/BST0320589>
- Browning, Karen S., & Bailey-Serres, J. (2015). Mechanism of Cytoplasmic mRNA Translation. *The Arabidopsis Book*, *13*, e0176. <https://doi.org/10.1199/tab.0176>
- Bruick, R. K., & Mayfield, S. P. (1999). *Light-activated translation of. 1385*(1998).
- Brzyżek, A. B., Brzyżek, G., Koter, M., Siedlecka, E., & Gawroński, P. (2022). Plastid retrograde regulation of miRNA expression in response to light stress. *BMC Plant Biology*, 1–15. <https://doi.org/10.1186/s12870-022-03525-9>
- Bush, M. S., Crowe, N., Zheng, T., & Doonan, J. H. (2015). The RNA helicase, eIF4A-1, is required for ovule development and cell size homeostasis in Arabidopsis. *Plant Journal*, *84*(5), 989–1004. <https://doi.org/10.1111/tpj.13062>
- Bush, M. S., Hutchins, A. P., Jones, A. M. E., Naldrett, M. J., Jarmolowski, A., Lloyd, C. W., & Doonan, J. H. (2009). Selective recruitment of proteins to 5' cap complexes during the growth cycle in Arabidopsis. *Plant Journal*, *59*(3), 400–412. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2009.03882.x>
- Bush, M. S., Pierrat, O., Nibau, C., Mikitova, V., Zheng, T., Corke, F. M. K., Vlachonassios, K., Mayberry, L. K., Browning, K. S., & Doonan, J. H. (2016). EIF4A RNA helicase associates with cyclin-dependent protein kinase A in proliferating cells and is

- modulated by phosphorylation. *Plant Physiology*, 172(1), 128–140. <https://doi.org/10.1104/pp.16.00435>
- Butt, H., Bazin, J., Prasad, K. V. S. K., Awad, N., Crespi, M., Reddy, A. S. N., & Mahfouz, M. M. (2022). The Rice Serine/Arginine Splicing Factor RS33 Regulates Pre-mRNA Splicing during Abiotic Stress Responses. *Cells*, 11(11). <https://doi.org/10.3390/cells11111796>
- Chaudhary, S., Jabre, I., Reddy, A. S. N., Staiger, D., & Syed, N. H. (2019). Perspective on Alternative Splicing and Proteome Complexity in Plants. *Trends in Plant Science*, 24(6), 496–506. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2019.02.006>
- Cheng, Y. L., & Tu, S. L. (2018). Alternative splicing and cross-talk with light signaling. *Plant and Cell Physiology*, 59(6), 1104–1110. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcy089>
- Chotewutmontri, P., & Barkan, A. (2020). Light-induced *psbA* translation in plants is triggered by photosystem II damage via an assembly-linked autoregulatory circuit. *PNAS*, 117(35), 21775–21784. <https://doi.org/10.1073/pnas.2007833117>
- Cosgrove, D. J. (1997). Relaxation in a high-stress environment: The molecular bases of extensible cell walls and cell enlargement. *Plant Cell*, 9(7), 1031–1041. <https://doi.org/10.1105/tpc.9.7.1031>
- D'amico-Damião, V., Cruz, F. J. R., Gavassi, M. A., Santos, D. M. M., Melo, H. C., & Carvalho, R. F. (2015). Photomorphogenic modulation of water stress in tomato (*Solanum lycopersicum* L.): The role of phytochromes A, B1, and B2. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 90(1), 25–30. <https://doi.org/10.1080/14620316.2015.11513149>
- De La Fuente Van Bentem, S., Anrather, D., Dohnal, I., Roitinger, E., Csaszar, E., Joore, J., Buijnink, J., Carreri, A., Forzani, C., Lorkovic, Z. J., Barta, A., Lecourieux, D., Verhounig, A., Jonak, C., & Hirt, H. (2008). Site-specific phosphorylation profiling of arabidopsis proteins by mass spectrometry and peptide chip analysis. *Journal of Proteome Research*, 7(6), 2458–2470. <https://doi.org/10.1021/pr8000173>
- Dobrikov, M. I., Shveygert, M., Brown, M. C., & Gromeier, M. (2014). Mitotic Phosphorylation of Eukaryotic Initiation Factor 4G1 (eIF4G1) at Ser1232 by Cdk1:Cyclin B Inhibits eIF4A Helicase Complex Binding with RNA. *Molecular and Cellular Biology*, 34(3), 439–451. <https://doi.org/10.1128/mcb.01046-13>

- Drechsel, G., Kahles, A., Kesarwani, A. K., Stauffer, E., Behr, J., Drewe, P., Rättsch, G., & Wachter, A. (2013). Nonsense-mediated decay of alternative precursor mRNA splicing variants is a major determinant of the Arabidopsis steady state transcriptome. *Plant Cell*, 25(10), 3726–3742. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.115485>
- Duek, P. D., Elmer, M. V., Oosten, V. R. Van, & Fankhauser, C. (2004). *The Degradation of HFR1 , a Putative bHLH Class Transcription Factor Involved in Light Signaling , Is Regulated by Phosphorylation and Requires COP1*. 14(Figure 2), 2296–2301. <https://doi.org/10.1016/j>
- Duque, P. (2011). A role for SR proteins in plant stress responses. *Plant Signaling & Behavior*, 6(1), 49–54. <https://doi.org/10.4161/psb.6.1.14063>
- Eberhard, S., Finazzi, G., & Wollman, F. A. (2008). The dynamics of photosynthesis. *Annual Review of Genetics*, 42, 463–515. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.42.110807.091452>
- Fankhauser, C., & Christie, J. M. (2015). Plant phototropic growth. *Current Biology*, 25(9), R384–R389. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.03.020>
- Fey, V., Wagner, R., Bra, K., Wirtz, M., Dietzmann, A., Leister, D., Oelmu, R., & Pfannschmidt, T. (2005). *Retrograde Plastid Redox Signals in the Expression of Nuclear Genes for Chloroplast Proteins of Arabidopsis thaliana * □ generate redox signals in the thylakoid membrane of*. 280(7), 5318–5328. <https://doi.org/10.1074/jbc.M406358200>
- Francis, C. (1970). Central Dogma of Molecular Biology. *Nature*, 227, 561–563.
- Gao, Z. F., Shen, Z., Chao, Q., Yan, Z., Ge, X. L., Lu, T., Zheng, H., Qian, C. R., & Wang, B. C. (2020). Large-scale Proteomic and Phosphoproteomic Analyses of Maize Seedling Leaves During De-etiolation. *Genomics, Proteomics and Bioinformatics*, 18(4), 397–414. <https://doi.org/10.1016/j.gpb.2020.12.004>
- Gavassi, M. A., Monteiro, C. C., Campos, M. L., Melo, H. C., & Carvalho, R. F. (2017). Phytochromes are key regulators of abiotic stress responses in tomato. *Scientia Horticulturae*, 222(January), 126–135. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.04.035>
- Geng, Y., Wu, R., Wee, C. W., Xie, F., Wei, X., Chan, P. M. Y., Tham, C., Duan, L., & Dinneny, J. R. (2013). A spatio-temporal understanding of growth regulation during the salt

- stress response in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 25(6), 2132–2154.
<https://doi.org/10.1105/tpc.113.112896>
- Gong, Z., Xiong, L., Shi, H., Yang, S., Herrera-Estrella, L. R., Xu, G., Chao, D. Y., Li, J., Wang, P. Y., Qin, F., Li, J., Ding, Y., Shi, Y., Wang, Y., Yang, Y., Guo, Y., & Zhu, J. K. (2020). Plant abiotic stress response and nutrient use efficiency. *Science China Life Sciences*, 63(5), 635–674. <https://doi.org/10.1007/s11427-020-1683-x>
- Gray, W. M., Östin, A., Sandberg, G., Romano, C. P., & Estelle, M. (1998). High temperature promotes auxin-mediated hypocotyl elongation in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(12), 7197–7202. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.12.7197>
- Griffin, J. H. C., & Toledo-ortiz, G. (2022). Plant photoreceptors and their signalling components in chloroplastic anterograde and retrograde communication. *Journal of Experimental Botany*, 73(21), 7126–7138.
- Gu, J., Ma, S., Zhang, Y., Wang, D., Cao, S., & Wang, Z. Y. (2020). Genome-wide identification of cassava serine/arginine-rich proteins: Insights into alternative splicing of Pre-mrnas and response to abiotic stress. *Plant and Cell Physiology*, 61(1), 178–191. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcz190>
- Han, C., & Yang, P. (2015). Studies on the molecular mechanisms of seed germination. *Proteomics*, 15(10), 1671–1679. <https://doi.org/10.1002/pmic.201400375>
- Hardtke, C. S., Gohda, K., Osterlund, M. T., Oyama, T., Okada, K., & Deng, X. W. (2000). HY5 stability and activity in *Arabidopsis* is regulated by phosphorylation in its COP1 binding domain. *EMBO Journal*, 19(18), 4997–5006.
<https://doi.org/10.1093/emboj/19.18.4997>
- Hartmann, L., Drewe-Boß, P., Wießner, T., Wagner, G., Geue, S., Lee, H. C., Obermüller, D. M., Kahles, A., Behr, J., Sinz, F. H., Rättsch, G., & Wachter, A. (2016). Alternative splicing substantially diversifies the transcriptome during early photomorphogenesis and correlates with the energy availability in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 28(11), 2715–2734. <https://doi.org/10.1105/tpc.16.00508>
- Hernández, G., & Vazquez-Pianzola, P. (2005). Functional diversity of the eukaryotic translation initiation factors belonging to eIF4 families. *Mechanisms of Development*, 122(7–8), 865–876. <https://doi.org/10.1016/j.mod.2005.04.002>

- Herz, M. A. G., Kubaczka, M. G., Swiezewski, S., Petrillo, E., & Kornblihtt, A. R. (2019). Light Regulates Plant Alternative Splicing through the Control of Transcriptional Elongation. *Molecular Cell*, *73*, 1066–1074. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.12.005>
- Hshin-Ping Wu, Yi-shin Su, Hsiu-Chen Chen, Yu-Rong Chen, Chia-Chen Wu, W.-D. L. and S.L. T. (2014). Genome-wide analysis of light-regulated alternative splicing mediated by photoreceptors in *Physcomitrella patens*. *Genome Biology*, *15*, 1–18. <https://doi.org/10.1104/pp.113.230540>
- Iida, K., & Go, M. (2006). Survey of conserved alternative splicing events of mRNAs encoding SR proteins in land plants. *Molecular Biology and Evolution*, *23*(5), 1085–1094. <https://doi.org/10.1093/molbev/msj118>
- Jin, H., Fu, M., Duan, Z., Duan, S., Li, M., Dong, X., Liu, B., Feng, D., Wang, J., Peng, L., & Wang, H. Bin. (2018). Low photosynthetic efficiency 1 is required for light-regulated photosystem II biogenesis in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *115*(26), E6075–E6084. <https://doi.org/10.1073/pnas.1807364115>
- Jin, X. (2022). Regulatory Network of Serine/Arginine-Rich (SR) Proteins: The Molecular Mechanism and Physiological Function in Plants. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(17). <https://doi.org/10.3390/ijms231710147>
- Jossier, M., Zivy, M., Hodges, M., Boex-fontvieille, E., & Tcherkez, G. (2013). Photosynthetic Control of *Arabidopsis* Leaf Cytoplasmic Translation Initiation by Protein Phosphorylation. *PLoS ONE*, *8*(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070692>
- Juntawong, P., & Bailey-Serres, J. (2012). Dynamic light regulation of translation status in *Arabidopsis thaliana*. *Frontiers in Plant Science*, *3*(APR), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fpls.2012.00066>
- Kalyana, M., Simpson, C. G., Syed, N. H., Lewandowska, D., Marquez, Y., Kusenda, B., Marshall, J., Fuller, J., Cardle, L., McNicol, J., Dinh, H. Q., Barta, A., & Brown, J. W. S. (2012). Alternative splicing and nonsense-mediated decay modulate expression of important regulatory genes in *Arabidopsis*. *Nucleic Acids Research*, *40*(6), 2454–2469. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr932>
- Kami, C., Lorrain, S., Hornitschek, P., & Fankhauser, C. (2010). Light-regulated plant growth and development. *Current Topics in Developmental Biology*, *91*(C), 29–66.

[https://doi.org/10.1016/S0070-2153\(10\)91002-8](https://doi.org/10.1016/S0070-2153(10)91002-8)

- Kelemen, O., Convertini, P., Zhang, Z., Wen, Y., Shen, M., Stamm, S., & Biochemistry, C. (2013). Function of Alternative splicing. *Gene*, 514(1), 1–30. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2012.07.083>.Function
- Kim, J., Song, H., Taylor, B. L., & Carre, I. A. (2003). *Light-regulated translation mediates gated induction of the Arabidopsis clock protein LHY*. 22(4), 935–944.
- Kim, S., & Kim, T. H. (2020). Alternative Splicing for Improving Abiotic Stress Tolerance and Agronomic Traits in Crop Plants. *Journal of Plant Biology*, 63(6), 409–420. <https://doi.org/10.1007/s12374-020-09282-2>
- Kirchhoff, H. (2019). Chloroplast ultrastructure in plants. *New Phytologist*, 223, 565–574. <https://doi.org/10.1111/nph.15730>
- Kircher, S., Kozma-bognar, L., Kim, L., Adam, E., Harter, K., & Schäfer, E. (1999). Light Quality – Dependent Nuclear Import of the Plant Photoreceptors Phytochrome A and B. *The Plant Cell*, 11(August), 1445–1456.
- Krainer, J. L. M. and A. R. (2010). Implementing a rational and consistent nomenclature for serine/arginine-rich protein splicing factors (SR proteins) in plants. *Plant Cell*, 22(9), 2926–2929. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.078352>
- Kruse, C. P. S., Basu, P., Luesse, D. R., & Wyatt, S. E. (2017). Transcriptome and proteome responses in RNAlater preserved tissue of Arabidopsis thaliana. *PLoS ONE*, 12(4), 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175943>
- Kubo, M., Udagawa, M., Nishikubo, N., Horiguchi, G., Yamaguchi, M., Ito, J., Mimura, T., Fukuda, H., & Demura, T. (2005). Transcription switches for protoxylem and metaxylem vessel formation. *Genes and Development*, 19, 1855–1860. <https://doi.org/10.1101/gad.1331305>.GENES
- Kumar, K., Sinha, S. K., Maity, U., Kirti, P. B., & Kumar, K. R. R. (2022). Insights into established and emerging roles of SR protein family in plants and animals. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, April, 1–30. <https://doi.org/10.1002/wrna.1763>
- Kwon, K. C., Verma, D., Jin, S., Singh, N. D., & Daniell, H. (2013). Release of Proteins from Intact Chloroplasts Induced by Reactive Oxygen Species during Biotic and Abiotic Stress. *PLoS ONE*, 8(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067106>

- Laloum, T., Carvalho, S. D., Martín, G., Richardson, D. N., Cruz, T. M. D., Carvalho, R. F., Stecca, K. L., Kinney, A. J., Zeidler, M., Barbosa, I. C. R., & Duque, P. (2021). The plant-specific SCL30a SR protein regulates ABA-dependent seed traits and salt stress tolerance during germination. *BioRxiv*, 2021.10.13.464208.
<http://biorxiv.org/content/early/2021/10/13/2021.10.13.464208.abstract>
- Laloum, T., Martín, G., & Duque, P. (2018). Alternative Splicing Control of Abiotic Stress Responses. *Trends in Plant Science*, 23(2), 140–150.
<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2017.09.019>
- Lee, J., He, K., Stolc, V., Lee, H., Figueroa, P., Gao, Y., Tongprasit, W., Zhao, H., Lee, I., & Deng, X. W. (2007). Analysis of Transcription Factor HY5 Genomic Binding Sites Revealed Its Hierarchical Role in Light Regulation of Development. *The Plant Cell*, 19(March), 731–749. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.047688>
- Li, Y., Guo, Q., Liu, P., Huang, J., Zhang, S., Yang, G., Wu, C., Zheng, C., & Yan, K. (2021). Dual roles of the serine/arginine-rich splicing factor SR45a in promoting and interacting with nuclear cap-binding complex to modulate the salt-stress response in Arabidopsis. *New Phytologist*, 230(2), 641–655.
<https://doi.org/10.1111/nph.17175>
- Li, Y., Yuan, W., Li, L., Miao, R., Dai, H., Zhang, J., & Xu, W. (2020). Light-Dark Modulates Root Hydrotropism Associated with Gravitropism by Involving Amyloplast Response in Arabidopsis. *Cell Reports*, 32(13), 108198.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108198>
- Ling, Y., Mahfouz, M. M., & Zhou, S. (2021). Pre-mRNA alternative splicing as a modulator for heat stress response in plants. *Trends in Plant Science*, 26(11), 1153–1170.
<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2021.07.008>
- Liu, B., Seong, K., Pang, S., Song, J., Gao, H., Wang, C., Zhai, J., Zhang, Y., Gao, S., Li, X., Qi, T., & Song, S. (2021). Functional specificity, diversity, and redundancy of Arabidopsis JAZ family repressors in jasmonate and COI1-regulated growth, development, and defense. *New Phytologist*, 231(4), 1525–1545. <https://doi.org/10.1111/nph.17477>
- Liu, M. J., Wu, S. H., Wu, J. F., Lin, W. D., Wu, Y. C., Tsai, T. Y., Tsai, H. L., & Wu, S. H. (2013). Translational landscape of photomorphogenic Arabidopsis. *Plant Cell*, 25(10), 3699–3710. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.114769>

- Lopato, S., Forstner, C., Kalyna, M., Hilscher, J., Langhammer, U., Indrapichate, K., Lorković, Z. J., & Barta, A. (2002). Network of interactions of a novel plant-specific Arg/Ser-rich protein, atRSZ33, with atSC35-like splicing factors. *Journal of Biological Chemistry*, 277(42), 39989–39998. <https://doi.org/10.1074/jbc.M206455200>
- Lopato, S., Kalyna, M., Dorner, S., Kobayashi, R., Krainer, A. R., & Barta, A. (1999). atSRp30, one of two SF2/ASF-like proteins from *Arabidopsis thaliana*, regulates splicing of specific plant genes. *Genes and Development*, 13(8), 987–1001. <https://doi.org/10.1101/gad.13.8.987>
- Ma, L., Gao, Y., Qu, L., Chen, Z., Li, J., & Zhao, H. (2002). Genomic Evidence for COP1 as a Repressor of Light-Regulated Gene Expression and Development in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 14(October), 2383–2398. <https://doi.org/10.1105/tpc.004416>
- Mansfield, S. G., & Briarty, L. G. (1996). AND COTYLEDON THE DYNAMICS OF SEEDLING IN ARABIDOPSIS DEVELOPMENT DURING RESERVE methods Material. *International Journal of Plant Science*, 157(3), 280–294.
- Maria Kalyna, Sergiy Lopato, and A. B. (2003). Ectopic Expression of atRSZ33 Reveals Its Function in Splicing and Causes Pleiotropic Changes in Development. *Molecular Biology of the Cell*, 14(September), 3565–3577. <https://doi.org/10.1091/mbc.E03>
- Marquez, Y., Brown, J. W. S., Simpson, C., Barta, A., & Kalyna, M. (2012). Transcriptome survey reveals increased complexity of the alternative splicing landscape in *Arabidopsis*. *Genome Research*, 22(6), 1184–1195. <https://doi.org/10.1101/gr.134106.111>
- Maruta, T., Noshi, M., Tanouchi, A., Tamoi, M., Yabuta, Y., Yoshimura, K., Ishikawa, T., & Shigeoka, S. (2012). H₂O₂-triggered retrograde signaling from chloroplasts to nucleus plays specific role in response to stress. *Journal of Biological Chemistry*, 287(15), 11717–11729. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.292847>
- Meinke, D. W., Cherry, J. M., Dean, C., Rounsley, S. D., & Koornneef, M. (1998). *Arabidopsis thaliana*: A model plant for genome analysis. *Science*, 282(5389). <https://doi.org/10.1126/science.282.5389.662>
- Melo, J. P., Kalyna, M., & Duque, P. (2020). Current Challenges in Studying Alternative Splicing in Plants: The Case of *Physcomitrella patens* SR Proteins. *Frontiers in Plant Science*, 11(March), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00286>
- Merchant, C., Stepanova, A. N., & Alonso, J. M. (2017). Translation regulation in plants:

- an interesting past, an exciting present and a promising future. *Plant Journal*, 90(4), 628–653. <https://doi.org/10.1111/tpj.13520>
- Modrek, B., & Lee, C. (2002). A genomic view of alternative splicing. *Nature Genetics*, 30(january), 13–19.
- N. P. Yurinaa, * and M. S. Odintsovaa. (2020). *Chloroplast Retrograde Signaling System*. July 2019. <https://doi.org/10.1134/S1021443719040149>
- Nielsen, P. J., & Trachsel, H. (1988). *The mouse protein synthesis initiation factor 4A gene family includes two related functional genes which are differentially expressed*. 7(7), 2097–2105.
- Ning, D., Liu, K. L. C., Qian, J. L. C., & Wang, Y. (2015). Large-scale comparative phosphoprotein analysis of maize seedling leaves during greening. *Planta*. <https://doi.org/10.1007/s00425-015-2420-3>
- Ortega, J. L., Moguel-Esponda, S., Potenza, C., Conklin, C. F., Quintana, A., & SenguptaGopalan, C. (2006). The 3' untranslated region of a soybean cytosolic glutamine synthetase (GS1) affects transcript stability and protein accumulation in transgenic alfalfa. *Plant Journal*, 45(5), 832–846. <https://doi.org/10.1111/j.1365313X.2005.02644.x>
- Osterlund, M. T., & Deng, X. (1998). Multiple photoreceptors mediate the light-induced reduction of GUS-COP1 from Arabidopsis hypocotyl nuclei. *The Plant Journal*, 16(May), 201–208.
- Osterlund, M. T., Hardtke, C. S., Wei, N., & Deng, X. W. (2000). Targeted destabilization of HY5 during light-regulated development of Arabidopsis. *Nature*, 405(May), 0–4.
- Paik, I., & Huq, E. (2019). Plant photoreceptors: Multi-functional sensory proteins and their signaling networks. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 92, 114–121. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2019.03.007>
- Paik, I., Yang, S., & Choi, G. (2012). Phytochrome regulates translation of mRNA in the cytosol. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(4), 1335–1340. <https://doi.org/10.1073/pnas.1109683109>
- Pérez-Martín, L., Busoms, S., Tolrà, R., & Poschenrieder, C. (2021). Transcriptomics reveals fast changes in salicylate and jasmonate signaling pathways in shoots of carbonatetolerant arabidopsis thaliana under bicarbonate exposure. *International Journal of*

- Molecular Sciences*, 22(3), 1–24. <https://doi.org/10.3390/ijms22031226>
- Petrillo, E., Godoy Herz, M. A., Fuchs, A., Reifer, D., Fuller, J., Yanovsky, M. J., Simpson, C., Brown, J. W. S., Barta, A., Kalyna, M., & Kornblihtt, A. R. (2014). A chloroplast retrograde signal regulates nuclear alternative splicing. *Science*, 344(6182), 427–430. <https://doi.org/10.1126/science.1250322>
- Pfeiffer, A., Shi, H., Tepperman, J. M., Zhang, Y., & Quail, P. H. (2014). Combinatorial complexity in a transcriptionally centered signaling hub in arabidopsis. *Molecular Plant*, 7(11), 1598–1618. <https://doi.org/10.1093/mp/ssu087>
- Podolec, R., & Ulm, R. (2018). Photoreceptor-mediated regulation of the COP1 / SPA E3 ubiquitin ligase. *Current Opinion in Plant Biology*, 45, 18–25. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2018.04.018>
- Reichel, M., Liao, Y., Rettel, M., Ragan, C., Evers, M., Alleaume, A. M., Horos, R., Hentze, M. W., Preiss, T., & Millar, A. A. (2016). In planta determination of the mRNA-binding proteome of arabidopsis etiolated seedlings. *Plant Cell*, 28(10), 2435–2452. <https://doi.org/10.1105/tpc.16.00562>
- Shen, H., Kan, J. L. C., & Green, M. R. (2004). Arginine-Serine-Rich Domains Bound at Splicing Enhancers Contact the Branchpoint to Promote Prespliceosome Assembly. *Molecular Cell*, 13(3), 367–376. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(04\)00025-5](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(04)00025-5)
- Shih, C. J., Chen, H. W., Hsieh, H. Y., Lai, Y. H., Chiu, F. Y., Chen, Y. R., & Tu, S. L. (2019). Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein h1 coordinates with phytochrome and the U1 snRNP complex to regulate alternative splicing in *Physcomitrella patens*. *Plant Cell*, 31(10), 2510–2524. <https://doi.org/10.1105/tpc.19.00314>
- Shikata, H., Hanada, K., Ushijima, T., Nakashima, M., Suzuki, Y., & Matsushita, T. (2014). Phytochrome controls alternative splicing to mediate light responses in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(52), 18781–18786. <https://doi.org/10.1073/pnas.1407147112>
- Shikata, H., Shibata, M., Ushijima, T., Nakashima, M., Kong, S. G., Matsuoka, K., Lin, C., & Matsushita, T. (2012). The RS domain of Arabidopsis splicing factor RRC1 is required for phytochrome B signal transduction. *Plant Journal*, 70(5), 727–738. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2012.04937.x>

- Spector, D. L., & Lamond, A. I. (2011). Nuclear Speckles. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3, 1–12.
- Stirbet, A., Lazár, D., Guo, Y., & Govindjee, G. (2020). Photosynthesis: Basics, history and modelling. *Annals of Botany*, 126(4), 511–537. <https://doi.org/10.1093/aob/mcz171>
- Suetsugu, N., & Wada, M. (2013). Evolution of three LOV blue light receptor families in green plants and photosynthetic stramenopiles: Phototropin, ZTL/FKF1/LKP2 and aureochrome. *Plant and Cell Physiology*, 54(1), 8–23. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcs165>
- Sugita, M., & Sugiura, M. (1996). Regulation of gene expression in chloroplasts of higher plants. *Plant Molecular Biology*, 32(1–2), 315–326. <https://doi.org/10.1007/BF00039388>
- Sullivan, J. A., & Deng, X. W. (2003). From seed to seed: The role of photoreceptors in Arabidopsis development. *Developmental Biology*, 260(2), 289–297. [https://doi.org/10.1016/S0012-1606\(03\)00212-4](https://doi.org/10.1016/S0012-1606(03)00212-4)
- Sun, A. Z., & Guo, F. Q. (2016). Chloroplast retrograde regulation of heat stress responses in plants. *Frontiers in Plant Science*, 7(MAR2016), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00398>
- Sun, S., Zhang, Z., Sinha, R., Karni, R., & Krainer, A. R. (2010). SF2/ASF autoregulation involves multiple layers of post-transcriptional and translational control. *Nature Structural and Molecular Biology*, 17(3), 306–312. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1750>
- Sureau, A., Gattoni, R., Dooghe, Y., Stévenin, J., & Soret, J. (2001). SC35 autoregulates its expression by promoting splicing events that destabilize its mRNAs. *EMBO Journal*, 20(7), 1785–1796. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.7.1785>
- Tabeta, H., Higashi, Y., Okazaki, Y., Toyooka, K., Wakazaki, M., Sato, M., Saito, K., Hirai, M. Y., & Ferjani, A. (2022). Skotomorphogenesis exploits threonine to promote hypocotyl elongation. *Quantitative Plant Biology*, 3, 1–12. <https://doi.org/10.1017/qpb.2022.19>
- Takemiya, A., Sugiyama, N., Fujimoto, H., Tsutsumi, T., Yamauchi, S., Hiyama, A., Tada, Y., Christie, J. M., & Shimazaki, K. I. (2013). Phosphorylation of BLUS1 kinase by phototropins is a primary step in stomatal opening. *Nature Communications*, 4(May). <https://doi.org/10.1038/ncomms3094>

- Tanabe, N., Yoshimura, K., Kimura, A., Yabuta, Y., & Shigeoka, S. (2007). Differential expression of alternatively spliced mRNAs of Arabidopsis SR protein homologs, atSR30 and atSR45a, in response to environmental stress. *Plant and Cell Physiology*, *48*(7), 1036–1049. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcm069>
- Tepperman, J. M., Hudson, M. E., Khanna, R., Zhu, T., Chang, S. H., & Wang, X. (2004). Expression profiling of phyB mutant demonstrates substantial contribution of other phytochromes to red-light-regulated gene expression during seedling de-etiolation. *The Plant Journal*, *38*, 725–739. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2004.02084.x>
- Tepperman, J. M., Zhu, T., Chang, H., Wang, X., & Quail, P. H. (2001). Multiple transcriptionfactor genes are early targets of phytochrome A signaling. *PNAS*, *98*(16), 0–5. <https://doi.org/10.1073/pnas.161300998>
- Toledo-Ortiz, G., Johansson, H., Lee, K. P., Bou-Torrent, J., Stewart, K., Steel, G., RodríguezConcepción, M., & Halliday, K. J. (2014). The HY5-PIF Regulatory Module Coordinates Light and Temperature Control of Photosynthetic Gene Transcription. *PLoS Genetics*, *10*(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004416>
- Ullah, H., Chen, J., & Young, J. C. (2006). Modulation of Cell Proliferation by Heterotrimeric G Protein in Arabidopsis Modulation of Cell Proliferation by Heterotrimeric G Protein in Arabidopsis. *Science*, *2066*(2001), 2066–2070.
- Van Santen, V. L., & Spritz, R. A. (1987). Splicing of plant pre-mRNAs in animal systems and vice versa. *Gene*, *56*(2–3), 253–265. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(87\)90142-9](https://doi.org/10.1016/0378-1119(87)90142-9)
- Vandenbussche, F., Verbelen, J. P., & Van Der Straeten, D. (2005). Of light and length: Regulation of hypocotyl growth in Arabidopsis. *BioEssays*, *27*(3), 275–284. <https://doi.org/10.1002/bies.20199>
- Wang, P., Abid, M. A., Qanmber, G., Askari, M., Zhou, L., Song, Y., Liang, C., Meng, Z., Malik, W., Wei, Y., Wang, Y., Cheng, H., & Zhang, R. (2022). Photomorphogenesis in plants: The central role of phytochrome interacting factors (PIFs). *Environmental and Experimental Botany*, *194*(July 2021). <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2021.104704>

- Wang, T., Wang, X., Wang, H., Yu, C., Xiao, C., Zhao, Y., Han, H., Zhao, S., Shao, Q., Zhu, J., Zhao, Y., Wang, P., & Ma, C. (2023). Arabidopsis SRPKII family proteins regulate flowering via phosphorylation of SR proteins and effects on gene expression and alternative splicing. *New Phytologist*, 238(5), 1889–1907. <https://doi.org/10.1111/nph.18895>
- Webster, C., Gaut, R. L., Browning, K. S., Ravelli, J. M., & Roberts, J. K. M. (1991). Hypoxia Enhances Phosphorylation of Eukaryotic Initiation Factor 4A in Maize Root Tips *. *The Journal of Biological Chemistry*, 266(34), 2–7. [https://doi.org/10.1016/S00219258\(18\)54502-6](https://doi.org/10.1016/S00219258(18)54502-6)
- Wiebauer, K., Herrero, J. J., & Filipowicz, W. (1988). Nuclear pre-mRNA processing in plants: distinct modes of 3'-splice-site selection in plants and animals. *Molecular and Cellular Biology*, 8(5), 2042–2051. <https://doi.org/10.1128/mcb.8.5.2042>
- Wilhelm, M., Schlegl, J., Hahne, H., Gholami, A. M., Lieberenz, M., Savitski, M. M., Ziegler, E., Butzmann, L., Gessulat, S., Marx, H., Mathieson, T., Lemeer, S., Schnatbaum, K., Reimer, U., Wunsch, H., Mollenhauer, M., Slotta-huspenina, J., Boese, J., Bantscheff, M., ... Kuster, B. (2014). Mass-spectrometry-based draft of the human proteome. *Nature*, 509(7502), 582–587. <https://doi.org/10.1038/nature13319>
- Wu, H., Sun, S., Tu, K., Gao, Y., Xie, B., Krainer, A. R., & Zhu, J. (2010). A Splicing-Independent Function of SF2/ASF in MicroRNA Processing. *Molecular Cell*, 38(1), 67–77. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.02.021>
- Xin, R., Zhu, L., Salomé, P. A., Mancini, E., Marshall, C. M., Harmon, F. G., Yanovsky, M. J., Weigel, D., & Huq, E. (2017). SPF45-related splicing factor for phytochrome signaling promotes photomorphogenesis by regulating pre-mRNA splicing in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(33), E7018–E7027. <https://doi.org/10.1073/pnas.1706379114>
- Yan, K., Liu, P., Wu, C. A., Yang, G. D., Xu, R., Guo, Q. H., Huang, J. G., & Zheng, C. C. (2012). Stress-Induced Alternative Splicing Provides a Mechanism for the Regulation of

- MicroRNA Processing in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Cell*, 48(4), 521–531.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.08.032>
- Yan, Q., Xia, X., Sun, Z., & Fang, Y. (2017). Depletion of *Arabidopsis* SC35 and SC35-like serine/arginine-rich proteins affects the transcription and splicing of a subset of genes. *PLoS Genetics*, 13(3), 1–29. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006663>
- Yang, X., Jia, Z., Pu, Q., Tian, Y., & Zhu, F. (2022). ABA Mediates Plant Development and Abiotic Stress via Alternative Splicing. *International Journal of Molecular Sciences*, 23, 3796.
- Yoon, E. K., Krishnamurthy, P., Kim, J. A., Jeong, M. J., & Lee, S. I. (2018). Genome-wide Characterization of *Brassica rapa* Genes Encoding Serine/arginine-rich Proteins: Expression and Alternative Splicing Events by Abiotic Stresses. *Journal of Plant Biology*, 61(4), 198–209. <https://doi.org/10.1007/s12374-017-0391-6>
- Yuda Fang, Stephen Hearn, and D. L. S. (2004). Tissue-specific Expression and Dynamic Organization of SR Splicing Factors in *Arabidopsis*. *Mol Biol Cell*, 15(June), 2664–2673. <https://doi.org/10.1091/mbc.E04>
- Zander, M., Lewsey, M. G., Clark, N. M., Yin, L., Bartlett, A., Saldierna Guzmán, J. P., Hann, E., Langford, A. E., Jow, B., Wise, A., Nery, J. R., Chen, H., Bar-Joseph, Z., Walley, J. W., Solano, R., & Ecker, J. R. (2020). Integrated multi-omics framework of the plant response to jasmonic acid. *Nature Plants*, 6(3), 290–302. <https://doi.org/10.1038/s41477-020-0605-7>
- Zhang, D., Chen, M. X., Zhu, F. Y., Zhang, J., & Liu, Y. G. (2020). Emerging Functions of Plant Serine/Arginine-Rich (SR) Proteins: Lessons from Animals. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 39(2), 173–194. <https://doi.org/10.1080/07352689.2020.1770942>
- Zhang, H., Lin, C., & Gu, L. (2017). Light Regulation of Alternative Pre-mRNA Splicing in Plants †. *Photochemistry and Photobiology*, 93(12), 159–165. <https://doi.org/10.1111/php.12680>
- Zhao, C., Wang, Y., Chan, K. X., Marchant, D. B., Franks, P. J., Randall, D., Tee, E. E., Chen, G., Ramesh, S., Phua, S. Y., Zhang, B., Hills, A., Dai, F., Xue, D., Gilliham, M., Tyerman, S., Nevo, E., Wu, F., Zhang, G., ... Chen, Z. H. (2019). Evolution of chloroplast retrograde signaling facilitates green plant adaptation to land. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(11), 5015–5020. <https://doi.org/10.1073/pnas.1812092116>

Anexo

<i>Primer</i>	Nro	Uso	Secuencia 5'-3'
SC35_Fwd	1	Amplif. c/sitio NotI	ATATGCGGCCCGCCATGTGCACTTCGGA AGGTC
SC35_Rev	2	Amplif. c/sitio Ascl	ATATGGCGCGCCTTTCCTGCAAACAAAA TGTAAC
SC35+3'UTR_Rev	3	Amplif. c/sitio Ascl	ATATGGCGCGCCTGGTAAAGGAAGAGA CTTCA
RT-SC35_Fwd	4	RT-PCR	GACTACCGGAAGCGGAGCAGG
RT-SC35_Rev	5	RT-PCR	CCTTTTGCAAAGCAGGGCTTC
SC35_seq1	6	Secuenciación	CCGTTTCCGTTATTTGTGCAATTGG

SC35_seq2	7	Secuenciación	CAGCCTCAGCCCAAGAAGCCCT
YFP N_seq	8	Secuenciación	GCTGACCCTGAAGTTCATCTGC
YFP-Fwd_seq	9	Secuenciación	CGAGGTGAAGTTCGAGGGCGAC
SALK_033824_LP	10	Genotipificación	GGCTTCTTCTGGGACTACGAC
SALK_033824_RP	11	Genotipificación	TGTGTCTTCGTCAAGGGGTAC
SALK_201518_LP	12	Genotipificación	TGACTCGGAATCATTGAATCC
SALK_201518_RP	13	Genotipificación	CAAGGAAGTTCATGAGCAAGC
SALK_051038_LP	14	Genotipificación	TGGTAGAAGAAAGAGGGGAATG
SALK_051038_RP	15	Genotipificación	AGCTTCTCCCACCAAAGATTC
LBb1.3	16	Genotipificación	ATTTTGCCGATTCGGAAC
Lba1	17	Genotipificación	TGGTTCACGTAGTGGGCCATCG
eIF4a2_Fwd	18	Amplif. c/sitio NotI	ATATGCGGCCGCAATGGCAGGATCCGC ACCGGA

eIF4a2_Rev	19	Amplif. c/sitio AscI	ATATGGCGCGCCACAGCAAATCAGCCAC GTTTG
------------	----	----------------------	---------------------------------------

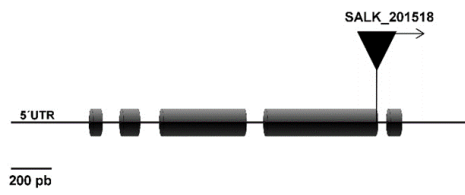
TablaA1.- Oligonucleótidos utilizados en esta tesis.

Vector	Resistencia en bacteria	Resistencia en planta
pENTR-D-TOPO	Kanamicina 50 mg/l	No corresponde
pH35GY	Espectinomicina 100 mg/l	Hygromicina 50 mg/l
pH35YG	Espectinomicina 100 mg/l	Hygromicina 50 mg/l
pH35GS	Espectinomicina 100 mg/l	Hygromicina 50 mg/l

Tabla A2.- Detalle de antibióticos usados.

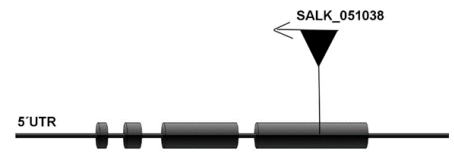
A

Salk_201518C: *eif4a1*



B

Salk_051038: *eif4a2*



C

Salk_124563: *sc35*

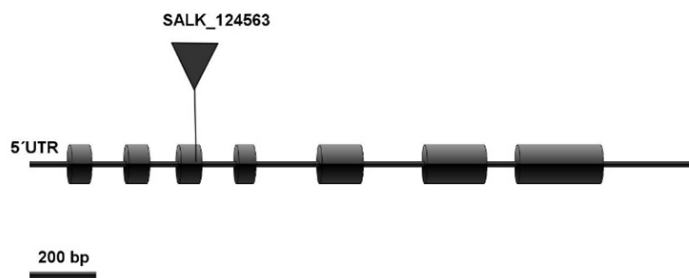


Figura 27.- Representación gráfica de las mutantes insercionales de *eif4a1*, *eif4a2* y *sc35* de tipo SALK. Posición del t-ADN en la secuencia de los genes de *eIF4A1* (A), *eIF4A2* (B) y *SC35* (C).